

# 괴사치수에서의 Black-pigmented Bacteroides 균주분리에 관한 연구

서울대학교 치과대학, 보존학교실  
\*서울대학교 치과대학 치주과학교실

최한석 · 윤수한 · 정종평\*

## — 목 차 —

- I. 서 론
- II. 실험재료 및 실험방법
- III. 실험성적
- IV. 총괄 및 고안
- V. 결 론
- 참고문헌
- 영문초록

## I. 서 론

치근단 질환은 여러가지 원인에 의해서 발생되는데 이 중 복합적인 미생물군에 의해 야기되는 경우가 많고 특히 괴사치수에서 60% 이상을 차지하는 혐기성 세균이 주 원인균으로 추정되고 있다!

이 혐기성 세균 중 증상과 관련되어 나타나는 균주로 Black-pigmented Bacteroides를 들 수 있다.

Black-pigmented Bacteroides 균주는 대개 장관, 여성 생식기, 그리고 호흡기의 심한 혐기성 감염증에서 발견된다.<sup>1, 21, 22)</sup>

Sundqvist<sup>3)</sup>는 최초로 Black-pigmented Bacteroides 균주와 질환과의 관계를 연구하기 위해 외상으로 치수가 괴사된 32개의 치아에서 균을 채취하여, 호기 및 혐기상태에서 배양한 결과 3종의 Bacteroides melaninogenicus 아종을 발견했으며, 이 균주들이 타진시의 반응, 증창, 삼출액과 관계가 있었다고 보고했다. 또한 Griffes<sup>4)</sup>는 B. melaninogenicus가 동통, 누공형성 및 악취와 관계가 있었다고 보고 하였다.

Sundqvist와 Moorer<sup>5)</sup>들이 Black-pigmented Bacteroides 균주의 발병 능력에 관하여 연구하였는데, Sundqvist<sup>6)</sup>는 화농성 치근단 병소에서 얻은 세균의 조합은 guinea Pig의 피하에 주입시 전염성 감염을 유발 하였으나 증상이 없는 만성 치근단 병소에서 얻은 세균의 조합은 전염성 감염을 유발하지 않았다고 보고했다. 또한 전염성 감염을 보인 모든 세균의 조합에서 B. melaninogenicus 혹은 B. asaccharolyticus가 발견되어 이들이 전염성 감염의 유발에 필수적이라고 언급하고 있다.

Moorer<sup>5)</sup>는 B. gingivalis가 농양을 유발하기 위해서는 S. mitis등 다른 세균의 도움이 필요하다고 보고했다.

이들 Bacteroides 균주는 골 흡수 능력이있는 내독소를 포함하며, 황화수소, 암모니아 및 다른 독성 물질을 생산하고, 강한 단백질 분해효소인 collagenase와 trypsin도 합성한다고 한다.<sup>7, 8, 9)</sup>

이상 여러가지 사실을 종합하여 볼 때 치근단 질환에서 중요한 역할을 한다고 생각되는 Black-pigmented Bacteroides 균주를 괴사치수에서 분리한 후 혐기성 조건하에서 배양하고, 생화학적 검사를 통해 각 균주의 분포를 검출하여 임상 증상과 어떤

관계가 있는가를 보는 것은 치근단 질환의 치료에 큰 도움이 되리라고 생각한다.

## II. 실험재료 및 실험방법

서울대학교 치과대학 보존과에 내원한 17세에서 34세까지 14명의 환자에서 치수가 피사된 14개의 치아를 선택하였다. 치수 피사 유무는 전기치수검사, 온도검사 및 X-선상의 치근단 병변 유무 등을 이용하여 결정하였으며 근관와동 형성시 이를 확인하였고, 임상증상은 Griffie<sup>3)</sup>의 방법에 따라 다음과 같이 기록하였다.

- (1) 동통
- (2) 촉진시의 과민반응
- (3) 타진시의 과민반응
- (4) 누공형성
- (5) 국소적 종창
- (6) 화농성 삼출액
- (7) 악취
- (8) X-선 소견

세균 채취는 Moller<sup>10)</sup>의 방법에 따라 치아를 rubber dam으로 분리한 후 치아 및 그 주위와 clamp를 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 1~2분간 소독한 후 고속엔진으로 #2 bur를 사용하여 초기 근관와동을 형성하고 최종 근관와동은 소독된 저속엔진으로 #2 bur를 사용하여 형성하였다. 멸균된 paper point를 근관내에

