

유세포분석기를 이용한 정상치수조직과 염증성 치수조직 내의 임파구 분포에 관한 연구

서울대학교 치과대학 치과보존학교실

김선아 · 배광식 · 임성삼

Abstract

FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS OF LYMPHOCYTES IN NORMAL AND INFLAMED PULP

Seon-Ah Kim, D.D.S., Kwang-Shik Bae, D.D.S., M.S.D., Ph.D.,
Dept. of Conservative Dentistry, Graduate School, Seoul National University

The purpose of this study was to examine the distribution of lymphocyte populations in normal, reversibly inflamed and irreversibly inflamed human dental pulp tissues using flow cytometry. Flow cytometry, with specific antibody and fluorochrome reagent allows us to know cellular properties of hematology cells by measuring fluorescence of stained cells.

Before extirpation of pulps in routine endodontic treatment, the clinical diagnosis were performed by symptom. The extirpated pulp tissues were divided into normal pulp group (N=5), reversible pulpitis group(N=10) and irreversible pulpitis group(N=7).

The specimen was placed into RPMI 1640 medium, minced into small pieces, and then digested in medium with collagenase. The cell suspension was resuspended in PBS for monoclonal antibody staining of T lymphocytes(CD3+), B lymphocytes (CD19+), T helper cell(CD4+) and T suppressor cell(CD8+). The percentages of cells were counted by FACStar(BD) flow cytometer. Following results were obtained;

* 본 연구는 '96년도 서울대학교 병원 임상연구비 지원에 의한 결과임.

1. In the most normal and inflamed pulps, the percentages of T lymphocyte, B lymphocytes, T helper cell and T suppressor/cytotoxic cell were less than 1% in total counted pulpal cells.
2. The higher percentages of T, B, T helper and T suppressor cells were observed in irreversible pulpitis group as compared with the normal pulp and reversible pulpitis group but the differences between groups were not statistically significant ($p>0.05$).
3. The percentages of T helper cells (CD4+ cells) were greater than that of T suppressor/cytotoxic cells (CD8+ cells) in the inflamed pulps.

Key word : pulp, flow cytometry, monoclonal antibody, T lymphocyte, B lymphocyte, T helper cell, T suppressor/cytotoxic cell

I. 서 론

면역반응에는 체액성반응과 세포성반응이 있다. 두 가지 면역반응에는 임파구가 중요한 역할을 한다. 임파구는 그 기능에 따라 B 임파구와 T 임파구, 두 개의 군집으로 나뉘는데 B 임파구는 항체를 형성하는 세포의 전구체이며 체액성 면역반응에 관여하고, T 임파구는 지연형과민반응, 외부 조직 이식과 암세포에 대한 거부반응, 바이러스 감염세포의 제거에 관여할 뿐만 아니라 B 임파구의 반응을 증폭시키거나 억제시키는 작용을 한다.

치수의 면역조직학적 연구는 치수조직이 치아우식을 통해 침범한 미생물에 대해 면역반응을 일으킬 수 있음을 보여주었고, 치수내 면역성분의 존재를 밝혀 주어 치수조직의 병변과 관련된 면역반응에 B 와 T 임파구가 매개함을 보여주고 있다¹⁻⁵⁾.

Honjo 등⁶⁾과 Pulver 등⁷⁾은 직접면역형광법(direct immunofluorescent technique)을 이용하여 비염증성 치수에 비해 염증성 치수에서 높은 농도의 IgG를 포함하는 세포를 관찰하였

다. 또 Pulver 등⁷⁾은 정상 치수보다 염증성 치수에서 높은 농도로 IgG와 IgA를 포함하는 세포들을 관찰하였다. 또한 Speer 등⁸⁾과 Pekovic과 Fillery⁹⁾는 염증성 치수에서 보체의 C3 성분의 존재를 확인하였다. 이러한 면역글로블린이나 다른 면역성분에 대한 연구가 이루어졌고 단일클론항체(monoclonal antibody)를 이용한 T 임파구의 확인 및 T 임파구 아군집의 구별을 가능하게 되어^{10,11)} Pekovic과 Fillery⁹⁾는 T 임파구와 반응하는 쥐의 단일클론항체와 간접면역형광법을 이용하여 염증성 치수 내의 T 임파구의 존재를 처음으로 확인하고 진행된 우식을 가진 치아의 치수에서 형질세포와 T 임파구를 관찰하였다. 이어서 Jontell 등¹²⁾은 단일클론항체와 간접면역과산화효소법을 사용하여 정상치수내에서 T 임파구 B 임파구와 T helper 세포, T suppressor 세포 등을 관찰하였고 Hahn 등¹³⁾도 간접면역과산화효소법과 단일클론항체를 사용하여 가역성 및 비가역성 염증치수에서 T 와 B 임파구의 분포를 정량적으로 관찰하였다. Okiji 등¹⁴⁾은 PAP(peroxidase-antiperoxidase complex)와 ABC(avidin-biotin complex)방법을 함께 사용한 이중염색

법으로 백서의 정상치수에서 면역적격세포들을 관찰한 바 있다. 이 등¹⁵⁾은 단일클론항체와 간접면역과산화효소법을 이용하여 다른 임상증상을 보이는 치수조직들의 임파구의 분포와 상대적 양을 관찰하였다.

이러한 조직학적, 면역학적, 생화학적 방법에 의해 얻어진 치수조직의 세포 성분에 관한 지식들은 치수조직을 각 연구방법에 맞춰 염색한 후 현미경으로 관찰하였기 때문에 살아있는 치수조직의 상태를 정확히 반영하지 못한다. 또한 조직 표본의 연속적인 절편들을 모두 관찰하는 일은 불가능하고 부위마다 관찰되는 양상이 매우 다르기 때문에 관찰된 부위가 전체 조직을 대표하지 못할 수 있으며 더우기 준비된 조직을 고정하는 단계에서 세포의 주요한 특성이 변형되고 관찰하고자 하는 세포의 성질도 변화될 수 있다^{13, 15)}.

살아있는 조직의 세포구성 및 세포의 특성과 기능에 대한 연구방법으로 단일클론항체와 형광색소화합물질을 이용한 유세포분석이 1980년대 초부터 이용되었다. 유세포분석은 특정 항체와 형광색소 물질을 이용하여 조혈세포의 표면과 세포형질 내의 물질, DNA 양 등의 상태를 알게 해준다¹⁶⁻²⁰⁾.

