

## *Actinobacillus actinomycetemcomitans*의 혈청형과 유전자형 분포가 치주질환 심도에 미치는 영향

부산대학교 치과대학 치주과학교실  
김은경 · 김성조 · 최점일

### I. 서 론

치주질환은 세균 감염으로 인식되어 있으며 몇몇 형태는 특이적인 미생물과 연관되어 있다고 보고 있다<sup>1,2,3)</sup>. 따라서 치주질환의 원인과 치료에 있어 원인균간의 관계, 질환의 전이 (transmission), 감염에 중요한 숙주반응을 이해하는 것이 중요하다.

이중 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. a.*)는 그람 음성, 통성, 이산화탄소 친화성의 발효성 간균으로 국소 유년성 치주염(LJP)<sup>3)</sup> 뿐만 아니라 급속 진행형 치주염(RPP)<sup>3,4)</sup>, 난치성 치주염<sup>5)</sup>, 사춘기전 치주염<sup>6)</sup>, 성인형 치주염(AP)<sup>7)</sup>의 원인 요소로 생각되어지고 있는 미생물중의 하나이다. Slots 등<sup>8)</sup>은 LJP 환자의 75~90%, RPP 환자의 50%, AP 환자의 20~30%에서 *A. a.* 감염이 존재하고 임상적으로 건강한 개체의 5~10%만이 *A. a.*가 존재한다고 보고있다. *A. a.*는 어린이, 청년기, 성인의 진행성 치주질환과 연관되어 있으나, 또한 파괴성 치주질환의 병력이 없는 치주적으로 건강한 개체에서도 나타날 수 있다<sup>9)</sup>.

*A. a.*는 치주조직 파괴에 있어 중요한 역할을 하는 여러 독성 요소를 가지고 있는데, 그중 가장 포괄적인 요소로는 leukotoxin이 있다<sup>10)</sup>. 그러나 모든 *A. a.*가 다 leukotoxin을 생성하지는 않는다. leukotoxin-producing & non-producing *A. a.* 모두 같은 치주조직에 존재하고 치주질환의 상태에 따라 비율이 달라진다. 즉,

건강한 개체에서는 7%만이 leukotoxin-producing strain이 보이는 반면, 질환에 이환된 개체에서는 43~75%를 보인다고 보고되고 있다<sup>11)</sup>. 또한 *A. a.*는 적어도 하나의 *A. a.*종간에, 또는 *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* 등과 공유하는 공통항원을 가지는데, 이들 공통 항원은 *A. a.* 감염의 진단과 치료를 복잡하게 한다<sup>12)</sup>.

*A. a.*는 분리종에 따라 병원성이 다른데, 그 예로써 세균 집락화와 치주조직 파괴에 필요한 독성 요소는 혈청형과 연관되어 있다고 알려져 있다. 즉, 혈청형은 종종 치주질환의 진행과 연관되어 있다<sup>13)</sup>. 따라서, *A. a.*의 혈청학적 연구는 치주질환의 원인에 있어 중요한 특정 혈청형과 미생물의 항원 관계를 규명하고자 했다. Zambon 등<sup>13)</sup>은 구강내 *A. a.* 균주를 혈청학적으로 a, b, c 3개의 혈청형으로 분류하였고, Saarela 등<sup>14)</sup>에 의해 미결정형의 임상적 혈청형 d와 e가 첨가하여 분류되었다.

Zambon 등<sup>13)</sup>은 구강으로부터는 주로 혈청형 a와 b가 분리되는 반면, 혈청형 c는 10% 정도의 빈도를 덜 빈번하게 나타난다고 하였으며, 건강한 개체에서는 거의 유사한 빈도로 혈청형 a와 b가 존재하는데 반해 LJP에서는 혈청형 b가 증가된 비율을 나타내고 혈청형 b 균주가 치주조직에 있어 더 파괴적이라고 하여 결과적으로 LJP 병원론에 중요하다고 생각되어졌다. Oppenheim 등<sup>15)</sup>은 IL-1 유리를 유도하는 혈청형 b-특이성 항원의 증가된 능력때문에 혈

형 b가 치주조직 파괴 능력을 가진다고 하였고, Zambon 등<sup>13)</sup>은 *A. a.* 혈청형 b 균주가 a와 c보다 더 많은 leukotoxin을 생성한다고 하였으며, 건강한 개체, 당뇨, AP 환자는 혈청형 a와 b가 거의 유사한 빈도로 나타나는 반면, LJP, post JP 환자에서는 혈청형 b가 a가 c보다 2배정도 빈번하게 나타난다고 보고하고 있다. Asikainen 등<sup>16)</sup>은 건강한 치주조직에서는 혈청형 c가 빈번하게 출현하는 반면, LJP와 AP에서는 혈청형 b가 우세하게 나타난다고 보고하고 있다. Ebersole 등<sup>17)</sup>은 LJP, RPP, AP 환자 모두 혈청형 b의 분포가 우세하나, AP에서는 혈청형 c가 더 높은 빈도로 나타난다고 하였다. Song 등<sup>18)</sup>은 한국의 LJP 환자에서 혈청형 c가 빈번하게 나타남을 보였다. Chung 등<sup>19)</sup>은 한국의 LJP 환자에서는 혈청형 a, b, c가 거의 같은 분포를 나타낸다고 보고하고 있다. 또한 Zambon 등<sup>13)</sup>은 하나 이상의 혈청형을 가진 환자는 없었다고 한 반면, Chung 등<sup>19)</sup>은 JP 환자 12명중 3명에서 2가지의 서로 다른 *A. a.* 혈청형이 발견되었다고 보고하고 있다.

