

흰 쥐 치아 재식 후 치수 치유 양상의
조직학적 및 면역조직화학적 관찰

연세대학교 대학원

치 의 학 과

고 은 진

흰 쥐 치아 재식 후 치수 치유 양상의
조직학적 및 면역조직화학적 관찰

지도 이 승 중 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2010년 6월 일

연세대학교 대학원

치 의 학 과

고 은 진

고은진의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2010년 6월 일

감사의 글

지난 보존과 생활을 통하여 저는 치의학이라는 학문을 더 많이 그리고 더 깊이 배울 수 있었습니다. 그리고, 다양한 경험과 지식을 배울 수 있었던 소중한 시간이었던 것 같습니다. 특히, 이번 논문 작업은, 그 동안 가볍게 읽었던 한 편의 논문이 실은 얼마나 많은 사람들의 노고가 깃들은 것들이었는지를 느낄 수 있었던 뜻 깊은 기회였습니다.

제가 보존과 수련을 시작했을 때부터, 실험 과정, 논문 완성에 이르기까지 항상 올바른 길로 방향을 제시해 주시고 자상하게 지도해주고 가르침을 주신 이승종 교수님께 진심으로 감사를 드립니다. 또한, 바쁘신 와중에도 기꺼이 실험을 도와주시고, 논문 심사를 맡아주신 김의성 교수님과 정한성 교수님께 진심으로 감사 드립니다.

그리고 이번 논문이 나올 수 있었던 것은, 학위 과정 동안 소중한 가르침을 주신 이찬영 교수님, 노병덕 교수님, 박성호 교수님, 정일영 교수님, 공형규 교수님, 박정원 교수님, 신수정 교수님이 계셨던 덕분인 것 같습니다. 진심으로 감사 드립니다.

어려운 보존과 수련기간 동안 나오되지 않고 잘 지낼 수 있었던 것은 동기들, 선배님들, 후배님들의 도움이 있었기 가능한 일이었습니다. 무엇보다도 항상 기꺼운 마음으로 도움을 준 태선이, 감운이, 언제나 든직한 도움을 준 선일이, 정현이, 오현이, 창원 오빠 등 동기들에게 감사를 드립니다. 그리고, 힘든 쥐 실험을 도와주었던 여러 인턴 선생님들, 특히 실험에 큰 도움을 주신 조직학 교실 이민정 선생님께도 감사를 드립니다.

마지막으로 항상 저에게 마음으로 큰 힘이 되어주시는 사랑하는 어머니와 하늘에 계신 아버지께 감사를 드립니다. 바쁜 와중에도 잊지 않고 동생을 챙겨주는 오빠와 은화언니, 그리고 사랑하는 조카인 재원이와 준원이에게도 고마운 마음을 전합니다.

2010년 6월

저자 씀

차 례

그림 차례	ii
표 차례	iii
국문요약	iv
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	6
1. 실험 동물의 전 처치 및 치아 재식	6
2. 실험 동물의 희생 및 표본 제작	6
3. 면역조직화학적 분석 (Immunohistochemical analysis)	8
III. 결과	9
IV. 고찰	23
참고 문헌	31
Abstract	38

그림 차례

Fig. 1. Control tooth(2w-1-c)	10
Fig. 2. 3 days after replantation(3d-4)	12
Fig. 3. 5 days after replantation(5d-4)	14
Fig. 4. 5 days after replantation(5d-3)	15
Fig. 5. 1 week after replantation(1w-4)	17
Fig. 6. 2 week after replantation(2w-3)	19
Fig. 7. 4 week after replantation(4w-1)	21
Fig. 8. 4 week after replantation(4w-5)	22
Fig. 9. 4 week after replantation(4w-6)	22

표 차 례

Table 1. 실험군 및 대조군.....	7
-------------------------	---

국 문 요 약

흰 쥐 치아 재식 후 치수 치유 양상의 조직학적 및 면역조직화학적 관찰

본 연구의 목적은 흰 쥐(rat)를 이용하여 미성숙 단계의 치아를 발치 후 즉시 재식 하였을 때 나타나는 치수의 치유 양상을 조직학적 및 면역조직화학적으로 관찰하고자 함이었다. 생후 4주된 암컷 Sprague-Dawley 계 흰쥐의 상악 우측 제 1 대구치를 발거 후 원래의 치조골와 내로 위치시켰다. 그리고 재식 후 3일, 5일, 1주일, 2주일, 4주일 후 희생하여 조직학적 및 면역조직화학적으로 관찰하였다. 면역조직화학적 관찰을 위하여 odontoblast의 표지자인 nestin을 이용하였다. 재식 후 3일 쯤부터 국소적으로 치수 내 염증 소견이 관찰되었으나, 치근 부위에서는 이미 치수의 재혈관화 및 치유가 진행되고 있는 소견이 관찰되었다. 재식 후 5일쯤부터는 odontoblast-like cell이 관찰되기 시작하였다. 삼차 상아질의 형성은 재식 후 1주 쯤부터 관찰되기 시작하였으며, 2주 쯤부터는 확실히 관찰할 수 있었다. Odontoblast-like cell 및 삼차 상아질 형성은 4주째까지도 계속 관찰되었다. 재식 후 4주째에는 bone-like tissue 및 cementum-like tissue이 형성되었음을 관찰하였다. 본 실험을 통하여 흰 쥐 치아 재식 시 석회화 과정은 초기에는 삼차 상아질 침착에 의해서 진행되나, 시간이 경과하면서 점차 bone-like tissue 또는 cementum-like tissue가 차지하는 비율이 증가하는 것을 관찰하였다.

핵심되는 말 : 삼차상아질, 골, 치수 치유, 치아 재식, 쥐

흰 쥐 치아 재식 후 치수 치유 양상의 조직학적 및 면역조직화학적 관찰

지도교수 <이 승 중>

연세대학교 대학원 치의학과

고 은 진

I. 서 론

치아의 치수-상아질 복합체(pulp-dentin complex)는 치아에 외부 자극이 가해졌을 때 발생한 손상을 스스로 치유할 수 있는 능력이 있는 조직이다. 예를 들어 치아 마모, 치아 우식, 수복 치료시의 와동 형성 등의 자극은 치수 조직에 가역적 및 비가역적 손상이 일으키는데, 치수 조직은 이러한 손상에 대하여 치수의 생활력과 기능을 유지하기 위한 반응을 나타낼 수 있다. 그 결과 치수 조직은 치유 과정을 통해 생활력을 회복하게 되며, 특히 손상 받은 odontoblast가 회복되면 치아의 석회화가 지속될 수 있게 된다(About, Bottero, et al., 2000; Chiego, 1992; Goldberg et al., 2008; Harada et al., 2008; Hirata et al., 2005; Kuratate et al., 2008; Ohshima, Nakakura-Ohshima, Yamamoto, and Takeyasu, 2001). 이는, odontoblast의 주된

역할이 전상아질 및 상아질의 기질(collagen, proteoglycans)를 생산하고, 칼슘 이온을 운반하여 전상아질 및 상아질의 석회화를 일으키는 것이기 때문에 나타나는 현상이다(Linde, 1995). 이 경우 치아의 석회화는 주로 삼차 상아질(tertiary dentin)이 침착되어 나타난다. 삼차 상아질은 상아세관이 매우 불규칙적인 것이 특징이며, 삼차 상아질의 상아세관은 이차 상아질과 연속되지 않는 것이 보통이다. 이러한 특징은 외부로부터 유해한 물질이 상아세관을 통해 치수조직으로 전달되지 않도록 보호하는 작용을 한다(Smith, 2002). 따라서, 삼차 상아질의 형성은 치수 조직에서 일어나는 방어 기전의 하나로 설명할 수 있다.

삼차 상아질은 삼차 상아질을 형성하는 세포와 그 형태에 따라 다시 반응성 상아질(reactionary dentin)과 수복 상아질(reparative dentin)로 구분될 수 있다. 만약, 자극이 odontoblast의 파괴를 일으킬 정도로 크지 않다면, odontoblast는 결국 살아남을 수 있게 된다. 오히려 자극에 의해 이전 상태보다 더 활성화되어 반응성 상아질을 활발하게 형성하게 된다. 따라서 반응성 상아질이 매우 빠르게 생성되고 침착되어 치아의 석회화가 진행된다. 또한, 원래 치수 내에 존재하였던 odontoblast에 의하여 형성되기 때문에 상아세관은 보통 이차상아질과 연결되어 나타나는 특징을 보인다(Stanley and Ranney, 1962). 그러나 만약 자극의 강도가 커서 odontoblast가 살아남지 못하게 되는 경우에는 odontoblast 대신 odontoblast-like cell이 새롭게 분화되어, 이들에 의해 수복 상아질이 형성되게 된다. 수복 상아질은 반응성 상아질과 달리 그 형태가 매우 다양한 것이 특징이다. 상아세관이 규칙적으로 형성되어 있기도 하고, 매우 불규칙적인 형태나 상아세관이 없는 형태로도 나타

나며, 때로는 상아기질 내에 세포가 함입되어 있기도 하는 등 매우 다양한 양상으로 나타난다(Smith, 2002).