유세포분석은 치과영역에서 DNA의 양과 S-phage의 세포의 조직내 비율에 따라 악성타액선종양, 편평세포설암, 구강인두종양 등의 임상단계를 진단하고 분류하는데에 주로 사용되었고²¹⁻²³⁾, 치주질환환자의 말초혈액내 다형핵백혈구의 대식작용의 활성을 측정하는데 사용된 바 있다²⁴⁾. Mangkornkan 등²⁵⁾은 유세포분석기를 이용하여 정상치수의 임파구를 정량 분석하여 그 결과를 보고한 바 있다.

본 연구는 정상치수조직과 염증치수조직에서의 임파구 분포를 비교관찰하여 치수질환의 발생 및 지속에 관련된 면역학적 기전을 이해하는데 도움이 되고자, 통상의 근관치료 전 임상적 증상을 통하여 정상치수, 가역성치수염, 그리고 비가역성 치수염 등으로 진단하고 발수한 조직을, 유세포분석기를 이용하여 T 임파구(CD3+ cell), B 임파구(CD19+ cell), T helper(CD4+)세포 그리고 T suppressor/

cytotoxic (CD8+)세포의 치수조직 내 분포에 대한 다소의 지견을 얻었기에 그 결과를 보고하는 바이다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 연구 재료

1995년 6월부터 1996년 6월 사이에 서울대학교병원 치과진료부 보존과에 내원한 환자의 22개 치아에서 통상의 근관치료를 통하여 발수한 치수조직을 실험 대상으로 사용하였다.

각 치아들은 다음과 같은 임상 검사를 거쳐 임상적 진단을 내린 후 발수하였다. (1) 얼음을 이용한 한냉검사; (2) 가열한 gutta-percha를 이용한 온열검사; (3) 전기치수검사기를 이용한 치수생활력검사; (4) 동통의 지속 정도와 강도를 포함한 동통의 병력 문진; (5) 치주낭 침을 사용한 치주낭 깊이 검사; (6) 타진반응 검사.

한냉, 온열, 타진 반응, 전기치수생활력검사 등에서 정상 범위에 속하고 동통의 병력이 없는 5개의 치아에서 발수한 치수조직을 정상치수로 임상진단을 내리고 정상치수군으로 사용하였다. 온열검사에서는 반응하지 않으나 한냉검사에서 동통을 느끼거나 매우 민감하게 반응하며, 자발적이지 않고 오래 지속되지 않는 일시적인 동통을 경험한 10개의 치아를 가역성치수염으로 임상진단을 내린 후 발수하여 얻은 치수조직을 가역성치수염군으로 분류하고, 자발통경험이 있고 한냉과 온열검사에서 민감하게 반응하는 7개의 치아를 비가역성치수염으로 임상진단을 내리고 발수하여 비가역성치수염군으로 사용하였다.

치수조직을 발수하여 유세포 분석을 시행한 22개 치아의 임상적 증상과 임상적 진단은 표 1과 같다.

2. 연구 방법

통상의 근관치료 과정중 발수하여 얻은 치수 조직은 복합항생제 (penicillin + streptomycin) 와 10% fetal calf serum이 포함되어 있는 RPMI 1640 medium 에 저장하여 세절한 후

Table 1. Clinical symptom and clinical diagnosis of experimented teeth.

	tooth no.	SP	cold	heat	EPT	percu.	caries	PPD	Clinical Dx.
1	25				3			under	normal
2	36	present		*	4			over	irreversible
3	27				3			under	normal
4	16	present	*	*	7	*		under	irreversible
5	44		*		5			under	reversible
6	35		*		2		present	under	reversible
7	17			*	6	*		under	irreversible
8	12		*		3		present	under	reversible
9	45				3			over	reversible
10	16		*		4		present	under	reversible
11	15	present	*	*	4			over	irreversible
12	36				3			under	normal
13	46	present	*	*	3			under	irreversible
14	24			*	5			under	reversible
15	27	present		*	6			under	irreversible
16	35		*		3			under	reversible
17	26	present	*		4		present	under	irreversible
18	16		*		3		present	under	reversible
19	37				3			under	normal
20	23			*	3			under	reversible
21	21		*		4			under	reversible
22	47				3			under	normal

SP, spontaneous pain ; PPD, periodontal pocket depth ; *, response to stimuli ; under, under 4 mm ; over, over 4 mm

원심 분리하여 조직압착결정을 얻었다. 여기에 2mg/ml collagenase (C-0130 Sigma Chemical Co.)를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 45분간 두어 단일 세포 현탁액(single cell suspension)을 만든 후 fetal calf serum과 sodium azide가 포함된 PBS(phosphate-buffered saline) 으로 2-3회 세척하고 임파구 조성을 관찰하기 위한 염색을 시행하였다.

각각의 단일클론항체 5µl를 세포현탁액과 잘 섞어 4°C 어두운 장소에서 30분간 반응시킨 후, PBS로 2회 세척했다. T 임파구와 B 임파구의 중복 염색을 위해 anti-Leu-4-fluorescein isothiocyanate conjugate 와 anti-Leu-16-PE conjugate antibody를 사용하고, anti-Leu-3a-PE conjugate와 anti-Leu-2a-FITC conjugate anti-

body를 이용하여 T helper 세포와 T suppressor/cytotoxic 세포를 중복 염색했다. 대조 염색을 위해서는 IgG-FITC-conjugate antibody를 이용했다. 항체 염색 후 FACStar plus (Becton Dickinson Co.) flow cytometer를 이용하여 임파구 분포를 분석하였다. 상기한 각 단일클론 항체는 T cell 표면의 CD3 항원, B cell 표면의 CD19 항원, T helper 세포의 CD4 항원 그리고 T suppressor/cytotoxic 세포의 CD8 항원과 결합한다.

III. 연구 결과

각 실험군에서 관찰된 임파구의 비율은 표 2, 3, 4와 같고 각 실험군의 평균과 표준편차는

Table 2. Percentages of each lymphocyte in normal pulps.

T cell (CD 3+ cell)	T cell (CD 19+ cell)	T cell (CD 4+ cell)	T cell (CD 8+ cell)
0.11%	0.22%	0.00%	0.14%
0.00%	0.00%	0.00%	0.04%
0.42%	0.28%	0.58%	0.45%
0.01%	0.01%	0.00%	0.01%
0.14%	0.13%	0.16%	0.14%

Table 3. Percentages of each lymphocyte in pulp tissues diagnosed as reversible pulpitis.