분리종이 같은 혈청형이라고 하더라도 유전적으로 상이할 수 있는데, 이는 유전자 지문양상(DNA fingerprinting) 같은 유전자형 연구로 결정할 수 있다. Genco & Loos<sup>25)</sup>은 유전자 지문양상을 사용한 구강악안면 병원균의 유전적 상이성에 대한 연구를 통해 병원론과 병원성 구강 미생물의 획득과 유전에 대한 정보를 제공한다고 하였다. Zambon 등<sup>26)</sup>은 제한효소 분석법을 통한 유전자 지문양상과 *A. a.* 혈청형을 비교한 결과 제한 형태 I은 혈청형 a와 동일하였고, 제한 형태 II는 혈청형 b의 60%, 제한 형태 III는 40%의 혈청형 b와 혈청형 c와 동일한 결과를 얻었다. DiRienzo 등<sup>24)</sup>은 특정 표지자를 이용한 유전자 지문 양상을 *A. a.* 역학과 유전 연구에 사용한 결과 한 개체내에서도 하나 이상의 *A. a.* 균주나 변종에 감염될 수 있고, 같은 가족내의 여러 구성원들은 서로 다른 균종이나 변종이 존재할 수 있음을 유전자 지문양상 분석으로 알 수 있다. 이상과 같이 *A. a.* 유전자형에 대한 연구는 있으나 치주질환과의 연관된 고찰은 아직 없는 상태이다.

다라서 이 연구에서는 여러 학자들간에도 의견일치를 보지 못하고 있는 혈청형과 치주질환에 따른 연관성을 한국인을 대상으로 고찰하여 기존의 연구들과 비교하고, 아직 연구되어 있지 않은 질환의 심도와 유전자형간의 관계를 고찰해 보고자 한다.

## II. 연구대상 및 방법

### 1. SUBJECT

Page & Schroeder의 판정 기준에 따라 성인형 치주염(AP)과 급속 진행형 치주염(RPP)으로 분류하고, AP 12명의 환자중 1명의 건강한 개체, 2명의 치은염 환자, 5명의 초기 치주염(4mm이하의 탐침 깊이, 분지부 이환은 없으며, incipient bone support loss) 환자 총 8명을 group I으로, 3명의 중증도 치주염(5~6mm 탐침 깊이와 확인가능한 골소실, 분지부 초기 이환) 환자를 group II로, 8명의 RPP 환자와 1명의 진행성 치주염 총 9명을 group III로 분류하였다.

이들 환자의 평균 연령은 35.6세(20~45)이고 이전 6개월간 항생제 투여 경력이나 치주치료 경험이 없는 사람을 대상으로 하였다.

### 2. 임상측정

각 환자의 가장 깊은 치주낭 탐침 깊이를 보이는 부위를 대상으로 치주낭 깊이(PD)와 부착수준(LA)을 측정하였다.

### 3. MICROBIAL SAMPLING과 IDENTIFICATION

#### 가. 표본 채취 및 배양

임상검사후 다음의 판정 기준 순서로 미생물 채취를 위한 4 치주낭을 선택했다.

- (1) 탐침출혈과 가장 많은 부착소실 양을 보이는 가장 깊은 열구
- (2) 부착소실이 없다면, 탐침출혈이 보이는 가장 깊은 열구
- (3) 탐침출혈이 없다면, 가장 깊은 열구
- (4) 얇고 건강한 열구만 존재한다면, 제1대구치의 근심면을 선택했다.

치은연상 치태를 제거하고 멸균된 paper point (#40) 2개를 대상 부위 열구에 30초간 넣어 두고 아울러 소독된 curret으로 부가적이 치은연하 치태를 채취했다. 채취된 표본은 1ml reduced transport fluid(RTF : Loesche 등<sup>26</sup>)가 포함된 vial에 넣은 후 Vortex mixer로 30초간 분산한 다음 10배율로 희석을 시행했다. 10<sup>2</sup>배율로 혼합희석된 vial에서 용액 0.1ml를 A. a. 를 위한 단백질배지인 Typtic soy agar-10% serum-75% ug/ml bacitracin-5ug/ml vancomycin (TSBV)<sup>27</sup> 상에 도말한 다음 3~5일간 37°C CO<sub>2</sub> jar<sup>28</sup> 배양기에서 배양했다. 일차적인 배양 시기가 지난후 20~100개의 집락은 가지는 적절한 배지를 선택하여 찾고자 하는 순수분리 배양이 얻어질 때까지 순수배양을 계속하였다. 순수분리배양이 이루어지면, 배지의 절반에 형성된 집락은 일차적인 DNA 조작에 이용하고 나머지는 0.15% dimethyl sulfoxide (DMSO)에 넣어 -70°C에 냉동저장하였다.