이러한 치수의 치유 반응이 치아 재식이나 치아 이식 등과 같이 매우 높은 강도의 충격이 가해졌을 때에도 일어날 수 있음이 보고되고 있다(Andreasen et al., 1995; Hasegawa et al., 2007; Hosoya et al., 2007; Hosoya et al., 2003; Nakakura-Ohshima et al., 2003; Ogawa et al., 2006; Ohshima, Nakakura-Ohshima, Yamamoto, and Maeda, 2001; Shimizu et al., 2000; Takamori et al., 2008; Unno et al., 2009). 치아 재식은 발거된 치아를 원래의 치조골외에 재위치 시키는 방법으로, 통법의 근관 치료가 실패하고 해부학적인 어려움으로 인하여 정상적인 치근단 수술을 시행하기 어려운 경우나, 안면외상 등의 이유로 치아가 완전 탈구된 경우에 시행하는 술식이다. 한편, 치아 이식은 상실된 치아를 수복하기 위한 방법의 하나로 치과 영역에서 이루어지는 치료 술식이다. 이러한 치아 재식이나 치아 이식은 모두 그 과정 중에 치아의 완전 탈구가 일어나며, 특히 생활치아가 완전 탈구 되었을 때에는 신경과 혈액 공급이 차단되어 치수 조직에 큰 충격이 가해지게 된다. 이로 인하여 치수에는 급성 염증 반응이 나타나며 odontoblast는 파괴적 변화를 보이게 된다. 그러나, 바로 치아를 재식 혹은 이식하면 치근단공을 통하여 치수조직이 재신경화, 재혈관화 및 재생이 되어 치유가 일어날 수 있음이 보고되고 있다. Byers(1992)와 Kvinnsland(1991)는 쥐의 치아를 재식한 후에 치수 조직이 재신경화 됨을 보고하였으며, Shimizu(2000), Ohshima(2001), Nakakura-Ohshima(2003), Tsukamoto-Tanaka(2006), Hasegawa(2007)은 치아 재식 혹은 이식 후에는 치수 조직이 일시적

으로 급성 염증을 보이지만, 그 이후에는 재혈관화가 일어나고 치수 조직이 치유됨을 보고하였다. 그리고, Andreasen(1995)은 사람의 치아에서도 완전 탈구된 치아를 재식 하였을 때 치수의 치유가 일어남을 임상적으로 보고하였다.

이렇게 치아 재식이나 치아 이식 후에 치수가 치유되면, 치수 조직의 기능이 재개되어 치아의 경조직이 계속 생성되고, 그 결과 치아의 석회화가 일어난다. 그리고, 치아 재식이나 치아 이식 후에 형성되는 경조직은 조직학적으로 주로 삼차 상아질 또는 골조직으로 구성되어 있다고 보고되고 있다(Hosoya et al., 2007; Nakakura-Ohshima et al., 2003; Ogawa et al., 2006; Ohshima, Nakakura-Ohshima, Yamamoto, and Maeda, 2001; Shimizu et al., 2000; Takamori et al., 2008; Tsukamoto-Tanaka et al., 2006; Unno et al., 2009). 이 중 삼차 상아질은 반응성 상아질 보다는 주로 수복 상아질의 형태로 나타난다. 수복 상아질이 형성되는 기전은 다음과 같이 설명된다. 손상을 받은 odontoblast가 생존하지 못하게 되면, 치수의 간엽세포들로부터 odontoblast-like cell이 새롭게 분화되고, 이들에 의해 수복 상아질이 형성된다는 것이다(Smith, 2002). 한편, 골 조직을 형성하는 세포의 기원에 대하여는 두 가지 가능성이 있다(Shimizu et al., 2000). 골 조직을 만드는 osteoblast가 치주 세포에서 유래되었을 가능성과 치수 간엽세포에서 유래되었을 가능성이다(Ogawa et al., 2006; Tsukamoto-Tanaka et al., 2006). 이렇게 치아의 석회화가 계속 일어날 수 있다는 것은 임상적으로 의미가 있다. 이것은 미성숙영구치에서 치근의 발육이 계속 진행될 수 있고, 상아질에 석회화 조직이 침착되어 남아있는 치근이 강화될 수 있다는 의미이기 때문이다(Kvinnsland et al., 1991).

최근, 미성숙 영구치아의 근관 치료시의 경향은 치근의 두께 및 길이 성장이 계속적으로 일어날 수 있도록 치근의 발육을 유도하는 방향으로 전환되고 있다 (Hargreaves et al., 2008). 단순히 치근단공을 폐쇄하는 개념의 apexification 보다는 생활력이 있는 치수조직을 남겨두어 계속적으로 치근 발육이 일어나도록 유도하는 apexogenesis가 치아의 장기적인 예후로 보았을 때 더 유리할 것이다. 또한, 생활력을 상실한 괴사치수를 가진 치아의 경우도 재혈관화를 통하여 치수조직이 재생되어 치근 발육 및 지속적인 석회화 조직 침착이 이루어질 수 있다고 보고되고 있다 (Banchs and Trope, 2004; Chueh and Huang, 2006; Iwaya et al., 2001; Jung et al., 2008; Thibodeau and Trope, 2007). 그러나, 각각의 술식 후에 치수가 치유되는 양상이나, 생성되는 석회화 조직이 조직학적으로 어떻게 구성되어있는지에 대한 연구는 아직 부족하다.

본 연구에서는 흰 쥐(rat)의 상악 우측 제 1 대구치를 이용하여 미성숙 단계의 치아를 발치 후 즉시 재식 한 뒤 나타나는 치수의 치유 양상을 조직학적으로 관찰하고자 하였다. 그리고, odontoblast의 marker인 nestin을 이용하여 면역조직화학적으로 관찰하고자 하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험 동물의 전 처치 및 치아 재식

본 실험에서는 생후 4주된 체중 100gm 내외의 암컷 Sprague-Dawley 계 흰쥐 25마리를 이용하였다.

마취는 Tiletamine(Zoletil50, Virbac, Carros, France) 1cc를 이용하여 복강내 주사하였다. 마취가 유도된 후 날카로운 탐침으로 상악 우측 제 1 대구치의 peritomy를 시행하였다. 그 후 조직 겸자를 이용하여 치관을 잡고 최소한의 외상을 가하면서 상악 우측 제 1 대구치를 발거하였다. 발거 후 치아를 원래의 치조골와 내로 위치시켰다. 발거치의 구강외 시간은 5초 이내가 되도록 조절하였다. 치아 재식 후 위치 유지를 위한 특별한 고정방법은 사용하지 않았으며 쥐에게는 1주일간 항생제 (Amoxicillin 0.5g/100g)가 든 사료를 공급하였다. 단, 3일 후, 5일 후에 희생하는 실험군에는 희생하는 날까지 항생제가 든 사료를 공급하였다.

2. 실험 동물의 희생 및 표본 제작

치아 재식을 시행한 쥐는 조직학적 관찰을 위해 순차적으로 희생하였다. 각 실험군은 치아 재식 시행한 3일, 5일, 1주, 2주, 4주 후 희생하였다. 각각 5마리씩 5개의 실험군을 설정하였고, 5일 후 군은 한 마리가 재식 후 사망하여 4마리로 설정하였으며, 4주후 군은 6마리로 설정하였다. 각 군에서 한 마리씩 상악 좌측 제 1 대구치를 대조군으로 설정하였다. <Table 1>

희생 시 Tiletamine(Zoletil50, Virbac, Carros, France) 1cc 로 복강내 주사하였다. 마취가 유도된 후에는 가슴을 절개하여 심장을 노출시킨 후 좌심실에 23G 주사기를 삽입시키고 동물의 피를 흘러버린뒤 4% paraformaldehyde(0.1M phosphate buffer, pH 7.4)로 심장을 통해 관류 고정하였다. 그 후 en bloc으로 상악골을 적출하였다. 적출된 상악골은 2일 이상 4% paraformaldehyde (0.1M phosphate buffer, pH 7.4)에 담가 고정한 후 5% nitric acid에서 5일간 탈회하였다. 탈회 후 상악골을 절단하였다. 실험군은 우측 제 1 대구치와 제 2 대구치를 중심으로 절단하였고, 대조군은 좌측 제1 대구치를 중심으로 절단하였다. 그 후 절단편을 파라핀에 포매하였다. Microtome을 이용하여 시상면 방향으로 4um 두께로 절단한 후 슬라이드를 제작하였다. 제작한 슬라이드는 hematoxylin과 eosin으로 염색을 시행하였다. 염색을 시행한 후 조직 소견을 광학현미경 하에서 관찰하였다.

	실험군					대조군	
3일	3d-1	3d-2	3d-3	3d-4	3d-5	3d-1-c	
5일	5d-1	5d-2	5d-3	5d-4			5d-1-c
1주	1w-1	1w-2	1w-3	1w-4	1w-5	1w-1-c	
2주	2w-1	2w-2	2w-3	2w-4	2w-5	2w-1-c	
4주	4w-1	4w-2	4w-3	4w-4	4w-5	4w-6	4w-1-c

Table 1. 실험군 및 대조군

3. 면역조직화학적 분석 (Immunohistochemical analysis)

면역조직화학 염색을 위하여 조직 절단편을 3% hydrogen peroxide로 15분간 처리한 후, 10mM citrate buffer(pH 6.0) 안에서 압력과 열을 5분간 가하여 전처리하였다. 그 후 1:50으로 희석시킨 anti-nestin monoclonal antibody(Chemicon International, Temecula, CA, USA)를 4℃ 환경에서 24시간동안 처리하였다. 이후 TBS로 15분씩 3번 씻어낸 후 biotinylated goat antirabbit secondary antibody(Zymed, CA, USA)와 streptavidin peroxidase(Zymed, CA, USA)를 각각 10분간 처리하였다. 최종적으로 조직 절단편을 diaminobenzidine(DAB) reagent kit(Zymed, CA, USA)으로 발색한 후 hematoxylin으로 counterstain 시행하여 조직 소견을 광학현미경 하에서 관찰하였다.

III. 결 과

< 대조군 >

3일, 5일, 1주, 2주, 4주 후의 모든 대조군은 dentinogenesis 과정 중의 치수 조직 소견을 보였다. 규칙적인 상아세관 구조를 보이는 상아질 및 전상아질 층이 관찰되었고, 그 하방의 치수-상아질 경계 부위에서는 상아기질을 분비하는 odontoblast layer 가 관찰되었다. 고배율에서 관찰하였을 때에는 odontoblast의 process가 전상아질 층으로 연장되어 있었다.

