

치아발육시 방사선조사와 칼슘결핍이 골형성단백질-2/4의 분포에 미치는 영향에 관한 연구

경희대학교 치과대학 구강악안면방사선학교실
박대희 · 황의환 · 이상래

The Effects of Irradiation and Calcium-deficient Diet on the Expression of Bone Morphogenetic Protein-2/4 during Early Tooth Development

Dai-Hee Park, Eui-Hwan Hwang, Sang-Rae Lee

Department of Oral and Maxillofacial Radiology, College of Dentistry, Kyung Hee University

ABSTRACT

Purpose : To investigate the expression of bone morphogenetic protein (BMP)-2/4 during early tooth development after irradiation and calcium-deficient diet.

Materials and Methods : The pregnant three-week-old Sprague-Dawley rats were used for the study. The control group was non-irradiation/normal diet group (Group 1), and the experimental groups were irradiation/normal diet group (Group 2) and irradiation/calcium-deficient diet group (Group 3). The abdomen of the rats at the 9th day of pregnancy were irradiated with single dose of 350 cGy. The rat pups were sacrificed at embryonic 18 days, 3 days and 14 days after delivery and the maxillae tooth germs were taken. The tissue sections of specimen were stained immunohisto-chemically with anti-BMP-2/4 antibody.

Results : At embryo-18 days, immunoreactivity for BMP-2/4 of the Group 1 was moderate in stratum intermedium of dental organ and weak in dental papilla and dental follicle, but that of Group 2 was weak in cell layer of dental organ, and no immunoreactivity was shown in dental papilla and dental follicle of Group 2 and in all tissue components of the Group 3. At postnatal-3 days, immunoreactivity for BMP-2/4 of the Group 1 was strong in cell layer of dental organ, odontoblasts and developing alveolar bone, but that of Group 2 and Group 3 was weak in odontoblasts and developing alveolar bone. At postnatal-14 days, immunoreactivity for BMP-2/4 of the Group 1 was strong in newly formed cementum, alveolar bone and odontoblasts, but that of Group 2 was weaker than that of Group 1. In the Group 3, tooth forming cell layer showed weak immunoreactivity, but other cell layers showed no immunoreactivity.

Conclusion : The expression of bone morphogenetic protein (BMP)-2/4 during early tooth development was disturbed after irradiation and calcium-deficient diet. (*Korean J Oral Maxillofac Radiol* 2000 ; 30 : 169-181)

KEY WORDS : irradiation, calcium-deficient diet, bone morphogenetic protein, tooth development

서 론

두경부 악성 종양의 방사선치료시에는 방사선에 의한 세포손상이 종양세포에만 국한되는 것이 아니라 방사선조사야에 포함된 모든 세포에 다양하게 발현되는데, 구강 및

이의 인접 조직의 경우 타액선의 손상으로 인한 구강건조증, 골조직의 손상으로 인한 방사선골괴사, 하악과두의 성장 중심부위 연골의 손상으로 인한 악골의 성장장애, 구강 점막의 손상으로 인한 점막염, 그리고 발육 중인 치아의 형성장애 등과 같은 의인성 손상이 발생된다.¹ 치아를 포함한 구강조직에 대한 방사선의 생물학적 효과는 방사선의 종류, 조사방법 및 조사선량, 그리고 방사선조사시 조직의 발육단계는 물론, 방사선에 대한 조직의 상대적인 감수성에 따라 매우 다양하게 나타나는데, 방사선은 기본적으로 세포분열에 장애를 유발시키는 것으로 알려져 있다.^{2,3}

접수일 : 2000년 6월 3일 채택일 : 2000년 7월 11일
Correspondence to : Prof. Eui-Hwan Hwang
Department of Oral and Maxillofacial Radiology, College of Dentistry, Kyung Hee University, #1 Hoeki-dong, Dongdaemun-ku, Seoul 130-701, Korea
Tel) 02-958-9406, Fax) 02-965-1256
E-mail) hehan@khu.ac.kr

Tribondeau와 R camier⁴에 의하여 방사선조사로 인한 악안면부위의 발육부전이 동반된 치아의 발육지연이 보고된 이래, 방사선이 치아와 악골을 포함한 인접 구강조직에 미치는 영향에 대하여서는 악성 종양의 방사선치료와 관련되어 유발된 합병증에 관한 많은 임상보고들이 있다. Leist⁵는 방사선에 의한 태아의 소두증(microcephalia)과 치아의 맹출지연을, Bruce와 Stafne,⁶ Brown,⁷ Stafne과 Bowling⁸은 방사선에 의한 왜소치와 부분 무치증, 치아의 석회화 지연, 치근의 형성장애, 치배의 괴사 등을 보고한 바 있다. 특히, 방사선이 치성 조직에 미치는 영향에 관하여서는 많은 실험적 연구가 이루어진 바 있는데, Dale⁹은 생후 90일된 백서에 1,350 R을 전신조사하여 대구치 치근의 형성장애와 2차 상아질 및 백악질의 침착 감소를, English 등¹⁰은 생후 21일된 백서의 두부에 1,500 R을 국소적으로 조사하여 생리적으로 왕성한 치성 세포의 손상으로 인한 치아의 형성부전을, Horn 등¹¹은 생후 21일과 40일된 백서의 두부에 국소적으로 방사선을 조사한 결과, 일회 조사한 경우에 비하여 분할 조사한 경우에 치아 형성조직의 손상이 현저하였다고 각각 보고하였다. 또한 태내 실험동물에 대한 방사선조사가 치성 조직에 미치는 영향에 관하여, Burstone¹²은 생쥐의 임신기간 중에 ³²P를 이용하여 방사선에 의한 대구치의 분화 장애를, Piekos¹³는 태내 햄스터에 70 R을 조사하여 상아모세포의 배열 이상, 치수내 혈관의 확장, 치수의 섬유화 및 치아의 발육지연을 각각 보고한 바 있다. 그러나 태내 실험동물에 대한 방사선조사 시 이의 영향에 관한 연구의 대부분은 태내, 또는 생후 사망, 선천적 기형과 발육정지 등과 같은 것으로서, 태내 실험동물에 대한 방사선조사가 치아의 발생과 초기 형성에 미치는 영향에 관한 연구는 드물다.

한편 방사선골괴사의 초기 변화로서도 나타나는 골다공증은 골기질의 형성결핍에 의하여 골질량이 감소되고, 골밀도가 낮아지지만, 이들 골조직은 정상적인 화학적 성분을 가지는 대사성 골질환의 하나이다.¹⁴⁻¹⁶ 골다공증은 노화, 불완전골형성증 등과 같은 특발성 요인, 폐경, 뇌하수체 기능저하증, 부갑상선기능항진증 등과 같은 내분비장애 요인, 장기간의 헤파린 투여, 골수질환 등과 같은 혈액장애 요인, 기아, 칼슘이나 비타민 D의 결핍 등과 같은 대사장애 요인, 그리고, 근육마비, 거동불능 등과 같은 전신적 요인 및 부동화, 국소적인 신경근 장애 등과 같은 국소적 요인 등 다양한 원인에 의해 발생된다.^{17,18} 골다공증시에는 골조직 뿐만 아니라 소량의 칼슘을 함유하고 있는 치아의 경조직에도 영향을 미쳐 상아질의 형성과 석회화에 장애가 유발되는데,^{19,20} 칼슘결핍이 치아의 구성 성분과 구조에 미치는 영향에 관하여, Ferguson과 Hartles²¹는 칼슘결핍시 성장 백서에서는 상아질의 형성장애가, 성숙 백서에서는 치아 중량의 감소가 유발된다고 하였으며, Lozupone과 Favia²²는 성장 백서에 저칼슘식을 투여하면 전상아질의 합성 감

소와 함께 법랑질과 상아질의 석회화가 현저히 감소된다고 하였다. 또한 Hartles와 Shapiro²³는 치아 크기의 감소에 대해, Engstrom 등²⁴과 Rasmussen²⁵은 전상아질의 폭경 증가에 대해 각각 연구보고한 바 있다.