삽입한 후 15초간 방치 하였다가 곧 혼합 gas(85% N<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub> 및 5% CO<sub>2</sub> 함유) 주입과 동시에 pre-reduced ringer액에 옮겼다. 이 ringer액을 실험실로 옮겨서 2분간 vortex mixer로 진탕한 후 단계적으로 10배씩 희석하여, 5% 가토 혈액을 함유한 혈액한천배지(5.0 µg/ml hemin과 0.5 µg/ml menadione 첨가)와 40 µg/ml Kanamycin(Sigma Chemical Co.) 이 첨가된 선택 혈액한천배지에 각각 100 µl씩 접종하여 37°C 혐기성 배양기(Coy Laboratory product, U. S. A.)에서 일주일간 배양하였다.<sup>11)</sup>

호기성 배양은 채취한 세균을 ringer액에 옮겨 단계적으로 10배씩 희석하여 혈액한천배지에 접종한 후 37°C 배양기에서 48시간 배양하였다.

배양후 혐기성 및 호기성 세균의 총 집락수와 Black-pigmented Bacteroides균 집락수를 계수하였다. 갈색 및 흑색을 띠는 균 집락을 무작위로 20개 이상 취한 후 순수분리하여 37°C 혐기성 배양기에서 일주일간 배양하였고, 이들 배양된 각 균주들은 생화학적 검사를 실시하여 동정 하였다.

배양된 각 균주들은 Gram염색, 집락 형태 및 용혈반응 여부를 관찰하였으며, 생화학적 검사는 Holdeman과 Cato<sup>11)</sup>의 방법에 따라 glucose, esculin, sucrose, cellobiose, lactose 등의 당분해 검사 및 esculin hydrolysis 여부, indole형성 시험을 실시하였다.

Black-pigmented Bacteroides의 분류는 Bergey's Manual of Systemic Bacteriology 제 9권에 수록

Table 1. Biochemical Characteristics of Black-pigmented Bacteroides

|                            | Glucose | Sucrose | Lactose | Cellobiose | Esculin |       | Indole |
|----------------------------|---------|---------|---------|------------|---------|-------|--------|
|                            |         |         |         |            | Acid    | Hydr. |        |
| <i>B. gingivalis</i>       | -       | -       | -       | -          | -       | -     | +      |
| <i>B. loescheii</i>        | +       | +       | +       | +          | ±       | +     | -      |
| <i>B. intermedius</i>      | +       | +       | -       | -          | -       | -     | +      |
| <i>B. denticola</i>        | +       | +       | +       | -          | +       | +     | -      |
| <i>B. melaninogenicus</i>  | +       | +       | +       | -          | -       | -     | -      |
| <i>B. corporis</i>         | +       | -       | -       | -          | -       | -     | -      |
| <i>B. asaccharolyticus</i> | -       | -       | -       | -          | -       | -     | +      |
| <i>B. levii</i>            | +       | -       | +       | -          | -       | -     | -      |
| <i>B. socranskii</i>       | +       | +       | +       | -          | +       | +     | -      |

된 방법에 따라 *B. gingivalis*, *B. intermedius*, *B. loescheii* 및 기타 Black-pigmented Bacteroides를 동정하였다. (Table 1)

### III. 실험 성적

환자의 평균 연령은 30.4세였고, 남자가 6명, 여자가 8명이었다. 구강검사와 병력을 통해 본 치수 피사의 원인은 치관 파절이 6명, 중심교두 파절이 2명 보철 치료시의 과도한 치질 삭제가 2명, 외상이 2명, 치아 우식증이 1명이었다. (Table 2)

채취한 모든 피사 치수의 내용물에서는 혐기 및 호기성 세균의 혼합 세균군이 나타났는데, 전체 세균중 호기성 세균이 39.1%, 혐기성 세균이 60.9%를 차지하였으며, 혐기성 세균중 Black-pigmented

**Table 3.** Mean percentage of aerobic and anaerobic bacteria in the root canal

|                                |              |
|--------------------------------|--------------|
| A. aerobic                     | 39.1 ± 37.5* |
| B. anaerobic                   | 60.9 ± 37.5  |
| 1) black-pigmented Bacteroides | 10.5 ± 24.9  |
| 2) other anaerobic bacteria    | 50.4 ± 36.6  |

\*Mean percentage ± Standard Deviation

Bacteroides가 10.5%, 그외의 혐기성 세균이 50.4%를 차지하였다. (Table 3)