#### 나. 미생물 동정

A. a. 동정의 첫번째 기준은 한천에 부착된 작고 둥글며 볼록하고 별모양의 내부구조를 가진 집락형태와 catalase 반응(3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)에 양성인 것으로 하였다. 그의 생화학적 검사로 oxygenase 검사, nitrate 환원 검사, indole 검사, p-nitrophenyl-alpha-D-glucosid-ase(ADG) 검사를 실시하였다.

ADG 검사는 ADG 용액에 colony를 접종시켜 24~48시간 실온에서 방치후 노란색으로 변하면 양성으로 판정했다. catalase 검사는 slide glass위에 colony를 두고 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 몇 방울 떨어뜨려 거품을 형성하면 양성으로 판정했다. oxygenase 검사는 filter paper에 균을 접종시키고 1% tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride 용액을 몇 방울 떨어뜨려 10초 내에 청자색으로 변하면 양성으로 판정했다. nitrate 환원 검사는 blood 배지에 균을 disk 크기로 접종시키고 nitrate disk를 위해 없어서 24~48시간 혐기성 상태로 배양한 후 nitrate 지시약 A 3방울과 B 3방울을 떨어뜨려 진한 적색이 되면 양성으로 판정했다. indole 검사는

colony를 48시간 혐기성 상태로 배양후 Kovac 지시약 10~%2/12방울을 떨어뜨려 적색층을 형성하면 양성으로 했다. 이상의 생화학 검사 결과, oxygenase 검사에 양성, catalase 검사에 양성, nitrate 환원 검사에 양성, indole 검사에 음성, ADG 검사에 양성인 경우 A. a. 로 했다.

#### 4. SEROTYPING OF A. a. ISOLATES & GENOTYPING BY DNA FINGERPRINTING

표준 균주로 A. a. 혈청형 a (ATCC 29523), b (ATCC 29522), c (ATCC 43719)등을 선택했고, 추가로 혈청형 d (IDH 781, Institute of Dentistry, Univ. of Helsinki, Finland) 및 e (IDH 1705, Institute of Dentistry, Univ. of Helsinki, Finland)를 사용하였고 (Table 1), n 임상 분리체와 같은 조건에서 배양하였다. *Escherichia coli* strain DH5 $\alpha$ 의 배양을 위해 완전배지는 Luria-Bertani(LB)를 사용하였고, 특별한 경우가 아닐때는 모든 세균의 배양은 37°C에서 행하였다. 항생제는 선별배지에 따라 ampicillin(50 $\mu$ g/ml), tetracyclin(25 $\mu$ g/ml)등을 첨가하여 사용하였다.

#### 가. 혈청형의 결정(Serotyping)

##### (1) 항혈청(Antisera)의 준비

A. a. 균주 ATCC 29523(serotype a), ATCC 29522(serotype b)와 ATCC 43719(serotype c)에 대한 항혈청은 Zambon 등<sup>13</sup>의 방법에 의해 준비하였다.

배양된 각 균주들을 약 500 $\mu$ g 농도되게 0.05% formaline-saline 용액에 현탁하여 세균현탁액 0.2ml와 동량의 complete Freund adjuvant 혼합물을 토끼 발바닥에 처음 주사하였다. 일주일 후 adjuvant 없이 세균현탁액만 토끼 귀 정맥에 주사하였고 이 과정을 2주 더 계속하였다. 5주째 토끼의 심장에서 채혈하여 3000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 혈구를 제거한 상등액을 취해 -20°C에서 보관하여 다음 실험에 사용하였다.

Table 1. Type strains and plasmid

Type strains	Relevant properties	Source
<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC29523	serotype a	ATCC
<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC29522	serotype b	ATCC
<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC43719	serotype c	ATCC
<i>A. actinomycetemcomitans</i> IDH781	serotype d*	
<i>A. actinomycetemcomitans</i> IDH1705	serotype e*	
Plasmid	Relevant Properties	Source
pAA2097 Tc <sup>R</sup> Am, including randomly cloned probe	Dirienzo, M. J.	

\* Inst. of Dent., Univ. of Helsinki, Finland

### (2) 면역흡착(Immunoabsorption)

위에서 얻은 항혈청을 특이항원에만 반응할 때까지 다른 *A. a.* 혈청형 균주들의 세포로 흡착을 하였다. 한 종류의 토끼 항혈청 1ml에 다른 serotype 균주들(약 100mg)를 첨가하여 37°C에서 진탕하면서 1시간 동안 반응시킨 후 4°C에서 12시간 유지하였다. 이 혼합물을 13,000 rpm으로 60분간 원심분리하여 상등액을 취하여 사용할 때까지 -70°C에서 보관하였다.