이와 같이 치아의 발육과정 중에는 여러 가지 체내, 외 조건에 의하여 세포 및 세포의 기질성분의 변화가 나타나게 되는데, 치아의 발육이상이나 병적 진행과정을 밝히기 위하여서는 다양한 체내, 외 조건의 변화를 이해할 필요가 있다. 따라서 치아의 발육과 맹출장애를 유발시키는 국소적 요인의 하나인 방사선과 칼슘대사의 부평형으로 인하여 골조직은 물론 치아 경조직의 석회화에도 영향을 미치는 전신적 요인의 하나인 골다공증이 치아의 발생과 초기 형성에 미치는 영향에 대한 평가도 이루어져야 할 것이다.

최근 치아의 발생과 초기 형성단계에서 세포의 기질단백질의 분포와 역할에 대한 관심이 집중되고 있는데, 치아의 발육과 연관되어 epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF), transforming growth factor (TGF)- β 등과 같은 생물학적 분자들이 밝혀지고 있으며, 이에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.²⁶⁻²⁸ 이 중 TGF- β 의 일종인 골형성단백질(bone morphogenetic protein, BMP)은 Urist²⁹가 수종의 산으로 탈회한 골기질을 근육에 이식하여 골이 유도됨을 확인하였고, Urist³⁰에 의해 BMP로 명명되었으며, 현재까지 BMP-1부터 BMP-13까지 13종류의 BMP가 밝혀져 있다.³¹ BMP는 배아의 세포층 사이에서 유도 신호물질로서 작용하며, 발육 중인 기관의 상피와 간엽조직간의 상호작용인 2차 유도시기에 신호물질을 전달하는 역할도 담당하는 것으로 알려져 있다.³³ 따라서 두개안면부의 발육을 조절하는 것으로 알려진 BMP는 골의 형태결정 및 형태발생에 있어서 중요한 역할을 담당하며, 특히 치아의 분화와 형태발생시기에 조절인자로 작용하는데, BMP-2와 BMP-4는 배아 발생시기의 골조직, 비장, 간, 뇌, 폐, 신장 및 심장의 형성시기에 중요한 조절인자로 알려져 있다.^{32,33}

이와 같이 BMP는 경조직의 발육에 있어서 특정한 역할을 담당하므로 치아의 발생과 초기 형성시 BMP의 위치와 분포는 방사선과 칼슘결핍이 치아 형성세포의 분화와 기질형성에 미치는 영향을 평가하는 지표로 사용될 수 있을 것으로 생각된다. 또한 구강조직 특히, 치아의 발육시기에 방사선과 칼슘결핍이 미치는 영향을 구명하기 위한 세포 및 세포의 기질의 변화를 관찰한 연구는 매우 드물어서 이에 관한 연구는 의의가 있다고 사료된다.

이에 저자들은 방사선조사와 칼슘결핍이 치아의 발생과 초기 형성과정에서 BMP-2/4의 분포에 미치는 영향을 구명하고자, 태내 백서의 치배 형성시기에 임신 백서의 복부에 방사선을 조사하고, 방사선조사 후에는 임신 백서에게 저칼슘식을 투여한 다음, 이들의 자백서 치배를 BMP-2/4 항체를 이용한 면역조직화학적 방법 및 투과전자현미

경을 이용한 병리조직학적 방법으로 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

체중 150 gm 내외의 생후 3주된 Sprague-Dawley계 백서 15두를 임신시킨 후, 이들을 실험목적에 따라 방사선비조사-정상식이군인 1군을 대조군으로, 방사선조사-정상식이군인 2군과 방사선조사-저칼슘식이군인 3군을 실험군으로 정하여 대조군과 실험군에 이들 백서 5두씩을 각각 배정하였으며, 이들 3개 군의 자백서 5두씩을 각 군의 실험동물로 채택하였다.

2. 실험방법

1) 방사선조사

방사선조사는 실험군인 2군과 3군의 백서 임신 9일에 실험동물용 마취제인 Zoletil (Vibrac Laboratories, France)을 체중 100 gm당 0.02 ml 근육내 주사하여 전신마취시킨 후, Co-60 심부 치료기(Theratron 780, Atomic Energy of Canada Ltd, Canada)를 이용하여 방사선원과 피부간 거리 80 cm, 심도 1.5 cm, 선량률 63.1 cGy/min으로 350 cGy의 흡수선량이 되도록 임신 백서의 복부에 일회 조사하였다.

2) 식이 투여

정상식이 투여군인 1군과 2군에는 칼슘 0.6%, 인 0.2%가 함유된 백서용 고품사료(Samyang Oil & Feed Co, Ltd, Korea)와 상수도 물을, 저칼슘식이 투여군인 3군에는 방사선조사 후, 칼슘 0.01%, 인 0.95%가 함유된 백서용 고품사료(Oriental Yeast Co, Ltd, Japan)와 멸균된 증류수를 각각 자유섭취시켰다.

3) 실험동물의 희생

각 군의 태생 18일, 생후 3일 및 생후 14일된 자백서를 희생시킨 다음, 제 1대구치 치배가 포함된 상악골을 절취하였다.

4) 관찰방법

(1) 면역조직화학적 관찰

면역조직화학적 관찰을 위해서 Avidin-Biotin Conjugate (ABC)법을 사용하여 면역염색을 시행하였다. 본 실험에서는 일차 항체로서 goat polyclonal anti-BMP-2/4 항체 (Santa Cruz Biotechnology, USA)를 사용하였다. BMP-2/4 항체는 BMP-2와 BMP-4에 동일하게 반응하는 항체이다. 이차항체 및 ABC reagent는 Vectastain Elite ABC kit (Vector laboratories, USA)를 사용하였다.

각 군의 실험동물을 ethyl ether로 흡입마취시킨 후, 10% 중성 완충 formalin (pH 7.0)으로 심장을 통하여 전신 관류 고정한다. 다음, 상악 제 1대구치 치배가 포함된 상악골을 절

취하여 동일한 용액에 4시간 더 고정하였다. 그 후 구강점막 이외의 불필요한 연조직을 제거하고, 0.01 M 인산 완충액 (pH 7.4)으로 30분간 수세하여 0.01 M 인산 완충액으로 희석시킨 10% ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA, pH 7.4)로 4°C에서 30일간 탈회 하였다. 탈회 후 조직을 0.01 M 인산 완충액으로 3회 수세한 다음, 10%, 15% sucrose 용액에 각각 5시간 동안, 20%, 30% sucrose 용액에 각각 24시간 동안 침지시켰다. 조직이 완전히 용액 내에서 가라앉은 것을 확인한 다음, OCT compound (Polyfreeze, Polyscience, USA)에 30분간 침지시켰다. 그 후 조직을 액체 질소에 넣어 급속 냉동시킨 후, 절편을 제작할 때까지 -20°C의 냉동고에 보관하였다. 절편제작은 냉동절편기 (HistoSTAT, Reichert-Jung, Germany)로 약 10 μm의 두께로 박절하였다. 박절이 끝난 절편은 실온에서 2시간 동안 건조, 부착시킨 다음 면역염색을 시행하였다.

조직내의 내재성 과산화효소를 불활성화시키기 위해 methanol에 희석한 0.5% H₂O₂로 실온에서 30분간 처리하였다. 0.01 M 인산 완충 식염수 (phosphate buffered saline, PBS, pH 7.2)로 5분씩 2회 수세한 후, 비특이적 반응을 방지하기 위해 토끼의 정상 혈청으로 20분간 반응시켰다. 여분의 혈청을 제거해 내고, 조직절편에 일차 항체로서 goat polyclonal anti-BMP-2/4 항체를 각각 4°C에서 하루동안 반응시켰다. 0.01 M PBS로 5분씩 3회 수세한 후, 이차 항체로서 biotinylated rabbit anti-goat IgG를 실온에서 30분간 반응시켰다. 0.01 M PBS로 5분씩 2회 수세한 후 ABC reagent로 실온에서 30분간 반응시켰다. 절편을 0.01 M PBS로 5분간 수세하고, 마지막으로 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.2)에 희석한 0.02% diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)와 0.02% H₂O₂를 혼합한 후 적용하여 빛을 차단시킨 상태에서 5분간 반응시켰다. 이 후 흐르는 물에 10분간 수세하고 수용성 봉입제로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다. 대조염색이 필요한 조직은 methyl green 용액으로 10분간 염색하고 흐르는 물에 수세한 후 수용성 봉입제로 봉입하였다. 대조군에서는 일차 항체 대신 PBS를 사용하였다.

