

# 유세포 분석기를 이용한 치근단 병소의 임파구 조성 및 CYCLING CELL 분포에 관한 연구

서울대학교 치과대학 치과보존학교실

오태석 · 임성삼

## 목 차

- I. 서 론
- II. 실험재료 및 방법
- III. 실험결과
- IV. 총괄 및 고안
- V. 결 론
- 참고 문헌
- 사진 부도
- 영문 초록

## I. 서 론

치근단 병소는 일반적으로 치근단 육아종과 낭종으로 크게 분류되며, 감염된 근관으로부터 세균이나, 세균의 독소 및 부산물 그리고 약품에 의하여 변형된 치수조직이 근단공을 통하여 치근단 조직에 들어가 잠재성 항원으로 작용하여 발생하는 것으로 알려져 있다<sup>1-4)</sup>. 감염된 근관으로부터 치근단 조직으로 항원이 계속적으로 유입되면 정상조직은 파괴되고, 병변이 진행, 확대되는 과정에는 면역반응이 관여되는바, 그 기전을 규명하기 위하여 항원의 성상 및 면역세포의 존재와 그 역할에 대한 연구가 많이 진행되어져왔다. 임파구가 관여하는 면역반응은 두가지 형태로 구분되는데, 하나는 항체형성세포(Antibody-producing cell)의 전구

물질인 B임파구가 관여하는 체액성 면역반응(Humoral immune response)이고, 또 다른 하나는 T임파구와 그 분비물질인 림포킨(lymphokine)이 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 것이 아니라 함께 복합적으로 치근단 병소의 병인론에 관여하는 것으로 사료된다.

최근까지도 치근단 병소의 면역반응을 밝히기 위한 많은 연구가 있었는데, Sundqvist<sup>5)</sup>이 치근단 병소가 존재하는 근관의 거의 전부에서 세균을 검출하였고, Rosengren<sup>6)</sup>은 백서의 치수에서 Streptococcus mutans를 이용하여 치근단 병소를 유발시켰음을 보고하였으며, Kakehashi<sup>7)</sup>은 무균백서와 일반백서를 실험동물로 사용하여 치수를 노출시킨 후, 치근단 병소의 발생을 조사하여 무균백서에서는 dentin bridge가 그리고 일반백서에서는 치근단 병소가 형성됨을 관찰하고 구강내 존재하는 세균이 치근단 병소의 발생에 매우 밀접한 관계가 있음을 시사하였다. 또한 Okada<sup>8)</sup>은 말의 혈청을 토끼의 치수강에 주입한 후 치근단 병소가 발생하는 것을 관찰하였고, Pitts<sup>9)</sup>은 개를 이용하여 치근단 병소의 유발과

\*본 연구는 1991년도 서울대학교 병원 특진연구비의 일부보조로 이루어졌음.

Salmonella minnesota R-595 endotoxin의 관계를 연구하였으며, Torabinejad등<sup>10)</sup>은 KLH (Keyhole limpet hemocyanin)로 미리 감각한 고양이의 치수강에 KLH를 투여한 후 치근단 병소의 발생을 관찰하여 면역복합체 (immune complex)의 형성이 중요한 역할을 한다고 보고하였다. 그리고 Block등<sup>11-16)</sup>은 근관충전용 시멘트가 치수조직을 변형시켜 합텐 (hapten)으로 만든 후 치근단 병소를 야기시킨다고 보고하였으며, Stuart<sup>17)</sup>와 Campbell<sup>18)</sup>등은 근관충전용 시멘트가 경화상태일 경우에도 합텐으로 작용할 수 있다고 보고하였다.

한편, 치근단 병소에서 체액성 면역반응에 대한 연구도 면역글로불린 (Immunoglobulin), 면역글로불린-함유세포 (Immunoglobulin-containing cell) 그리고 보체 (complement) 등의 존재를 확인하고 면역글로불린의 생합성 여부를 통하여 활발히 진행되어 왔다<sup>19-23)</sup>. Toller와 Holborow<sup>24)</sup>는 면역형광법 (Immunofluorescence)을 이용하여 치근단 병소내에서 다수의 면역글로불린-함유세포의 존재를 확인하였고, Naidorf등<sup>25)</sup>은 면역전기영동법 (Immunoelectrophoresis) 및 단순방사선면역확산법 (Single radial immunodiffusion)을 사용하여 치근단 병소에서 IgG, IgA 및 IgM을 정량 분석하였고, Morse등<sup>26)</sup>은 사람의 치근단 병소에서 면역글로불린 생성세포의 존재를 확인하였고, Kuntz등<sup>27)</sup>은 치근단 병소에서 면역글로불린-함유세포와 보체의 존재를 확인하였으며, Jones와 Lally등<sup>28)</sup>은 치근단 병소에서 면역글로불린의 생합성을 자가방사기록법 (Autoradiography)으로 조사하였고, 또한 조<sup>29)</sup>는 PAP (peroxidase-antiperoxidase) 방법을 통하여 치근단 병소에서 IgG, IgA, IgM의 분포를 관찰하였고, Stern등<sup>20)</sup>은 치근단 육아종에서 직접 면역과산화효소법 (direct immunoperoxidase method)으로 면역글로불린의 존재를 밝혔으며, Torabinejad등<sup>30)</sup>도 치근단 병소에서 IgG, IgE, Kappa chain 및 Rhamda chain의 존재를 간접면역과산화효소법 (indirect immunoperoxidase method)을 통하여 규명하였고, 부<sup>31)</sup>는 면역조직화학적방법 (immunohisto-

chemical method)을 이용하여 인위적으로 백서에 치근단 병소를 유발시킨 후 면역글로불린의 분포에 관한 조사를 하였으며, 백<sup>32)</sup>은 백서의 치수 및 치근단 병소에서 면역글로불린 G 아강 (subclass) 분포에 관한 면역조직화학적 조사를 하였다.

이와 더불어 세포성 면역반응이 관여하는 T 림파구에 관한 연구도 단일클론항체 (monoclonal antibody)의 발달과 함께 활발히 진행되어왔다<sup>33-38)</sup>. Wamke와 Levy등<sup>39)</sup>은 Avidin-Biotin-horseradish peroxidase 방법을 사용하여 T세포와 B세포의 확인에 단일클론항체가 효과적임을 보고하였고, Skaug등<sup>40)</sup>은 치근단 육아종에서 anti-T림파구 항혈청과 면역형광염색법을 이용하여 T림파구를 관찰하였으며, 또한 Torabinejad등<sup>41)</sup>은 면역과산화효소법과 단일클론항체를 사용하여 만성 치근단 병소에서 B림파구와 T림파구의 분포를 정량적으로 관찰, 보고하였고, Cymerman등<sup>42)</sup>은 사람의 만성 치근단 병소에서 Avidin-Biotin-horseradish peroxidase 방법과 단일클론항체를 이용하여 T림파구 아군집을 연구하였으며, 오<sup>43)</sup>는 PAP방법과 단일클론항체를 사용한 면역조직화학적연구를 통하여 사람의 치근단 병소의 근관치료전과 후의 B림파구, T림파구 및 T림파구 아군집의 분포를 관찰, 보고하였다. 그리고 Piattelli등<sup>44)</sup>은 사람의 치근단 육아종에서 단일클론항체, 광학현미경과 전자현미경을 사용하여 T림파구, B림파구, 대식세포 그리고 활성화된 T림파구 (activated T lymphocyte)의 분포를 관찰하였다. Kopp등<sup>45)</sup>은 치근단 육아조직에서 면역학적 적격 (immunocompetent) T림파구, 단핵구세포 그리고 HLA-DR-determined 세포들을 단일클론항체와 면역조직화학적 alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase 방법을 사용하여 정량적으로 분석한 결과 거대세포가 제일 많았으며, 다음에 T림파구가 많았다고 발표하였으며, 또한 T림파구중 T helper/inducer 세포가 더 많았으며, 치근단 낭종에서는 면역학적 적격세포의 수가 증가하였고 그리고 활성화된 T림파구는 매우 적었다고 보고하였다. 또한

Lukic등<sup>46)</sup>은 20예의 치근단 육아종을 단일클론항체와 간접적면역형광법을 이용하여 관찰한 후 T임파구와 B임파구의 존재를 확인하고, 육아종 형성과정에서 T세포 아군집의 상대적 분포와 병리생리학적 중요성을 연구한 결과 단핵구세포의 침윤(mononuclear infiltration)이 광범위하게 있는 경우는 T세포가, 국소적으로 있는 경우는 B세포가 우세하게 관찰되었고, 또한 염증세포의 광범위한 침윤이 있는 경우와 상피가 관찰되는 육아종의 경우에는 CD8-positive세포가 많이보였으나, 국소적 침윤이 있는 경우에는 CD4-positive 세포가 우세하다고 보고하여 면역학적 적격세포의 서로 다른 아군집의 비율이 육아종과 낭종으로의 변환에 대한 병인론을 반영하는 것 같다고 보고하였다.

이상의 치근단 조직의 세포성분에 관한 현재까지의 지식들은 대부분 전통적인 조직학적, 생화학적 그리고 면역학적 방법을 통하여 얻어진 것들이다. 조직을 고정하고, 염색한 후 조직표본을 광학현미경으로 분석하면 세포의 구성과 구조 그리고 세포의 병리학적 변화등을 관찰할 수 있다. 그러나 이러한 모든 관찰들이 정적인 조직표본으로부터 얻어졌기 때문에 실제로 이 방법이 살아있는 조직의 세포적 역학(cellular dynamics)을 정확하게 보여주는지는 명확하지 않다. 더군다나 조직의 연속표본이 검사되더라도 조직의 일부분이 조작중에 소실되고, 부위마다 관찰되는 양상이 매우 다르므로 따라서 보정된 자료가 전체조직을 대표하지 못하는 경우가 있고 또한 더욱 심각한 문제는 조직을 고정하게되면 중요한 세포적 성질과 특성이 상당량 변화되는 것이다. 최근에는 단일클론항체, 형광색소화학(Fluorochrome chemistry) 및 세포화학염색(cytochemical staining)의 광복합한 만한 진보로 유세포 분석기(Flow cytometer)를 이용하여 세포구조와 기능을 빨리 분석하는 것이 가능해졌다. 이러한 기구를 사용하면 재래의 생화학적 현미경 방법에서는 불가능했던 세포의 특성에 관한 역학적, 정량적 정보를 얻을 수 있다. 즉 다른 세포형태의 구별이 가능하고, 표현형

(phenotype)이 다른 세포군집의 특성을 관찰할 수 있으며, 특별한 염색방법과 같이 사용하면 개개세포의 생화학적 특성을 정량적으로 분석할 수 있다. 더군다나 상당히 정확하고 민감하기 때문에 표본에서 매우 적게 나타나는 희귀세포의 존재를 감지할 수 있다. 그러나 고품조직의 분석을 할 경우에는 세포의 단일현탁액(single suspension)을 만들때 기계적, 효소적 방법을 동원해야만 하는 어려움이 있고 세밀한 조작이 필요한 단점도 있다<sup>47-54)</sup>.