### (3) ELISA에 의해 혈청형 결정

혈청형을 결정할 분리된 *A. a.* 균주들을 0.02% NaCO<sub>3</sub>를 포함하는 0.1M NaCO<sub>3</sub> buffer(pH 9.6)에 580m에서 Optical Density(OD) 0.25~0.3 되게 현탁하였다.

이 항원현탁액을 ELIS용 microtitre plate의 각 well에 50μl씩 첨가하여 2시간동안 상온에 방치하고 3번 증류수로 세척하여 blocking buffer(0.05% Tween 20에 녹인 0.25% BSA)를 전 well에 가득 첨가한 후 4°C에서 12시간 보관하였다. 이 sample를 3번 증류수로 세척한 후 PBS에 희석된 흡착된 특이 혈청형 항체 50 μl를 각 well에 첨가하여 상온에서 2시간 반응시키고, 3번 증류수로 세척한 후 goat anti-rabbit Ig G-conjugated alkaline phosphatase를 50 μl씩 각 well에 첨가하였다. 2시간 후 증류수로 3번 세척하여 기질 p-nitrophenyl phosphate액(1mg/10ml : 0.05mM NaCO<sub>3</sub>, pH 9.8 with 1 mM MgCl<sub>2</sub>) 50ml를 각 well에 첨가하여 반응시켰고, 1N NaOH를 사용하여 반응 정지를

시켰다. 발색도를 microELISA reader로 spectrophotometer 파장 450nm에서 측정하였다.

### 나. 유전자형의 결정(Genotyping)

#### 1) 표지자 준비(Probe Preparation)

##### (1) Transformation

표지자로 사용할 plasmid pAA2097은 Dr. DiRienzo(Univ. of Pennsylvania)가 기준한 것으로 host *E. coli* DH5α에 도입해 증폭하여 사용하였다. Competent cell과 DNA의 도입은 Hanahan<sup>30)</sup>의 방법에 따라 수행하였다.

Host strain을 37°C에서 5×10<sup>7</sup>~2×10<sup>8</sup> cells/ml 되게 진탕 배양한 후, 배양액을 얼음속에서 10분간 냉각하고 냉동원심분리기에서 4°C에서 5,000rpm으로 10분간 원심분리하여 집균하였다. 세포침전물에 미리 차게 해둔 멸균된 CaCl<sub>2</sub>용액(50mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM Tris-Cl pH 8.0)을 원래 배양에 부피 1/5정도로 첨가한 다음, 세포를 현탁시켜 얼음속에 15분동안 두었다가 5,000rpm으로 4°C에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 버리고 미리 차게 해둔 CaCl<sub>2</sub>용액으로 원래 부피의 1/50되게 현탁시킨 후, 차게 해둔 effendorf tube에 competent cell 0.2ml씩 분주하여 사용하였다.

Competent cell 0.2ml과 plasmid DNA solution 0.1ml를 혼합하여 0°C에서 60분간 방치한 후, 2분간 42°C에서 열충격을 가하고 LB 배지를 0.8ml씩 각 반응물에 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 흔들지 않고 배양하였다. 이 배양액을 선택배지 tetracyclin과 ampicillin이 첨가된 LB

agar plate에 적당히 희석시켜 도말하고 37°C에서 하룻밤 배양하여 colony를 확인하였다.

### (2) plasmid DNA의 분리 및 정제

plasmid DNA의 분리와 정제를 위해, small scale DNA 분리와 large scale DNA 분리방법은 Maniatis 등<sup>31)</sup>의 방법을 사용하였다. 즉 항생제를 포함하는 LB medium 5ml에 균을 접종하여 37°C에 하룻밤 배양한 후, 이 배양액을 LB medium 500ml에 1:100으로 접종하여 하룻밤동안 배양하였다. 이 배양액을 4°C 5,000 rpm(한일 H50A-6, Rotor 10BN6)에서 10분동안 원심분리하여 균체를 회수하고, STE buffer (pH 8.0)로 1회 세척하였다. 세척된 균체에 lysozyme(50mg/ml)을 포함하는 용액 I 10ml에 균체를 현탁시키고 상온에 5분간 방치하였다. 이 혼합액에 용액 II 20ml를 첨가하고 tube의 입구를 밀봉한 후 부드럽게 여러번 뒤집고 10분간 얼음속에 방치하였다. 용액 II를 처리한 혼합액에 얼음속에 냉각된 용액 III 15ml를 첨가하여 여러번 빨리 뒤집고 10분동안 얼음속에 담가둔 후 4°C, 15,000rpm(한일 H50-A, Rotor A10H-24)으로 30분동안 원심분리하여 잔여 세포와 염색체 DNA가 제거된 상등액을 상등액 부피의 0.6배 양의 isopropanol을 첨가하여 잘 섞은 후 15분동안 상온에 방치하였다. Isopropanol이 첨가된 용액을 꺼내어 상온에서 10,000 rpm에 30분동안 원심분리하여 상등액을 조심스럽게 버리고 침전물을 얻었다. 70% ethanol로 상온에서 1회 세척하고 원심분리하여 상등액을 버리고 DNA 침전물을 얻었다. TE(pH 8.0) buffer 8ml에 침전물을 녹이고 CsCl 8g을 넣어 완전히 녹인후, ethidium bromide 용액 (EtBr, 10mg/ml in H<sub>2</sub>O) 0.8ml을 첨가하였다. CsCl과 EtBr이 첨가된 DNA 용액을 20°C, 55,000rpm으로 20시간동안 초원심분리(Kontron T-2000)하여 plasmid DNA를 분리하였다. TE-buffer saturated isoamyl alcohol을 사용하여 붉은색이 없어질 때까지 ethidium bromide를 제거하였다. plasmid DNA 용액을 dialysis tube에 넣고 TE(pH 8.0) buffer 1L에 dialysis(4°C, 3시간씩 3회 완충액교환)을 하여 CsCl를

