

# 한국인의 급성 진행성 치주염 환자 치은연하 균태 *Bacteroides gingivalis* 균주분리에 관한 연구(I)

\* 서울대학교 치과대학  
\*\* 단국대학교 치과대학

정종평\* · 이영희\*\* · 최주용\* · 손재운\*  
손성희\* · 최상묵\* · 한수부\*\*

## ISOLATION AND IDENTIFICATION OF BACTEROIDES GINGIVALIS OF KOREAN RAPIDLY PROGRESSIVE PERIODONTITIS.

Chung, C.P., Lee, Y.H., Choi, J.Y., Son, J.U., Son, S.H., Choi, S.M. and Han, S.B.

\* *College of Dentistry, Seoul National University*  
\*\* *College of Dentistry, Dankook University*

..... > Abstracts < .....

Three Korean rapidly progressive periodontitis patient (R.P.P.) were examined for the isolation and identification of black-pigmented *Bacteroides* and *Bacteroides gingivalis* in the subgingival plaque. Black-pigmented *Bacteroides* and *Bacteroides gingivalis* were recovered from all three R.P. patients and the predominant isolates were *Bacteroides intermedius* followed by *Bacteroides gingivalis*. The *B. gingivalis* isolated from subgingival plaque of rapidly progressive periodontitis patients were Gram-negative pleomorphic rods and each produced brown to black colonies on blood agar plate supplemented with 5% rabbit 5ug/ml haemin, 0.5ug/ml of menadione and 40ug/ml of Kanamycin. The *B. gingivalis* isolated were fermented none of Glucose, Sucrose, Lactose, Esculin and Cellobinose and produced indole.

Isolation and identification of *Bacteroides gingivalis* in Korean R.P. patients can be contributed to the research on the pathogenesis of Korean periodontal disease.

.....

### I. 서 론

치주질환중 성인성 치주염 및 급성진행성 치주염의 치은연하 치태에서 가장 빈번히 감염되어 나타나는 혐기성 세균으로는 black-pigmented Bacter-

oides를 들수 있겠다. 이들 black-pigmented *Bacteroides*는 특히 급성진행성 치주염의 경우 전체 혐기성 세균 중 20~30%비율을 나타낼 정도로 높은 감염율을 보이고 있다(Slots 1981, 1982).

이중 특히 *Bacteroides gingivalis*균주는 급성진행

성 치주염환자 대부분에서 가장 자주 나타나며 높은 비율을 차지하고 있다 (Slots 1982, 1984). 이 *Bacteroides gingivalis* 균주는 전이성 감염증상을 나타내며 (Mayrand 1980), 치은연하 깊이 생존하면서 치주조직혈관으로부터 치주낭내로 나오는 다형핵백혈구의 탐식 및 화학 주성 능력을 제어 및 마비시키는 힘을 이 균주의 capsular 항원에서 보이고 있음이 판명되었다 (VanDyke 1982).

이와 더불어 조직을 파괴하는 여러 효소를 분비하며, 이러한 독성물질들은 치주조직의 급성진행성에 크게 관여 한다고 보겠다. 이러한 치주질환의 원인으로서 중요하다고 생각되는 *Bacteroides gingivalis* 균주를 한국인의 급성진행성 치주염 환자의 치은연하 치태내에서 분리하여 이를 혐기성 조건에서 배양하여 생화학적 검사를 통하여 확인하는 것이 한국인의 치주질환을 이해하고 연구하는데 도움이 되며, 이러한 기초적인 연구가 진행됨으로서 면역학적 및 병리 조직적인 연구에 크게 밑바침이 되리라 생각되어 이 연구를 하게 된 것이다.

## II. 실험재료 및 방법

### 환자의 선택

본 서울대학교 치과대학 치주과에 내원한 환자중 급성진행성 치주염 (Page 1982) 으로 판정된 27세, 30세 및 35세 환자 3명을 택하여 균태채취를 실시하였다.

### 치은연하 균태채취 및 세균배양

선택된 급성진행성 치주염 환자의 치주낭 중에서 활동성으로 판정된 부위 2곳을 택하여 균태 세균 채취를 실시하였다.