(2) 투과전자현미경 관찰

각 군의 실험동물에 ketamine (Yuhan, Korea)을 체중 kg 당 75 mg 복강내 주사하여 마취시킨 후, cacodylate 완충액이 포함된 2.5% glutaraldehyde (pH 7.4)로 관류고정하였다. 제 1대구치 치배가 포함된 상악골을 주위 조직과 함께 적출하고 4% glutaraldehyde-5% paraformaldehyde에 3시간 더 고정한 후, 0.1 M cacodylate 완충액으로 수세하고 3% glutaraldehyde가 포함된 0.1 M EDTA에 넣어 4°C에서 4주간 탈회하였다. 상악골의 반쪽으로부터 제 1대구치를 포함한 1 mm 두께의 근원심 시료를 만들어 1% osmium tetroxide (pH 7.2)에 실온에서 1시간 30분간 후고정하고, 1% uranyl acetate (pH 6.2)로 실온에서 1시간 30분간 전자염색하였다. 조직은 0.1 M cacodylate 완충액으로 수세하고 일련의 etha-

anol로 탈수시킨 후, PolyBed812 혼합액(Polyscience, USA)으로 포매하여 60°C에서 72시간 중합시켰다. 광학현미경 관찰을 위해서 1 μm의 준박절편을 제작하였고, hematoxylin-eosin으로 중염색하여 관찰하였다. 투과전자현미경 관찰을 위해서 다이아몬드 칼을 부착시킨 초박절편기(MT-X, RMC, USA)로 50-70 nm의 초박 절편을 만들고, 이 절편은 uranyl acetate에 25분, lead citrate에 7분 동안 이중 염색을 하였으며, 염색된 절편은 투과전자현미경(JEM-1010, JEOL, Japan)으로 관찰하였다.

결 과

1. 태생 18일군

치아의 발생과정에서 모자시기(cap stage)에 해당되는 시기로서, 치아기의 세포층은 각각 잘 분화된 세포층으로 나뉘어져 있었다. 이 시기는 치아를 형성하는 경조직의 기질이 분비되기 이전의 단계로서, 내치상피가 법랑모세포로 분화되지 않은 키 큰 원주형 세포층이 형성되어 있었고, 치유두의 간엽세포는 밀집된 양상이었으며, 치낭이 치배를 둘러싸고 있었다(Fig. 1).

1) 1군

이 시기에 BMP-2/4 항체에 대한 면역염색 결과, 구강상피에서는 강한 면역 반응을 보였으나, 하방의 간엽조직에서는 면역반응을 거의 보이지 않았다. 치아기의 상피세포에서도 거의 면역반응이 나타나지 않았고, 내치상피에 인접한 일부 중간층 세포에서만 중등도의 면역반응을 보였으며, 치배를 둘러싼 치낭 세포에서는 약한 면역반응을 나타내었다(Fig. 2).

2) 2군

이 시기에 BMP-2/4 항체에 대한 면역염색 결과, 치아기에서는 면역반응이 거의 나타나지 않았고, 간엽조직 사이로 함입해 들어간 치배의 상피세포에서만 전체적으로 약한 면역반응을 보였으며, 치유두와 치낭에서는 면역 반응을 거의 나타내지 않았다(Fig. 3).

3) 3군

이 시기에 BMP-2/4 항체에 대한 면역염색 결과, 1군 및 2군에서와 유사하게 구강상피층에서만 약한 면역반응을 보였고, 하방의 간엽조직에서는 면역 반응을 거의 보이지 않았다. 치배에서는 전체적으로 면역반응이 나타나지 않았다(Fig. 4).

2. 생후 3일군

치아의 발생과정에서 후기 종시기(bell stage), 또는 치관형성시기에 해당되는 시기로서, 치아 경조직의 기질이 분비되기 시작하는 활동성의 세포들이 관찰되었다(Fig. 5).

1) 1군

이 시기에 BMP-2/4 항체에 대한 면역염색 결과, 치아기의 모든 세포층에서 강한 면역반응이 나타났고, 치배를 둘러싼 치낭 세포층에서도 중등도의 면역 반응을 보였다. 상아모세포의 분화가 완성되어 전상아질을 분비하고 있는 상아모세포층에서는 강한 면역반응이 관찰되었다. 발생 중인 치조골의 표면과 골 내부에 있는 골세포의 세포질에서도 강한 면역반응을 보였다(Fig. 6).

2) 2군

이 시기에 BMP-2/4 항체에 대한 면역염색 결과, 치아기의 외치상피와 내치상피에서는 중등도의 면역반응을, 성상세망에서는 약한 면역반응을, 내치상피에 인접한 중간층 세포와 치배를 둘러싼 치낭에서는 중등도의 면역반응을 보였다. 전상아질을 분비하고 있는 상아모세포층에서는 중등도의 면역반응이 관찰되었고, 발생 중인 치조골의 표면과 골의 내부에 있는 골세포의 세포질에서도 중등도의 면역반응을 보였지만, 구강상피층에서는 여전히 강한 면역반응을 보이고 있었다(Fig. 7).

3) 3군

이 시기에 BMP-2/4 항체에 대한 면역염색의 결과, 치아기에서는 면역반응이 사라졌고, 전상아질을 분비하고 있는 상아모세포층에서는 약한 면역반응을, 장차 교두가 될 부위에 있는 법랑모세포의 분비단부위의 세포질에서는 중등도의 면역반응을 보였다. 상방의 치조골에서는 광화된 골기질 이외의 세포성분에서만 약한 면역반응을 보였지만, 구강상피에서는 중등도의 면역반응을 나타내었다(Fig. 8).

3. 생후 14일군

치아의 발생과정에서 치근 형성시기에 해당되는 시기로서, 치근 경조직의 기질이 분비되기 시작하는 활동성의 세포들이 관찰되었다(Fig. 9).

1) 1군

이 시기에 BMP-2/4 항체에 대한 면역염색 결과, 새로 형성된 치근 상아질의 표면을 따라 부착된 백악질에서 치근의 거의 전 길이에 걸쳐 강한 면역 반응을 나타내었으며, 치근 형성부위의 치주인대에서는 중등도의 면역반응을 보였다(Fig. 10). 특히, 새로 형성되는 치조골에서는 골외막, 골 주위와 골속 질의 내강 주위를 따라 강한 면역반응을 나타내었다(Fig. 11). 치근 상아질을 따라 배열되어 있는 상아모세포는 길쭉한 원주형의 상아모세포로 분화되었는데, BMP-2/4의 항체에 대해 전상아모세포로부터 면역반응이 나타나기 시작하여 상아기질을 분비하는 분비기의 상아모세포에서도 면역반응을 나타내었다(Fig. 12) 투과전자현미경으로 상아모세포를 관찰한 결과, 핵이 기저측에 위치하고, 주변부로 분산된 염색질을 풍부하게 가지고 있었

으며, 세포질내의 세포소기관들은 수많은 소포, 많은 양의 조면세포질내세망, 핵의 상아질층에 위치한 잘 발달된 골지복합체, 그리고 세포체 전체에 걸쳐 산재되어 있는 많은 사립체 등으로 매우 발달되어 있었다(Fig. 13).

2) 2군

이 시기에는 치근 형성이 미약하여 치근의 길이가 짧았고, BMP-2/4 항체에 대한 면역염색 결과, 새로 형성된 백악질을 따라 약한 면역반응을, 치근 형성부위의 치주인대 부위에서는 1군보다 약한 면역반응을 나타내었다(Fig. 14). 치아 주위의 치조골에서는 중등도의 면역반응이 관찰되었으며(Fig. 15), 전상아질, 상아모세포에서는 약한 면역반응을 나타내었다(Fig. 16). 투과전자현미경으로 상아모세포를 관찰한 결과, 상아모세포의 세포질이 위축되었고, 세포소기관의 수도 감소되어 있는 양상이 관찰되었다(Fig. 17).

3) 3군

이 시기에는 치근의 발육이 약하고 치근이 변형되어 있었으며, BMP-2/4 항체에 대한 면역염색 결과, 치아 형성부위의 세포층에서 약한 면역반응을 나타내었다(Fig. 18). 치주인대 및 치조골 부위에서는 면역반응을 거의 보이지 않았다(Figs. 19, 20). 투과전자현미경으로 상아모세포를 관찰한 결과, 상아모세포의 세포질이 위축되었고, 핵이 농축되어 있는 양상이 관찰되었다(Figs. 21).