본 연구에서는 치근단 병소의 병인론에 관여하는 면역학적 기전에 대한 더 많은 이해를 얻고자, 조직표본을 광학현미경으로 검색하여 사람의 만성 치근단 병소내의 염증세포의 구성비를 관찰하였고, 또한 조직의 역학적, 정량적 분석이 가능한 유세포 분석기와 단일클론항체를 이용하여 임파구의 분포 및 T임파구 아군집의 비율을 조사하였으며 그리고 핵산분석(DNA analysis)을 통하여 cycling cell의 분포를 관찰하여 다소의 지견을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

실험군으로는 1991년 4월부터 1992년 7월까지 서울대학교 치과대학병원, 서울중앙병원, 청아치과병원 그리고 일반치과의원에 내원한 환자중에서 32예의 치근단 병소를 선택하였으며, 그 중 25예는 임파구와 다른 염증세포의 연구실험에 사용하였고 나머지 7예는 핵산분석에 사용하였다. 대조군으로는 같은 기간동안 교정치료를 받기위하여 내원한 환자중 정상적인 매복지치를 선택하여, 발치 후 얻은 8예의 지치주위조직을 이용하였다. 이 선택과정에서 문진과 검사를 통하여 전신질환이 있는 환자들의 치근단 병소조직은 실험대상에서 제외하였다. 실험군으로 선택된 환자들의 연령분포는 13세부터 66세까지였고, 남녀분포는 남자가 14명, 여자가 18명이었으며, 임상적 증상과 발생부위, 성별, 연령 및 진단은 표 1과 같다.

**Table 1.** Clinical symptoms and diagnosis of experimented periapical lesions

Sample No.	Age/Sex	Location	Clinical symptoms					Clinical Dx.
			P.	D.	S.	F.	Pus.	
1	24/M	#42-31	+	-	+	-	-	Peria.cyst
2	34/M	#33	-	+	-	+	-	Peria.granuloma
3	36/F	#12-11	-	+	+	+	-	Peria.cyst
4	51/F	#17	-	-	-	+	-	Peria.granuloma
5	42/F	#47	-	+	-	-	-	Peria.granuloma
6	21/F	#12-11	+	-	+	-	-	Peria.cyst
7	51/F	#21-22	+	-	+	+	+	Peria.abscess
8	31/F	#17	-	-	-	-	-	Peria.granuloma
9	62/M	#21	-	+	+	-	-	Peria.cyst
10	34/M	#12-11	+	-	+	+	+	Peria.abscess
11	22/M	#41	-	+	-	-	-	Peria.granuloma
12	13/F	#31-32	-	+	-	+	+	Peria.cyst
13	33/M	#16	-	+	-	+	-	Peria.granuloma
14	28/F	#21-23	-	+	+	-	-	Peria.cyst
15	54/M	#16	-	-	-	-	-	Peria.granuloma
16	52/M	#27	-	+	-	-	-	Peria.granuloma
17	23/F	#36	-	-	-	+	-	Peria.granuloma
18	30/F	#45	-	+	+	-	-	Peria.cyst
19	42/F	#48	-	+	-	-	-	Peria.granuloma
20	39/M	#17	+	-	+	+	-	Peria.granuloma
21	22/F	#37	-	-	-	-	-	Peria.granuloma
22	66/F	#12-11	-	+	+	-	-	Peria.cyst
23	20/F	#46-45	-	+	-	+	+	Peria.granuloma
24	24/M	#36-37	-	-	-	+	-	Peria.granuloma
25	15/M	#13-11	+	-	+	-	-	Peria.cyst
26	27/F	#34-35	-	+	-	-	-	Peria.granuloma
27	34/M	#45	-	+	+	-	-	Peria.cyst
28	45/M	#26	-	-	-	-	-	Peria.granuloma
29	31/F	#41-32	-	-	+	+	+	Peria.abscess
30	37/F	#34	-	+	-	+	-	Peria.granuloma
31	54/M	#16	-	-	-	+	-	Peria.granuloma
32	22/F	#23	-	+	+	-	-	Peria.cyst

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

**2. 실험방법**

치근단 절제술과 발치를 통하여 얻은 조직은 즉시 두 부분으로 나누어서 큰 조직은 유세포 분석을 위하여 복합항생제 (penicillin+streptomycin)와 10% fetal calf serum이 포함되어 있는 RPMI 1640 medium에 저장시켰고, 남은 작은 조직은 광학현미경으로 검색하기 위하여 10% formalin용액에 고정시켰다.

**1) 병리조직학적 관찰**

모든 표본을 탈수과정을 거쳐 paraffin에 포매한 후 4-6 $\mu$ 의 박절표본을 제작하여 Hematoxylin-Eosin 중복염색을 시행한 후, 광학현미경으로 검색하여 치근단 병소조직의 조직병리학적 진단을 얻었으며, 염증세포의 종류별 구성비를 알아보기 위하여, 각각의 표본에서 임의로 정한 6-10개의 high power microfield( $\times 400$ )에서 측정된 수를 총계하여

다시 microfield수로 나누어 결정했다. 염증세포의 수를 측정하는 과정에서 정확성을 높이기 위하여 Stern등<sup>55)</sup>이 사용한 방법과 유사하게 Eyepiece square(Olympus, OCM 20.4m/m Square 10/10×10)를 이용하였다.

## 2) 유세포 분석

### 가. 조직의 처리과정

적출한 후 즉시 RPMI1640 medium에 저장시킨 실험조직을 소독된 칼과 가위를 이용하여 잘게(0.3-1.0mm<sup>3</sup>)자른 후 10ml의 멸균된 시험관에 옮겨서 5분동안 원침시켰다. 그 후에 위에 떠있는 상층액을 버리고 조직압착결정(tissue pellet)에 0.8% collagenase와 0.02% trypsin을 첨가하여 30분간 분산시켰다. 다음 단계로 이렇게 만들어진 세포현탁액(cell suspension)을 2-3회 medium으로 씻은 후 fetal calf serum과 sodium azide가 포함된 sterile PBS(phosphate-buffered saline)으로 세척하여 단일클론항체로 염색할 준비를 마쳤다.

### 나. 중복염색

각각의 단일클론항체 10 $\mu$ l를 세포현탁액과 잘 섞어 4°C 어두운 장소에서 30분간 반응시킨 후, PBS로 2회 세척하였다. 염색된 세포현탁액은 1% paraformaldehyde로 고정하고 5-W Innova Laser가 부착되어 있는 FACSCAN(Becton-Dickinson Co.) 유세포 분석기를 이용하여 형광으로 세포들을 분석하였으며, 그 결과는 four-quadrant cell analysis figure로 나타났다. 이 과정중 각각의 표본에서 1×10<sup>4</sup>개의 세포들이 분석되었다. 실험에 사용된 단일클론항체로는 T임파구와 B임파구의 중복염색을 위하여 monoclonal mouse antihuman CD3(DAKO-CD3, UCHT1)FITC-conjugated +CD19(DAKO-CD19, HD37)RPE-conjugated antibody를 사용하였고, T helper세포와 T suppressor/cytotoxic세포를 중복염색하는 시약으로는 monoclonal mouse antihuman CD4(DAKO-CD4, MT310)FITC-conjugated +CD8(DAKO-CD8, DK25)RPE-conjugated antibody를 사용하였다. 그리고 대조염색을 위

해서는 Mouse IgG1 FITC-conjugated + Mouse IgG1 RPE-conjugated antibody를 이용하였다.

### 다. 핵산분석

Collagenase/Trypsin으로 처리하여 얻은 세포 부유액을 nylon mesh로 거르고 4°C 1000 rpm으로 10분간 원침시켰다. 상층액을 버리고 media를 가하여 전체 부피가 1ml가 되도록 한 후, 세포수를 세어 1.25×10<sup>6</sup> 세포에 해당하는 양만큼 취하여 다시 원침하였다. 그 후에 상층액을 버리고 침전을 citrate buffer 100 $\mu$ l로 부유시켰다. 여기에 A용액(trypsin 15mg in stock solution 500ml)을 900 $\mu$ l 가하고 실온에서 10분간 방치하였다. 다음에 B용액(trypsin inhibitor 250mg+RNase 50mg in stock solution 500ml)을 750 $\mu$ l 가하고 10분간, 그리고 C용액(propidium iodide 250mg+spermine 580mg in stock solution 500ml, pH 7.6) 750 $\mu$ l를 가하고 10분간 실온에서 방치하였다. 다시 한번 nylon mesh로 거른 후, 빛을 차단한 채 얼음에 꽂아 보관하였으며 3시간내에 Coulter EPICS V 유세포 분석기로 핵산분석을 시행하였다.

## III. 실험결과

### 1. 병리조직학적 소견

대조군에서 Hematoxylin-Eosin 중복염색을 하여 광학현미경으로 관찰한 결과 정상적인 결체조직과 약간의 염증세포등이 관찰되었고 교원질과 혈관등은 정상적인 소견을 보였다. 실험군에서는 25예중 5예는 치근단 낭종으로 그리고 나머지 20예는 치근단 육아종으로 진단되었다. 또한 핵산분석을 시행한 7예중 3예는 치근단 낭종, 4예는 치근단 육아종으로 진단되었다. 치근단 낭종의 경우는 거의 대부분의 예에서 내강, 상피세포층 그리고 상피층 직하부의 결체조직층이 관찰되었고, 만성염증세포들의 침윤이 보였으나 각각의 예에서 임파구와 형질세포들의 침윤 정도와 분포등은 많은 차이가 있었으며, 주로 상피와 인접해 있는 결체조직에

거의 보편적인 염증세포의 침윤이 관찰되었다. 또한 육아조직과 신생혈관들도 다른 모습으로 관찰되었으나 상피로 둘러싸인 내강의 존재를 제외하고는 치근단 육아종과 유사한 조직소견을 보였다. 한편 치근단 육아종의 경우에는 염증세포들의 침윤이 활발하였고, 작은 혈관과 육아조직이 많이 발달되어 있었으며, 또한 미세한 교원조직잔사등이 자주 관찰되었으며, 임파구와 형질세포들의 침윤정도는 예에 따라 차이가 많았으나, 임파구들은 주로 결체조직 안의 관상으로 밀집된 형질세포들 사이에서 관찰되었다. 25예의 치근단 낭종과 치근단 육아종에

서 염증세포의 종류별 구성비는 표 2와 같다.