치수 조직의 중심 부위에서는 fibroblast 및 blood vessel 등이 존재하고 있는 것을 관찰할 수 있었다. <Fig.1>

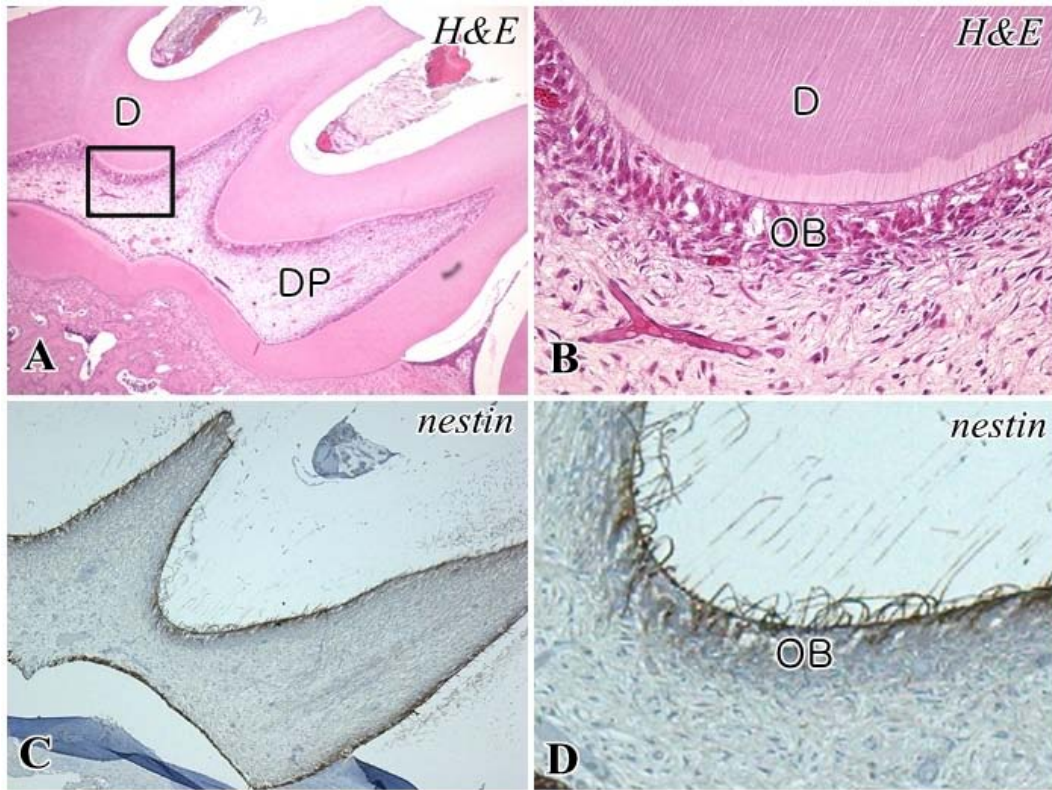


Figure 1. control tooth(2w-1-c), **A:** coronal zone. It presents normal dentinogenesis process. (magnification, x50) **B,D:** Higher magnification of boxed area in **A**. Nestin-positive odontoblasts are arranged along the pulp-dentin border. Beneath the odontoblast layer, regular tubular dentin is observed. (magnification, x400) **C:** At pulp-dentin border, odontoblasts are intensely nestin-positive. Abbreviations: D, dentin; DP, dental pulp; OB, odontoblasts

< 재식 후 3일 >

치아 재식을 시행한 후 3일째에는 치수 치유가 진행되고 있는 소견이 관찰되었다.

한 개의 표본에서만 치수 전반에 걸쳐 급성 염증 소견이 나타났으며, 나머지 표본에서는 치관 부위에 국한된 국소적 염증 소견이 있었다. 염증 부위에서는 PMNs (polymorphonuclear leukocytes) 및 적혈구 등의 세포와 fibrin network가 관찰되었다. <Fig.2-A,B>

반면 치수강저 부위와 치근 부위의 치수에는 치관 부위보다 염증 소견이 미미하였으며, 침착된 PMNs의 수가 비교적 적었다. 또한 혈관이 분포하고 있어 재혈관화가 시작되었음을 관찰할 수 있었다. <Fig.2-A,D>

전반적으로 치수-상아질 경계의 odontoblast cell layer는 퇴축되어있거나 소실되어있는 상태였다. 또한, nestin 면역반응도 나타나지 않았다.<Fig.2-C,D>

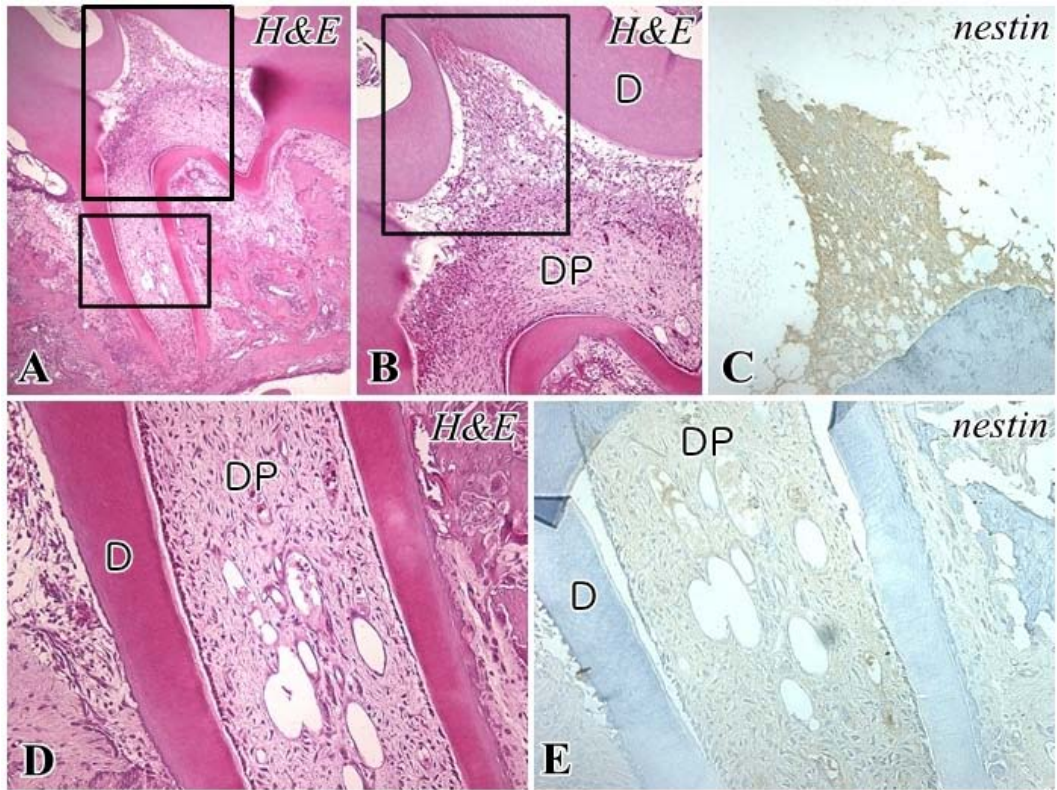


Figure 2. 3 days after replantation(3d-4), **A:** There is localized inflammation in the coronal pulp. (magnification, x50), **B:** Higher magnification of upper boxed area in **A**. Neutrophils and red blood cells are observed in the pulp horn area. (magnification, x100), **C:** Higher magnification of boxed area in **B**. Nestin-positive cells are not observed. **D,E :** Higher magnification of lower boxed area in **A**. Blood supply is recovered in the root pulp. Nestin-positive cells are not observed. (magnification, x200) Abbreviations: D, dentin; DP, dental pulp

< 재식 후 5일 >

치아 재식 후 5일 째 에도 치수의 국소적인 염증은 존재하였지만, 3일 째 보다는 치수의 재혈관화 및 재생이 더 진행된 소견이었다. 심한 급성 염증 반응은 한 개의 표본에서만 관찰되었으며, 나머지에서는 3일 째 소견과 비슷하게 모두 치관 부위에만 국한된 경미한 염증이 나타났다. PMNs 등의 염증세포의 수는 보다 적게 관찰되었다. 혈관의 분포는 치근과 치수강저 뿐 아니라 치관 부위에서도 나타나 재혈관화가 더 진행되고 있는 소견이었다. <Fig.3>

5일 째 부터 nestin에 양성반응을 보이는 odontoblast-like cell이 관찰되기 시작하였다. 주로 치근의 치수-상아질 경계에서 관찰되었으나 일부 표본에서는 치관 부위에서도 nestin 양성반응이 나타났다. <Fig.3><Fig.4>

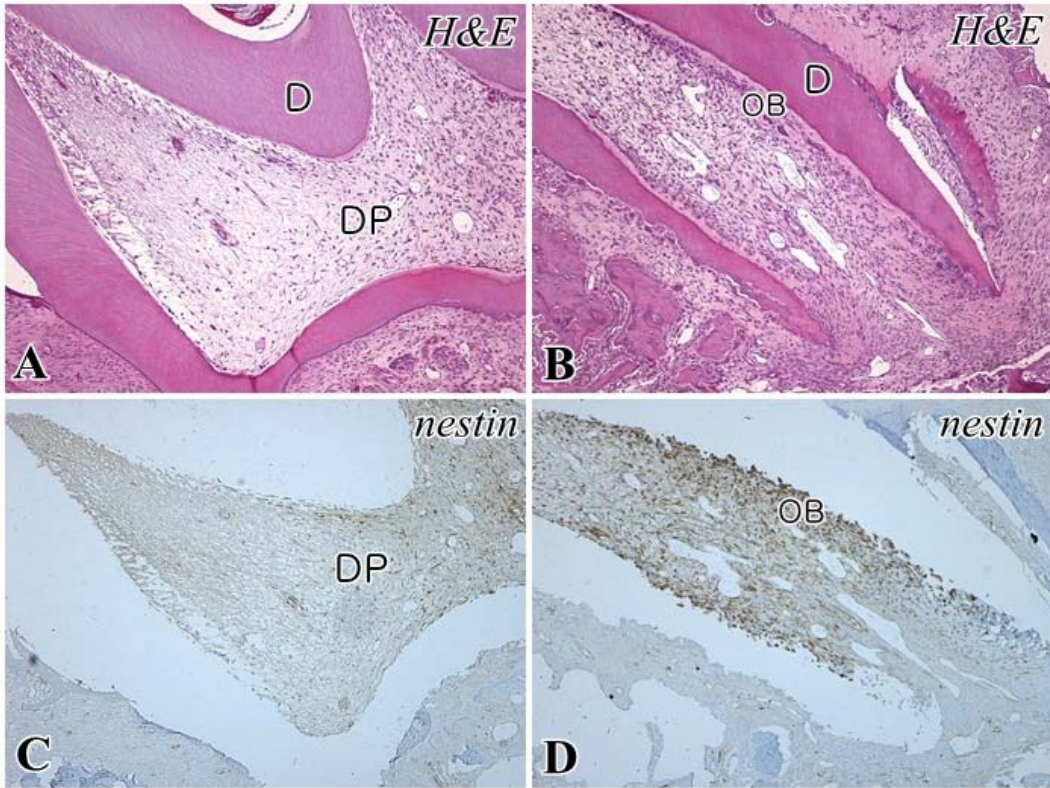


Figure. 3. 5 days after replantation(5d-4), **A,C:** Coronal zone. Localized inflammation still remains including neutrophils and fibrin networks in the pulp horn area. And nestin-positive cells are not observed in the coronal area.(magnification, x100), **B,D:** Root zone. Formation of odontoblast-like cell layer begins at the pulp-dentin border. Odontoblast-like cells show nestin-positive reaction. (magnification, x100) Abbreviations: D, dentin; DP, dental pulp; OB, odontoblast-like cells