고 찰

발육 중인 치아는 치아의 발육장애를 유발시킬 수 있는 국소적, 또는 전신적 요인의 영향을 쉽게 받아 이의 구조나 구성성분에 변화가 야기되며, 해부학적 형태와 기능적 요구에 따라 흡수와 형성을 반복하면서 개형이 연속적으로 이루어지는 골조직과는 달리, 치아의 형성장애는 영구적으로 남게 된다.³⁴ 발육 중인 치아의 구조나 구성성분에 변화를 야기시키는 국소적 요인의 하나인 방사선조사시에는 치아의 발육정지로부터 치아 발육의 완전한 실패까지 각 치아의 형성단계와 관련된 치아의 형성부전이나 치배의 변성과 괴사 등 다양한 형태의 발육장애가 유발되며,³⁵⁻³⁷ 최근의 연구에서는 성장이 완료된 치아의 경우에도 외상에 대한 치수의 정상적인 반응 저하, 치수의 노출에 따른 치수의 괴사 및 치근단 병소의 발생이 보고된 바 있다.³⁸ 또한 전신적 요인의 하나인 골다공증시에는 골조직 뿐만 아니라 치아 경조직에도 영향을 미쳐 상아질의 형성장애, 치아의 중량 감소, 전상아질의 합성 감소 및 법랑질과 상아질의 석회화 감소 등이 유발된다.^{21,22}

이와 같이 방사선조사시에는 발육 중인 치아의 구조나 구성성분에 여러 가지 장애가 유발되며, 칼슘결핍 등으로 인해 골다공증이 유발되는 경우 치아의 발육장애는 더욱 심화될 것으로 사료된다. 따라서 본 실험에서는 태내 백서

의 치배 형성시기인 백서의 임신 9일째에 임신 백서에는 영향이 없고, 태내 백서의 기형을 유발시키는 선량인 350 cGy의 흡수선량³⁹을 일회 조사하고, 이 후에는 저칼슘식을 투여하여 치아 형성과정에 장애를 유발시키는 국소적 요인인 방사선과 전신적 요인인 칼슘결핍이 치아의 발생과 초기 형성과정에 미치는 영향을 BMP-2/4 항체를 이용한 면역조직화학적 방법 및 투과전자현미경을 이용한 병리조직학적 방법으로 관찰하였다.

본 실험에서는 태생 18일, 생후 3일 및 생후 14일된 자백서의 치배를 실험재료로 이용하였는데, 치아의 발생 및 초기 형성 과정은 상피와 간엽간의 상호 유도작용을 통해 상피세포가 법랑질을 분비하는 법랑질모세포로 분화되고, 신경능선세포에서 유래된 간엽세포들이 상아질을 분비하는 상아모세포로 분화되기 때문에 초기 발생과정에 있는 치아는 방사선조사에 의한 기형발생 효과를 연구하는데 유용한 실험재료이다.^{40,41} 또한 본 실험에서는 칼슘결핍으로 인한 골다공증을 유발시키기 위해 실험동물에 저칼슘식을 투여하였는데, 이는 난소적출술, 부동화, 좌골신경절 단술 등과 같은 다른 여러 실험적으로 골다공증을 유발시키는 방법⁴²⁻⁴⁴에 비하여 비교적 짧은 실험기간 동안 골다공증상태의 지속적이고도 안정적인 유지가 가능하기 때문이었다.⁴⁵

한편 치아의 발생은 그 기원이 서로 다른 상피와 간엽간의 상호 유도작용에 의해 세포의 분화와 기질 분비, 그리고 광화 등의 일련의 과정을 거치게 되는데, 발생 중인 배자에서 상피와 상피를 지지하는 간엽조직의 사이에는 기능적인 상관관계가 있으며, 이 두 조직간의 상호 유도작용은 조직을 일정하게 발생시키는데 필요하다.⁴⁰ 따라서 본 실험에서는 치아와 신장과 같이 여러 계열의 혼합된 조직을 형성하는데 필요한 상피와 간엽간의 상호 유도작용을 조정하는 것⁴⁶으로 알려져 있는 BMP-2/4의 발현양상을 면역조직화학적 방법으로 관찰하였다.

BMP는 약 16-18 kDa의 아단위(subunit)를 가지는 2량체 분자로서, 중배엽의 유도, 골격의 형성, 치아의 발육, 그리고 사지의 형태발생과 같은 다수의 과정에 관여하며, 세포의 증식, 분화, 형태 발생 등을 포함한 여러 과정을 조절한다.^{47,48} 특히, BMP는 치아의 분화와 형태발생을 조절하는데,³² BMP-4는 치아의 형성 초기에, BMP-2는 치아의 형성 후기에 관여한다.⁴⁶ 치아의 형성 후기에 BMP는 법랑모세포, 상아모세포 및 상아기질에서 나타나며, 치수의 간엽세포가 증식하고, 상아모세포로 분화하는데 관여하는데, BMP는 골양 상아질(osteodentin)과 관주 상아질(intratubular dentin)의 형성을 유도하는 것으로 알려져 있다.^{46,49,50}

본 실험의 1군에서는 치아의 발생 과정 중 모자시기인 태생 18일군에서 치아기의 세포층은 각각 잘 분화된 세포층으로 나뉘어져 있었다. 또한 내치상피가 법랑모세포로 분화되지 않은 큰 원주형 세포층으로 형성되어 있었고,

치유두의 간엽세포는 밀집된 양상이었으며, 치낭이 치배를 둘러싸고 있었는데, BMP-2/4 항체에 대한 면역염색 결과, 구강상피에서 강한 면역반응이, 치아기의 일부 중간층 세포에서는 중등도의 면역반응이, 하방의 치유두와 치낭에서는 약한 면역반응이 관찰되었다. 치관 형성시기에 해당하는 후기 종시기인 생후 3일군에서는 치아 경조직의 기질이 분비되기 시작하는 활동성의 세포들이 관찰되었으며, BMP-2/4 항체에 대한 면역염색 결과, 치아기의 모든 세포층에서 강한 면역반응을 보였으며, 특히 전상아질을 분비하고 있는 상아모세포층과 골세포의 세포질에서도 강한 면역반응이 관찰되었다. 또한 치근 형성시기인 생후 14일군에서는 치근 경조직의 기질이 분비되기 시작하는 활동성의 세포들이 관찰되었으며, BMP-2/4 항체에 대한 면역염색 결과, 치근의 거의 전 길이에 걸쳐 있는 백악질과 상아모세포층, 그리고 치조골의 골외막, 골 주위와 골수의 내강 주위에서 강한 면역반응이 관찰되었으며, 치주인대 부위에서는 중등도의 면역반응을 보였다. 또한 투과전자현미경 소견에서 상아모세포는 염색질이 풍부하였으며, 세포질내의 세포소기관들은 매우 잘 발달되어 있었다.