이들의 평균치를 조사해본 결과 치근단 낭종에서는 임파구가 41.8%, 형질세포가 19.0%, 대식세포가 30.3% 그리고 중성구가 8.8%로 나타났고(그림 1), 치근단 육아종의 경우에는 임파구가 42.1%, 형질세포가 15.9%, 대식세포가 33.8% 그리고 중성구가 8.2%로 조사되었다(그림 2). 그리고 치근단 낭종과 치근단 육아종간에 구성비를 비교, 관찰해본 결과 임파구와 중성구는 거의 차이가 없었고, 대식세포는 치근단 육아종에서 많았으며 형질세포는 치근단 낭종에서 많았다(그림 3).

**Table 2.** Composition of periapical inflammatory cells by total cell count

Sample Number	Total cells	Lymphocytes	Plasma cells	Macrophages	Neutrophils
<i>Periapical cyst</i>					
1	244	72(30%)	98(40%)	51(21%)	23( 9%)
2	119	40(34%)	22(18%)	48(40%)	9( 8%)
3	374	186(50%)	43(12%)	114(30%)	31( 8%)
4	446	216(48%)	62(14%)	128(29%)	40( 9%)
5	199	64(32%)	38(19%)	78(39%)	19(10%)
	1382	578(41.8%)	263(19.0%)	419(30.3%)	122(8.8%)
<i>Periapical granuloma</i>					
1	227	85(37%)	52(23%)	68(30%)	22(10%)
2	539	252(47%)	64(12%)	172(32%)	51( 9%)
3	129	44(34%)	12( 9%)	58(45%)	15(12%)
4	152	52(34%)	22(14%)	68(45%)	10( 7%)
5	236	78(33%)	41(17%)	96(41%)	21( 9%)
6	461	297(64%)	36( 8%)	95(21%)	33( 7%)
7	147	39(26%)	15(10%)	85(58%)	8( 6%)
8	298	62(21%)	116(38%)	96(32%)	24( 9%)
9	242	113(47%)	48(20%)	63(26%)	18( 7%)
10	244	54(22%)	94(38%)	84(35%)	12( 5%)
11	214	105(49%)	32(15%)	63(29%)	14( 7%)
12	295	144(49%)	28( 9%)	98(33%)	25( 9%)
13	152	72(47%)	13( 8%)	59(39%)	8( 6%)
14	303	165(54%)	26( 9%)	81(27%)	31(10%)
15	528	286(54%)	60(11%)	144(27%)	38( 8%)
16	221	62(28%)	41(18%)	78(36%)	40(18%)
17	193	54(28%)	33(17%)	91(47%)	15( 8%)
18	412	176(43%)	65(16%)	152(37%)	19( 4%)
19	224	71(32%)	39(17%)	94(42%)	20( 9%)
20	125	38(30%)	14(11%)	61(49%)	12(10%)
	5342	2249(42.1%)	851(15.9%)	1806(33.8%)	436(8.2%)

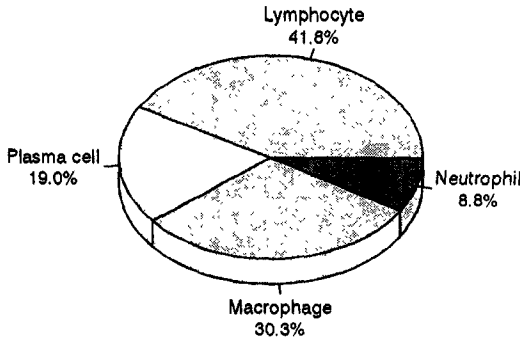


Fig. 1. Periapical Inflammatory Cells in Periapical cyst

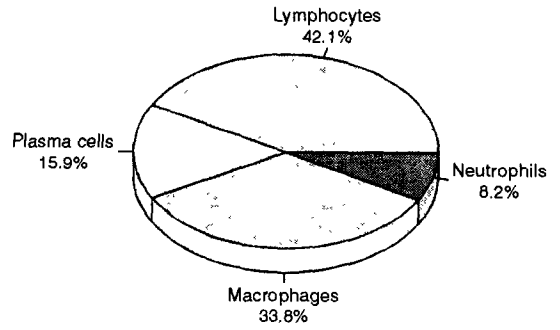


Fig. 2. Periapical Inflammatory Cells in Periapical granuloma

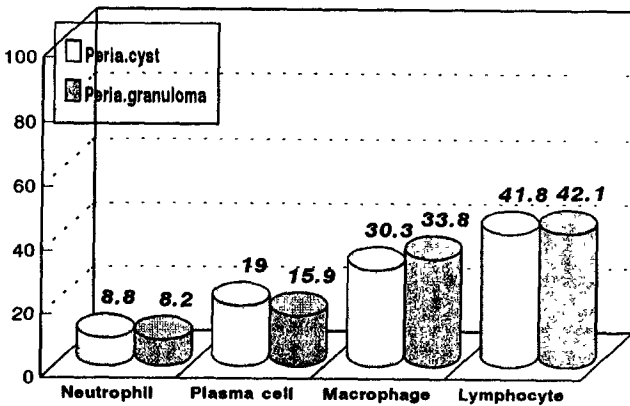


Fig. 3. Composition of Periapical Inflammatory Cells in periapical cyst and periapical granuloma

## 2. 유세포 분석

조직표본에 존재하는 세포들의 크기와 과립성 (granularity)을 확인하여 입파구의 영역에서 세포를 선택한 후 (gating) 먼저 세포의 비특이성 결합을 조사한 다음 표본에 존재하는 입파구의 정량적 분석을 좀 더 정확히 하기 위해 두단계의 즉, 먼저 T입파구와 B입파구에 관한 분석을 시행하고 다음에 T helper세포와 T suppressor/cytotoxic세포에 대한 유세포분석을 실시하였다. T입파구와 B입파구의 중복염색을 시행하여 입파구의 상대적 양을 조사해 본 결과 표 3에서 보는 바와 같이 실험군에서는 적게는 2.01%에서 많게는 70.47%, 대조군에서는 적게는 0.07%에서 많게는 0.78%로 평

균치가 대조군에서는 0.46%, 치근단 낭종에서는 21.24% 그리고 치근단 육아종에서는 12.44%로 관찰되었다(그림 4, 5, 6).

한편 대조군 4예와 실험군 25예에서 T입파구와 B입파구의 분포를 조사하여본 결과 대조군 4예중 2예에서는 T입파구만 보였고, 1예에서는 B입파구가 아주 극소량 그리고 T입파구가 매우 많이 관찰되었으며, 나머지 1예에서는 거의 비슷한 양으로 조사되었고(그림 7), 실험군에서는 대조군과는 달리 25예 모두에서 T입파구의 양이 많이 관찰되었다(그림 8, 9). 또한 대조군과 실험군사이에서 입파구의 분포를 비교 관찰한 결과, T입파구가 대조군에서는 89.25%, 실험군에서는 68.54%로 대조군에서 더 높은 비율을 차지하고 있었다(그림 10).

그리고 T입파구 아군집을 조사하기 위하여 T helper세포와 T suppressor/cytotoxic세포의 중복염색을 시행한 결과 대조군 4예중, 1예에서는 T suppressor/cytotoxic세포만이 관찰되었고, 1예에서는 같은 비율로, 다른 1예에서는 T helper세포가 4.8배, 그리고 나머지 1예에서는 T suppressor/cytotoxic세포가 2배로 다양하게 관찰되었다(그림 11). 한편 실험군의 경우에는 치근단 낭종으로 진단된 5예중, 4예에서 T suppressor/cytotoxic세포가 많이 발견되었고, 나머지 1예는 T helper세포가 약간 많은 것으로 관찰되었으나(그림 12), 치근단 육아종으로 진단된 20예 모두에서는 T helper세포가 우세하게 관찰되었다(그림 13). 또한 각군사이에 T입파구 아군집의 비율

**Table 3.** Composition of T & B lymphocyte and T lymphocyte subpopulation

	Sample No.	Relative conc. of lym.(×/10000)		B lymphocyte	T lymphocyte	T4 : TB
<i>Control group</i>	1	78	0.78%	0.00%	0.78%	T4(-)
	2	7	0.07%	0.00%	0.07%	2 : 1
	3	30	0.30%	0.12%	0.18%	1 : 1
	4	67	0.67%	0.02%	0.65%	4.8 : 1
	Average	(0.46%)		(0.04%)	(0.42%)	
<i>Periapical cyst</i>	1	832	8.32%	4.02%	4.30%	1 : 2.9
	2	567	5.67%	0.77%	4.90%	1 : 2.2
	3	2866	28.66%	4.75%	23.91%	1 : 1.4
	4	5485	54.85%	26.78%	28.07%	1 : 1.2
	5	868	8.68%	2.60%	6.08%	1.2 : 1
	Average	(21.24%)		(7.79%)	(13.45%)	
<i>Periapical granuloma</i>	1	560	5.60%	2.14%	3.46%	1.3 : 1
	2	3580	35.80%	5.78%	30.02%	2.5 : 1
	3	255	2.55%	0.37%	2.18%	2.2 : 1
	4	683	6.83%	1.33%	5.50%	1.8 : 1
	5	594	5.94%	2.62%	3.32%	6.1 : 1
	6	7047	70.47%	11.25%	59.22%	1.3 : 1
	7	293	2.93%	1.04%	1.89%	1.8 : 1
	8	743	7.43%	2.31%	5.12%	3.0 : 1
	9	655	6.55%	2.14%	4.41%	1:7 : 1
	10	216	2.16%	0.98%	1.18%	4.6 : 1
	11	1430	14.30%	4.60%	9.70%	1.2 : 1
	12	1510	15.10%	1.60%	13.50%	2.6 : 1
	13	598	5.98%	2.31%	3.67%	1.5 : 1
	14	790	7.90%	2.61%	5.29%	2.1 : 1
	15	3427	34.27%	14.27%	20.00%	1.5 : 1
	16	450	4.50%	1.20%	3.30%	2.1 : 1
	17	431	4.31%	1.21%	3.10%	1.5 : 1
	18	890	8.90%	3.50%	5.40%	1.9 : 1
	19	524	5.24%	2.38%	2.86%	3.2 : 1
	20	201	2.01%	0.81%	1.20%	1.8 : 1
	Average	(12.44%)		(3.22%)	(9.22%)	

을 비교, 관찰하여본 바 치근단 육아종에서는 T helper세포가 66.8%로, 치근단 낭종의 경우는 T suppressor/cytotoxic세포가 60.3%로 우세하였으며, 대조군에서는 거의 유사하게 관찰되었다(그림 14).