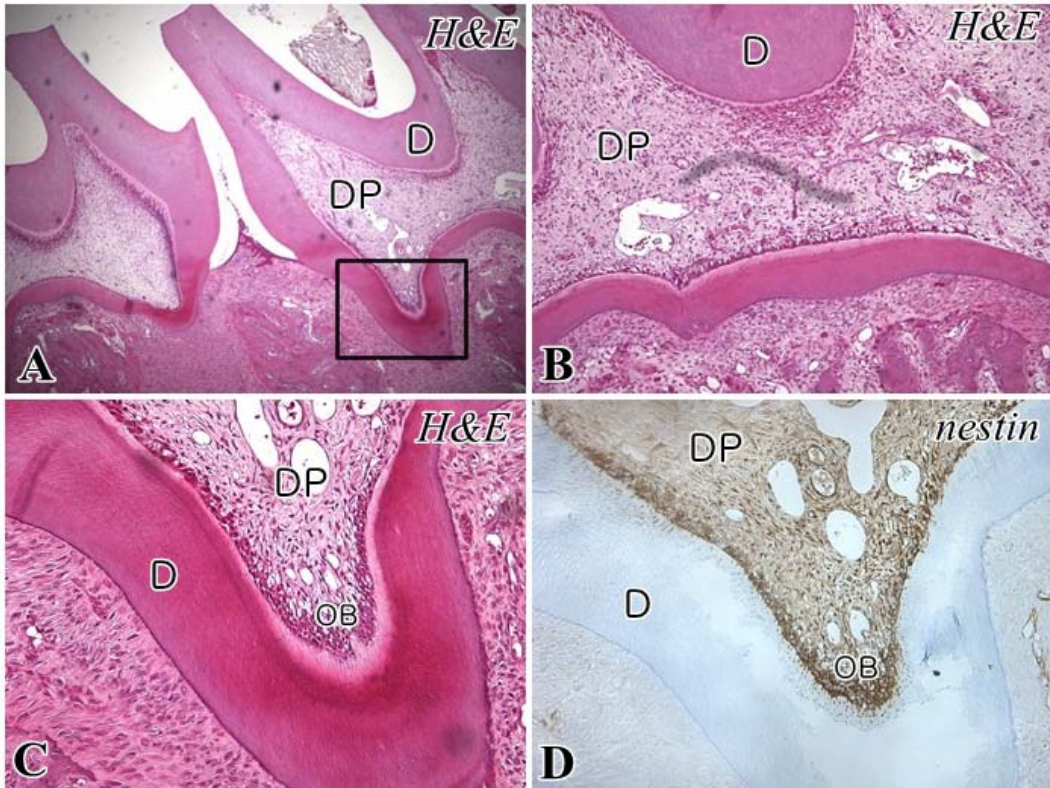


Figure 4. 5 days after replantation(5d-3), **A,B:** Inflammatory reaction almost disappeared in this slide. (magnification, x50, x100), **C,D :** Higher magnification of boxed area in **A**. Nestin-positive odontoblast-like cells are observed in the coronal area. (magnification, x200) Abbreviations: D, dentin; DP, dental pulp; OB, odontoblast-like cells

< 재식 후 1주일 >

치아 재식 후 1주일 쯤에는 치수가 치유되고 있는지 여부가 보다 명확하게 나타났다.

5개 중 2개의 표본에서 국소적인 염증이 없이 완전히 치수의 생활력이 회복된 소견을 관찰할 수 있었다. 1개의 표본에서만 전반적으로 심한 염증 반응이 나타났으며, 나머지 2개의 표본에서는 치관 부위에 국한된 경미한 염증이 있었다. 염증이 있는 부위의 치수조직에서는 nestin에 음성반응을 보였고, odontoblast-like cell layer의 형성도 관찰되지 않았으며, 삼차 상아질 형성도 관찰되지 않았다.

치수의 염증 없는 부위 에서는 치아 재식 후 5일째보다 nestin에 약한 양성반응을 보이는 odontoblast-like cell layer가 형성되어 있었다. 치수-상아질 경계 상방으로는 약간의 삼차 상아질 형성이 시작되고 있었다. 그리고, 치수 전반에 걸쳐 보다 풍부한 blood vessel들이 관찰되었다.

이 시기부터 이전 시기에서는 나타나지 않았던 치근단공 부위의 석회화를 관찰할 수 있었다. 치근의 치근단공 부위에 석회화 조직이 침착되어 bridge를 형성하고 있었으며, 그 석회화 기질은 세포성 백악질과 같이 내부에 다수의 세포들이 함입되어 있었다. <Fig.5>

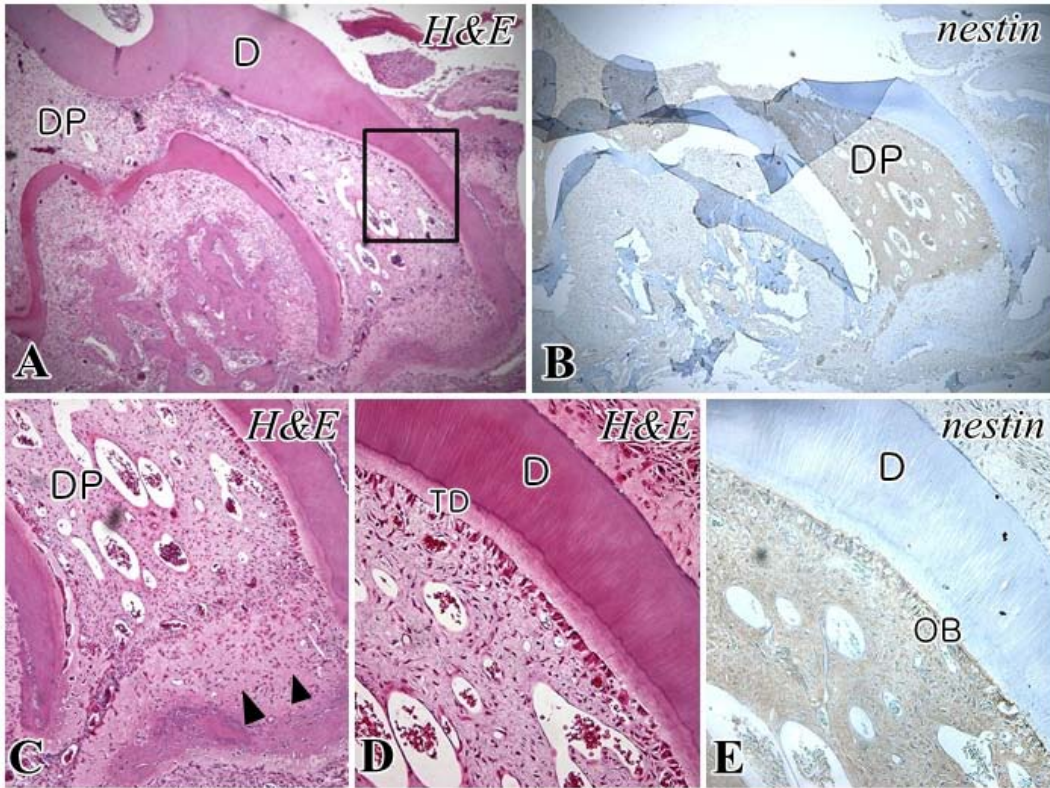


Figure. 5. 1 week after replantation(1w-4), **A,B:** Inflammatory lesion disappeared in all of the pulp. Blood supply is recovered to the coronal pulp. But, intensity of nestin-immunoreactivity is generally weaker than that of 5 days after replantation. (magnification, x50) **C:** At root apex area, there is formation of mineralized region which is similar to the cellular cementum tissues.(arrows) (magnification, x100) **D,E:** Higher magnification of boxed area in **A**. Under the pulp-dentin border, there is a layer of odontoblast-like cells. Some tertiary dentin is deposited beneath the odontoblast-like cells layer.(magnification, x 200) Abbreviations: D, dentin; DP, dental pulp; OB, odontoblast-like cells; TD, tertiary dentin

< 재식 후 2주일 >

재식 후 2주일째에는 심한 염증을 보이는 1개의 표본을 제외하고, 다른 4개의 표본에서는 모두 완전히 치수 조직이 치유된 소견이었다.