T cell (CD 3+ cell)	T cell (CD 19+ cell)	T cell (CD 4+ cell)	T cell (CD 8+ cell)
0.12%	0.06%	0.09%	0.09%
0.05%	0.57%	0.05%	0.37%
0.07%	0.44%	0.09%	0.14%
0.17%	0.27%	0.40%	0.15%
0.41%	0.26%	0.45%	0.35%
0.20%	0.01%	0.12%	0.06%
0.15%	0.10%	0.08%	0.07%
0.06%	0.55%	0.03%	0.16%
0.32%	0.32%	0.52%	0.42%
0.11%	0.08%	0.18%	0.12%

Table 4. Percentages of each lymphocyte in pulp tissues diagnosed as irreversible pulpitis.

T cell (CD 3+ cell)	T cell (CD 19+ cell)	T cell (CD 4+ cell)	T cell (CD 8+ cell)
0.71%	1.16%	0.89%	0.42%
21.05%	3.35%	18.75%	8.19%
0.16%	0.36%	0.26%	0.26%
0.87%	0.75%	0.00%	0.44%
0.18%	0.16%	0.16%	0.09%
4.28%	0.15%	2.56%	0.54%
0.66%	0.40%	0.56%	0.30%

표 5과 같다. 각 실험군의 유세포분석의 예는 그림 1, 2, 3과 같다.

정상치수군보다 가역성치수염군에서 각 종류의 임파구의 평균 비율이 높고 가역성치수염군보다 비가역성치수염군에서의 비율이 높지만, 각 군간 차이의 통계적 유의성은 없었다. ($p > 0.05$, oneway ANOVA test)

정상치수군에서는 평균치와 각 증례 내에서의 수치도 T 임파구가 B 임파구에 비해 많은 것으로 나타났고, T suppressor/cytotoxic(CD8+) 세포가 T helper(CD4+) 세포에 비해 평균치도 높았으며 각 증례에 있어서 T suppressor/cytotoxic 세포가 많은 경우가 자주 관찰되었다.

DATE: 25-SEP-95

TIME: 15:22:01

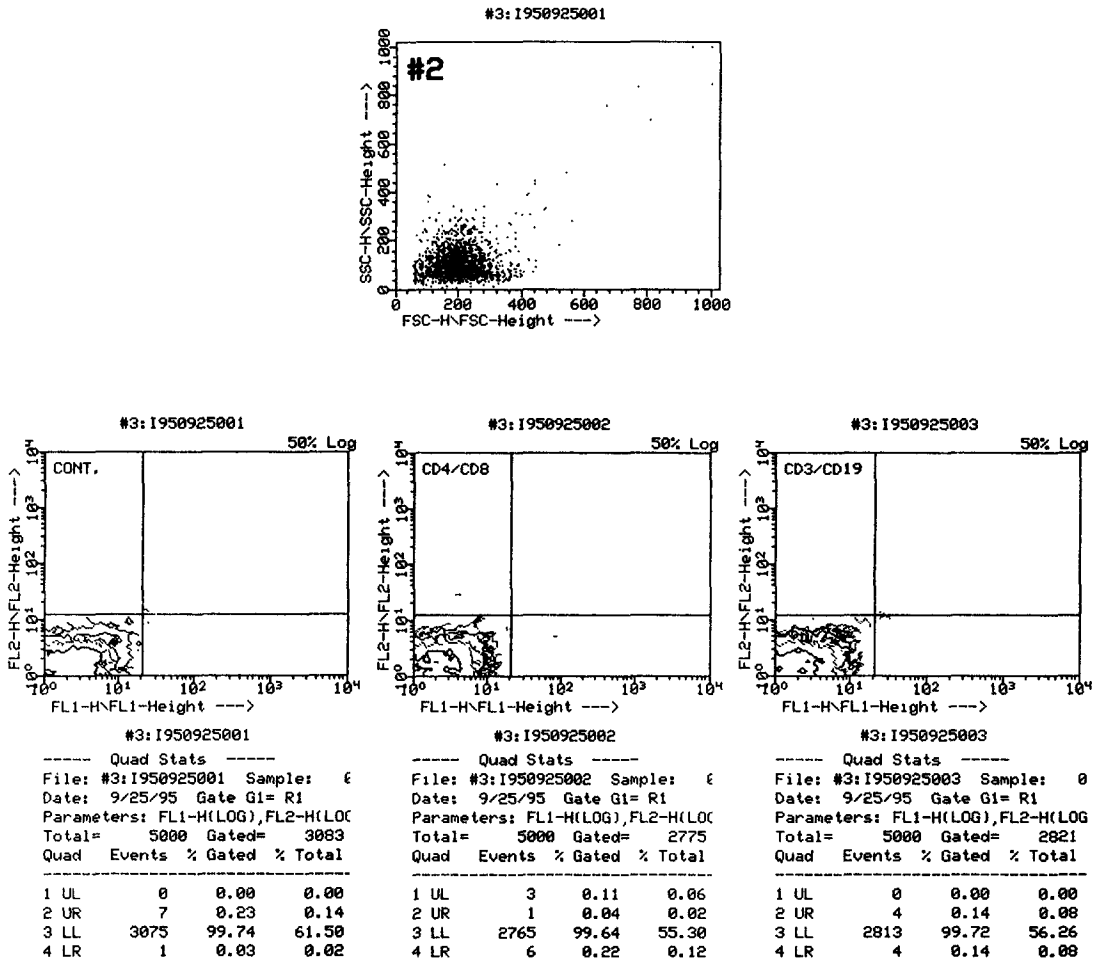


Fig. 1. Dot-plot histograms illustrating the light scattering characteristics of normal pulp.