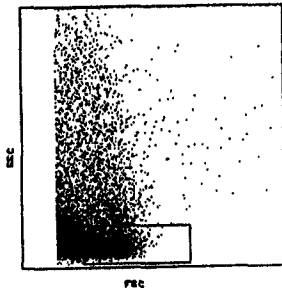
### 3. 핵산분석

치근단 조직의 세포들은 DNA양이 서로 다른 세포들로 구성되어 있으므로 핵산분석을 통

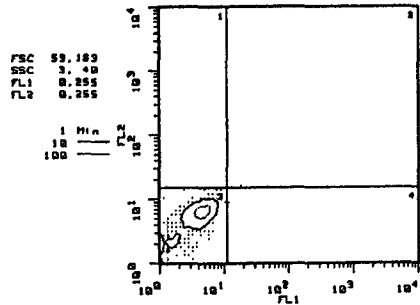
하여 조사해본 결과(그림 15) 대조군에서는 G0/G1기에 속한, 즉 이수체의 DNA양을 갖고 있는 세포가 93.4%-95.5%이고, S+G2/M기에 속한, 즉 이수체 이상의 DNA양을 갖고 있는 세포(중식지수)가 4.47%-6.6%로 나타났으며, 치근단 낭종의 경우는 G0/G1기에 속한 세포가 88.4%-91.4%이고, S+G2/M기에 속한 세포가 8.53%-11.55%로 나타났다. 한편 치근단 육아종의 경우는 G0/G1기에 속한 세포가 91.5%-95.4%이고, S+G2/M기에 속한 세포



Cytometer: FACSCAN  
 FL1 : N. CONTROL FL2:



Cytometer: FACSCAN  
 FL1 : N. CONTROL FL2:



Cytometer: FACSCAN  
 FL1 : T FL2: B



Cytometer: FACSCAN  
 FL1 : T4 FL2: T8

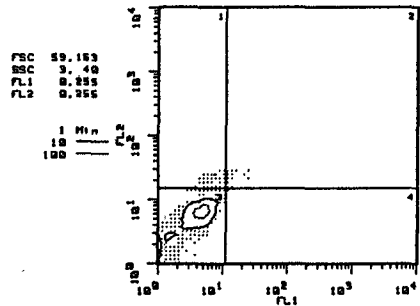
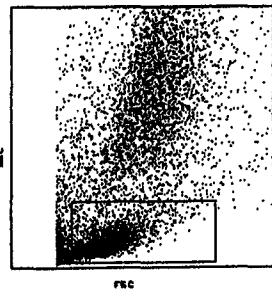
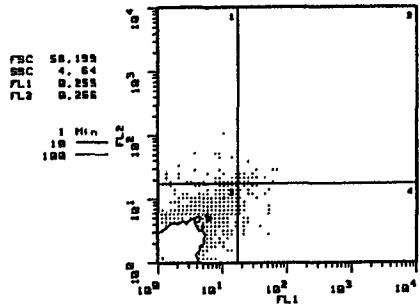


Fig. 4. Flow cytometric analysis in Control group

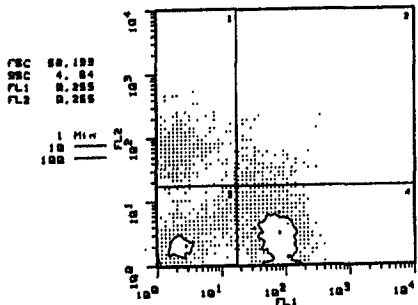
Cytometer: FACSCAN  
 FL1 : N. CONTROL FL2:



Cytometer: FACSCAN  
 FL1 : N. CONTROL FL2:



Cytometer: FACSCAN  
 FL1 : T FL2: B



Cytometer: FACSCAN  
 FL1 : T4 FL2: T8

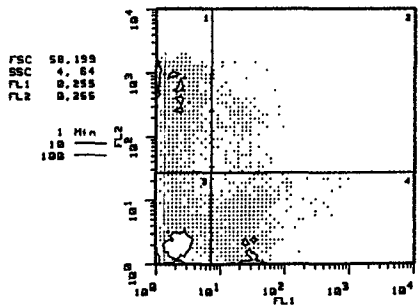


Fig. 5. Flow cytometric analysis in Periapical cyst

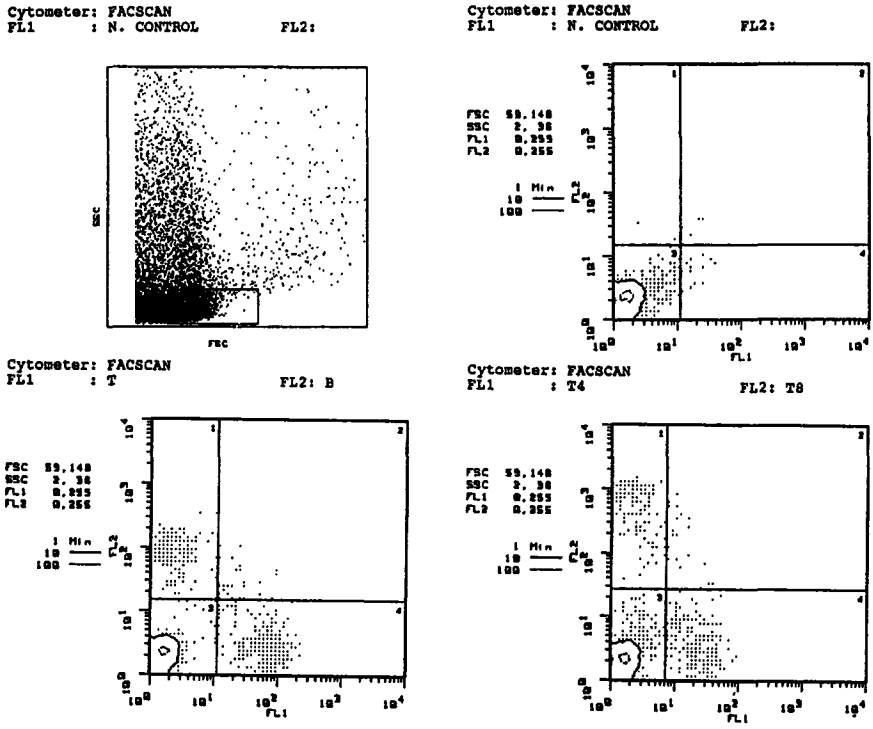


Fig. 6. Flow cytometric analysis in Periapical granuloma

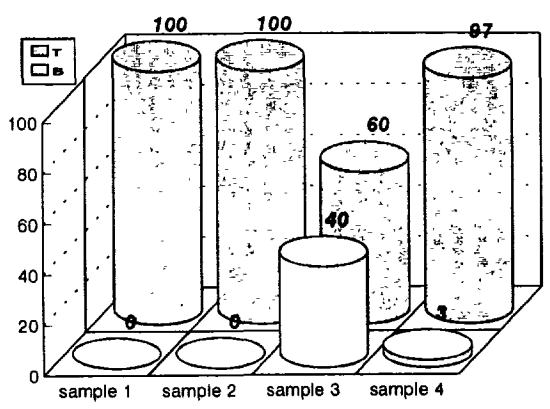


Fig. 7. Distribution of T & B Lymphocyte in Control group

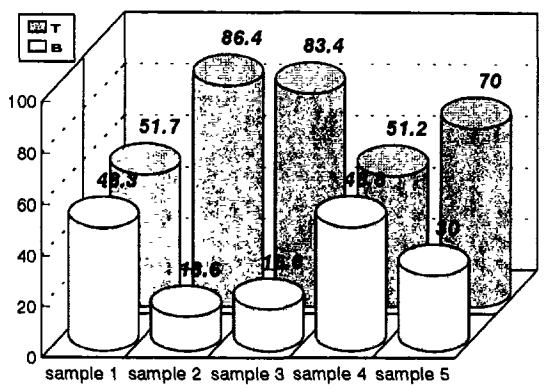


Fig. 8. Distribution of T & B Lymphocyte in Periapical cyst

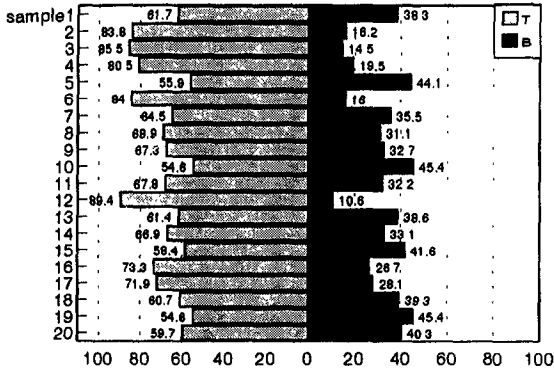


Fig. 9. Distribution of T & B Lymphocyte in Periapical granuloma

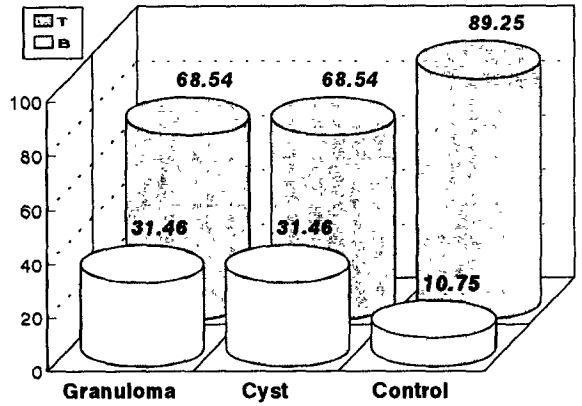


Fig. 10. Comparison of T & B Lymphocyte Distribution between experimental group and control group