제거한 다음 DNA 농도를 측정하여 -20°C에 보관하였다.

### (3) Agarose gel electrophoresis

Plasmid DNA를 확인하는 모든 실험은 0.7% agarose gel에서 대개 5V/cm에서 3시간 동안 전기영동을 행하였다.

### (4) DNA의 절단과 DNA fragment의 회수

여러가지 제한효소를 사용한 plasmid의 절단은 적당한 digestion buffer에서 37°C, 1시간 동안 수행되었다. 제한효소 처리에 의해 발생하는 DNA 절편은 TAE buffer를 사용한 0.7% agarose gel 전기영동을 행하여 분석하였다. 제한효소로 절단된 절편은 agarose gel상에서 전기영동한 후 원하는 DNA 단편들을 GENE CLEAN II KIT로 정제하였으며, 여기에 사용된 모든 시약들은 GENE CLEAN II kit에 포함되어 있거나 제조회사의 지시대로 만들어 사용하였다. 그 방법은 다음과 같았다.

TAE buffer를 사용한 gel 전기영동을 통해 전개된 DNA bands중에서 원하는 DNA 절편이 위치한 band를 자외선 조사기상에서 찾아 수술요 칼로 정확하게 자른뒤 eppendorf tube에 담았다. 여기에 gel조각의 3배량의 6M sodium iodide가 포함된 NaI stock 용액을 첨가하여 용액내의 sodium iodide의 최종농도가 3M이 되도록 하였다. 이것을 45~55°C water bath에 옮겨 DNA 절편이 들어있는 gel을 녹였다. 사용전에 잘 현탁된 GLASSMILK를 5μl첨가하여 5~10분간 ice-cold 시켰다. 이때 DNA는 GLASSMILK 입자에 결합하게 되는데, 이것을 12,000g에서 5초간 원심분리시켜 DNA가 결합되어 있는 GLASSMILK 입자를 침전시켰다. 상층액을 버리고난 후, ice-cold된 NEW WASH 용액 700μl정도로 3회 세척하였다. NEW WASH 용액에 들어있던 ethanol 성분이 모두 기화하고난 후, TE buffer나 멸균수를 10μl정도 첨가하여 45~55°C water bath에서 5~10분간 원심분리한 후, DNA가 용출되어 있는 상층액만을 새로운 eppendorf tube에 옮겨 -20°C에 보관하여 다음 실험에 사용하였다.

## 2) *A. a.* genomic DNA의 분리

세포의 genomic DNA 분리는 Zambon 등<sup>23)</sup>의 방법을 변형하여 사용하였다.

고체배지에서 자란 세균의 colony를 면봉을 사용하여 집균한 후 STE buffer 1ml에 현탁하고 2분동안 미세원심분리가(FISHER Scientific 사, MODEL 235C)에서 원심분리하여 상등액을 버리고 TE 475 $\mu$ l에 현탁한 후 lysozyme(10 mg/ml) (25 $\mu$ l를 첨가하여 얼음속에서 30분동안 방치하였다. 이 현탁액에 STEP buffer 90ml와 RNase(10mg/ml) 5ml를 첨가하여, 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시킨 후, Proteinase K(20mg/ml) 5 $\mu$ l를 첨가하고 55 $^{\circ}$ C에서 60분간 반응시켰다. 위 반응액과 동량의 Phenol/chloroform/isoamyl alcohol(25 : 24.1, pH 8.0)액 600 $\mu$ l를 넣어 잘 혼합하여 5분동안 미세원심분리기에서 원심분리하여 상등액을 취하고 동량의 chloroform-isoamyl alcohol 600 $\mu$ l를 첨가하여 혼합한 후 5분동안 원심분리하여 상등액을 취하였다. 이 상등액에 3M sodium acetate 60 $\mu$ l와 isopropanol 600 $\mu$ l를 첨가하여 상온에서 10분간 방치한 후 10분동안 원심분리하여 DNA를 침전시키고, 60% ethanol로 한번 세척한 후 상온에서 잔존하는 ethanol이 완전히 제거될 때까지 건조하여 TE 50 $\mu$ l에 DNA를 녹였다. 이 DNA용액을 spectrophotometer로 양을 측정한 후, -20 $^{\circ}$ C에서 보관하여 다음 실험에 사용하였다.