DATE: 11-OCT-95

TIME: 15:37:57

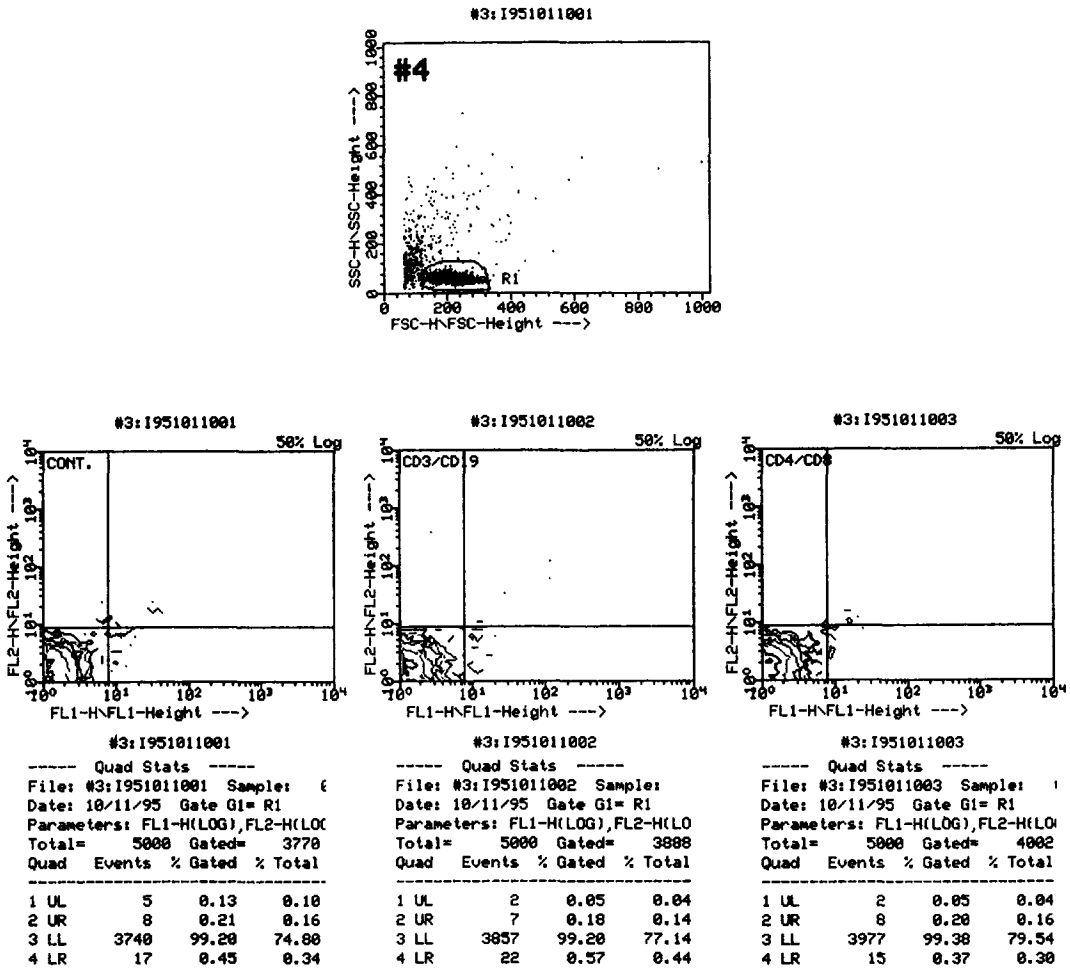
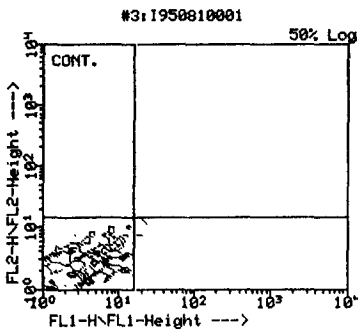
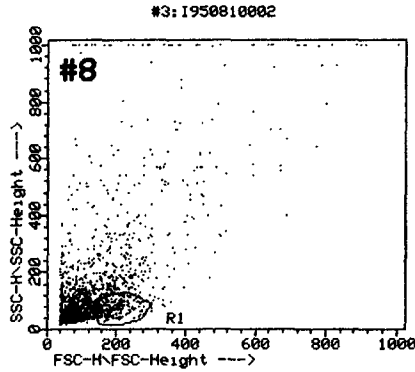


Fig. 2. Dot-plot histograms illustrating the light scattering characteristics of pulp tissues diagnosed as reversible pulpitis.

DATE: 22-APR-96

TIME: 11:35:05



#3: I950810001

----- Quad Stats -----

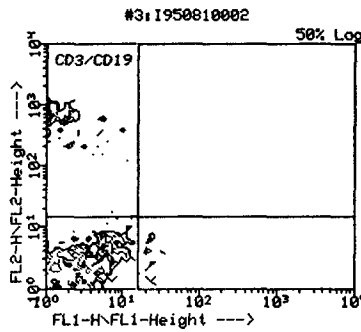
File: #3: I950810001 Sample:

Date: 8/10/95 Gate G1= R1

Parameters: FL1-H(LOG), FL2-H(LOG)

Total= 860 Gated= 200

Quad	Events	% Gated	% Total
1 UL	0	0.00	0.00
2 UR	1	0.50	0.12
3 LL	193	96.50	22.44
4 LR	6	3.00	0.70



#3: I950810002

----- Quad Stats -----

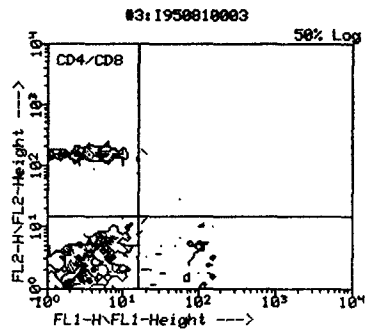
File: #3: I950810002 Sample: (

Date: 8/10/95 Gate G1= R1

Parameters: FL1-H(LOG), FL2-H(LOG)

Total= 5000 Gated= 696

Quad	Events	% Gated	% Total
1 UL	147	21.12	2.94
2 UR	0	0.00	0.00
3 LL	523	75.14	10.46
4 LR	26	3.74	0.52



#3: I950810003

----- Quad Stats -----

File: #3: I950810003 Sample: (

Date: 8/10/95 Gate G1= R1

Parameters: FL1-H(LOG), FL2-H(LOG)

Total= 5000 Gated= 725

Quad	Events	% Gated	% Total
1 UL	131	18.07	2.62
2 UR	3	0.41	0.06
3 LL	532	73.38	10.64
4 LR	59	8.14	1.18

Fig. 3. Dot-plot histograms illustrating the light scattering characteristics of pulp tissues diagnosed as irreversible pulpitis.

Table 5. Mean percentage and standard deviation of each lymphocyte.

	T cell(CD3+)	B cell(CD19+)	Th cell(CD4+)	Ts cell(CD8+)
normal pulp	0.14% ±0.17	0.13% ±0.12	0.15% ±0.25	0.16% ±0.17
reversible pulpitis	0.17% ±0.12	0.27% ±0.20	0.20% ±0.18	0.19% ±0.13
irreversible pulpitis	3.99% ±7.66	0.93% ±1.20	3.31% ±6.86	1.46% ±2.97

The differences between groups were not statistically significant.