Nestin에 양성반응을 보이는 odontoblast-like cell들이 치수 전반에 걸쳐 치수-상아질 경계에서 layer를 이루고 있었으며, 그 상방으로 두꺼운 삼차 상아질 층이 형성되었다. 삼차 상아질은 상아세관이 규칙적 혹은 불규칙적으로 나타나는 다양한 형태였고, 기존의 이차 상아질과는 뚜렷한 경계로 구분이 되었다. 그리고, 형성된 삼차상아질 대부분에서 세포의 함입은 나타나지 않았다. <Fig.6-A,B,D,E>

재식 후 1주일째부터 나타난 치근단공 부위의 석회화는 2주째에 더욱 진행된 소견이었다. 석회화 기질은 삼차 상아질과 세포성 cementum-like 조직이 뚜렷한 경계 없이 혼합되어 있는 양상이었다. <Fig.6-C>

심한 염증 반응을 보이는 1개의 표본에서는 odontoblast layer는 나타나지 않았으며, 상아질의 두께 증가도 나타나지 않았으며, 치근부의 상아질은 외흡수가 상당히 진행된 상태였다.

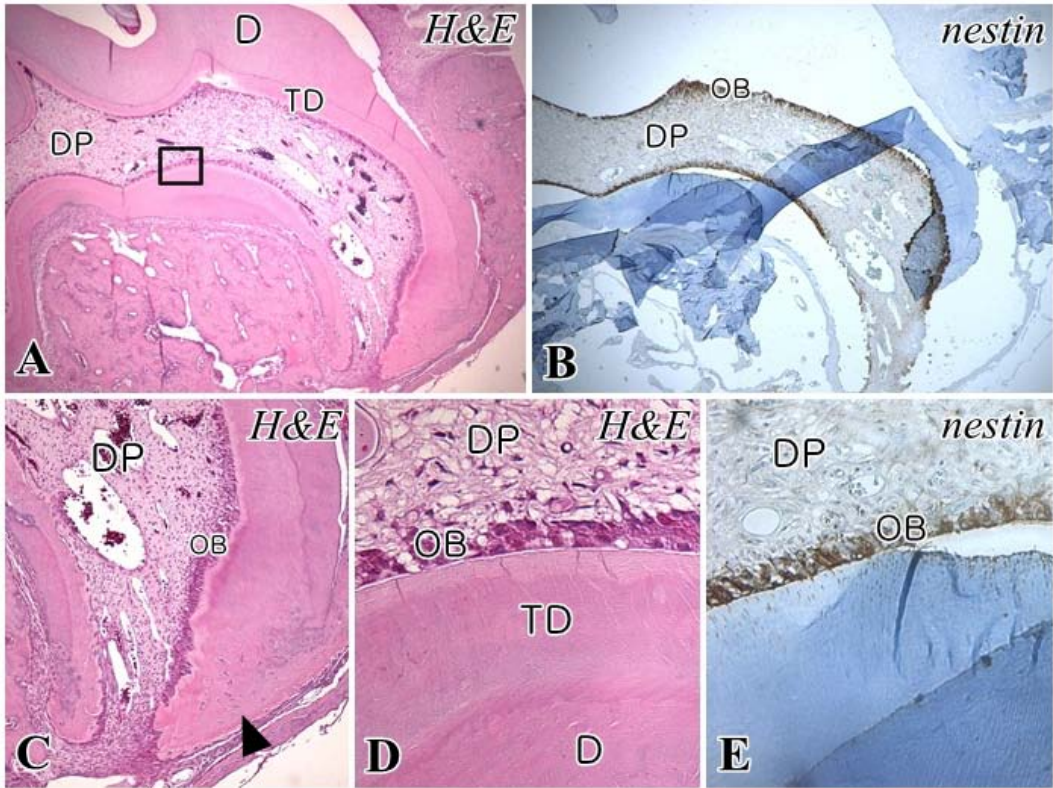


Figure. 6. 2 week after replantation(2w-3), **A:** Tertiary dentin deposition is clear with increased thickness beneath the preexisting dentin. (magnification, x50) **B:** Intense nestin-immunoreactivity is observed along the pulp-dentin border throughout the pulp. (magnification, x50) **C:** At root apex area, there is increased formation of mineralized tissue. It is mixed with tertiary dentins and cementum-like tissues.(arrow) (magnification, x100) **D,E:** Higher magnification of boxed area in **A**. Beneath the pulp-dentin border, there is a layer of nestin-positive odontoblast-like cells. Increased tertiary dentin deposition is discovered. (magnification, x 400) Abbreviations: D, dentin; DP, dental pulp; OB, odontoblast-like cells; TD, tertiary dentin

<재식 후 4 주일>

재식 후 4주일째에는 6개 중 1개의 표본에서만 심한 염증이 나타났다. 나머지 5개의 표본에서는 치수의 치유와 치아의 석회화가 2주째보다 훨씬 진행된 소견이 관찰되었다.

삼차 상아질 층은 매우 두꺼운 두께로 형성되어 있었으며, 이로 인해 그 하방의 치수강은 협소해진 상태였다. 또한 삼차 상아질층 하방의 치수-상아질 경계에는 nestin에 강한 양성반응을 보이는 odontoblast-like cell layer가 관찰되었다. <Fig.7>

이 시기에 이전까지는 관찰되지 않았던 bone-like tissue들이 나타났다. 치유 소견이 관찰되는 5개 표본 중 2개만이 삼차 상아질로만 석회화된 소견이었고, 2개에서는 bone-like tissue와 삼차 상아질이 같이 나타났고, 1개에서는 bone-like tissue만으로 석회화된 소견이 관찰되었다. 삼차 상아질과 bone-like tissue가 같이 나타난 경우, bone-like tissue는 치수 중심부에서 나타나거나 혹은 삼차 상아질과 혼합되어있는 형태로 나타나기도 하였다.<Fig.8> Bone-like tissue는 특징적으로 조직 내에 osteocyte-like cell과 Haversian canal들이 존재하는 것으로 구분할 수 있었다. 그리고 그 주변으로는 osteoblast들이 분포하고 있었으나, 반면 nestin에 양성반응을 보이는 odontoblast-like cell들은 관찰되지 않았다. <Fig.8>

삼차 상아질과 bone-like tissue가 아닌 cementum-like tissue들도 국소적으로 관찰되었다. 이들은 주로 이전까지 주로 치근단공 부위에서 관찰할 수 있었으나, 4주째부터는 치근 상방부위에서도 나타났다. 치근 상방부에서 관찰되는 경우는 주로 치근 외흡수가 진행되어 치근 상아질층이 거의 소실된 경우였다. <Fig.7-D>

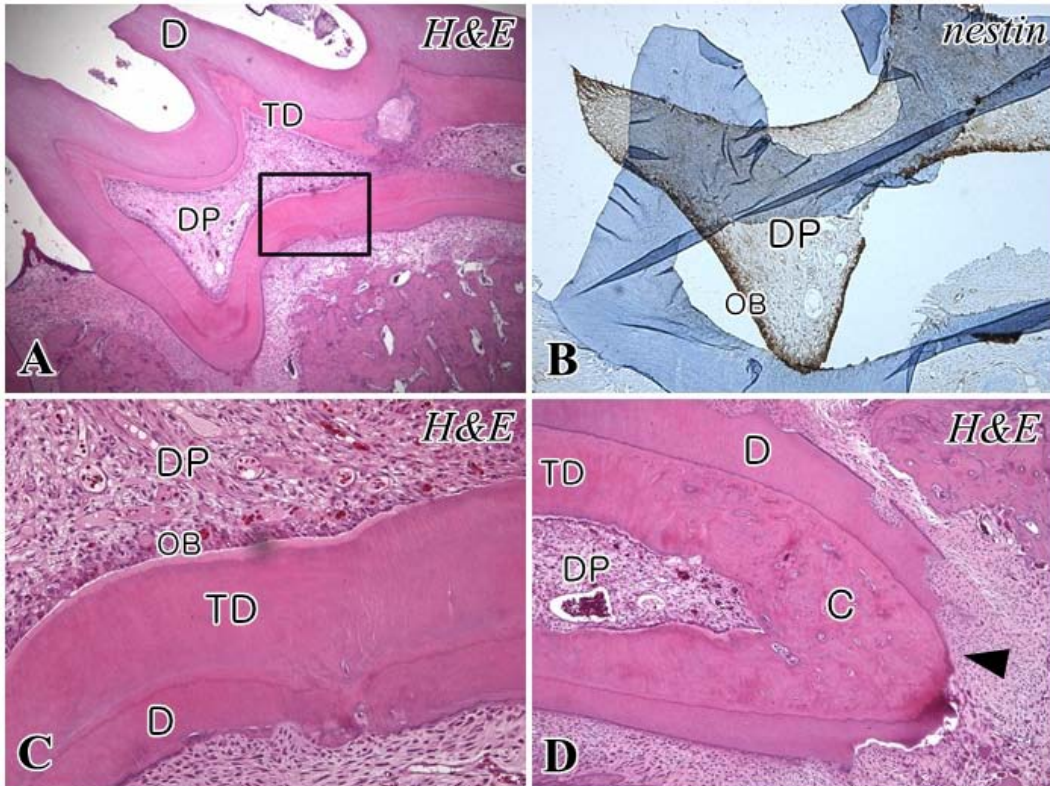


Figure. 7. 4 week after replantation(4w-1), **A:** Tertiary dentin thickness is increased than that of 2 week after replantation. And pulp space is more narrowed. (magnification, x50) **B:** Intense nestin-positive cells are arranged along the pulp-dentin (magnification, x100) **C:** Higher magnification of boxed area in **A**. Odontoblast-like cells are arranged beneath a large amount of tertiary dentin. (magnification, x200), **D:** Mixed form of tertiary dentin and cellular cementum-like tissues is discovered under the external root resorption area.(arrow) (magnification, x100) Abbreviations: C, cementum-like tissues; D, dentin; DP, dental pulp; OB, odontoblast-like cells; TD, tertiary dentin