## 3) Southern Blotting와 hybridization

### (1) Hybridization probe의 준비

*A. a.* 균주들의 genomic DNA상에서 균주간 DNA 유전자 지문양상을 위하여 사용된 상보 교합 표지자는 plasmid pAA2097에서 제한효소 *EcoR* I과 '13/Sal I으로 절단된 약 4.6kb DNA 단편을 agarose 전기영동상에서 분리하여 GENE CLEAN II kit로 회수하여 사용하였다.

(2) Enterobacteria genomic DNA의 transfer 각 제한효소에 절단된 Enterobacteria genomic DNA는 0.8% agarose gel로 3시간 동안 전기영동하였다. Agarose gel에 분리된 DNA 절편을 변성시켜 Nylon filter(Bio-Rad사)에 흡착,

고정한 방법은 Maniatis 등<sup>31)</sup>의 방법을 변형하여 행하였다. Filter에 흡착시키는 방법은 capillary transfer를 하였다. Gel은 500ml의 변성용액에 넣어 1시간 정도 실온에서 천천히 진탕한 후, 증류수로 2회정도 gel을 세척하여 500ml의 중화용액을 넣고 실온에서 30분정도 천천히 진탕하였다. Gel은 10X SSC가 담긴 그릇위의 3 mm filter paper위에 거꾸로 놓은 후 미리 10X SSC에 포화된 Nylon filter를 gel에 놓고 그 위에 3mm filter paper 두장과 paper towel(Kim towel type 50)을 15cm정도 되게 하여 약 0.5~1 kg 정도의 물체를 올려 놓고 overnight시켰다. Nylon filter가 gel로부터 분리되어 2X SSC에서 간단히 세척한 후 paper towel에서 습기를 제거하고 80 $^{\circ}$ C의 vacuum-dry oven에서 2시간 동안 구워 고정하였다.

### (3) Southern hybridization

Genomic DNA fingerprint 분석을 하기 위해 사용한 southern hybridization은 nonradioactive labelling system인 Enhanced Chemiluminescence(ECL) Kit(Amersham Co.)를 사용하였다.

표지자로 쓸 DNA를 증류수로 100mg/10 $\mu$ l로 희석하였다. 이 DNA 용액을 끓는 물에 5분간 담가둔 후 얼음속에서 5분동안 방치하고 5초간 원심분리하였다. DNA 용액과 동량의 DNA labelling agent를 첨가하여 잘 혼합한 후 동량의 glutaraldehyde solution를 가하여 1초간 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켜 즉시 사용하였다.

Hybridization bag에 DNA blot된 Nylon filter를 넣고 filter의 면적(0.25ml/cm)에 따라 pre-hybridization 용액 양을 첨가한후 42 $^{\circ}$ C의 waterbath에서 약하게 진탕하면서 1시간동안 prehybridization을 하였다. Hybridization bag에 labelled probe를 첨가하여 12~14시간동안 42 $^{\circ}$ C에서 진탕하면서 상보결합을 수행하였다. 반응이 끝난 filter를 깨끗한 용기에 옮겨 primary wash buffer(2ml/cm)로 20분간 2회 반복하여 세척하고, 상온에서 secondary wash buffer(2ml/cm)로 5분간 두번 세척하였다. 이

filter를 3mm paper 위에서 1분간 건조한후 filter 면적(0.125ml/cm)에 따라 final volume이 맞게 동량의 detection 1과 2를 혼합하여 filter 위에 붓고 1분간 반응시켰다. 반응액을 제거한 다음 filter를 wrap으로 싼 뒤, 암실에서 intensifying screen이 있는 cassette에서 hyper film-ECL(PRN2103)에 장착하여 1~15분 동안 방치한 후 현상하였다.

여기에서 사용한 반응 system 용액은 구입 회사의 지시에 따라 filter의 면적에 비례하여 사용하였다. 유전자형의 명칭은 표준 혈청형 a, b, c가 나타내는 지문 양상을 기준으로하여 각각 A, B, C형으로 분류하고, 혈청형 d와 e가 나타내는 지문 양상을 역시 각각 D와 E라고 지칭하였다. 또한, A, B, C, D, E 어떤 형도 나타내지 않는 기타 형을 보이는 유전자형을 NT로, 미결정 혈청형을 nd로 나타내었다.