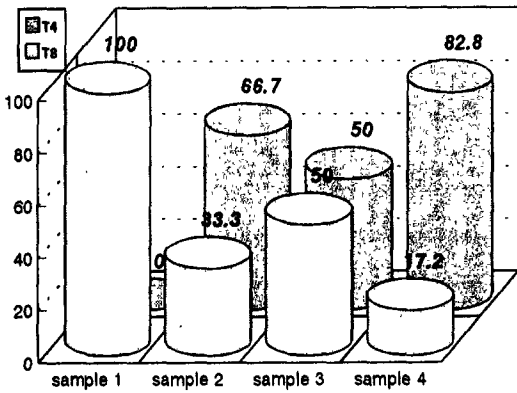


Fig. 11. Distribution of T4 & T8 cells in Control group

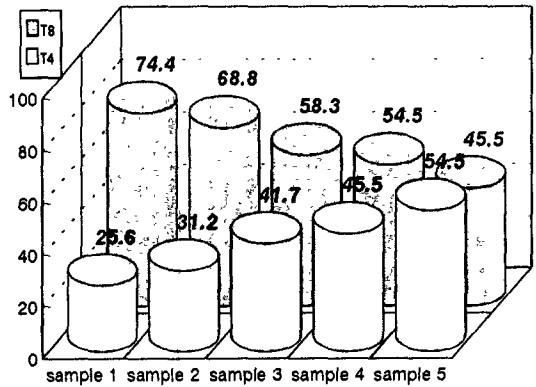


Fig. 12. Distribution of T4 & T8 cells in Periapical cyst

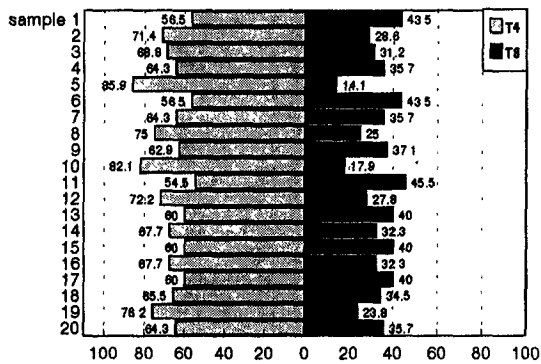


Fig. 13. Distribution of T4 & T8 cells in Periapical granuloma

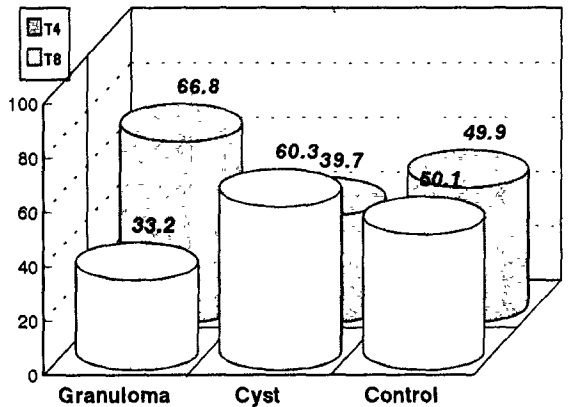


Fig. 14. Comparison of T4 & T8 cells Distribution between experimental group and control group

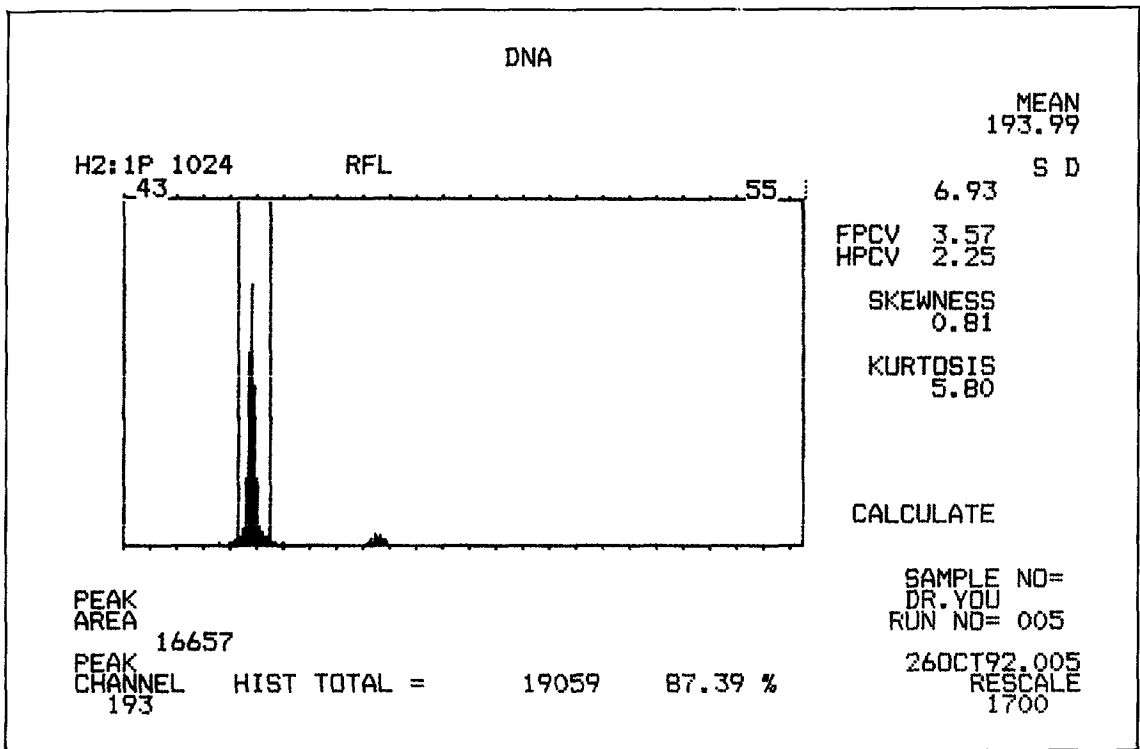


Fig. 15. Graph of DNA analysis

Table 4. Examination of cycling cell by DNA analysis

	Non-cycling phase		Cycling phase	
	G0+G1		S	G2+M
Control group				
1	95.5%		3.67%	0.8%
2	93.4%		4.10%	2.5%
3	95.1%		3.43%	1.5%
4	94.2%		4.46%	1.3%
Aver.	(94.6%)		(3.92%)	(1.53%)
Peria.cyst				
1	89.7%		4.64%	5.6%
2	91.4%		3.43%	5.1%
3	88.4%		4.85%	6.7%
Aver.	(89.8%)		(4.30%)	(5.8%)
Peria.granuloma				
1	93.7%		3.27%	3.0%
2	91.5%		6.55%	1.9%
3	92.7%		4.10%	3.2%
4	95.4%		2.65%	1.9%
Aver.	(93.3%)		(4.14%)	(2.5%)

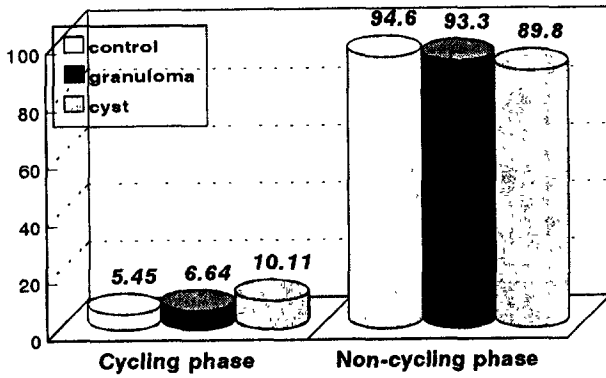


Fig. 16. DNA Analysis in control group and experimental group

가 4.55%-8.45%로 나타났다(표 4). 그리고 대조군 및 치근단 육아종과 치근단 낭종에서 증식지수(proliferating index)를 비교, 관찰해 본 결과 평균치는 5.45%-10.1%로 조사되었으며, 대조군, 치근단 육아종, 치근단 낭종의 순서로 조금씩 더 컸다(그림 16).

#### IV. 총괄 및 고안

일반적으로 치근단 병소는 치아우식증이나 치주염을 통한 세균감염과 치수괴사에 의한 이종단백이 항원으로 작용하여 면역반응을 일으켜 발생하는 것으로 사료되며, 치근단 병소에서는 형질세포, 임파구, 대식세포 및 중성구등의 염증세포들이 관찰되는 것으로 알려져있다. Piattelli등<sup>44)</sup>은 치근단 육아종에서 광학현미경, 전자현미경 그리고 단일클론항체를 이용하여 면역세포들을 조사해본 결과 대략적으로 T 임파구가 35%, B 임파구가 11% 그리고 대식세포가 42% 정도로 나타났다고 밝혔다. 또한 Stern등<sup>21)</sup>은 치근단 육아종을 정량분석한 결과, 관찰한 구성세포중 52%가 염증세포이고 이 중에서 임파구가 32%, 형질구가 13%, 중성구가 8% 그리고 대식세포가 47%로 구성된다고 보고하였으며, 또 다른 논문에서는 치근단 육아종의 세포부유액에서 염증세포를 분석한 결과 대식세포가 30%, 형질세포가 15%, 중성구가 12% 그리고 임파구가 44%라고 보고하였다.

Yu등<sup>56)</sup>은 백서의 치근단 병소에서 염증세포

는 모든 구성세포의 50%정도이며, 임파구가 50-60%로 가장 많았고, 다핵성 백혈구가 20-25%, 대식세포, 형질구, 미확인 아세포가 10-15%를 차지한다고 하였다. 그리고 Kopp 등<sup>40)</sup>은 치근단 병소에서 대식세포가 T 임파구보다 많이 관찰되었으며, 활성화된 T 임파구는 적은 것으로 보고하였다. 이와같이 많은 학자들의 연구에 의하여 치근단 병소에 출현되는 세포들은 단순히 염증시의 침윤세포가 아니라 항체생성과 관련이 있는 세포로 밝혀졌으며, 그래서 Burnett<sup>57)</sup>에 의하여 면역학적 적격세포(Immune competent cell-ICC)로 불리게 되었다. 본 연구에서도 치근단 병소에서 염증세포의 구성을 조사한 결과 치근단 낭종에서는 임파구가 41.8%, 대식세포가 30.3%, 형질세포가 19.0% 그리고 중성구가 8.8%로 나타났고, 치근단 육아종에서는 임파구가 42.1%, 대식세포가 33.8%, 형질세포가 15.9% 그리고 중성구가 8.2%로 관찰되어 Stern등<sup>21)</sup>이나 Yu 등<sup>56)</sup>의 보고와 거의 유사한 결과를 보였으나, Kontiainen등<sup>36)</sup>이 임파구는 51.7%, 형질세포는 2.1%, 중성구는 39.7% 그리고 대식세포는 3.6%라고 보고한 것과는 차이를 보였다. 또한 치근단 낭종과 치근단 육아종간에 임파구와 중성구는 비슷한 분포를 보였고, 형질세포는 치근단 낭종에서 그리고 대식세포는 치근단 육아종에서 조금 더 많은 분포를 보였지만, 두 군 사이에 염증세포의 구성비는 별 차이가 없었다.