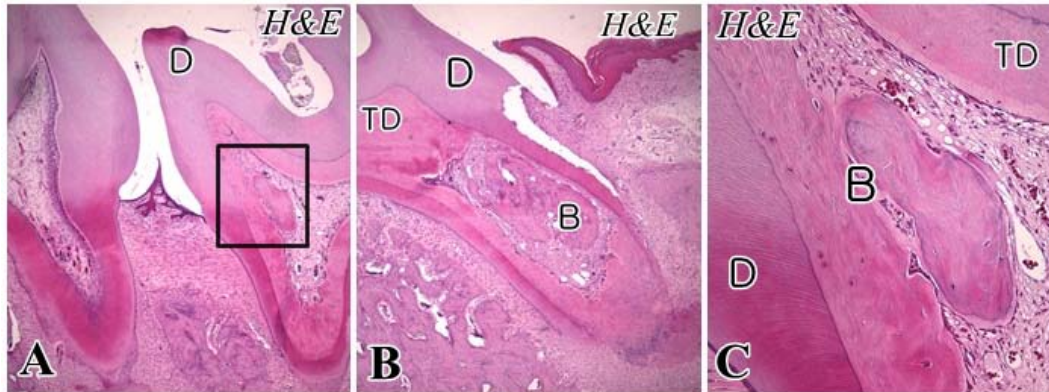


Figure. 8. 4week after replantation(4w-5) **A:** Both tertiary dentin and bone-like tissues are observed. Bone-like tissues are mixed with tertiary dentin. (magnification, x50) **B:** Bone-like tissues occupy the pulp space. (magnification, x50), **C:** Higher magnification of boxed area in **A**. Cell inclusions are observed in the hard tissue matrix. (magnification, x 200) Abbreviations: B, bone-like tissues; D, dentin; TD, tertiary dentin

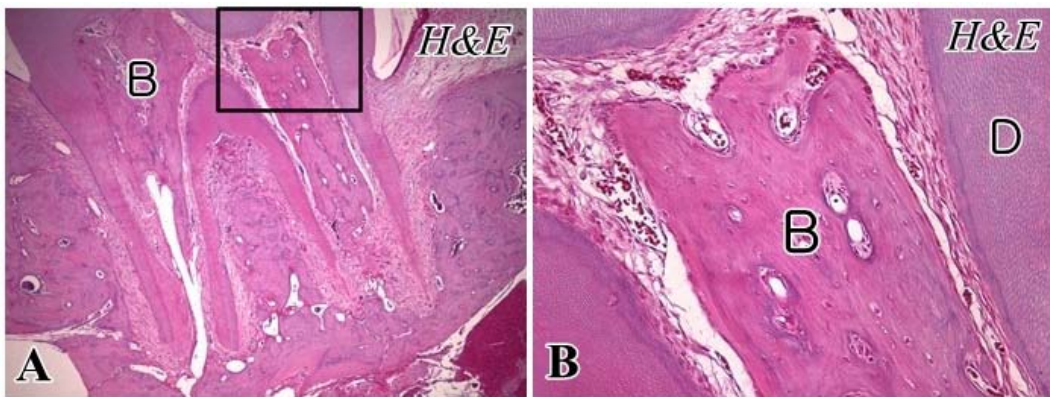


Figure. 9. 4week after replantation(4w-6) **A:** As a result of pulp healing, only bone-like tissues are formed. There is no formation of tertiary dentin. (magnification, x 50) **B:** Higher magnification of boxed area in **A**. In the bone-like tissues matrix, Haversian canals and osteoblast-like cells are observed. (magnification, x 200) Abbreviations: B, bone-like tissues; D, dentin

IV. 고찰

치아의 재식 후에 치수 조직의 치유를 평가하기 위하여 본 실험에서는 쥐(rat)를 이용하였다. 치아재식 실험에 적절한 동물실험 모델을 선택하기 위하여 다음과 같은 조건을 고려해야 한다. 우선, 치아의 발치와 재식이 용이해야 하고, 실험 결과가 일관적이고 재현성이 있어야 하며, 충분한 개체수를 이용할 수 있어야 한다. 쥐는 개체간의 유전적 일관성이 우수하여 비교적 일관성 있는 결과를 보인다. 그리고 사육이 용이하며 비용이 비교적 적게 든다. 또한, 손상 받은 조직의 치유속도가 빨라 전체 치유 과정을 단기간에 관찰 할 수 있다는 장점이 있다. 쥐의 종류로는 rat과 mouse가 있는데, rat의 상악 제 1 대구치는 치근이 5개이기 때문에 발치 시 치근 파절의 위험성이 높은 반면, mouse의 상악 제 1 대구치는 치근이 3개여서 발치가 더 용이한 점이 있다. 그러나 개체 및 치아의 크기가 rat보다 훨씬 작기 때문에 발치 및 재식을 기술적으로 통제하기 어려운 점이 존재하여 본 실험에서는 rat을 실험동물로 선택하였다.

이번 실험에서 시행한 치아 재식은 생활치를 완전 탈구 시킨 후 원래의 치조골위로 재위치 시키는 술식이다. 치아를 탈구하면 치수 조직으로의 신경과 혈액 공급이 차단되게 된다. 그 후 이로 인하여 치수의 급성 염증 반응이 나타나고, odontoblast는 파괴적 변화를 보이게 된다. 그러나, 치수-상아질 복합체는 다른 결합 조직과는 달리 방어와 치유의 기능을 할 수 있는 조직으로서 이러한 손상에 대하여 치유 반응을 나타낼 수 있다(Okiji, 2002; Smith, 2002). 그리고, 방어와 치유 기전을 통하여

odontoblast는 새로운 석회화 조직을 생성하게 된다. 이러한 작용은 치수조직 내에 남아있던 odontoblast에 의해서도 일어날 수 있지만, odontoblast가 생존하지 못한 경우, 치수 간엽세포로부터 odontoblast-like cell이 분화하여 원래의 odontoblast의 기능을 대신하기도 한다고 하였다(Smith, 2002). 본 실험에서는 치아 재식 후에 점차적으로 치수 조직이 재신경화, 재혈관화 및 재생되어 치유가 됨을 확인하였다. 그리고, 치유가 진행되면서 파괴되었던 odontoblast를 대체할 수 있는 odontoblast-like cell이 나타나고, 그 후 점차적으로 치아의 석회화가 일어남을 확인할 수 있었다. 이러한 odontoblast-like cell의 출현은 nestin을 이용한 면역조직화화학적 방법으로 확인하였다. Nestin은 세포의 골격을 구성하고 있는 중간세사(intermediate filament) type VI에 속하는 단백질의 한 종류이며, 신경상피 줄기세포(neuralepithelial stem cell)에 특이하게 발현되어 nestin으로 명명되었다. Nestin은 신경계통의 줄기세포 혹은 전구세포(progenitor cell)을 나타내는 지표로 사용되고 있으며, 발생과정의 전기에는 발현이 증가되나 발생후기에는 발현이 감소하는 것으로 알려져 있다(Lendahl et al., 1990; Sejersen and Lendahl, 1993; Wiese et al., 2004). 치아에서의 nestin 발현은 치아 발생과정 중 분화 상태의 odontoblast에서 나타난다. Nestin은 치아 발생이 완료되면서부터 발현이 감소되나, 성숙한 치아에서도 치아 우식, 치아 재식 등의 자극이 가해지면 다시 dentin-pulp complex에서 발현이 증가하게 된다(About, Laurent-Maquin, et al., 2000). 이러한 nestin은 새로 분화하고 있는 odontoblast나, dentin matrix를 분비하는 있는 상태의 odontoblast에서 나타나기 때문에, 분화 혹은 기능중인 odontoblast의 marker로 nestin을 사용할 수 있다(About, Laurent-Maquin, et al., 2000; Terling et al., 1995).

치아 재식이나 치아 이식 후 일어나는 치수의 치유 반응에 대하여, 이전 연구에서는 삼차 상아질 형성이 나타나거나, bone-like tissue가 형성된다고 보고하였으며, 때로는 이 두 가지 반응이 동시에 나타나기도 한다고 하였다(Hosoya et al., 2007; Nakakura-Ohshima et al., 2003; Ogawa et al., 2006; Ohshima, Nakakura-Ohshima, Yamamoto, and Maeda, 2001; Shimizu et al., 2000; Takamori et al., 2008; Tsukamoto-Tanaka et al., 2006; Unno et al., 2009). Shimizu(2000)는 쥐 치아 재식 후 4주째에 25%에서 삼차 상아질 형성이 나타났고, 50%에서는 bone-like tissue 형성 및 25%에서는 이 두 가지가 혼합된 양상인 dentin-bone mixed tissue 형성이 나타났다고 하였다. Tsukamoto-Tanaka(2006)는 20%의 삼차 상아질 형성, 60%의 bone-like tissue 형성 및 20%의 dentin-bone mixed tissue 형성이 나타났다고 보고하였다. 이를 종합하면 이전 실험에서는 치아의 석회화가 주로 bone-like tissue 형성으로 일어났음을 알 수 있다. 그러나, 본 실험에서는 이전과 다른 결과를 얻었다. 치아 재식 후 4주째 결과를 관찰하였을 때, 2개의 표본에서는 tertiary dentin(40%), 다른 2개의 표본에서는 tertiary dentin과 bone-like tissue(40%)이 동시에 혼재되어 나타났으며, 나머지 1개의 표본은 모두 bone-like tissue(20%)로만 치유된 결과를 관찰할 수 있었다. 이는 이전 실험에서의 결과와는 달리 삼차 상아질과 dentin-bone mixed tissue가 형성된 비율이 bone-like tissue가 형성된 비율보다 높았음을 의미한다. 이와 같은 결과를 얻은 원인을 생각해보면, 본 실험에서는 발치 후 재식 시까지의 시간을 5초 이내로 최소화했기 때문으로 사료된다. Ogawa(2006)는 발치 후 재식까지 걸리는 시간과 치수치유 결과에 유의한 연관성이 존재한다고 하였다. 즉, 재식시간이 연장될수록 삼차 상아질보다는

dentin-bone mixed tissue, bone-like tissue로 치유되거나, 염증반응이 나타날 가능성이 높다고 하였다.