균태세균 채취를 위하여 해당 치아주위의 타액을 분리시키기 위하여 gauze를 사용하였고 건조 탈지면으로 치은연상균태를 완전 제거하고 건조시킨 후 보존 치료용 paper point (Johnson Fine Absorbent points, Johnson & Johnson East Windsor, N. J. U. S. A.) 3개를 동시에 같은 치아의 치은연하 치주낭에 삽입한 후 약 10~15초간 기다렸다가 빼내어 2ml pre-reduced ringer액이 들은 시험관속에 mixed gas 주입과 동시에 집어 넣은후 마개를 막아서 놓았다. 채취된 균태용액을 혐기성 세균 배양기 (P. A. C. E anaerobic chamber Lab-line Instr. Inc. Melrose Park, Illinois, 60.160, U. S. A.) 및 분주기와 더불어 넣은후 10배 희석을 하였다. 10배희

석이된 균태용액을 24시간 동안 pre-reduced 시켜 놓은 blood agar clate 및 black-pigmented *Bacteroides* 선택배지에 100 $\mu$ l씩 각각 분주하였다 (Holdeman 1977). 사용된 blood agar plate는 5% 토끼혈액, 5.0 $\mu$ g/ml Hemin (Sigma chemical Co., St. Louis, M. O) 0.5 $\mu$ g/ml Menadione (Sigma chemical Co., St. Louis, M. O) 이들을 Tryptic soy agar를 사용하였고 black-pigmented *Bacteroides*의 선택배지는 5% 토끼혈액, 5.0 $\mu$ g/ml hemin 0.5 $\mu$ g/ml menadione 및 40 $\mu$ g/ml Kanamycin (Sigma chemical Co., St. Louis, M. O)를 넣어 만들었다 (Zambon. 1981).

이렇게 각각 희석시켜 배지에 분주한 후 5%  $CO_2$ , 10%  $H_2$ , 및 85%  $N_2$ 가 들은 혐기성 세균배양기 (P. A. C. E. anaerobic chamber Lab-line Instr. Inc. Melrose Park, Illinois 60160 U. S. A.)에 7일간 배양하였다. 배양 7일후 나타난 전체균주 Colony수와 Black-pigmented colony 숫자를 각 10배수의 배지에서 각각 세어낸후 20개의 black-pigmented *Bacteroides* colony를 각 희석된 배지에서 따내어 pre-reduced된 blood agar plate에 계대하여 1주일간 배양하였다. 동시에 Gram염색, Colony의 형태 및 색깔, Hemolysis 및 Glucose, Sucrose, Lactose, Cellobiose, Esculin fermentation 및 Esculin hydrolysis 그리고 Indole 형성 유무를 생화학적 검사로 결정하였다 (Slots, 1982, 1984).

## III. 결 과

각기 계대된 균주를 생화학적 검사를 실시한 결과 *Bacteroides gingivalis*의 특성인 Glucose, Sucrose, Lactose, Cellobiose 및 Esculin fermentation 반응에서 음성반응으로 나타났으며 Esculin hydrolysis에서도 역시 음성반응이 나타났고 단지 Indole을 생산함으로써 Indole 검사에서 양성반응을 나타내고 있다. Gram 염색에서는 음성반응으로 나타났으며 여러형태의 작은 막대기형의 균주로 나타나고 있다 (그림 1, 2).

blood agar plate와 Kanamycin 이들을 선택배지에서의 black-pigmented *Bacteroides*의 배양정도를 보면 blood agar plate에서 보다는 선택배지에서 더 많은 숫자가 배양됨을 알 수 있었다. 또한 *Bacteroides gingivalis*는 3명의 급성진행성 치주염환자 모두에서 나타났으며 특히 Kanamycin이 들어있는

선택배지에서 더 많이 나타남을 알수 있었고 나타난 colony의 색깔은 갈색 및 흑색을 띄고 있었다. 표준균주인 *Bacteroides gingivalis* 381 (New York주립대학교 치과대학, Dr. Slots로부터 기증 받음) 과 형태적인 비교에서는 서로 다른 점을 발견할수 없었다(그림 3).