가역성치수염군의 경우 T 임파구보다 B 임파구가, 비가역성치수염군의 경우는 B 임파구에 비해 T 임파구가 더 많은 비율로 관찰되었고, 두 실험군 모두 T helper(CD4+) 세포가 T suppressor/cytotoxic(CD8+) 세포보다 더 많은 것으로 나타났으나 그 차이의 통계적 유의성은 없었다. ($p>0.05$)

IV. 총괄 및 고찰

세균이나 세균성 항원이 치수로 유입되면 면역반응의 진행을 암시하는 염증부위에 임파구, 형질세포 및 대식세포 등의 침윤이 일어난다. 세균성 항원은 면역반응유발성이 매우 높으며 T 나 B 임파구의 표면항원수용체와 반응하여 T 나 B 임파구의 활성을 유도하게 된다.

T 임파구의 아군집을 분리하는 것은 IgG($T\gamma$)와 IgM($T\mu$)에 대한 임파구의 표면수용체의 차이에 의해 가능하였으며, Moretta²⁶⁾ 의하여 $T\mu$ 세포는 면역반응을 촉진하는 기능을 제공하고 Hayward²⁷⁾ 의하면 $T\gamma$ 세포는 억제하는 기능을 나타냄이 밝혀졌다. 임파구를 기능에 따라 분류하기 위해 erythrocyte rosetting²⁸⁻³⁰⁾, 면역형광현미경³¹⁻³³⁾, 효소조직화학법³⁴⁾ 등 여러 방법들과 유세포분석이 사용되고 있다.

유세포분석이란 DNA나 세포질 내의 물질, 세포 표면의 성분 등 세포의 특정 요소와 특이하게 결합할 수 있는 형광 색소와 형광성을 만드는 빛(레이저 빔)을 이용하여 각 세포들의 특성을 분석하는 방법이다. 형광성을 띤 세포에 빛을 조사하여 광선의 흡수 또는 산란되는 양을 측정함으로써 세포의 크기, 모양, 밀도, 과립성 및 착색정도를 알 수 있으므로 세포의 생화학적 생물리학적 분석이 가능하다. 유세포분석이란 용어에서 알 수 있듯이 형광 탐지 장치를 유체

(flow)를 이룬 세포들이 통과하면서 세포들의 특성에 대한 양적, 질적인 분석이 이루어진다.

유세포분석은 모양은 같지만 기능이 서로 다른 임파구를 분류하게 해주며 또한 세포 형태는 같지만 각기 다른 임상증상을 보이는 종양조직내의 이종세포를 구별하게 해준다. 그러므로 형태학적 특성을 이용해 조직세포의 군을 분류하는 방법으로는 불가능했던 조형세포 특히 임파구와 종양 조직의 특성에 관한 연구가 유세포분석을 통해 이루어졌다^{35, 36)}. 유세포분석은 선천적 또는 후천적 면역 결핍 환자에서의 말초혈액 내 B 와 T 임파구의 수를 세는 데 이용되고^{37, 38)} 외과병리학 분야에서의 종양의 DNA증식과 ploidy 분석에 이용도가 높아지고 있다^{39, 40)}. 각종 검사실에서도 유용하게 사용되는데 임상검사실에서는 주로 채취된 혈액내 존재하는 망상적혈구(reticulocyte)의 수를 결정하는데 사용되고^{41, 42)}, 혈액 연구실에서 백혈병과 임파종양의 표면마커(surface marker)의 분석 뿐아니라 세포핵 내의 항원에 관한 연구에 이용하고 있으며^{43, 44)} 면역학 연구실에서는 자가항체의 확인에 사용되어 기존의 면역형광법 또는 방사면역분석법 들보다 더 객관적인 정보를 얻는데 사용한다⁴⁵⁾. 특히 유세포분석을 이용한 큰 발전은 세포의 표면마커의 측정에 있어서 표준화를 이루었다는 점이다. 실험자의 손으로 이루어지는 면역글로블린과 sheep E-rosettes에 의한 T 임파구와 B 임파구의 확인법도 어느정도 표준화되어 있지만 각 실험실 간의 결과에는 거의 연관성이 없다. 그러나 표준 단일클론항체와 유세포분석기에 의해 확인되는 세포의 수는 실험실 간의 차이가 거의 없다^{46, 47)}.

유세포분석기를 이용하여 치수조직의 임파구 분석을 시행하는 경우 전체조직세포수에 대한 임파구의 비율을 얻을 수 있지만 T 임파구 아

군집에 대한 보다 정확한 측정을 위해 임파구 영역을 gating하여 gated area내의 비율을 구한다. Mangkornkan 등²⁵⁾은 정상치수의 유세 포분석을하여 B 임파구를 확인할 수 없었고 T 임파구의 비율이 1-2% 정도로 확인하였으나, 본 실험에서는 대부분의 임파구의 비율은 1% 미만으로 나타났다.

T 임파구의 아군집인 T helper (Th)세포와 T suppressor/cytotoxic(Ts/c)세포는 면역 반응에서 서로 다른 기능을 한다. Ts/c 세포는 면역반응을 억제하는 기능을 갖으며, 또한 바이러스, 세포내 세균 등과 같이 병원성미생물이 항체의 공격으로 보호되는 숙주세포내에서 증식하기 전에 숙주세포를 공격하여 숙주세포가 cell-death 프로그램에 의해 죽게하는 역할도 하므로 effector cell이라고도 한다. Th 세포는 세포 밖의 미생물에 작용하는데 그 역할에 따라 대식세포를 활성화시켜 미생물을 소화하게하는 Th1 세포와, B 세포를 증식시켜 항체를 생산하게 하는 작용을 하는 Th2 세포로 세분된다⁴⁸⁾. antigen-presenting cell에 의해 활성화된 Th 세포는 자신과 다른 T 세포를 활성화시켜 interleukin-2를 분비하게하며 B 세포와 항원과의 반응을 촉진시켜 체액성면역반응을 촉진시킨다. Th 세포와 Ts/c 세포는 작용하는 세포의 항원을 펩타이드 절편의 형태로 인식하는데 MHC(major histocompatibility complex) 물질이 매개하고 이 때 CD4, CD8항원은 각각 Th 세포와 Ts/c 세포에서 공동수용체(co-receptor) 역할을 하게 된다. 따라서 CD4/CD8의 비는 T 임파구의 면역반응에서의 조절 균형을 반영한다. Torabinejad와 Kottering²⁾, Kopp와 Schariting⁴⁹⁾의 연구와 더불어 오 등⁵⁰⁾은 치근단병소의 유세포분석을 한 결과 치근단낭종과 치근단육아종 내의 Th/Ts/c (CD4/CD8)의 비가 달라진단에 이용할 수 있는 가능성을 제시하였다. Mangkornkan 등²⁵⁾의 유세포분석기를 이용한 연구에서는 정상치수에 있어서 CD4/CD8의 비가 1.2로 보고되었고, Jontell 등¹²⁾과 Hahn 등¹³⁾은 단일클론항체와 광학현미경을 통해 1/2로 보고하였다. 그러나 본 실험에서는 치수조직 내의 T임파구의 비율은 매우 작아 각 개개의