치아 형성시 BMP-2/4의 발현양상에 대하여, Bennett 등²⁸은 백서의 구강악안면부 발생시 BMP-2/4의 면역반응을 관찰한 결과, 태생 13일까지의 치배에서는 상피에서 BMP-2에 대해 약한 면역반응이, 발육 중인 Meckel 연골이 있는 부위에서는 강한 면역반응이 나타났고, 하방의 치성 간엽조직에서는 면역반응이 나타나지 않았으며, BMP-4에 대해서는 치배에서만 면역반응이 관찰되었다고 하였다. Vainio 등⁴⁶은 BMP-4 mRNA가 초기의 치성 상피에서 발현되었다가 모자시기에는 상피에서 하방의 간엽으로 이동된다고 하였으며, Thesleff와 Vaahtokari⁵¹는 치아 발생의 종시기에 치아유두세포가 상아모세포로 분화되는 시기에는 여러 가지 단백질과 성장인자인 TGF- β 1과 연관된 유전자의 증폭이나 발현이 시작된다고 하였다. Aberg 등⁵²은 종시기 치배의 BMP-2/4의 발현양상에 대해, 치아기의 상피에서 면역반응이 사라지고, 치유두 간엽의 중앙부위에서 나타났다가 면역반응이 치관 부위로 확장되며, 전상아모세포에서 가장 현저해진다고 하였다. 또한 BMP-4의 면역반응은 법랑삭(enamel cord)이 없어지면서 치배의 상피에서 사라졌다가 전상아모세포를 포함하여 교두 부위의 치유두에서 강해진다고 하였다. 본 실험에서는 모자시기에 해당하는 태생 18일군에서 BMP-2/4의 면역반응이 Bennett 등²⁸의 연구결과와 유사하게 관찰되었으나, 치관 형성시기인 후반 종시기에 해당하는 생후 3일군에서는 Aberg 등⁵²의 연구결과와 다소 상이한 BMP의 발현양상을 보였는데, 치관 형성시기에 BMP-4 발현양상에 대해, Vainio⁴⁶는 상아모세포와 법랑모세포 모두에서 면역반응이 관찰된다고 하였고, Heikinheimo⁵³는 종시기 이후에는 치아기의 상피와 치낭에서 면역반응이 관찰되지 않는다고 보고한 바 있다. 따라서 이러

한 BMP의 발현양상에 대한 본 실험결과와 선학들의 실험결과와의 다소간의 차이는 실험동물의 종류에 따라 발생 시기의 구분에서 다소 차이가 있을 수 있고, 치아 형성시기에는 BMP의 발현양상이 급속히 변화되기 때문인 것으로 생각되며, 향후 이 시기의 BMP의 발현양상에 대해서는 좀 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다. 한편 본 실험의 생후 14일군에서는 치조골 주위에서 BMP-2/4의 강한 면역반응이 관찰되어 치근이 형성되는 과정 중에 그 주위에서 치조골이 발생되고, 성숙되는 과정을 관찰할 수 있었다. Schoeder⁵⁴는 골모세포와 그 주위의 미분화 간엽세포, 골수, 그리고 치낭 세포층에서 면역반응이 발현되는 것은 미분화 간엽세포인 치낭 세포가 골모세포로 분화되기 때문이라고 하였다.

이에 비하여 본 실험의 방사선조사-정상식이군인 2군의 BMP-2/4 항체에 대한 면역염색 결과, 태생 18일군에서는 치배의 상피세포에서만 전체적으로 약한 면역반응을 보였을 뿐, 치아기 및 치유두와 치낭에는 면역반응을 거의 보이지 않았으며, 생후 3일군에서는 치아기의 외치상피와 내치상피에서 중등도의 면역반응이, 상아모세포층과 골세포의 세포질에서도 중등도의 면역반응을 보였다. 또한 생후 14일군에서는 백악질과 전상아질 및 상아모세포층에서는 약한 면역반응이, 치조골에서는 중등도의 면역반응을 보였으나, 치주인대 부위에서는 1군에 비하여 약한 면역반응이 관찰되었다. 투과전자현미경 소견에서 상아모세포는 세포질이 위축되었고, 세포소기관의 수도 감소되어 있었다.

방사선은 발육 중인 치아에 대해 다양한 치아 구조의 이상과 발육장애를 유발시키는데, 특히 조직분화기와 석회화기 이전의 치배는 방사선에 상당히 민감한 반응을 나타낸다.⁵⁵ Matthews와 Cameron⁵⁶은 태생 15일된 생쥐에게 300 R의 방사선을 조사한 결과, 상아질의 침착률 감소와 치아의 맹출지연이, Saad 등⁵⁷은 태생 12일된 백서에 400 rad의 방사선을 조사한 결과, 치유두와 치아기 세포의 성숙과정에 현저한 장애가 유발됨을 각각 보고한 바 있다. Thesleff 등⁵⁸과 Kleinman 등⁵⁹은 내치상피와 외치상피 세포들은 교통반점과 부착반점 등으로 연결되고, 이 연결복합체는 세포간의 직접적인 소통에 관여할 뿐만 아니라 기저막에 상피세포를 부착시켜 상피와 간엽사이의 간접적인 접촉을 이루고, 치아 형성세포의 분화를 유도하는 역할을 한다고 하였는데, 본 실험의 BMP-2/4 항체에 대한 면역염색 결과, 2군의 태생 18일군에서 치아기, 치유두 및 치낭에서 면역반응이 거의 나타나지 않았고, 생후 3일군과 생후 14일군에서도 1군에 비하여 치아기, 상아모세포층, 백악질 및 발육 치조골 부위에서만 약한 면역반응이 발현되었던 것은 방사선조사가 이러한 유도 기전에 영향을 미쳐 상피와 간엽사이의 부착을 방해할 뿐만 아니라 상아모세포의 분화를 일으킬 수 있는 세포막 수용기의 형성을 방해하여 치아의 발생을 위해 필요한 공간적 위치를 파괴하는데도 관

여하기 때문인 것으로 생각되며, 생후 14일군의 투과전자현미경소견에서도 방사선조사에 의한 상아모세포의 손상을 관찰할 수 있었다. 치성 세포의 방사선감수성에 대해, Collett와 Thonard,⁶⁰ Adkins⁶¹는 치성 세포 중 전상아모세포가 방사선에 가장 민감하다고 하였고, Koppang과 Stokke⁶²는 순측의 상아모세포가 설측의 상아모세포에 비해 방사선에 좀 더 민감하다고 하였는데, 방사선에 의한 세포의 초기 변화는 방사선감수성이 높은 표적인 세포핵의 손상에 의하여 일어나는 것으로 알려져 있다.⁶³ 이와 같이 본 실험의 2군에서 1군에 비하여 상아모세포층 및 백악질 부위에서 전반적으로 면역반응이 약하게 나타난 것은 방사선조사로 인해 치아기, 치유두 등의 세포분화가 제대로 이루어지지 않았기 때문인 것으로 판단된다. 또한 본 실험에서는 1군에 비하여 2군에서 발육 치조골 부위에서 약한 면역반응이 발생되어 치조골의 형성에 장애가 유발되었음을 알 수 있었는데, 일반적으로 방사선은 골기질의 형성과 골의 석회화에 장애를 일으키는 중요한 요인의 하나로 알려져 있으며, 조직학적으로는 골세포의 파괴, 골변연부의 골모세포와 신생 유골의 결손이 특징적으로 나타난다.^{64,65}

본 실험의 방사선조사-저칼슘식이군인 3군의 BMP-2/4 항체에 대한 면역염색 결과, 태생 18일군에서는 구강상피에서만 약한 면역반응을 보였고, 간엽조직이나 치배에서는 면역반응을 보이지 않았으며, 생후 3일군에서는 법랑모세포의 분비단 부위의 세포질과 구강상피에서 중등도의 면역반응을 보였으나, 치아기 세포층에서 면역반응이 사라졌고, 상아모세포층과 광화된 골기질 이외의 세포성분에서만 약한 면역반응을 보였다. 또한 생후 14일군에서는 치아 형성부위의 세포층에서만 약한 면역반응이 보였고, 치주인대 및 치조골 부위에서는 면역반응이 거의 보이지 않았다. 투과전자현미경 소견에서는 세포질이 위축되었고, 핵의 농축양상이 관찰되었다. 따라서 본 실험의 3군에서는 태생 18일군에서 2군과 유사한 면역반응을 보였을 뿐, 1군은 물론, 2군에 비하여 생후 3일군에서는 상아모세포층과 발육 치조골에서만 약한 면역반응을, 생후 14일군에서는 치아 형성세포층을 제외한 다른 모든 부위에서 면역반응을 나타내지 않았다. 이와 같이 본 실험에서 1군과 2군에 비하여 3군에서 BMP-2/4의 면역반응이 전반적으로 약하게 발현된 것은 방사선조사의 영향으로 인해 치아 형성세포와 골모세포의 기능이 장애를 받고, 이로 인한 상아질과 백악질 및 치조골의 형성장애와 더불어 칼슘 공급의 저하로 인한 칼슘결핍이 이들의 형성장애를 심화시킨 것으로 사료되는데, 생후 14일군의 투과전자현미경 소견에서도 상아모세포의 세포질 위축과 핵의 농축 양상이 관찰되었다. Furuta 등⁶⁶은 칼슘결핍시에 상아질의 석회화, 치근의 성장 및 상아기질의 침착에 현저한 장애가 유발된다고 하였으며, Kurita⁶⁷는 방사선에 의하여 골모세포의 장애가 발생되면 미토콘드리아의 칼슘저장이 증가되고, 주위 골조직으로부터 칼슘

의 이동이 발생되며, 저칼슘상태로 인한 칼슘공급의 저하로 골조직의 손실이 증가된다고 한 바 있어, 이들의 연구결과와 본 실험의 결과는 대체로 일치된다고 생각된다. 또한 Belanger,⁶⁸ Henrikson⁶⁹은 세포성 백악질의 경우, 이는 골조직과 여러 면에서 매우 유사하므로 골다공증시 골무기질의 손실이 발생하는 것과 마찬가지로 치아에서도 백악질 용해가 발생된다고 보고하여 칼슘결핍에 의해 백악질의 형성장애가 유발될 수 있음을 시사한 바 있다.