#### IV. 총괄 및 고안

급성진행성 치주염환자로 진단된 25~35세 사이의 환자 3명에게서 항생제 및 Scaling을 이용한 치료가 있기전에 가장 활동성으로 염증이 진행되고 있는 부위를 택하여 균태 채취를 하였으나 각 부위에서 모두 *Bacteroides gingivalis*가 배양되었다. 전체균주 colony에 대한 black-pigmented *Bacteroides*의 비율은 각 부위마다 다르며 가장 많이 나타나는 부위는 약 70% 이상이 나타남을 볼수있었다. 이들 나타난 B. P. B.에 대한 생화학적 검사 결과로는 *Bacteroides intermedius*가 70% 이상으로 나타나며 *Bacteroides gingivalis*와 *Bacteroides melaninogenicus*, *Bacteroides oralis* 및 기타가 각각 나타남을 보이며, *B. gingivalis*의 분포는 10~20% 정도로 나타나고 있으나 더 많은 균태, 채취, 배양을 통하여 통계적인 처리가 요구된다고 본다. *B. gingivalis* 균주 결정에 필요한 여러방법 중에서 가장 안정성있고 정확하다고 보는 생화학적 검사를 실시하였으나 Gas-liquid Chromatography를 통한 각종 acid의 생산여부가 요구되나 이 경우 다른 균주와 동일한 결과가 나오므로 첨가된 실험으로서만이 필요하다고 본다. 또한 생화학적 검사결과를 보는데는 배양후 3주의 기간이 소요되며 채취, 배양된 균태 세균 중 black-pigmented *Bacteroides* 전체균주중의 *B. gingivalis* 균주의 비율을 알아내는데 모든 B. P. B. colony에 대하여 생화학적 검사를 실시하기는 불가능하므로 Long-wave U. V. light fluorescence 방법이나 기타 방법을 통하여 실시함으로써 통계적인 유의성있는 균주들의 분포를 보는것이 요구된다. 한국인의 *B. gingivalis* 균주분리 배양과 더불어 이 균주의 형태학적, 면역학적 및 병리조직학적인 연구가 본격적으로 진전이 되리라 생각된다.

#### V. 결 론

급성진행성 치주염의 원인균으로 알려지고 있는 *Bacteroides gingivalis* 균주분리를 위하여 3명의 급성진행성 치주염 환자의 활동성 치주낭내에서 paper point를 이용하여 균태세균을 혐기성 상태에서 채취하여 B. A. P.배지 및 Kanamycin 선택배지에 분주한후 5% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub> 및 85% N<sub>2</sub>가 들

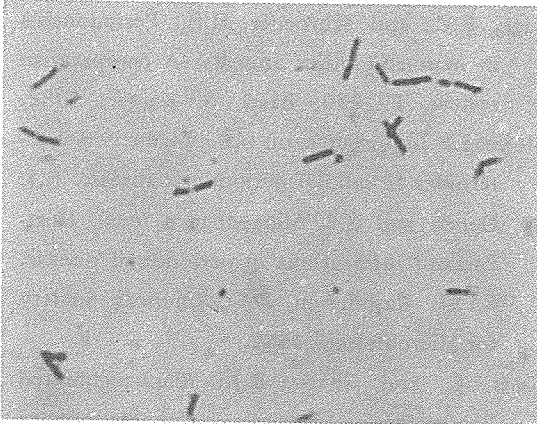


그림 1. *B. gingivalis* SNUDC 1 (X1250)

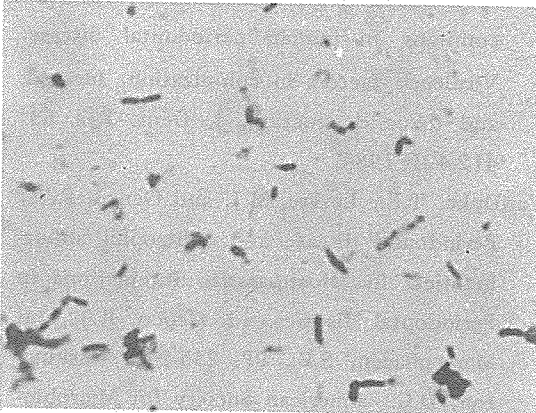


그림 2. *B. gingivalis* SNDC 2 (X1250)