임상 증상과 Black-pigmented Bacteroides와의 관계를 chi-square분석에 의해 살펴본 결과 누공형

**Table 2.** Clinical features of patient population and presence or absence of Black-pigmented Bacteroides

| Patient's No. | Sample site | Age/Sex | Causes of pulpal necrosis   | Black-pigmented Bacteroides presence |
|---------------|-------------|---------|-----------------------------|--------------------------------------|
| 1             | <u>1</u>    | 19/M    | crown fx.                   | no                                   |
| 2             | <u>2</u>    | 29/M    | trauma                      | yes                                  |
| 3             | <u>1</u>    | 19/M    | crown fx.                   | yes                                  |
| 4             | <u>4</u>    | 20/M    | TFO                         | no                                   |
| 5             | <u>3</u>    | 63/F    | excessive crown preparation | no                                   |
| 6             | <u>4</u>    | 25/F    | central cusp fx.            | no                                   |
| 7             | <u>1</u>    | 22/F    | crown fx.                   | yes                                  |
| 8             | <u>1</u>    | 24/F    | crown fx.                   | no                                   |
| 9             | <u>1</u>    | 24/M    | crown fx.                   | yes                                  |
| 10            | <u>1</u>    | 45/F    | trauma                      | no                                   |
| 11            | <u>1</u>    | 22/M    | excessive crown preparation | yes                                  |
| 12            | <u>1</u>    | 17/F    | crown fx.                   | yes                                  |
| 13            | <u>4</u>    | 35/F    | central cusp fx.            | yes                                  |
| 14            | <u>3</u>    | 62/F    | dental caries               | yes                                  |

**Table 4.** Relationship between Black-pigmented Bacteroides and signs and symptoms.

|                         | No. of patients with Black-pigmented Bacteroides Present (8 patients) | No. of patients with Black-pigmented Bacteroides absent (6 patients) | Total (14 patients) | Chi-square values | p      |
|-------------------------|---|--|---------------------|-------------------|--------|
| Sinus tract             | 6   | 0  | 6                   | 4.53              | < 0.05 |
| Exudate                 | 6   | 0  | 6                   | 4.53              | < 0.05 |
| Foul odor               | 7   | 3  | 10                  | 0.69              | > 0.05 |
| Pain                    | 1   | 1  | 2                   | 0.04              | > 0.05 |
| Palpation               | 1   | 1  | 2                   | 0.04              | > 0.05 |
| Swelling                | 5   | 2  | 7                   | 0.60              | > 0.05 |
| Periapical radiolucency | 7   | 4  | 11                  | 0.36              | > 0.05 |
| Percussion              | 2   | 3  | 5                   | 0.59              | > 0.05 |

**Table 5.** Frequency of Black-pigmented Bacteroides in the necrotic pulp

| Black-pigmented Bacteroides | Frequency | Percentage |
|-----------------------------|-----------|------------|
| <i>B. loescheii</i>         | 20/27     | 74.1%      |
| <i>B. denticola</i>         | 3/27      | 11.1%      |
| <i>B. intermedius</i>       | 2/27      | 7.4%       |
| <i>B. gingivalis</i>        | 2/27      | 7.4%       |
| Total                       | 27/27     | 100 %      |

성과 삼출액이 5% 유의수준에서 Black-pigmented Bacteroides와 관계가 있었다. (Table 4)

4종의 Black-pigmented Bacteroides 균주가 발견되었는데, *B. loescheii*가 74.1%, *B. denticola*가 11.1%, *B. intermedius*와 *B. gingivalis*가 7.4%였다. (Table 5)

#### IV. 총괄 및 고안

Black-pigmented Bacteroides는 비활성의 포자를 형성하지 않는, Gram음성의 간균으로서, 장관, 여성 생식기, 그리고 호흡기의 심한 혐기성 감염증에서 많이 발견 되는데, 구강내에는 치주염 환자에서 많이 분리된다.<sup>20)</sup>

이들의 발병 능력에 관해서는 잘 알려져 있다. 즉, 골 흡수 능력이 있는 내독소를 갖고 있고, 황화수소와 같은 유독성 물질을 생산해내며, collagen 분해 효소나 trypsin과 같은 강한 단백질 분해효소를 방출한다. 또한 다형핵 백혈구에 의한 탐식작용을 억제하고, 조직과피에 관여하는 면역물질을 방출한다.<sup>21)</sup>

과거에는 Black-pigmented Bacteroides 균주가 *Bacteroides melaninogenicus*로 분류되었는데, 이균주를 다른 세균과 구분하는 기준은 혈액을 포함한 배지상에 형성된 집락의 Black-pigment였다. 이것이 발효반응의 차이에 의해 여러 아종으로 분류되다가 최근에 이들의 유전적 차이로 아종에서 탈피하여 9종의 Black-pigmented Bacteroides 즉, *B. melaninogenicus*, *B. loescheii*, *B. intermedius*, *B. corporis*, *B. levii*, *B. asaccharolyticus*, *B. gingivalis*, *B. socranskii*, *B. denticola*로 분류되었다.