치근단 병소의 생성, 지속 및 확대에 관여하는 면역학적 기전에서 임파구는 중요한 역할을 하며 그에 관한 연구가 활발히 진행되어왔다. Torabinejad등<sup>30)</sup>은 항원-항체 복합체와 IgE-mediated 반응이 치근단 조직에 일차적 변화를 야기시키고 그 후 치근단 병소의 지속과 확대에는 지연형 과민반응(delayed-type hypersensitivity)이 관여하는 것으로 보고하였고, Douglas등<sup>58)</sup>에 의하면 미리 감작된 임파구(sensitized lymphocytes)가 항원성 물질과 접촉하여 림포킨을 생성하고, 이 림포킨이 염증세포의 행동변화를 일으키고, 활성화시키며, 일정부위에 유지시킬 뿐 아니라 림프독소(lymphotoxin)를 생성하여 세포의 파괴와 파

골세포 활성화인자(osteoclast activating factor)의 분비를 통한 골의 흡수를 일으키는 것으로 보고되었다. 또한 치근단 병소의 병인론에 관여하는 면역반응은 체액성 면역반응과 세포성 면역반응이 서로 밀접하게 상호작용하는 것으로 알려져있다. T임파구가 형질세포의 면역글로블린 생성을 조절하는 과정에서 T helper세포는 B임파구가 형질세포로 분화되는 것을 자극하고, T임파구의 전구물질을 자극하여 cytotoxic T세포가 되도록하며, T suppressor세포는 형질세포의 항체형성을 억제하고 cytotoxic T세포의 형성을 방해하는 작용을 한다. 이와같이 면역반응의 조절에 상호역작용을 하는 T임파구 아군집을 분리하는 것은 IgG(Tr)와 IgM(T $\mu$ )에 대한 임파구의 표면수용체(surface receptor)의 차이에 의하여 가능하였으며, Moretta<sup>59)</sup>에 의하면 T $\mu$ 세포는 보조자(helper)기능을 제공하고 Hayward<sup>60)</sup>에 의하면 Tr세포는 억제자(suppressor)기능을 나타냄이 밝혀졌다. Tr세포와 T $\mu$ 세포의 분리는 rosette방법에 의하여 가능하며, Gilhus<sup>61)</sup>의 연구에 따르면 T $\mu$ 세포는 혈구흡착(hemadsorption)방법을 사용하여 확인할 수 있는 것으로 보고되었으나, Beverley등<sup>34)</sup>에 의하면 rosette를 형성하는 모든 세포가 T임파구가 아니라는 것이 밝혀져, 이후 많은 학자들의 연구를 통하여 T임파구 아군집을 분리하는 데는 T임파구 아군집에 대하여 단일특이성을 갖는 단일클론항체를 사용하는 것이 좋은 결과를 얻을 수 있음이 밝혀졌다. 이러한 단일클론항체, 간접면역과산화효소법(indirect immunoperoxidase technique), PAP염색 그리고 혈구흡착 방법등의 도입을 통하여 치근단 병소에서 임파구의 존재확인, 정량적 분석 및 T임파구 아군집의 상대적 비율등에 대한 연구들이 활발히 진행되어왔으나, 많은 연구들이 조직의 고정이나 동결 후 박절표본에서 임방 mm당 양성반응 세포의 수를 조사하는 것으로, 보정된 자료가 전체조직을 대표하는 것으로 보는 데는 문제점이 있을 수 있다. 그러나 이와는 대조적으로 유세포 분석법은 치근단 병소조직의 역학적 분석을 통하여 표본내에 존재하는 실제의 세포

수를 측정할 수 있고, 이의 정확도와 정밀성은 이미 상당히 연구되어, 정량적 분석의 좀 더 신뢰할 수 있는 방법임이 입증되었다. 더군다나 임파구가 존재하는 부위로의 backgating을 통하여 임파구 아군집의 정량적 측정도 더욱 정확하게 되었다. 본 연구에서는 실험대상으로 선택한 15예의 대조군과 50예의 치근단 병소중 많은 예에서 실험에 실패를 하였던 데 이는 조직을 단일현탁액으로 만드는 과정중 시간의 지체와 세밀한 조작상의 실패등에 기인한 것으로 사료되며 이점이 바로 유세포 분석법의 큰 단점이기도 하다. 또한 조직이 작은 경우에도 조직의 처리과정과 단일현탁액을 나누는 과정에서 문제점이 발생하여 실패의 원인이 되었다.

일반적으로 사람의 치근단 병소는 크게 치근단 육아종, 치근단 낭종 그리고 그외의 다른 병소로 분류될 수 있는데 많은 학자들이 조직검사를 통하여 분포를 조사해본 결과 육아종이 48%-84%, 낭종이 17%-47% 그리고 다른 병소가 0%-20%로 주로 치근단 육아종과 치근단 낭종이 많았으며, 그 중에서도 육아종이 더욱 높은 분포를 보였다. 본 연구에서도 유세포 분석과 핵산분석을 시행한 32예 치근단 병소중 24예는 치근단 육아종으로 그리고 나머지 8예는 치근단 낭종으로 진단되어 치근단 육아종이 75%의 분포를 보여, Torabinejad등<sup>41)</sup>의 연구에서 13예의 치근단 병소중 9예가 치근단 육아종으로 진단된 보고와 유사하였으며, 또한 Kopp등<sup>45)</sup>의 논문에서 16예의 치근단 병소중 3예의 반흔조직을 제외하고 8예가 치근단 육아종이라는 보고와도 일치하였으나, 오<sup>43)</sup>의 연구에서는 21예의 치근단 병소중 치근단 낭종으로 진단된 예가 15예인 것과는 차이를 보였는데, 이는 아마도 치근단 조직이 채취된 부위와 치근단 조직이 채취된 방법-치근단 절제술이나 발치술이나-등에 따라, 그리고 질병에 대한 조직학적 판단기준의 차이에서 비롯된 것으로 사료되었다.

본 연구에서는 임파구의 정량적 분석을 시행하였는데 유세포 분석을 실시한 25예 모두에서 T임파구와 B임파구의 존재를 확인할 수 있어

서, Cymerman등<sup>42)</sup>, Torabinejad등<sup>41)</sup>, 오<sup>43)</sup>, Lukic등<sup>46)</sup>, Kontiainen등<sup>36)</sup> 그리고 Kopp등<sup>45)</sup>의 보고와 일치하였으나, 치근단 육아종 66예 중 T임파구의 존재를 66%정도에서 확인할 수 있었다는 Skaug등<sup>40)</sup>의 보고와는 다른 점을 보였는데, 이 차이는 Skaug등<sup>40)</sup>이 사용한 closed chamber 혈구흡착방법이 단일클론항체를 사용하는 방법보다 T임파구에 대한 특이성이 낮은 점에 기인되는 것으로 사료되었다. 또한 유세포 분석에서 임파구의 상대적 양은 작게는 2.01%에서 많게는 70.47%로(평균 16.84%) 각 개의 조직에 따라 큰 차이를 보였는데 이는 광학현미경으로 조직학적 표본을 조사하여 비교 관찰한 결과, 침윤된 염증세포의 정도에 따라 관찰되는 세포들의 구성비가 다른 점에 기인된 것으로 사료되었다. 즉 임파구와 형질세포가 같은 정도로 보이거나 혹은 어느 한 쪽이 상당히 많거나 또 임파구가 거의 보이지 않거나, 대식세포와 중성구가 많이 관찰되는 경우들이 있었다. 그러나 중요한 것은 실험군 25예 모두에서 T임파구의 분포가 평균 68.54% 그리고 B임파구의 분포가 31.46%로 T임파구가 2.18배 정도 많은 것으로 조사되었는데 이는 Torabinejad등<sup>41)</sup>, Cymerman등<sup>42)</sup>, Piattelli등<sup>44)</sup>, Kontiainen등<sup>36)</sup>, Lukic등<sup>46)</sup> 및 오<sup>43)</sup>의 연구와 유사하였다. 그러나 Lukic등<sup>46)</sup>의 연구에서는 치근단 육아종중 국소적으로 단일핵세포의 침윤이 있는 경우에 B임파구의 수가 T임파구의 수보다 많은 것으로 조사되어 약간의 차이를 보였다. 한편 대조군에서는 유세포 분석이 성공한 4예 모두에서 임파구의 양이 1%미만으로 관찰되었으며(평균 0.46%), 1예에서는 거의 임파구가 보이지 않았다. 또한 T임파구와 B임파구를 살펴본 결과, 2예에서는 B임파구는 없었고 T임파구만 보였으며, 1예에서는 B임파구는 아주 극소량 그리고 T임파구는 거의 대부분을 차지하였으며, 나머지 1예에서는 T임파구와 B임파구가 비슷한 양으로 관찰되어 압도적으로 T임파구의 분포가 우세하였다. 이와같은 결과는 Mangkornkarn 등<sup>62)</sup>이 사람의 치수조직을 유세포 분석한 후 치수조직에서는 T임파구는 관찰되나 B임파구

는 보이지 않았다고 보고한 것과 그리고 임파구가 전체세포의 1%정도였다는 보고와 유사하였다. 이렇게 B임파구가 적게 관찰되는 것은 치근단 병소의 초기 면역반응시에 항원이 T임파구를 증가시키고, 자극하여 혈관확장을 일으키는 림포킨을 방출하고, 순환하고 있는 B임파구가 조직내로 이동해와 T임파구와 반응한 후, 증식하고, 면역글로불린을 생성하는 형질세포로 분화되기 때문인 것으로 사료되었다.