Odontoblast는 치수 조직에서 가장 분화도가 높은 세포이며, neural crest로부터 기원한다. Odontoblast의 주된 역할은 전상아질 및 상아질의 기질(collagen, proteoglycans)을 생산하는 것이며 또한 칼슘 이온을 운반하여 전상아질 및 상아질의 mineralization을 진행시키는 역할을 한다(Linde, 1995). 이렇게 odontoblast에 의하여 생성되는 상아질은 다시 일차 상아질, 이차 상아질, 삼차 상아질로 분류된다. 이러한 분류는 상아기질을 분비하는 세포의 종류, 상아질이 생성되는 시기와 환경에 의해 이루어진다. 이 중 일차 상아질과 이차 상아질을 생성하는 세포는 odontoblast이며, 같은 세포에 의해 형성되기 때문에 일차 상아질과 이차 상아질의 상아세관은 서로 연속되어있는 양상으로 나타난다. 다만 일차 상아질은 치아 맹출 전까지 형성되는 조직이며, 이차 상아질은 치아가 맹출한 후에 기능을 시작하면서부터 생성된다는 차이점이 존재한다. 그리고, 매우 느린 속도로 일생에 걸쳐서 천천히 형성되는 특징이 있다. 반면, 삼차 상아질은 치아에 충격이 가해졌을 때 이에 대한 반응으로 생성되는 조직이다. 즉, 치아에 자극이 가해지면, odontoblast가 비정상적으로 활성화되거나, odontoblast-like cell 출현이 유도되며, 매우 빠른 속도로 삼차 상아질이 형성된다(Smith, 2002; Smith et al., 1995). 본 실험에서는 치아 재식 후 점차적으로 odontoblast-like cell이 나타났고, 그 후 삼차 상아질이 형성됨을 관찰할 수 있었다. 치아 재식 후 5일째부터 odontoblast-like cell 출현을 관찰하였고, 2주째부터 삼차 상아질이 뚜렷하게 침착 되었음을 확인하였다. 그리고 치아 재식 후 4주째에는 두꺼

운 삼차 상아질 층이 형성되어 치수강이 급격히 좁아졌음을 관찰하였다. 특히, 대조군과 비교하였을 때, 상아질 층의 두께가 확연히 두터움을 관찰할 수 있었다. 이로써, odontoblast-like cell이 빠른 속도로 삼차 상아질을 생성하였음을 확인하였다. 그리고, 치수-상아질 경계부위에 나열되어있는 odontoblast-like cell을 5일째부터 4주째까지 계속적으로 관찰할 수 있었다. 이것은 삼차 상아질 생성이 4주째까지도 계속적으로 일어난다는 것을 의미하며, 삼차 상아질 생성이 언제까지 지속되는지에 대하여는 더 장기적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Odontoblast-like cell의 기원에 대하여는 논란의 여지가 있으나, 치수에 존재하는 미분화된 간엽 세포들이 분화하여 생성되는 것이라는 견해가 우세하다. 치수의 미분화된 간엽 세포는 cell-rich zone과 pulp core에 위치하며, 주로 혈관 주위에서 발견된다. 이 세포들은 자극을 받으면 분화하여 fibroblast나 odontoblast로 분화하게 된다(Smith, 2002). Gronthos(2002)와 Batouli(2003)는 사람의 DPSCs(Dental pulp stem cells)을 쥐에 이식하였을 때 상아질 표면에 odontoblast가 나열되고 삼차상아질이 형성되었음을 보고하였다. 이는 odontoblast-like cell의 기원이 치수 내에 존재함을 직접적으로 밝혀주고 있는 부분이다. 이러한 미분화된 간엽 세포의 수는 나이가 증가함에 따라 감소한다. 따라서 연령이 높아질수록 치수 치유의 가능성은 낮아지게 된다(Smith, 2002; Smith et al., 1995). 또한, 미성숙 치아일 경우 치근단공이 성숙 치아에 비하여 매우 넓기 때문에 치근단공을 통하여 재혈관화가 일어날 가능성이 높다(Kristerson and Andreasen, 1984). 본 실험에서는 치아 재식 후 치수의 치유가 비교적 높은 비율로 일어났다. 모든 실험군에서 각각 염증소견이 관찰된 1마리를 제

외하고 모두 치수의 치유가 일어났다. 이는 이번 실험에서 낮은 연령(4주령)의 쥐를 이용하였고, 또한 미성숙 제 1 대구치를 이용하였기 때문으로 사료된다.

치수의 치유 시기에 대하여는 본 실험의 결과와 이전 연구의 결과가 비슷하였다. 이전 연구에서는 Rat의 치아를 재식하였을 때 5일 후부터 odontoblast-like cell의 출현이 시작되었으며, 삼차 상아질의 형성은 1-2주일, bone-like tissue의 형성은 3-4주에 나타났다(Ohshima, Nakakura-Ohshima, Yamamoto, and Maeda, 2001; Shimizu et al., 2000). 본 실험에서도 odontoblast-like cell은 5일 후부터 나타났으며, 삼차 상아질의 형성은 2주 후부터 뚜렷하게 관찰되었다. 또한 bone-like tissue의 형성은 4주 후부터 관찰이 되었다. 또한, 치유는 치근단 부위와 치수강저 부위에서 먼저 일어나는 경향이 관찰되었는데, 이는 rat의 상악 제1대구치의 치근 이개부에 존재하는 medullary tube를 통하여도 재혈관화가 일어날 수 있기 때문으로 생각된다. Medullary tube는 치아의 치수 조직과 치주 조직이 연결되는 통로로써, 치아 재식 시 이곳을 통하여도 재혈관화가 일어날 수 있기 때문에 치수강저 부위의 치수 치유 속도가 보다 빠르게 나타날 수 있다(Shimizu et al., 2000).

이번 실험에서는 cementum-like tissue의 형성도 나타났는데, 이는 특히 치근 외 흡수로 상아질 층이 거의 흡수된 곳, 그리고 치주조직과 직접 연결되는 치근단부위에서 나타났다. Cementum-like tissue의 존재는 치유 과정 중 치주 조직이 개입이 되어 백악질 형성 과정이 진행되었다는 것을 의미한다. 치아 재식 시에는 치수 조직과 마찬가지로 치주 조직에도 강한 손상이 가해지게 된다. 따라서, 이에 대한 보상반응

으로 cementogenesis가 진행될 수 있다. 또한, 상아질의 흡수가 일어난 곳에서는 근관내로 cementoblast-like cell이 유입되어 상아 기질과 혼합된 백악기질을 형성하게 된다. 그 이후 hydroxyapatite 결정이 침착되면 상아질과 백악질이 혼합체를 형성하는 반응이 진행된다. 이러한 과정을 통하여 intracanal cementum이 형성될 수 있다 (Egelberg, 1987).

최근, 생활 치수를 가진 치아에서만 아니라, 생활력이 없는 괴사치수를 가진 미성숙 영구치아를 치료함에 있어서도 치수 재생 개념의 술식이 시도되고 있다 (Hargreaves et al., 2008). 즉, 괴사 치수를 가진 치아도 재혈관화를 통하여 치수 조직이 재생될 수 있고, 그 결과 석회화 조직이 침착되어 치근의 발육이 진행될 수 있다는 것이다. 그러나, 이 경우 재혈관화된 근관 내부가 실제로 어떤 과정으로 치유되고 있는지, 그리고 석회화가 일어난 부분이 조직학적으로 어떻게 구성되어 있는지에 대한 연구는 아직 부족하다. 이에 Wang(2010)은 치근단 치주염을 가진 미성숙 치아에서 치수를 제거하고 빈 근관내로 재혈관화를 유도한 후 그 치유 양상을 조직학적으로 관찰하였다. 그 결과 근관 내에 약간의 생활력 있는 치수 조직이 남아있는 부분에서는 odontoblast layer가 형성되었지만, 대부분은 근관 내로 치주 세포가 유입되어 intracanal-cementum, bone-like tissue, PDL이 형성되었음을 관찰하였다. 이는 근관 내의 치수 조직이 재생되지 못한 경우, 치주 조직이 근관 내로 유입되어 치유가 일어날 수도 있다는 것을 의미한다(Nelson-Filho et al., 2008; Vojinovic and Vojinovic, 1993). 이번 실험에서는 치아 재식을 시행한 후 대부분의 치아에서 치수 생활력이 회복되었기에 치주 조직이 아닌 치수 조직에 의하여 치유가 진행될 수 있

있을 것으로 사료된다. 그 결과, 초기에는 삼차 상아질 침착에 의해서 치아의 석회화가 진행됨을 관찰하였으나, 시간이 경과하면서 점차 bone-like tissue 또는 cementum-like tissue가 차지하는 비율이 증가하는 것을 관찰하였다. 이러한 결과는 치수강 내에 생활력이 있는 치수가 존재할 때, 치수 치유 및 치아 석회화가 어떤 양상으로 나타나는지에 대한 정보를 제공해 줄 수 있을 것으로 사료된다. 다만, 치아 재식 후 4주 쯤에 bone-like tissue와 cementum-like tissue가 나타난 것으로 보아 치아 석회화가 장기적으로 진행되는 양상에 대한 관찰이 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- About, I., Bottero, M. J., de Denato, P., Camps, J., Franquin, J. C., Mitsiadis, T. A. 2000. "Human dentin production in vitro". *Exp Cell Res* 258(1): 33-41.
- About, I., Laurent-Maquin, D., Lendahl, U., Mitsiadis, T. A. 2000. "Nestin expression in embryonic and adult human teeth under normal and pathological conditions". *Am J Pathol* 157(1): 287-295.
- Andreasen, J. O., Borum, M. K., Jacobsen, H. L., Andreasen, F. M. 1995. "Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 2. Factors related to pulpal healing". *Endod Dent Traumatol* 11(2): 59-68.
- Banchs, F., Trope, M. 2004. "Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol?". *J Endod* 30(4): 196-200.
- Batouli, S., Miura, M., Brahim, J., Tsutsui, T. W., Fisher, L. W., Gronthos, S., Robey, P. G., Shi, S. 2003. "Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis". *J Dent Res* 82(12): 976-981.
- Byers, M. R., Kvinnsland, I., Bothwell, M. 1992. "Analysis of low affinity nerve growth factor receptor during pulpal healing and regeneration of myelinated and unmyelinated axons in replanted teeth". *J Comp Neurol* 326(3): 470-484.
- Chiego, D. J., Jr. 1992. "An ultrastructural and autoradiographic analysis of primary and replacement odontoblasts following cavity preparation and wound healing in the rat molar". *Proc Finn Dent Soc* 88 Suppl 1: 243-256.