증례에서의 CD4/CD8의 비를 구하기는 적당하지 않았으나, 평균값을 이용한 CD4/CD8의 값은 정상치수에서는 0.93, 가역성치수염군에서는 1.05, 비가역성치수염군에서는 2.27로 나타났다. 임상적증상에 따라 치수조직을 구분하고 단일클론항체와 면역조직화학적방법으로 염색하여 임파구의 분포를 관찰한 이 등¹⁵⁾의 연구에서는 정상치수는 0.27, 급성증상군은 0.05, 만성증상군은 0.69의 수치를 보였고, Hahn 등¹³⁾의 연구에서는 정상치수가 0.26, 가역성치수염증상의 치수에서는 0.56, 비가역성치수염증상의 치수에서는 1.14의 값을 얻어 본 연구와는 차이를 보였다. 이러한 차이의 이유로는 유세포분석이 실험실 간의 표준화로 기존의 임파구 확인법에 비해 객관성을 제공하고 있지만 현미경을 이용한 육안적인 확인이 불가능하므로 확인하고자하는 임파구의 비율이 매우 작은 치수조직에서는 다른 종류의 세포에서 표면항원과 항체반응이 일어나게 되면 한 개 세포의 차이라도 CD4/CD8의 값에 큰 영향을 미치기 때문에 사료된다. 그러나 염증성 증상이 심해질수록 CD4 세포의 수가 CD8 세포의 수보다 상대적으로 더 많이 증가함은 본 연구와 일치된다. 즉 염증의 초기에는 미생물에 감염된 세포에 직접 작용하는 세포성 면역반응이 일어나고 치수 내 염증이 진행되면서 antigen-presenting cell에 의해 활성화된 Th 세포가 유도하는 체액성 염증반응이 더 우세함을 보여준다.

Jontell 등¹²⁾의 연구와 유세포분석기를 이용한 Mangkornkan 등²⁵⁾의 연구에서는 정상치수에서 B 임파구가 발견되지 않았고, Hahn 등¹³⁾의 연구에서도 정상치수에서 T 임파구에 비해 B 임파구가 극히 적은 수로 나타난다고 하였다. 그러나 본 연구에서는 염증성치수뿐아니라 정상치수에서도 B 임파구가 발견되었는데 그 이유는 병리조직학적 소견과 무관하게 임상적증상으로부터 정상치수를 선택한 점과 치수조직의 전체 세포 수 5000개 중 10개 내외의 임파구 수는 유세포분석의 허용오차 범주 내에 속할 수 있는 점을 지적할 수 있다. 그러나 역시 적은 양이지만 정상치수보다 가역성치수염증상의 치

수에서 B 임파구의 수가 증가되었음은 분명히 확인할 수 있었고 가역성치수염증상의 치수에서는 T 임파구보다 B 임파구가 더 많이 확인되었다. 그러므로 적은 양의 B 임파구의 정확한 확인을 위해서는 정밀한 세포염색법과 유세포 분석프로그램개발 등의 연구가 필요할 것으로 사료된다. 그러나 T, B 임파구의 침윤이 많은 염증성 치수에서는 5000개의 치수 세포 중 많게는 100개 이상 확인되기도 했는데, 조직 절편을 현미경으로 관찰하여 확인하기에는 그 수가 많은 이런 증례에서는 현재의 유세포분석이 간편하며 정확하다고 사료된다.

유세포분석기를 이용하여 정상치수의 임파구 분포를 연구한 Mangkornkan 등²⁰⁾의 연구에서 제 3대구치를 발거하여 치수조직을 얻은 것과는 달리 본 연구에서는 통상의 근관치료 중에서 치수조직의 발수과정을 통해 얻었다. 이 경우 임상증상을 비교적 정확히 얻을 수 있고 살아 있는 조직을 비교적 빠른 시간에 적출하여 실험할 수 있다는 장점이 있고, 발수과정에서 치수조직이 변형되거나 전체 조직을 얻지 못할 경우 적출한 조직이 전체 조직을 대표할 수 없는 단점이 있다.

본 연구에서 치수조직을 각 실험군으로 분류한 기준은 동통을 비롯한 임상적 증상이다. Baume⁵¹⁾이나 Lundy 등⁵²⁾, Garfunkel 등⁵³⁾의 연구는 치수의 조직학적 진단과 임상적 진단 사이에 절대적 연관성은 없다고 보고하였지만, Cohen 등⁵⁴⁾의 연구에서는 동통은 다른 증상 (sign & symptom)과 더불어 치수의 상태를 나타내 주는 완전한 지표는 아니지만 적절히 진단에 이용할 수 있다고 보고되었는데 본 연구에서도 임파구의 침윤 정도와 동통과의 연관성을 유의하게 규정할 수는 없었으나 동통 등 임상적 증상이 심화될수록 임파구 침윤의 평균이 높아지는 것을 확인할 수 있었다. 비가역성치수염군의 임파구의 비율이 정상치수군과 가역성치수염군의 임파구 비율에 비해 통계적으로 유의하게 높지 않은 이유는 염증이 상당히 진행된 경우라도 염증 세포의 침윤뿐 아니라 만성치수염의 특징인 다양한 정도의 석회화, 섬유화, 국소농양 등의 부위가 치수

조직 내에 많은 부분을 차지하여⁵⁵⁻⁵⁹⁾ 분석 가능한 임파구의 절대수가 적었기 때문으로 사료된다.

본 실험에서는 임상적 증상에 의해 치수병변의 진단을 내린 후 치수를 발수하여 단일세포현탁액을 만들고 단일클론항체와 유세포분석기를 이용하여 임파구 분포를 비교한 결과 치수의 염증상태에 따라 임파구 분포 양상이 달라지는 것을 볼 수 있었다. 그러나 대부분의 치수조직 내의 임파구의 비율이 작기 때문에 치수 병변 상태의 진단을 위해 임파구 분포의 유세포분석을 단독으로 이용하기는 어려워 보이며 이를 위해서는 다양한 방법을 통한 치수 면역반응의 연구와 유세포분석의 프로그램개발이 필요할 것이다.