이상과 같이 본 실험에서는 치아발육시 방사선과 칼슘결핍이 BMP-2/4의 분포에 미치는 영향을 평가한 결과, 방사선은 치아 경조직 형성세포인 상아모세포와 백악모세포, 그리고 치조골 형성세포인 골모세포의 분화 과정에 장애를, 칼슘결핍은 기질의 생성, 분비 및 석회화 과정에 장애를 일으켜 BMP-2/4의 합성분비 감소를 유발시키는 것으로 사료되는 바, 향후 방사선과 칼슘결핍으로 인한 치아와 치조골의 발육장애 기전을 상세히 구명하기 위해서는 이에 대한 분자생물학적 연구가 필요할 것으로 판단되며, 이와 더불어 BMP의 발현양상을 이용한 이의 진단 및 치료방법에 관한 연구도 병행되어 이루어져야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Sweeney WT, Elzay RP, Levitt SH. Histologic effect of fractionated doses of selective applied ⁶⁰Co irradiation on the teeth of albino rats. *J Dent Res* 1977; 56: 1403-7.
2. Coady JM, Santagelo MV, Toto PD. Gamma-irradiated mouse incisor. *J Dent Res* 1967; 46: 681-5.
3. Poyton HG. The effects of radiation on teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1968; 26: 639-46.
4. Tribondeau L, Récamier D. Altérations des yeax et du Sequelette Facial d'un Chat nouveau-né par roentgenisation. *Compt Rend Soc de Biol* 1905; 58: 1031.
5. Leist M. Odontologischer Befund bei 6 Kindern von intragravitatem mit Röntgenstrahlen bzw. Radium bestrehten Müttern. *Ztschr f Stomatol* 1926; 24: 448.
6. Bruce KW, Stafne EC. The effect of irradiation on the dental system as demonstrated by the roentgenogram. *J Am Dent Assoc* 1950; 41: 684.
7. Brown WE Jr. Oral manifestations produced by early irradiation: report of a case. *J Am Dent Assoc* 1949; 38: 754.
8. Stafne EC, Bowing HH. The teeth and their supporting structures in patients treated by irradiation. *Am J Orthod Oral Surg* 1947; 33: 828.
9. Dale PP. Radiological effects in the rat dentition. *Proceedings of the 25th Year Celebration of the University of Rochester Dental Branch Fellowship. Program* 955. 1957. p. 141.
10. English AJ, Schlack GA, Freidrick E. Oral manifestations of ionizing radiation. II Effects of 200 V X-ray on rat incisor teeth when administered locally to the head in the 1500 r dose range. *J Dent Res* 1954; 33: 377.
11. Horn Y, Markitzu A, Ulmansky M. Effect of single versus fractionated doses of X-radiation on incisors in rats. *J Dent Res* 1975; 54: 378-83.
12. Burstone MS. The effect of X-ray irradiation on the teeth and supporting structures of the mouse. *J Dent Res* 1950; 29: 220-36.

13. Piekos B. Studies on the influence of X-radiation on the tooth primordia in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Acta Med Pol Vars* 1969; 10: 75-118.
14. Follis RH. A survey of bone disease. *Am J Med* 1957; 22: 469-84.
15. Frost HM. The pathomechanics of osteoporosis. *Clin Orthop* 1985; 200: 198-225.
16. Gallagher JC. The pathogenesis of osteoporosis. *Bone and Mineral* 1990; 9: 215-27.
17. Griffith ER, Stonebridge JB, Lehmann JF. Current methods of in-vivo measurement of osteoporosis. *Am J Phy Med* 1973; 52: 75-91.
18. Haas HC. The pathogenesis of osteoporosis. *Reconstr Surg Traumat* 1967; 9: 82-94.
19. Väänänen HK. Pathogenesis of osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 1991; 49: 11-4.
20. Messer HH, Guo MK. Lack of relation of pulp Ca^{2+} -, Mg^{2+} -ATPase to mineralization rate in rat incisor dentine in response to vitamin and calcium intake. *Archs Oral Biol* 1979; 24: 271-5.
21. Ferguson HW, Hartles RL. The effect of vitamin D on the dentine of the incisor teeth and on the alveolar bone of young rats maintained on diets deficient in calcium or phosphorus. *Archs Oral Biol* 1964; 9: 447-60.
22. Lozupone E, Favia A. Effects of a low calcium maternal and weaning diet on the thickness and microhardness of rat incisor enamel and dentin. *Archs Oral Biol* 1989; 34: 491-8.
23. Hartles RL, Shapiro IM. Changes in the rat incisor teeth in response to dietary deficiencies of calcium or phosphorus in the presence and absence of added vitamin D. *Archs Oral Biol* 1966; 11: 21-9.
24. Engstrom C, Linde A, Magnusson BC. Odontoblast metabolism in rats deficient in vitamin D and calcium. A histochemical survey. *J Oral Pathol* 1977; 6: 359-66.
25. Rasmussen P. Histologic and microradiographic observations on teeth during calcium deprivation in rats. *Scand J Dent Res* 1977; 85: 549-56.
26. Kronmiller JE, Upholt WB, Kollar EJ. Expression of epidermal growth factor mRNA in the developing mouse mandibular process. *Archs Oral Biol* 1991; 36: 405-10.
27. Vaahotokari A, Vanio S, Thesleff I. Associations between transforming growth factor- β 1 RNA expression and epithelial-mesenchymal interactions during tooth morphogenesis. *Development* 1991; 113: 985-94.
28. Bennet JH, Hunt P, Thorogood P. Bone morphogenetic protein-2 and -4 expression during murine orofacial development. *Archs Oral Biol* 1995; 40: 847-54.
29. Urist MR. Bone formation by autoinduction. *Science* 1965; 150: 893-9.
30. Urist MR, Strates BS. Bone morphogenetic protein. *J Dent Res* 1971; 50: 1391-406.
31. Noda M. Signaling in osteoblastic differentiation. *Experimental medicine* 1996; 14: 42-9.
32. Thesleff I. Homeobox genes and growth factors in regulation of craniofacial and tooth morphogenesis. *Acta Odontol Scand* 1995; 53: 129-34.
33. Helder MN, Özkaynak E, Sampath KT, Luyten FP, Latin V, Oppermann H, Vukicevic S. Expression pattern of osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in human and mouse development. *J Histochem Cytochem* 1995; 43: 1035-44.
34. Rasmussen P. Quantitative observation on teeth during calcium deprivation. *Scand J Dent Res* 1977; 85: 348-54.
35. Gartner LP, Hiatt JL, Provenza DV. Effect of ionizing radiation on incisor development of the prenatal mouse. *Acta Anat* 1977; 98: 367-75.
36. Worth HM. Principle and practice of oral radiologic interpretation. Chicago: Year Book Medical Publishers; 1975. p. 334-5.
37. 猪 宏史. ラット切歯根尖部に對する放射線限局照射の影響. *東北醫誌* 1971; 82: 331-55.
38. Fawzi MI, Shklar G, Krakow AA. The effect of radiation on the response of dental pulp to operative and endodontic procedures: an experimental study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985; 59: 405-13.
39. Russel LB. Analysis of the changing radiation response of the developing mouse embryo. *J Cell Comp Physiol* 1954; 43: 103.
40. Lumsden AGS. Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth germ. *Development* 1988; 103: 155-69.
41. Avey JK. Development of teeth. In: Essentials of oral histology and embryology. St Louise: Mosby Year Book; 1992. p. 51-69.
42. Rosenquist JBL. Sensitivity to low calcium diet in different bones: an experimental study in the adult rat. *Scand J Dent Res* 1992; 100: 327-9.
43. Aitken JM, Armstrong E, Anderson JB. Osteoporosis after oophorectomy in the mature female rat and the effect of estrogen and/or progesterone therapy in its prevention. *J Endocrinol* 1972; 55: 79-82.
44. Uthoff HK, Jaworski ZFG. Bone loss in response to long term immobilization. *J Bone Joint Surg* 1978; 60: 420.
45. Nasu M, Amano Y, Kurita A, Yosue T. Osseointegration in implant-embedded mandible in rats fed calcium-deficient diet: a radiological study. *Oral Disease* 1998; 4: 84-9.
46. Vainio S, Karavanova I, Jowett A, Thesleff I. Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cell* 1993; 75: 45-58.
47. Hogan BL. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 1996; 10: 1580-94.
48. Dale L, Howes G, Price BM, Smith JC. Bone morphogenetic protein 4: a ventralization factor in early in early *Xenopus* development. *Development* 1992; 115: 573-85.
49. MacKenzie A, Leeming G, Jowett AK, Ferguson MW, Sharpe PT. The homeobox gene 7.1 has specific regional and temporal expression patterns during early murine craniofacial and embryogenesis, especially tooth development in vivo and in vitro. *Development* 1991; 111: 269-85.
50. Li H, Bartold PM, Zhang CZ, Clarkson RW, Young WG, Waters MJ. Growth hormone and insulin-like growth factor I induce bone morphogenetic proteins 2 and 4: a mediator role bone and tooth formation? *Endocrinology* 1998; 3855-62.
51. Thesleff I, Vaahotokari A. The role of growth factor in determination and differentiation of the odontoblastic cell lineage. *Proc Finn Dent Soc* 1992; 88: 357-68.
52. Aberg T, Wozney J, Thesleff I. Expression patterns of bone morphogenetic proteins (Bmps) in the developing mouse tooth suggest roles in morphogenesis and cell differentiation. *Dev Dyn* 1997; 8: 4-39.
53. Heikinheimo K. Stage-specific expression of dacapentaplegic-Vg-related genes 2, 4, and 6 (Bone morphogenetic proteins 2, 4, and 6) during human tooth morphogenesis. *J Dent Res* 1994; 73: 590-97.
54. Schroeder HE. The periodontium. *Handbook of microscopic anatomy*. Vol 5. Berlin: Springer-Verlag; 1986.
55. Guggenheimer J, Fischer WG, Pechersky JL. Anticipation of dental