- Chueh, L. H., Huang, G. T. 2006. "Immature teeth with periradicular periodontitis or abscess undergoing apexogenesis: a paradigm shift". *J Endod* 32(12): 1205-1213.
- Egelberg, J. 1987. "Regeneration and repair of periodontal tissues". *J Periodontal Res* 22(3): 233-242.
- Goldberg, M., Farges, J. C., Lacerda-Pinheiro, S., Six, N., Jegat, N., Decup, F., Septier, D., Carrouel, F., Durand, S., Chaussain-Miller, C., Denbesten, P., Veis, A., Poliard, A. 2008. "Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair". *Pharmacol Res* 58(2): 137-147.
- Gronthos, S., Brahim, J., Li, W., Fisher, L. W., Cherman, N., Boyde, A., DenBesten, P., Robey, P. G., Shi, S. 2002. "Stem cell properties of human dental pulp stem cells". *J Dent Res* 81(8): 531-535.
- Harada, M., Kenmotsu, S., Nakasone, N., Nakakura-Ohshima, K., Ohshima, H. 2008. "Cell dynamics in the pulpal healing process following cavity preparation in rat molars". *Histochem Cell Biol* 130(4): 773-783.
- Hargreaves, K. M., Giesler, T., Henry, M., Wang, Y. 2008. "Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold?". *J Endod* 34(7 Suppl): S51-56.
- Hasegawa, T., Suzuki, H., Yoshie, H., Ohshima, H. 2007. "Influence of extended operation time and of occlusal force on determination of pulpal healing pattern in replanted mouse molars". *Cell Tissue Res* 329(2): 259-272.

- Hirata, M., Yamaza, T., Mei, Y. F., Akamine, A. 2005. "Expression of osteocalcin and Jun D in the early period during reactionary dentin formation after tooth preparation in rat molars". *Cell Tissue Res* 319(3): 455-465.
- Hosoya, A., Nakamura, H., Ninomiya, T., Hoshi, K., Yoshiba, K., Yoshiba, N., Takahashi, M., Okabe, T., Sahara, N., Yamada, H., Kasahara, E., Ozawa, H. 2007. "Hard tissue formation in subcutaneously transplanted rat dental pulp". *J Dent Res* 86(5): 469-474.
- Hosoya, A., Yoshiba, K., Yoshiba, N., Hoshi, K., Iwaku, M., Ozawa, H. 2003. "An immunohistochemical study on hard tissue formation in a subcutaneously transplanted rat molar". *Histochem Cell Biol* 119(1): 27-35.
- Iwaya, S. I., Ikawa, M., Kubota, M. 2001. "Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract". *Dent Traumatol* 17(4): 185-187.
- Jung, I. Y., Lee, S. J., Hargreaves, K. M. 2008. "Biologically based treatment of immature permanent teeth with pulpal necrosis: a case series". *J Endod* 34(7): 876-887.
- Kristerson, L., Andreasen, J. O. 1984. "Influence of root development on periodontal and pulpal healing after replantation of incisors in monkeys". *Int J Oral Surg* 13(4): 313-323.
- Kuratate, M., Yoshiba, K., Shigetani, Y., Yoshiba, N., Ohshima, H., Okiji, T. 2008. "Immunohistochemical analysis of nestin, osteopontin, and proliferating cells in the reparative process of exposed dental pulp capped with mineral trioxide aggregate". *J Endod* 34(8): 970-974.

- Kvinnslund, I., Heyeraas, K. J., Byers, M. R. 1991. "Regeneration of calcitonin gene-related peptide immunoreactive nerves in replanted rat molars and their supporting tissues". *Arch Oral Biol* 36(11): 815-826.
- Lendahl, U., Zimmerman, L. B., McKay, R. D. 1990. "CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein". *Cell* 60(4): 585-595.
- Linde, A. 1995. "Dentin mineralization and the role of odontoblasts in calcium transport". *Connect Tissue Res* 33(1-3): 163-170.
- Nakakura-Ohshima, K., Watanabe, J., Kenmotsu, S., Ohshima, H. 2003. "Possible role of immunocompetent cells and the expression of heat shock protein-25 in the process of pulpal regeneration after tooth injury in rat molars". *J Electron Microsc (Tokyo)* 52(6): 581-591.
- Nelson-Filho, P., Borsatto, M. C., de Oliveira, P. T., da Silva, R. A. 2008. "Partial replacement of the dentin-pulp complex by periodontal supporting tissues in a traumatically intruded primary maxillary incisor". *Dent Traumatol* 24(5): 553-555.
- Ogawa, R., Saito, C., Jung, H. S., Ohshima, H. 2006. "Capacity of dental pulp differentiation after tooth transplantation". *Cell Tissue Res* 326(3): 715-724.
- Ohshima, H., Nakakura-Ohshima, K., Yamamoto, H., Maeda, T. 2001. "Alteration in the expression of heat shock protein (Hsp) 25-immunoreactivity in the dental pulp of rat molars following tooth replantation". *Arch Histol Cytol* 64(4): 425-437.

- Ohshima, H., Nakakura-Ohshima, K., Yamamoto, H., Takeyasu. 2001. "Responses of odontoblasts to cavity preparation in rat molars as demonstrated by immunocytochemistry for heat shock protein (Hsp) 25". *Arch Histol Cytol* 64(5): 493-501.
- Okiji, T.: Pulp as a connective tissue. In Seltzer and Bender's dental pulp, 2002, pp. 95~117.
- Sejersen, T., Lendahl, U. 1993. "Transient expression of the intermediate filament nestin during skeletal muscle development". *J Cell Sci* 106 (Pt 4): 1291-1300.
- Shimizu, A., Nakakura-Ohshima, K., Noda, T., Maeda, T., Ohshima, H. 2000. "Responses of immunocompetent cells in the dental pulp to replantation during the regeneration process in rat molars". *Cell Tissue Res* 302(2): 221-233.
- Smith, A. J.: Dentin formation and repair. In Seltzer and Bender's dental pulp, 2002, pp. 41~62.
- Smith, A. J., Cassidy, N., Perry, H., Begue-Kirn, C., Ruch, J. V., Lesot, H. 1995. "Reactionary dentinogenesis". *Int J Dev Biol* 39(1): 273-280.
- Stanley, H. R., Ranney, R. R. 1962. "Age changes in the human dental pulp. I. The quantity of collagen". *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 15: 1396-1404.

- Takamori, Y., Suzuki, H., Nakakura-Ohshima, K., Cai, J., Cho, S. W., Jung, H. S., Ohshima, H. 2008. "Capacity of dental pulp differentiation in mouse molars as demonstrated by allogenic tooth transplantation". *J Histochem Cytochem* 56(12): 1075-1086.
- Terling, C., Rass, A., Mitsiadis, T. A., Fried, K., Lendahl, U., Wroblewski, J. 1995. "Expression of the intermediate filament nestin during rodent tooth development". *Int J Dev Biol* 39(6): 947-956.
- Thibodeau, B., Trope, M. 2007. "Pulp revascularization of a necrotic infected immature permanent tooth: case report and review of the literature". *Pediatr Dent* 29(1): 47-50.
- Tsukamoto-Tanaka, H., Ikegame, M., Takagi, R., Harada, H., Ohshima, H. 2006. "Histochemical and immunocytochemical study of hard tissue formation in dental pulp during the healing process in rat molars after tooth replantation". *Cell Tissue Res* 325(2): 219-229.
- Unno, H., Suzuki, H., Nakakura-Ohshima, K., Jung, H. S., Ohshima, H. 2009. "Pulpal regeneration following allogenic tooth transplantation into mouse maxilla". *Anat Rec (Hoboken)* 292(4): 570-579.
- Vojinovic, O., Vojinovic, J. 1993. "Periodontal cell migration into the apical pulp during the repair process after pulpectomy in immature teeth: an autoradiographic study". *J Oral Rehabil* 20(6): 637-652.

Wang, X., Thibodeau, B., Trope, M., Lin, L. M., Huang, G. T. J. 2010. "Histologic Characterization of Regenerated Tissues in Canal Space after the Revitalization/Revascularization Procedure of Immature Dog Teeth with Apical Periodontitis". *J Endod* 36(1): 56-63.

Wiese, C., Rolletschek, A., Kania, G., Blyszczuk, P., Tarasov, K. V., Tarasova, Y., Wersto, R. P., Boheler, K. R., Wobus, A. M. 2004. "Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells?". *Cell Mol Life Sci* 61(19-20): 2510-2522.

ABSTRACT

Histologic and Immunohistochemical analysis of dental pulp healing after tooth replantation in rats.

Eun Jin Go

Department of Dentistry

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Seung Jong Lee D.D.S, M.S.D, Ph.D.)

The objective of this study was to histologically observe the dental pulp healing after tooth replantation in rats. For immunohistochemical analysis, nestin was used as the odontoblastic marker. The maxillary right first molars of 4-week-old rat were extracted, and then immediately repositioned in the original socket. At 3 days after replantation, there was localized inflammatory reaction. But, pulp revascularization and healing had already begun in the root area. At 5 days after replantation, odontoblast-like cells were observed. Tertiary dentin deposition was observed beneath the pulp-dentin border from 1 week after the replantation, and gradually increased until 2 weeks after the replantation. The presence of odontoblast-like cells and the formation of tertiary dentin continued up to 4 weeks. At 4 weeks, the deposition of bone-like tissues and cementum-like

tissues were observed. These results showed that the mineralization of tooth after replantation was initially occurred by the deposition of tertiary dentin, but as time passed, the deposition of bone-like tissues and cementum-like tissues was begun and increased.

Key words: Tertiary dentin, Bone, Dental pulp healing, Tooth replantation, Rat