V. 결 론

본 연구는 정상치수와 염증성치수조직 내의 임파구 분포를 관찰하고 치수의 염증상태에 따른 차이를 규명하기 위하여 근관치료 전에 임상적 증상에 따라 정상치수, 가역성치수염 그리고 비가역성치수염으로 진단하고 발수한 치수조직을 실험대상으로하여 각 시편을 collagenase로 단일세포현탁액을 만든후 단일클론항체와 FACStar puls(BD Co.)유세포분석기를 이용하여 각 실험군의 치수조직 내의 T 임파구, B 임파구, T helper (CD4+)세포 그리고 T suppressor /cytotoxic (CD8+)세포의 분포를 측정, 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 대부분의 정상치수 및 염증성 치수에서 T 임파구, B 임파구, T helper 세포와 T suppressor/cytotoxic 세포의 치수조직 내의 비율은 1% 미만이었다.
2. 정상치수와 가역성 치수염 증상을 보이는 치수에 비해 비가역성 치수염 증상을 보이는 치수에서 T, B, T helper 세포와 T suppressor/cytotoxic 세포들의 평균 비율은 더 증가되었으나 통계적 유의성은 없었다. ($p > 0.05$)
3. 염증성 치수에서는 T helper (CD4+) 세

포가 T suppressor/cytotoxic (CD8+) 세포보다 더 많은 비율로 확인되었다.

V. 참고 문헌

1. Torabinejad, M., Bakland, L.K. : Immunopathogenesis of chronic periapical lesions. *Oral Surg.* 46 : 685-699, 1978.
2. Torabinejad, M., Kettering, J.D. : Identification and relative concentration of B and T lymphocytes in human chronic periapical lesions. *J. Endodon.* 11 : 122-125, 1985.
3. 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.
4. Cymerman, J.J., Cymerman, D.H., Walters, J., Nevins, A.J. : Human T lymphocyte subpopulations in chronic periapical lesions. *J. Endodon.* 10 : 9-11, 1984.
5. 백승호 : 실험적 치수 및 치근단 병소에서의 면역글로불린 G 아강 분포에 관한 면역조직화학적 연구. *대한치과보존학회지.* 16 : 41-59, 1985.
6. Honjo, H., Tsubakimoto, K., Utsumi, N., Tsutsui, M. : Localization of plasma proteins in the human dental pulp. *J. Dent. Res.* 49 : 888, 1970.
7. Pulver, W.H., Taubman, M.A., Smith, D.J. : Immune components in normal and inflamed human dental pulp. *Arch. Oral Biol.* 22 : 103-111, 1977.
8. Speer, M.L., Madonia, J.V., Heuer, M.A. : Quantitative evaluation of the immunocompetence of the dental pulp. *J. Endodon.* 3 : 418-23, 1977.
9. Pekovic, D.D., Fillery, E.D. : Identification of bacteria in immunopathologic mechanisms of human dental pulp. *Oral Surg.* 57 : 652-61, 1984.
10. Eleazer, P.D., Farber, P.A., Seltzer, S. : Lack of lymphocyte stimulation by root canal products. *J. Endodon.* 1 : 388-94, 1975.
11. Khler, G., Milstein, C. : Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 256 : 495-497, 1975.
12. Jontell, M., GunRaj, M.N., Bergenholtz, G. : Immunocompetent cells in the normal dental pulp. *J. Dent. Res.* 66 : 1149-1153, 1987.
13. Hahn, C.L., Falkler, W.A., Siegel, M.A. : A study of T and B cells in pulpal pathosis. *J. Endodon.* 15 : 20-26, 1989.
14. Okiji, T., Kawashima, N., Kosaka, T., Matsumoto, N., Kobayashi, C., Suda, H. : An immunohisto-chemical study of the distribution of immunocompetent cells, especially macrophages and Ia Antigen-expressing cells of heterogeneous populations, in normal rat molar pulp. *J. Dent. Res.* 71 : 1196-1202, 1992.
15. 이우철 : 비가역성 치수염의 임상증상에 따른 임파구 분포에 관한 연구. *대한치과보존학회지.* 20 : 235-249, 1995.
16. Keren, D.F., Hanson, C.A., Hurtubise, P.E. : Flow Cytometry and Clinical Diagnosis ASCP 1-55, 1993.
17. Lovett, E.J., Schnitzer, B., Keren, D.F., Flint, A., Hudson, J.L. & McClatchey, K.D. : Application of flow cytometry to diagnostic pathology. *Lab. Invest.* 2 : 115-140, 1884.
18. Melamed, M.R., Mullaney, P.F. & Mendelsohn, M.L. : Flow cytometry and sorting. John Wiley & Sons, 177-189, 1979.
19. 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.
20. Shapiro, H.M. : Practical Flow Cytometry. 2nd ed/ New York : Alan R. Liss, Inc.,