- anomalies induced by radiation therapy. *Radiology* 1975; 117: 405-6.
56. Mattews JL, Cameron JA. Effects of intrauterine X-radiation on the bones and teeth of mice. *J Dent Res* 1959; 36: 666.
57. Saad AY, Abdelazim AA, El-Khasab MM, Mansor MA. Effects of gamma radiation on incisor development of the prenatal albino mouse. *J Oral Pathol Med* 1991; 20: 385-8.
58. Thesleff I, Lehtonen E, Saxen L. Basement membrane formation in transfilter tooth culture and its relation to odontoblast differentiation. *Differentiation* 1978; 10: 71-9.
59. Kleinman HK, McGarvey ML, Hassell JR, Star VL, Cannon FB, Laurie GW, Martin GR. Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry* 1986; 25: 312-8.
60. Collett WK, Thonard JC. The effect of fractional radiation on dentinogenesis in the rat. *J Dent Res* 1965; 44: 84-90.
61. Adkins KF. The effect of 1200 r of X-radiation on dentinogenesis in the mandibular teeth of rats. *Archs Oral Biol* 1967; 12: 1569-76.
62. Koppang HS, Stokke T. Further studies on the radiosensitivity of the rat incisor. *Odont Tidskr* 1969; 77: 47-61.
63. 山口彦之. 放射線と生物. 東京: 啓學出版; 1975. p. 5-125.
64. Howland WJ, Loeffler RK, Starchman DE, Johnson RG. Postirradiation atrophic changes of bone and related complications. *Radiology* 1975; 117: 677-86.
65. Murray CG, Herson J, Daly TE, Zimmerman S. Radiation necrosis of the mandible: a 10-year study. Part I. Factors influencing the onset of necrosis. *I Int J Radiation Biol Phys* 1980; 6: 543-8.
66. Furuta T, Shimizu Y, Takahashi I, Mitani H. Formation and mineralization of murine molar roots with hypocalcaemia induced by a low-calcium diet and the changes after returning to a normal diet. *Archs Oral Biol* 1999; 44: 629-39.
67. Kurita A. The effect of X-ray radiation on mandibular bone of low calcium diet rats. *Shigaku* 1991; 79: 341-63.
68. Belanger LF. Resorption of cementum by cementocyte activity ("cementolysis"). *Calcif Tissue Res* 1968; 1: 229-36.
69. Henrikson P-Å. Periodontal disease and calcium deficiency. An experimental study in the dog. *Acta Odontol Scand* 1968; 26: 1-132.

Explanation of Figures

- Fig. 1.** In the Group 1 at embryo-18 days, tooth bud of cap stage shows tall columnar inner dental epithelium and densely grouping mesenchyme of dental papilla. (H-E staining, original magnification $\times 40$)
- Fig. 2.** In the Group 1 at embryo-18 days, strong immunoreactivity is shown in oral epithelium, but no immunoreactivity is shown in underlying mesenchyme. Epithelial layer of dental organ shows no immunoreactivity. Moderate immunoreactivity is shown in stratum intermedium facing inner dental epithelium. Weak immunoreactivity is shown in the mesenchyme of dental papilla and in dental follicle. (BMP-2/4, original magnification $\times 40$)
- Fig. 3.** In the Group 2 at embryo-18 days, no immunoreactivity is shown in dental organ, dental papilla, and dental follicle. Weak immunoreactivity is shown in epithelium of tooth bud. (BMP-2/4, original magnification $\times 40$)
- Fig. 4.** In the Group 3 at embryo-18 days. Oral epithelium shows weak immunoreactivity, and underlying mesenchyme shows no immunoreactivity. (BMP-2/4, original magnification $\times 40$)
- Fig. 5.** In the Group 1 at postnatal-3 days, tooth bud of bell stage shows functional cells secreting the matrix of crown. (H-E staining, original magnification $\times 40$)
- Fig. 6.** In the Group 1 at postnatal-3 days, immunoreactivity is strong in dental organ and moderate in dental follicle. (BMP-2/4, original magnification $\times 40$)
- Fig. 7.** In the Group 2 at postnatal-3 days, outer and inner dental epithelium show moderate immunoreactivity. Stellate reticulum shows weak immunoreactivity. Stratum intermedium facing inner dental epithelium and dental follicle surrounding tooth bud show moderate immunoreactivity. The surface of developing alveolar bone and osteocytes show moderate immunoreactivity, while oral epithelium shows strong immunoreactivity. (BMP-2/4, original magnification $\times 40$)
- Fig. 8.** In the Group 3 at postnatal-3 days, immunoreactivity disappears on dental organ. In the functional odontoblasts secreting dentin matrix, immunoreactivity is weak. In the cuspal area of mineralizing tooth, the distal end of secreting ameloblasts shows moderate immunoreactivity. Surface alveolar bone shows weak immunoreactivity, while oral epithelium shows moderate immunoreactivity. (BMP-2/4, original magnification $\times 40$)
- Fig. 9.** In the Group 1 at postnatal-14 days, tooth bud of root formation stage shows functional cells secreting the matrix of root. (H-E staining, original magnification $\times 40$)
- Fig. 10.** In the Group 1 at postnatal-14 days, cementum shows strong immunoreactivity. (BMP-2/4, original magnification $\times 40$)
- Fig. 11.** In the Group 1 at postnatal-14 days, strong immunoreactivity is shown in newly formed alveolar bone, periosteum, cortical bone, and cancellous bone. (BMP-2/4, original magnification $\times 200$)
- Fig. 12.** In the Group 1 at postnatal-14 days, immunoreactivity is shown in preodontoblasts and in secretory ameloblasts. (BMP-2/4, original magnification $\times 200$)
- Fig. 13.** In the Group 1 at postnatal-14 days, odontoblast shows well-developed organelle of cytoplasm. (TEM, original magnification $\times 1000$)
- Fig. 14.** In the Group 2 at postnatal-14 days, newly formed cementum shows weak immunoreactivity. Immunoreactivity is weaker at the periodontal ligament around the developing root of Group2 than at that of Group1. (BMP-2/4, original magnification $\times 40$)
- Fig. 15.** In the Group 2 at postnatal-14 days, alveolar bone around teeth shows moderate immunoreactivity. (BMP-2/4, original magnification $\times 200$)
- Fig. 16.** In the Group 2 at postnatal-14 days, pre-dentin and odontoblast show weak immunoreactivity. (BMP-2/4, original magnification $\times 200$)
- Fig. 17.** In the Group 2 at postnatal-14 days, odontoblast shows atrophy of cytoplasm and diminished number of organelle. (TEM, original magnification $\times 1,000$)
- Fig. 18.** In the Group 3 at postnatal-14 days, weak immunoreactivity is shown in tooth forming area. (BMP-2/4, original magnification $\times 40$)
- Figs. 19, 20.** In the Group 3 at postnatal-14 days, no immunoreactivity is shown in periodontal ligament and alveolar bone. (BMP-2/4, original magnification $\times 200$)
- Fig. 21.** In the Group 3 at postnatal-14 days, odontoblast shows atrophy of cytoplasm and condensed nucleus of odontoblast. (TEM, original magnification $\times 1,000$)