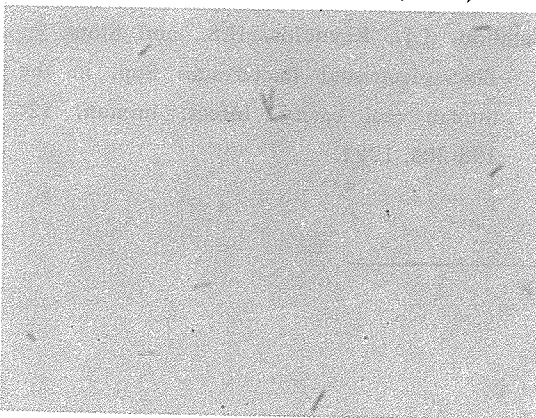


그림 3. *B. gingivalis* 381 (X1250)

은 혐기성균 배양기에 7일간 배양한후 생화학적  
검사를 실시하였든바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 분리된 한국인의 *B. gingivalis*는 Gram 음성의  
작은 막대기형 균으로서 표준 균주인 *B. gingi-*  
*valis* 381과 형태적인 차이를 볼수가 없었다.
2. 분리된 한국인의 *B. gingivalis*는 생화학적 검사  
에서 Glucose, Sucrose, Lactose, Cellobiose  
및 Esculin fermentation을 하지않고 Esculin  
hydrolysis를 일으키지 않고 Indole만을 생산하  
였으며, 이는 표준 균주 *B. gingivalis* 381과 동  
일한 결과였다.
3. 채취, 배양된 급진형성 치주염환자의 전체균  
태, colony, B. B.균주 Colony 및 *B. gingi-*  
*valis* 균주 Colony 각각의 분포율에 대하여는  
보다 많은 연구가 필요하다고 본다.

## REFERENCES

- Coykendall, A.L., Kaczmarek, F.S., and Slots,  
J.: Genetic heterogeneity in *Bacteroides*  
*asaccharolyticus* (Holdeman and Moore  
1970) Finegold and Barnes 1977 (approved  
lists, 1980) and proposal of *Bacteroides*  
*gingivalis* sp. nov. and *Bacteroides macacae*  
(Slots and Genco) Comb. mov. Int. J.  
Syst. Bacteriol. 30:559-564. 1980.
- Holdeman, L.V., Gato, E.P., and Moore, W.E.C.:  
Anaerobe laboratory manual, 4th ed. Vir-  
ginia Polytechnic Institute and State Univer-  
sity, Blacksburg, Va, 1977.
- Mayrand, D., McBride, B.C., Edwards, T. and  
Jensen, S.: Characterization of *Bacteroides*  
*asaccharolyticus* and *B. melaninogenicus*  
oral isolates. Canad. J. Microbiol. 26:1178-  
1183, 1980.
- Mouton, C., Hammond, P.G., Slots, J., and  
Genco, R.J.: Serum antibodies to oral  
*Bacteroides asaccharolyticus* (*Bacteroides*  
*gingivalis*): Relationship to age and Perio-  
dental disease. Infect. Immun. 31:182-  
1981.
- Page, R.C., and Schroeder, H.E.: Periodontitis  
in man and other animals: A comparative  
review. P. 330. Basel, S. Karger, 1982.
- Slots, J.: Importance of black-pigmented *Bac-*  
*teroides* in human periodontal disease. R.J.  
Genco and S.E. Mergenhagen (eds). Host-  
Parasite interactions in periodontal disease,  
P, 27. Washington, D.C. American Society  
for Microbiology, 1982.
- Slots, J., and Genco, R.J.: Black-pigmented  
*Bacteroides* species, *Capnocytophaga*  
species and *Actinobacillus actinomycetem-*  
*comitans* in human periodontal disease:  
Virulence factors in colonization, survival,  
and tissue destruction. J. Dent. Res. 63:  
412-421, 1984.
- VanDyke, T.E., Levine, M.J. and Genco, R.T.:  
Periodontal disease and neutrophil abnor-  
malities. In: Host-parasite Interactions in  
Periodontal diseases, ed. Genco, R.J. and  
Mergenhagen, S.E., PP. 235-245. Washing-  
ton, D.C.: American Society for Microbio-  
logy.
- Zambon, J.J., Reynolds, H.S., and Slots, J.:  
Black-pigmented *Bacteroides* Spp. in the  
human oral cavity. Infect. Immun. 32:  
198-203, 1981.