또한 면역반응에서 서로 반대적인 조절기능을 갖고있어, T임파구의 전체적 조절유지성을 반영하는 T임파구 아군집의 비율을 관찰, 조사해본 결과 실험군중 치근단 육아종으로 진단된 20예에서는 T helper 세포가 많이 관찰되었는데, 적게는 1.2배에서 많게는 6.1배(평균: 2.29배)이었다. 반면에 실험군중 치근단 낭종으로 진단된 5예중에서, 4예는 T suppressor/cytotoxic세포가 많이 관찰되었는데, 1.2배에서 2.9배(평균: 2.0배)였고, 그리고 나머지 1예는 T helper세포가 1.2배 많이 관찰되었다. 이처럼 본 연구에서는 치근단 육아종에서는 T helper세포가 우세하고(66.8%), 치근단 낭종에서는 T suppressor/cytotoxic세포가 우세한 것으로(60.3%) 조사되어, Torabinejad등<sup>41)</sup>과 Kopp등<sup>45)</sup>의 보고와 유사하였으나, Cymerman등<sup>42)</sup>의 두 세포사이에 큰 차이없이 비슷한 수로 존재한다는 보고와는 차이를 보였으며, Kontiainen등<sup>36)</sup>이 치근단 병소에서 T suppressor/cytotoxic세포가 2배 정도 많다고 보고한 것과는 역시 많은 차이를 보였다. 또한 Lukic등<sup>46)</sup>은 염증세포들이 국소적으로 침윤되어 있는 육아종의 경우에는 CD4-positive T세포가 우세하게 관찰되었으나, 염증세포들이 넓게 침윤되어 있거나 상피의 증식이 관찰되는 육아종의 경우에는 CD8-positive T세포가 우세하게 나타난다고 보고하였고, 그리고 Stashenko등<sup>63)</sup>은 백서에서 인위적으로 치근단 병소를 만들고 시간 경과별로 T임파구 아군집의 비율을 조사한 후 골파괴와 병소확장이 빨리 진행되는 활동기(1-15일)에는 T helper세포가 우세하나, 병소가 안정화되고 만성화됨에 따라 T suppressor세포가 증가한다고 보고하였다.

이와같이 치근단 병소의 발생과 확장에는 대식세포의 활성화와 싸이토킨(cytokine)의 생성을 유도하는 CD4-positive T세포가 중요한 역할을 하며, 병소가 계속 진행됨에 따라 세포성 면역반응과 자가면역 그리고 세포파괴에 조절 기능을 발휘하는 CD8-positive T세포가 점차 그 역할을 증대시킨 것으로 사료되었으며, 또한 치근단 육아종에서 치근단 낭종으로의 변환에 T임파구 아군집의 비율변화가 중요한 역할을 하는 것으로 사료되었다. 한편 대조군 4예 중에서 2예는 T helper세포가 더 우세하였고, 1예는 같은 비율로 나타났으며 그리고 나머지 1예에서는 T suppressor/cytotoxic세포만이 관찰되어서, 평균적으로 T helper 세포와 T suppressor/cytotoxic세포의 비율은 1:1이었다. Jontell등<sup>64)</sup>과 Hahn등<sup>65)</sup>은 정상치수조직에서 면역적격세포들을 관찰한 후 T helper세포와 T suppressor/cytotoxic세포의 비율이 1:2라고 보고하였으며, Mangkornkarn등<sup>62)</sup>은 유세포 분석법을 통하여 정상치수조직을 조사한 후 T helper세포와 T suppressor 세포의 비율이 1.2:1이라고 보고하여 차이를 보였는데 이와같이 정상조직에서도 분석방법에 따라 다른 결과가 도출될 수도 있었다.

일반적으로 단일세포의 DNA양과 세포주기(cell cycle)사이의 관계는 이미 인정되어 있으므로, 핵산분석을 통하여 정상조직이나 병소조직의 역학적 분석을 한 후 조직내 세포의 세포분열활성을 조사할 수 있다. 본 연구에서는 핵산분석을 이용하여 대조군과 치근단 병소조직내 세포들의 DNA양을 조사한 결과 구성세포들이 크게 두 종류로 구성되어 있음을 알았다. 대조군에서는 이수체의 DNA양을 갖는 non-cycling 세포(G0/G1)가 93.4%-95.5%이고, 이수체이상의 DNA양을 갖는 cycling세포(S+G2/M, 증식지수)가 4.47%-6.60%이고, 치근단 낭종에서는 noncycling세포가 88.4%-91.4%이고, cycling세포가 8.53%-11.55%로 나타났으며, 치근단 육아종에서는 noncycling세포가 91.5%-95.4%이고, cycling세포가 4.55%-8.45%로 나타나 증식지수가 치근단 낭종에서 제일 높은 것으로 나타났으나, 일반적으로

10%보다 적은 수의 세포들이 세포분열활성을 보여, Mangkornkarn등<sup>62)</sup>이 정상치수조직에서 구성세포의 DNA양을 조사한 후 10%정도가 cycling세포였다고 보고한 것과 유사한 결과를 보였다. 이와같은 결과로 미루어 암세포로의 변환이 없는 일반적인 치근단 병소조직인 경우에도 세포분열활성에 큰 차이가 나타나지 않음을 짐작할 수 있었으며, 앞으로 좀더 많은 연구를 해보면 치근단 낭종과 치근단 육아종간의 감별진단에 핵산분석을 응용할 수도 있을 것으로 사료되었다.

이상의 연구를 통하여 치근단 병소의 발생, 확대 및 지속에 중요한 역할을 하는 면역학적 기전을 연구하는데 유세포 분석이 크게 활용될 수 있으며, 정상조직과 병소조직의 연구 및 비교가 가능할 뿐만 아니라, 다른 여러종류의 단일클론항체와 함께 사용하면 많은 다양한 세포들의 확인 및 비교도 가능할 것으로 사료되며, 또한 치근단 병소의 발생부터 치유까지 경과별로 면역적격세포들의 분포를 비교, 관찰하면 면역학적 기전에 대한 좀 더 많은 이해를 얻을 수 있을 것으로 예상되는 바 이에 대한 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료되는 바이다.

## V. 결 론

32예의 치근단 병소조직과 8예의 지치주위조직을 광학현미경, 단일클론항체 그리고 유세포 분석기를 사용하여 치근단 병소내의 염증세포의 구성을 관찰하고, 임파구의 분포와 상대적 양, T임파구 아군집의 비율을 조사하였으며 그리고 핵산의 양을 측정하여 cycling cell분포를 관찰한 후 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 32예 치근단 병소중 24예는 치근단 육아종으로 진단되었고, 8예는 치근단 낭종으로 진단되었으며, 치근단 병소내 염증세포의 구성을 살펴본 결과 치근단 육아종에서는 임파구가 42.1%, 대식세포가 33.8%, 형질세포가 15.9%, 중성구가 8.2%로 관찰되었고 그리고 치근단 낭종에서는 임파구가 41.



- 8%, 대식세포가 30.3%, 형질세포가 19.0%, 중성구가 8.8%로 나타났다.
2. 유세포 분석을 실시한 치근단 병소 25예 모두에서 T임파구, B임파구, T helper세포 그리고 T suppressor/cytotoxic세포를 확인할 수 있었으며, 또한 T임파구의 수가 B임파구의 수보다 많았다.
  3. 유세포 분석을 실시한 대조군 4예중 2예에서는 B임파구가 없고, T임파구만 보였으며 그리고 나머지 2예에서는 T임파구의 수가 많았다.
  4. 치근단 육아종으로 진단된 20예 모두에서 T helper세포의 수가 T suppressor/cytotoxic세포의 수보다 평균 2.29배 많았다.
  5. 치근단 낭종으로 진단된 5예중 4예에서는 T suppressor/cytotoxic세포의 수가 평균 2배 많았으며, 나머지 1예에서는 T helper세포의 수가 많았다.
  6. 유세포 분석을 실시한 대조군 4예중 2예에서는 T helper세포가 많았고, 1예에서는 같은 비율로 그리고 나머지 1예에서는 T suppressor/cytotoxic세포만 보였다.
  7. 핵산분석결과 증식지수가 대조군에서는 평균 5.45%, 치근단 육아종에서는 평균 6.64%, 치근단 낭종에서는 평균 10.1%로 나타나 치근단 낭종에서 제일 높은 것으로 관찰되었다.

## 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. 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.

4. Longwill, D.G., Marshall, F.J. & Creamer, H.K.: Reactivity of human lymphocytes to pulp antigen. *J. Endod.* 8:27-32, 1982.
5. Sundqvist, G.: Bacterial studies of necrotic pulp. Umea University Odontological Kisser-tation. No. 7. Umea, Sweden Univevsity of Umea, 1976.
6. Rosengren, L. & Winblad, B.: Periapical destruction caused by experimental pulpal inoculation of *Streptococcus mutans* in rats. *Oral Surg.* 39:479-487, 1975.
7. Kakehashi, S., Stanley, H.R., Fitzgerald, R.J.: The effects of surgical exposure of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg.* 20:340-349, 1965.
8. Okada, H., Aono, M., Yoshida, M., Munemoto, K., Nishida, O. & Yokomizo, I.: Experimental study on focal infection in rabbits by prolonged sensitization through dental pulp canals. *Arch. Oral Biol.* 12: 1017-1034, 1967.
9. Pitts, D.L., Willams, B.L., & Morton, T.H.: Investigation of the role of endotoxin in periapical inflammation. *J. Endod.* 8:10-18, 1982.
10. Torabinejad, M., & Kiger, R.D.: Experimentally induced alterations in periapical tissue of the cat. *J. Dent. Res.* 59(1): 87-96, 1980.
11. 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.
12. 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. *J. Endod.* 4:53-59, 1978.
13. 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.
14. 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 the root canal. *Oral Surg.* 47:179-184, 1979.
  15. 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.
  16. 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.
  17. 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.
  18. 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.
  19. 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.
  20. 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.
  21. Stern, M.H., Mackler, B.F. & Dreizen, S.: A quantitative method for the analysis of human periapical inflammation. *J. Endod.* 7: 70-74, 1981.
  22. Pulver, W.H., Taubman, M.A. & Smith, D.J.: Immune components in human dental periapical lesions. *Arch. Oral Biol.* 23: 435-443, 1978.
  23. Yanagisawa, S.: Pathologic study of periapical lesions I. periapical granuloma: Clinical, histopathologic and immunohistopathologic studies. *J. Oral Path.* 9:283-300, 1980.
  24. Toller, P.A. & Holborow, E.J.: Immunoglobulins and immunoglobulin-containing cells in cysts of the jaws. *Lancet.* 2:178-181, 1969.
  25. Naidorf, I.J.: Immunoglobulins in the periapical granuloma; a preliminary report. *J. Endod.* 1:15-18, 1975.
  26. Morse, D.R., Lasater, D.R. & White, D.: Presence of immunoglobulin-producing cells in periapical lesions. *J. Endod.* 1:338-343, 1975.
  27. Kuntz, D.D., Genco, R.J., Guttuso, J. & Natiella, J.R.: Localization of immunoglobulins and the third component of complement in dental periapical lesions. *J. Endod.* 3:68-73, 1977.
  28. Jones, O.J. & Lally, E.T.: Biosynthesis of immunoglobulin isotypes in human periapical lesions. *J. Endod.* 6:672-677, 1980.
  29. 조효선 : 치근단 병소의 면역병리조직학적 연구. *J.KAOD.* 8 : 19-30, 1982.
  30. Torabinejad, M., Kettering, J.D. & Bakland, L.K.: Localization of IgE immunoglobulin in human dental periapical lesion by the peroxidase-antiperoxidase method. *Arch. Oral Biol.* 26:677-681, 1981.
  31. 부정선 : 실험적 백서 치근단 병소에서의 면역글로블린 분포에 관한 면역조직화학적 연구. *서울치대논문집*, 14 : 69-84, 1990.
  32. 백승호 : 실험적 백서 치수 및 치근단 병소에서