Black-pigmented Bacteroides의 순수 배양 균주는 실험동물의 피하에 주입시 거의 전염성 감염을 일으키지 못했는데, Black-pigmented Bacteroides와 다른 세균 즉, *B. oralis*, *veillonella pavula*, some anaerobic streptococci, G(+) facultative rod 등을 혼합하여 주입했을 때는 전염성 감염이 유발되었다. 이것은 이들 세균 자체는 비감염성이나, Black-pigmented Bacteroides 성장에 필수적인 물질을 생성하여 감염을 유발하는 것으로 사료된다.

본 연구에서는 여러가지 임상 증상중 누공형성

및 삼출액과 Black-pigmented Bacteroides가 5% 유의 수준에서 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 나타났는데, Black-pigmented Bacteroides와 관계가 있었던 증상들은 모두 치근단 농양에서 나타나는 증상으로 추정되고 있으며, 이러한 결과는 Sundqvist와 Griffie의 연구보고와 유사하였다.

치근단 농양과 Black-pigmented Bacteroides와의 관계를 관찰하기 위해서는 병리조직학적인 소견을 포함하는 다른 연구가 필수적이라 사료된다.

혐기성 세균이 전체 세균중 60.9%를 차지 하였는데 이는 Zavistosky의 연구결과(63%) 보다 약간 낮은 비율로서 이러한 차이는 세균 채취법, 세균 채취시 치근단 병소의 병적 상태, 그리고 실험과정등에 기인되는 것으로 생각된다. 또, 혐기성 세균이 60% 이상을 차지하였다는 사실로 보아 치근단 병소에 있어서 이들 세균이 주원인균 이라고 추측할 수 있다.

J. Slots<sup>14)</sup>는 B. gingivalis가 급성 전이성 파괴를보여서 유주농양과 결합조직농양등을 유발하고, B. asaccharolyticus가 전이성을 보이는 비교적 작은 농양을 유발하며, B. melaninogenicus와 B. loescheii는 독성이 작아서 중증도의 염증반응만 야기 시킨다고 보고했다. 이것은 Black-pigmented Bacteroides의 효소활성도 차이 때문에 나타나는 현상인데, Van Steenberg등<sup>15, 16, 19)</sup>은 B. gingivalis가 collagen, azocoll, casein등을 분해하는 능력이 있는 반면, 다른 Black-pigmented Bacteroides는 이들 단백질을 분해하지 못하며, gelatin분해에 있어서도 B. gingivalis가 가장 강하고, B. intermedius가 중정도, 그리고 다른 Black-pigmented Bacteroides는 거의 분해 능력이 없다고 보고했다.

본 연구에서는 B. loescheii가 74.1%, B. denticola가 11.1%, B. gingivalis와 B. intermedius가 7.4% 나타났는데 각 균주와 임상 증상 혹은 조직 파괴정도와의 관계는 식별하기 어려웠다.

4종의 Black-pigmented Bacteroides 균주중 B. loescheii는 병원성이 약한 것으로 알려져 있으나 높은 비율로 나타난 사실로 보아 치근단 질환에 있어서 어떠한 영향을 미칠 것으로 생각된다. 따라서 이 균주와 치근단 질환과의 관계에 대한 더 많은 연구가 요구된다고 사료된다.

## V. 결 론

서울대학교 치과대학 보존과에 내원한 14명의 환자로부터 외상, 치아우식증등의 원인으로 치수가 괴사된 14개의 치아를 선택하여 세균채취를 하고, 혐기 및 호기 상태에서 배양한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 혐기성 세균이 전체 세균중 60.9%, 호기성 세균이 39.1%를 차지하였다.
2. 4종의 Black-pigmented Bacteroides균주가 발견되었는데, 이 중 B. loescheii가 74.1%, B. denticola가 11.1%, B. intermedius와 B. gingivalis가 7.4%를 차지하였다.
3. Black-pigmented Bacteroides의 존재는 누공형성 및 삼출액과 관계가 있었다.