- 1988.
21. Bang, G., Donath, K., Thoresen, S., Clausen, O.P. : DNA flow cytometry of reclassified subtypes of malignant salivary gland tumors. *J. Oral Pathol. & Med.* 23(7) : 291-7, 1994.
 22. Monasebian, D.M., Ruskin, J.D. : Flow cytometric analysis of squamous cell carcinoma of the tongue. *J. Oral & Maxillofacial Surg.* 52(6) : 574-8 ; discussion 578-9, 1994.
 23. Monasebian, D.M., Ruskin, J.D., Pirruccello, S.J. : Flow cytometric analysis of posterior oropharyngeal tumors. *J. Oral & Maxillofacial Surg.* 51(3) : 292-7, 1993.
 24. Kimura, S., Yonemura, T., Hiraga, T., Okada, H. : Flow cytometric evaluation of phagocytosis by peripheral blood polymorphonuclear leucocytes in human periodontal diseases. *Arch. Oral Biol.* 37(6) : 495-501, 1992.
 25. Mangkornkarn, C., Steiner, J.C., Bohman, R., Lindemann, R.A. : Flow cytometric analysis of human dental pulp tissue. *J. Endodon.* 17 : 49-53, 1991.
 26. Moretta, L., Webb, S.R., Grossi, C.E., Lyndard, 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.
 27. Hayward, A.R., Layward, L., Lyndard, P.M., Moretta, L., Dagg, M., Lawton, A.R. : Fc-receptor heterogeneity of human suppressor T cell. *J. Immunol.* 121 : 1-5, 1978.
 28. Abramson, N., Gelfand, E.W., Jandle, J.H. : The interaction between human monocytes and red cells. Specificity for IgG subclass and IgG fragments. *J. Exp. Med.* 132 : 1207-1218, 1970.
 29. Yodoi, J., Isthizaka, K. : Lymphocytes bearing Fc receptor for IgE. I. presence of human and rat T lymphocytes with Fc receptors. *J. Immunol.* 123 : 455-462, 1980.
 30. Lum, L.G., Muchmore, A.V., Keren, D.F. : A receptor for IgA on human T lymphocytes. *J. Immunol.* 122 : 65-69, 1979.
 31. Whiteside, T.L. : Basic techniques for the detection of human T and B lymphocytes in tissues. *Clin. Immunol. News* 1 : 1-15, 1980.
 32. Brubaker, S.B., Whiteside, T.L. : Localization of human T lymphocytes in tissue sections by a resetting technique. *Am. J. Pathol.* 88 : 323-332, 1977.
 33. Sakamoto, H., Oda, T. : Studies of human lymphocytes in frozen tissue section. Viability and spontaneous rosette formation with sheep erythrocytes. *J. Immunol. Methods* 26 : 325-335, 1979.
 34. Grossi, C.E., Webb, S.R., Zicca, A. : Morphological and histochemical analyses of two human T-cell subpopulations bearing receptors for IgM or IgG. *J. Exp. Med.* 147 : 1405-1417, 1978.
 35. Foon, K.A., Todd, F.R. : Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood.* 68 : 1-30, 1986.
 36. Hanson, C.A., Gajl-peczalska, K.J. : Monoclonal antibodies to lymphoreticular and myeloid antigens, in Wick MR, Segal GP (eds) : *Diagnostic Use of Monoclonal Antibodies in Clinical Immunohistochemistry.* New York : Marcel Dekker, 147-226, 1988.
 37. Gupta, S., Good, R.A. : Markers of human lymphocyte subpopulations in primary immunodeficiency and lymphoproliferative disorders. *Semin Hematol* 17 : 1-29, 1980.
 38. Kornfield, H., Vande Stowe, R.A., Large, M. : T-lymphocyte subpopulations in homosexual men. *N. Engl. J. Med.* 307 : 729-731, 1982.

39. Coon, J.S., Landay, A.L., Weinstein, R.S. : Advances in flow cytometry for diagnostic pathology. *Lab. Invest.* 57 : 453-479, 1987.
40. Eliassen, C.A., Opitz, L.M., Vamvakas, C. : Flow cytometric analysis of DNA ploidy and S-phase fraction in breast cancer using cells obtained by ex vivo fine-needle aspiration. An optical method for sample collection. *Mod. Pathol.* 4 : 196-200, 1991.
41. Furguson, D.J., Lee, S.F., Gordon, P.A. : Evaluation of reticulate counts by flow cytometry in a routine laboratory. *Am. J. Hematol.* 33 : 13-17, 1990.
42. Davis, B.H., Bigelow, N.C. : Flow cytometric reticulocyte quantification using thiazole orange provides clinically useful reticulocyte maturity index. *Arch Pathol. Lab. Med.* 113 : 684-689, 1989.
43. Urbano-Ispizua, A., Matutes, E., Villamor, N. : The value of detecting surface and cytoplasmic antigens in acute myeloid leukemia. *Br. J. Hematol.* 81 : 178-183, 1992.
44. Almasri, N.M., Iturraspe, J.A., Benson, N.A. : Flow cytometric analysis of terminal deoxynucleotidyl transferase. *Am. J. Clin. Pathol.* 95 : 376-380, 1991.
45. Veys, A., Gutteridge, C.N., Macey, M. : Detection of granulocyte antibodies using flow cytometric analysis of leukocyte immunofluorescence. *Vox sang* 56 : 42-47, 1989.
46. Homburger, H.A., McCarthy, R., Deodhar, S. : Assessment of interlaboratory variability in analytical cytology. *Acta Paediatr.* 81 : 125-132, 1992.
47. Kotylo, P.K., Sample, R.B., Redmond, N.L. : Reference ranges for lymphocyte subsets. A comparison of standard vs. rapid whole-blood lysis techniques. *Arch Pathol. Lab. Med.* 115 : 181-184, 1991.
48. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roeberts, K., Watson, J.D. : Molecular biology of the cell. Garland Pub. 3rd ed. 1197-1246, 1994.
49. Kopp, W., Schwarting, R. : Differentiation of T lymphocyte subpopulation, macrophages and HLA-DR-restricted cells of apical granulation tissue. *J. Endodon.* 2 : 72-75, 1989.
50. 오태석 : 유세포분석기를 이용한 치근단병소의 임파구조성 및 cycling cell 분포에 관한 연구 대한치과보존학회지. 18 : 317-340, 1993.
51. Baume, L. : Diagnosis of diseased of the pulp. *Oral Surg.* 29 : 102-116, 1970.
52. Lundy, J., Stanley, H.R. : Correlation of pulpal histopathology and clinical symptoms in human teeth subjected to experimental irritation. *Oral Surg.* 27;187, 1969.
53. Garfunkel, A., Sela, J., Ulmansky, M. : Dental pulp pathosis. Clinicopathologic correlations based on 109 cases. *Oral Surg.* 35 : 110-117, 1973.
54. Cohen, J.S., Reader, A.L., Fertel, R., Beck, F.M., Meyers, W.J. : A radioimmunoassay determination of the concentrations of prostaglandins E2 and F2 in painful and asymptomatic human dental pulps. *J. Endodon.* 11 : 330-335, 1985.
55. Seltzer, S. : Classification of pulpal pathosis. *Oral Surg.* 34 : 269-287, 1972.
56. Seltzer, S., Bender, I. : The dental pulp. Philadelphia;Lippincott, 315-37, 1975.
57. Bender, I., Seltzer, S. : The effect of periodontal disease on the pulp. *Oral Surg.* 33 : 458-74, 1972.
58. Morse, D., Seltzer, S., Siani, S., Biron, G. : Endodontic classification. *J. Am Dent. Assoc.* 94 : 685-9, 1977.
59. Mendoza, M.M., Reader, A., Meyers, W.J., Marquard, J.V. : An ultrastructural investigation of human apical pulp in irreversible pulpitis. II. Vasculature and connective tissue. *J. Endodon.* 13 : 318-27, 1987.