## 5. 통계학적 분석

혈청형 & 유전자형과 각 질환의 유형별 group간의 관계, 혈청형 & 유전자형과 부착 수준별 group간의 관계는  $X^2$  검정(chi-square analysis)을 실시하였고, 혈청형과 치주낭 깊이 & 부착수준간의 유의성은 분산분석(analysis of variance)를 실시하였다. 각 질환 유형별 군과 부착수준별 분류군내에서 각 혈청형과 유전자형의 관련성을 알아보기 위해 대응분석(correspondence analysis)를 실시하였고 혈청형별 분류에서는 {c,a} group으로, 유전자형별 분류에서는 {B, E, NT, D}와 {C, A} group의 2개 분류군을 형성해 다중비교(Tukey test)를 실시하였다.

Table 2. Composition of Buffers used in purification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* genomic DNA

Butter Solutions	Composition
STE buffer	0.1M NaCl 10mM Tris-HCl(pH 8.0) 1mM EDTA
TE buffer	50mM Tris-HCl(pH 8.0) 50mM EDTA
STEP buffer	0.5% SDS 50mM Tris-HCl(PH 8.0) 0.4M EDTA proteinase K(사용직적)
RNase	Pancreatic RNase A(10mg/ml) in TE buffer preheated to 80°C for 10minutes to inactivate DNase
Phenol/chloroform	1 : 1 mixture equilibrated with 0.5M Trs-HCl(pH 8.0) The chloroform is a mixture of the chloroform and isoamylacohol(24 : 1)
DNA solution TE	10mM Tris-HCl(pH 8.0) 1mM Tris-HCl(pH 8.0) 1mM EDTA

Table 3. Composition of Southern hybridization solutions

Solutions	Composition
DNA denaturation solution	1.5M NaCl 0.5M NaOH
DNA neutralization solution	1.0M NaCl 0.5M Tris-HCl(pH 7.6)
20XSSC	3M NaCl 0.3M Trisodium citrate(pH 7.6)
Primary wash buffer	0.4% SDS 0.5X SSC
Secondary wash buffer	2X SSC
Prehybridization solution	ECL-hybridization solution 5% bloking agent 0.5M NaCl
Hybridization solution	prehybridization with labelled DNA probe

### III. 결 과

#### 1. 치주질환의 심도에 따른 분류군별 혈청형과 유전자형의 분포

Group I 은 총 8명의 환자 16부위중 유전자형은 C가 가장 많았고 A, D순이었으며, 혈청형은 c, a의 순이었고 미결정형이 하나 있었다. group II는 총 4명의 환자 9부위중 유전자형은 C와 미결정형으로 구성되었고, 혈청형은 c가 가장 많았다. group III는 총 8명의 환자 21부위중 유전자형은 D가 가장 많았고 다음으로 B, C, E 순이었으며, 혈청형은 c와 미결정이 차지했다(표 4).

X<sup>2</sup> 검정 결과 유전자형과 각 군간에는 상관관계가 있었으며, 대응분석 결과 group I 은 유전자형 A와 C, II는 NT, III는 B, D, E와 관련이 있는 것으로 나타났다(그림 1). 혈청형과 각 group간에 분산분석 결과 상관관계가 있었으며, group I 은 a와 c, II는 c, III는 b & nd와 관련이 있는 것으로 대응분석 결과 나타났다(그림 2).

#### 2. 혈청형별 치주낭 깊이와 부착수준 분포

혈청형 a는 평균 치주낭 깊이가 3.25mm, 평균 부착수준이 3.5mm이었고, 혈청형 b는 8.25mm와 9.5mm, 혈청형 c는 5.64mm와 6.46mm으로 나타났으며, 그의 기타형은 7.21mm와 8.79mm였다(표 5). 분산분석 결과 혈청형에 따라 PD/LA에 차이가 있었고, 다중비교시 {b, nd}와 {c, a} group 간에는 PD/LA에 있어 차이가 있었다.

#### 3. 유전자형별 치주낭 깊이와 부착수준 분포

유전자형 A의 평균 치주낭 깊이는 2mm, 평균 부착수준은 2mm이었으며, B는 8.25mm와 9.5mm, C는 4.6mm와 5.2mm, D는 7.22mm와 8.89mm, E는 7.75mm와 9.5mm 이었으며, 그의 기타형은 7.5mm와 8.67mm이었다(표 6).

분산분석 결과 유전자형에 따라 PD/LA에 차이가 있었으며, {E, E, NT, D}와 {C, A}의 2군간에 다중비교 결과 PD/LA에 있어 차이가 있었다.