## REFERENCES

1. Zavistoky, J.: Quantitative bacteriology of endodontic infection, Oral Surg. February, 1980.
2. Sundqvist, G.: Bacterial study of Necrotic pulps, Umea University Odontological Dissertation No. 7, Umea, Sweden, 1976, University of Umea.
3. Griffie, M.B.: The relationship of Bacteroides melaninogenicus to symptoms associated with pulpal necrosis, Oral Sug. November, 1980.
4. Sundqvist, G.K.: Capacity of Anaerobic Bacteria from Necrotic Dental Pulp to Induce Purulent Infections, Infection and Immunity, Aug. 1979, p. 685-693 Vol. 25, No. 2.
5. Moorer, W.R.: Long-term tissue response to bacteria enclosed in a subcutaneous implant that simulates the infected dental root canal, International Endodontic J, 1984, 17, p. 207-215.
6. Moorer, W.R.: Abscess formation induced in rabbits with bacteria-filled subcutaneous

- implants that simulate the infected dental root canal, *Oral Sug.* 59: p.642-646, 1985.
7. Hausman, E., Raisz: Endotoxin: Stimulation of bone resorption in tissue culture. *Science* 168: p.862-864, 1970.
  8. MacDonald, J.B., Socransky, S.S.: Aspects of the pathogenesis of mixed anaerobic infections of mucous membranes. *J. Dent. Res.* 42: p.529-544, 1963.
  9. Gibbons, R.J.: Aspects of the pathogenicity and ecology of the indigenous oral flora of man. *Anaerobic Bacteria: Role in disease*, Charles C. Thomas, Publisher, Springfield III. U.S.A. 1974.
  10. Moller, A.J.R.: Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth, *Odontol. J.* 74: suppl. 1, p.380, 1966.
  12. Zambon, J.J., Reynolds, H.S., and Slots, J.: Black-pigmented *Bacteroides* Spp. in the human oral cavity. *Infect. Immun.* 32: p.198-203, 1981.
  13. Bergeys Manual of Systemic Bacteriology. Vol. 1, 9th edition.
  14. Slots, J.: Black-pigmented *Bacteroides* species, *Campylobacter* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: Virulence Factors in Colonization, Survival, and Tissue Destruction, *J. Dent. Res.* 63(3): p.412-421, March, 1984.
  15. Van Steenberg, T.J.M.: Classification and Virulence of Black-pigmented *Bacteroides* Strains. Thesis Vrije University of Amsterdam. 1981.
  16. Mayrand, D., McBride, B.C.: Characterization of *B. asaccharolyticus* and *B. melaninogenicus*. *Can. J. Microbiol.* 26: p.1178-1183, 1980.
  17. Loesche, W.J.: Evaluation of kanamycin as an aid in the isolation of *Bacteroides melaninogenicus* from dental plaque, *Archs. Oral Biol.* Vol. 16, p. 813-815, 1971.
  18. Loesche, W.J.: Oxygen Sensitivity of Various Anaerobic Bacteria, *Applied Microbiology*, Nov. 1969, p. 723-727.
  19. Slots, J.: Importance of Black-pigmented *Bacteroides* in Human Periodontal Disease.
  20. Chung, C.P.: Isolation and Identification of *Bacteroides gingivalis* of Korean rapidly progressive periodontitis, *J. Korean Dent. Asso.* Vol. 22, No. 10, 1984: p. 865-868.
  21. Burdon, K.L.: *Bacterium melaninogenicum* from normal and pathologic tissues, *J. Infect. Dis.*, 1921, 28, p. 341.
  22. Fabricius, L.: Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. *Scand. J. Dent. Res.*, 1981: 90: p. 134-144.

# A STUDY ON THE ISOLATION OF BLACK-PIGMENTED BACTEROIDES IN THE NECROTIC PULP

Han Seuk Choi\*, Soo Han Yoon\*, Jong Pyoung Chung\*\*

*\*Dept. of Operative Dentistry, Seoul National University*

*\*\*Dept. of Periodontics, Seoul National University*

..... > **Abstract** < .....

The purpose of this study was to compare Black-pigmented Bacteroides isolated from necrotic pulp with the presence or absence of eight symptoms associated with pulpal necrosis and to identify the proportion of each Black-pigmented Bacteroides species.

The canal contents of fourteen traumatically and cariously necrotized teeth were sampled with a special technique and cultured aerobically and anaerobically for growth in blood agar plate and for Black-pigmented Bacteroides on selective blood agar plate. Each Black-pigmented Bacteroides species were identified by Gram's stain, hemolysis reaction, colony color and morphology and biochemical tests.

The results were as follows;

1. 60.9 percent of the bacteria isolated were anaerobic and 39.1 percent were aerobic.
2. Four Black-pigmented Bacteroides species were isolated; B. loescheii (74.1%), B. denticola (11.1%), B. intermedius (7.4%) and B. gingivalis (7.4%).
3. Black-pigmented Bacteroides was found to be significantly related to sinus tract formation and exudate.

.....