1

2

3

4



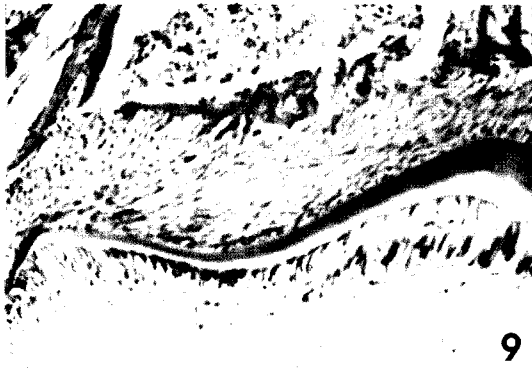
5



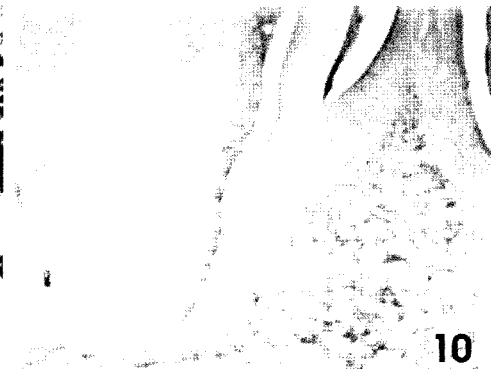
6

7

8



9



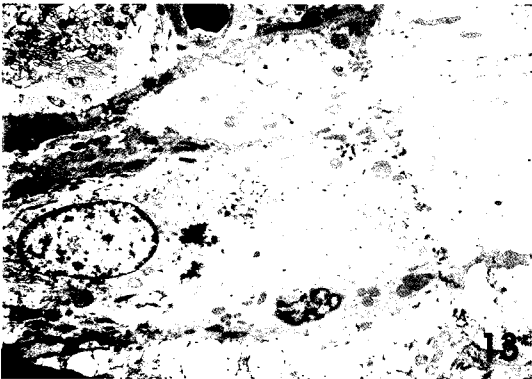
10



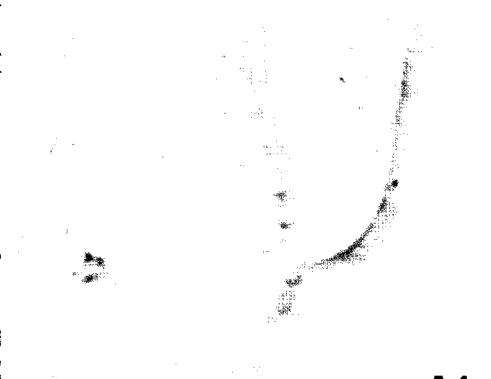
11



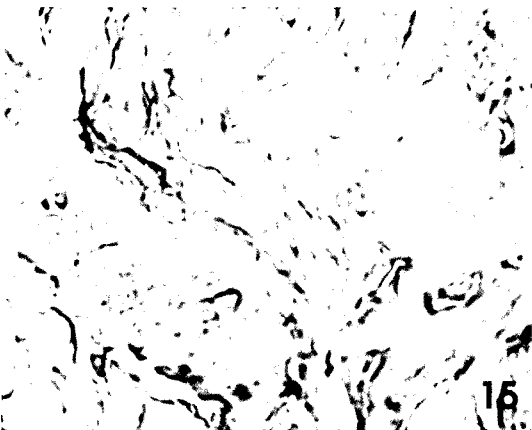
12



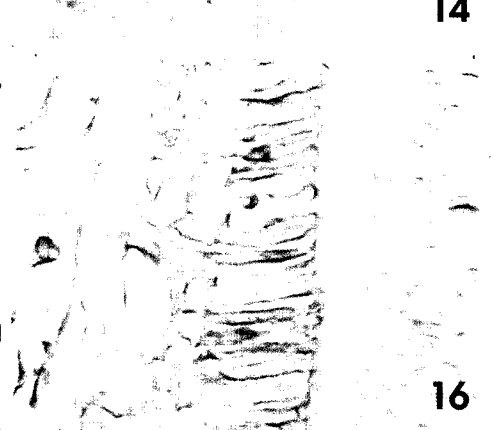
13



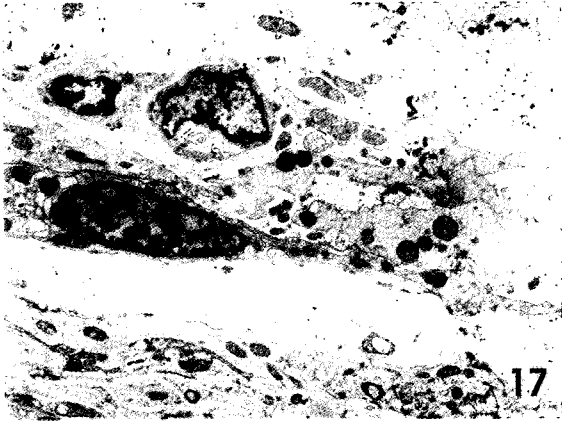
14



15



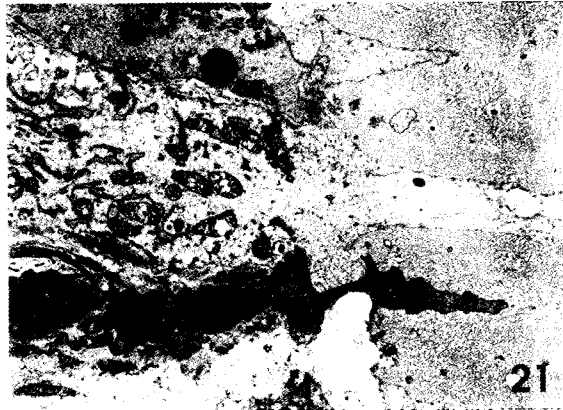
16



17



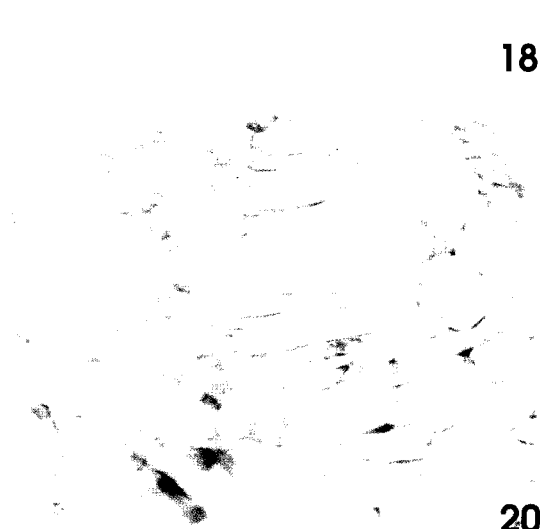
19



21



18



20