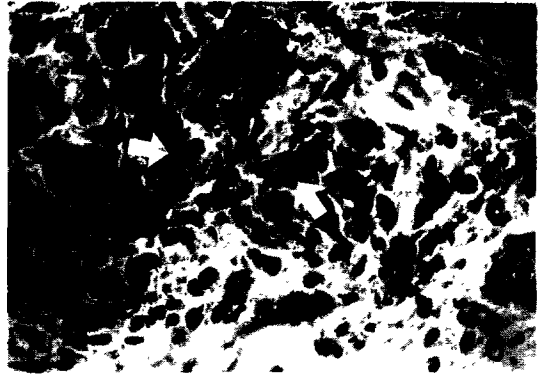
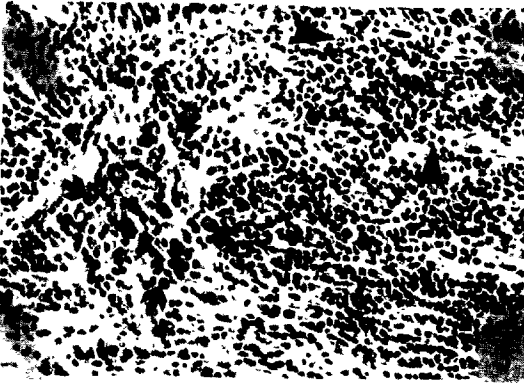
- 의 면역글로불린 G아강 분포에 관한 면역조직 화학적 연구. *J.KACD*. 16(1) : 41-59, 1991.
33. Köhler, G. & Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495-497, 1975.
  34. Beverly, P. CL. & Callard, R.E.: Distinctive functional characteristics of human "T" Lymphocytes defined by E-rosetting and a monoclonal anti-T cell antibody. *Eur. J. Immunol.* 11:329-334, 1981.
  35. Cordell, J.L., Falini, B., Erber, W.N. et al.: Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune-complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complex). *J. Histochem. Cytochem.* 32:219-229, 1984.
  36. Kontiainen, S., Ranta, H. & Lautenschlager, I.: Cells infiltrating human periapical inflammatory lesions. *J. Oral Path.* 15:544-550, 1986.
  37. Barkhordar, R.A. & Desouza, Y.G.: Human T-lymphocyte subpopulations in periapical lesions. *Oral Surg.* 65:763-769, 1988.
  38. Bergenholtz, G., Lekholm, U., Liljenberg, B. & Lindhe, J.: Morphometric analysis of chronic inflammatory periapical lesions in root-filled teeth. *Oral Surg.* 55:295-304, 1983.
  39. 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.
  40. Skaug, N., Johannessen, A.C., Nilsen, R. & Marte, R.: In situ characterization of cell infiltrates in human dental periapical granuloma 3. Demonstration of T lymphocytes. *J. Oral Path.* 13:120-127, 1984.
  41. 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.
  42. 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.
  43. 오태석 : 근관치료 전과 후의 치근단 병소에서 임파구의 분포에 관한 면역조직화학적 연구. *J.KAOD*. 11 : 63-75, 1985.
  44. Piattelli, A., Artese, L., Rosini, S., Quaranta, M. & Musiani, P.: Immune cells in periapical granuloma: Morphological and Immunohistochemical characterization. *J. Endod.* 1: 26-29, 1991.
  45. Kopp, W. & Schwarting, R.: Differentiation of T lymphocyte subpopulations, macrophages, and HLA-DR-restricted cells of apical granulation tissue. *J. Endod.* 2:72-75, 1989.
  46. Lükic, A., Arsenijevic, N., Vujanic, G. & Ramic, Z.: Quantitative analysis of the immunocompetent cells in periapical granuloma; Correlation with the histological characteristics of the lesions. *J. Endod.* 3:119-122, 1990.
  47. Lovett, E.J., Schnitzer, B., Keren, D.F., Flint, A., Hudson, J.L. & McClatchey, K.D.: Application of flowcytometry to diagnostic pathology. *Lab. Invest.* 2:115-140, 1984.
  48. Willman, C.L. & Stewart, C.C.: General principles of multiparameter flow cytometric analysis: Applications of flow cytometry in the diagnostic pathology laboratory. *Seminar in Diagnostic Pathology* 1: 3-12, 1989.
  49. Melamed, M.R., Mullaney, P.F. & Mendelsohn, M.L.: Flow cytometry and sorting. New York: John Wiley & Sons, 177-189, 1979.

50. Traganos, F.: Flow cytometry: principles and applications. 1. Cancer Invest. 2:149-163, 1984.
51. Muirhead, K.A., Horan, P.K. & Poste, G.: Flow cytometry, present and future. Bio/Technology 3:337-356, 1985.
52. Pollack, A., Moulis, H., Block, H.L. & Irvin, G.L.: Quantitation of cell kinetic responses using simultaneous flow cytometric measurement of DNA and nuclear protein. Cytometry 5:473-481, 1984.
53. Shapiro, H.M.: Practical Flow Cytometry. 2nd ed. New York: Alan R. Liss, Inc., 1988.
54. Coon, J.S., Landay, A.L. & Weinstein, R.S.: Biology of disease. Advances in flowcytometry for diagnostic pathology. Lab. Invest. 57:453-479, 1987.
55. 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.
56. Yu, S.M. & Stashenko, P.: Identification of inflammatory cells in developing rat periapical lesions. J. Endod. 13:535-540, 1987.
57. 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.
58. 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.
59. 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 response by T cells bearing receptor for IgM or IgG. J. Exp Med. 146:184-200, 1977.
60. 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.
61. Gilhus, N.E., Frostad, S., Matro, R. & Tönder, O.: The ontogeny of immunological receptors in the thymus. Acta. Pathol Microbiol Immunol. Scand Sect C 90:307-314, 1982.
62. Mangkornkarn, C., Steiner, J.C., Bohman, R. & Lindemann, R.A.: Flow cytometric analysis of human dental pulp tissue. J. Endod. 2:49-53, 1991.
63. Stashenko, P., Yu, S.M. & Wang, C.Y.: Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. J. Endod. 9:422-426, 1992.
64. Jontell, M., Gunraj, M. & Bergenholtz, G.: Immunocompetent cells in normal dental pulp. J. Dent. Res. 66:1149-1153, 1987.
65. Hahn, C.L., Falkler, W.A. Jr. & Siegel, M.A.: A study of T and B cells in pulpal pathosis. J. Endod. 1:20-26, 1989.

## LEGEND FOR FIGURES

- Fig. 1.** Periapical cyst: the cyst wall is composed of epithelial lining and fibrotic stroma (W). It is filled with cholesterol clefts (C). (H&E, x10)
- Fig. 2.** Higher magnification of Fig. 1: the cyst wall is lined by squamous epithelium and diffusely infiltrated with chronic inflammatory cells. (H&E, x40)
- Fig. 3.** Inflammatory infiltrates include many lymphocytes, plasma cells (black arrows) and a few neutrophils (arrow heads). Lymphocytes are aggregated in the right half of the figure. (H&E, x100)
- Fig. 4.** Periapical granuloma: it is irregular shaped tissue, being composed of epithelial cells and prominent infiltration of inflammatory cells (H&E, x10)
- Fig. 5.** Periapical granuloma: it is irregular shaped tissue, being composed of epithelial cells and prominent infiltration of inflammatory cells (H&E, x10)
- Fig. 6.** Many macrophages (white arrows) as well as lymphocytes are scattered in the stroma of the periapical granuloma. (H&E, x200)

논문 사진부도



## FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS OF LYMPHOCYTE AND CYCLING CELL DISTRIBUTION IN PERIAPICAL LESIONS

Tae - Seok Oh, D. D. S., M. S. D., Sung - Sam, Lim, D. D. S., M. S. D., Ph. D.

*Dept. of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Seoul National University*

This study was designed 1) to compare the distributions of periapical inflammatory cells and 2) to identify lymphocytes and compare the lymphocyte distribution with T lymphocyte subpopulation and then 3) to examine the distribution of cycling cell in human dental periapical lesions.

From each of the twenty-five human dental periapical lesions observed one small portion was fixed, embedded in paraffin, sectioned serially and stained with HE. The periapical inflammatory cells were counted to obtain the relative concentration of lymphocyte, plasma cell, macrophage and neutrophil.

The large part of each lesion was analysed using Flow cytometer and monoclonal antibodies to obtain the relative concentration of T lymphocyte, B lymphocyte, T helper cell and T suppressor/cytotoxic cell. In addition to that, seven human dental periapical lesions were examined with DNA analysis to observe the distribution of cycling cell.

Following results were obtained:

1. 24 cases of the 32 periapical lesions examined were diagnosed as periapical granuloma and the remaining 8 cases as periapical cyst. Lymphocytes comprised 42.1% of total inflammatory cells in periapical granuloma and 41.8% in periapical cyst. Corresponding percentages for macrophages were 33.8% and 30.3%; for plasma cells, 15.9% and 19.0%; for neutrophils, 8.2% and 8.8%.
2. All of the periapical lesions examined had T lymphocyte, B lymphocyte, T helper cell, T suppressor/cytotoxic cell. And in all cases, T lymphocytes were observed predominantly more than B lymphocytes.
3. In 2 cases of the control group only T lymphocytes were found, and in the remaining 2 cases T lymphocytes were observed predominantly.
4. T helper cells were observed predominantly more than T suppressor/cytotoxic cells in all cases of periapical granulomas.
5. T suppressor/cytotoxic cells were observed predominantly more than T helper cells in 4 cases of periapical cysts (total 5 cases were examined) and only in one case T helper cells were more than T suppressor/cytotoxic cells.
6. In control group, T helper cells were predominant in 2 cases and T helper cells were equivalent to T suppressor/cytotoxic cells in one case. In remaining one case T suppressor/cytotoxic cells were predominant.

7. As the result of DNA analysis, the average proliferating indices of the various groups examined were measured as follows: in the control group 5.45%, in periapical granuloma 6.64%, in periapical cyst 10.1%. The highest index was observed in periapical cyst.

---

Key words: Flow cytometer, T lymphocyte subpopulation, Monoclonal antibody, DNA analysis, Proliferating index