Table 4. Mean pocket depth, level of attachment and the probotypes and serotypes distributions according to the disease severity groups

	group I	group II	group III
No. of isolation sites	16	7	23
No. of subjects	8	3	9
pocket depth <sup>a</sup>	3± 0.63	5.86± 0.90	
level of attachment <sup>b</sup>	3± 0.63	5.86± 1.21	9.57± 0.84
probotype			
distribution(%)			
A	3(18.75)	0(0)	0(0)
B	0(0)	0(0)	4(17.39)
C	12(75)	4(57.14)	4(17.39)
D	1(6.25)	0(0)	8(34.78)
E	0(0)	0(0)	4(17.39)
NT*	0(0)	3(42.86)	3(13.04)
serotype			
distribution(%)			
a	3(18.75)	1(14.29)	0(0)
b	0(0)	0(0)	4(17.39)
c	12(75)	4(57.14)	8(34.789)
nd <sup>‡</sup>	1(6.25)	2(28.57)	11(47.83)

<sup>a</sup>: mean pocket depth± s. d.(mm)

<sup>b</sup>: mean level of attachment± S. D.(mm)

\* NT : non-type

<sup>‡</sup>nd : not determined

<sup>†, ††</sup>: p-value<0.005 by Chi-square analysis

#### 4. 부착수준별 혈청형과 유전자형 분포

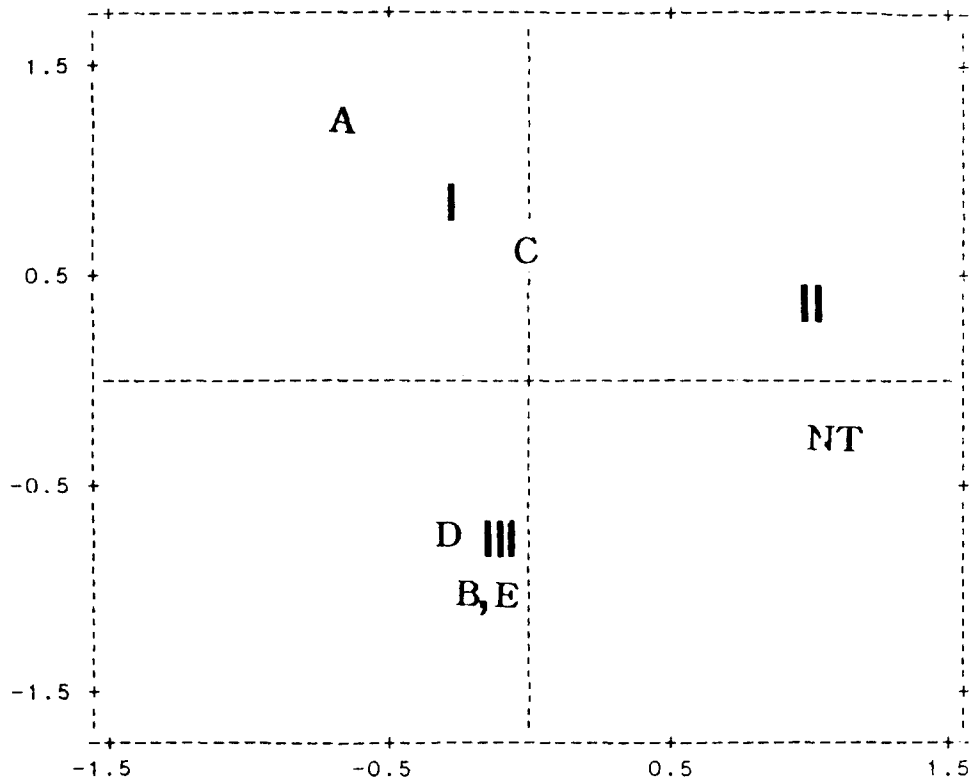
4mm미만의 부착수준을 나타내는 경미한 군에서 유전자형은 C, A 순이었고, 혈청형도 c, a 순이었다. 부착수준 중증도 군에서 유전자형은 C, D로 구성되고 혈청형은 c와 미결정형으로 구성되었다. 6mm이상의 부착수준을 보이는 군에서 유전자형은 C, D, B, E 순이었고 혈청형은 c와 a로 구성되었다(표 7). X<sup>2</sup> 검정 결과 유전자형과 부착수준간에는 상관관계가 있었으며, 대응분석결과 경미한 군은 유전자형 A와 C, 중증도 군에서는 C, 심한 부착소실 보이는 군에서는 B, D, E, NT와 관련이 있는 것으로 나타났다(그림 3). 혈청형과 부착수준

간의 X<sup>2</sup> 검정 결과 상관관계가 있었으며, 대응분석결과 경미한 군은 혈청형 a와 c, 중증도 군은 c, 심한 부착소실 군은 b와 nd에 상관관계를 보였다(그림 4).

#### IV. 총괄 및 고안

이연구 결과 A. a는 질환의 활성기인 부위에서 빈번하게 나타난다는 보고(Ebersole 등<sup>34, 35</sup>)와 치은탐침 출혈과 깊은 치주낭, 부착소실이 많을수록 A. a. 출혈 빈도가 높은 경향을 보인다는 Ebersole 등<sup>36</sup>의 보고와 일치하였다. 그러나, 치주낭 깊이가 3mm이하의 비교적 건강

Fig. 1. Diagrammatic representation of the relationship between the disease severity groups and the genotypes



\* correspondence analysis was done.

I : Disease severity group I (healthy, gingivitis, early periodontitis)

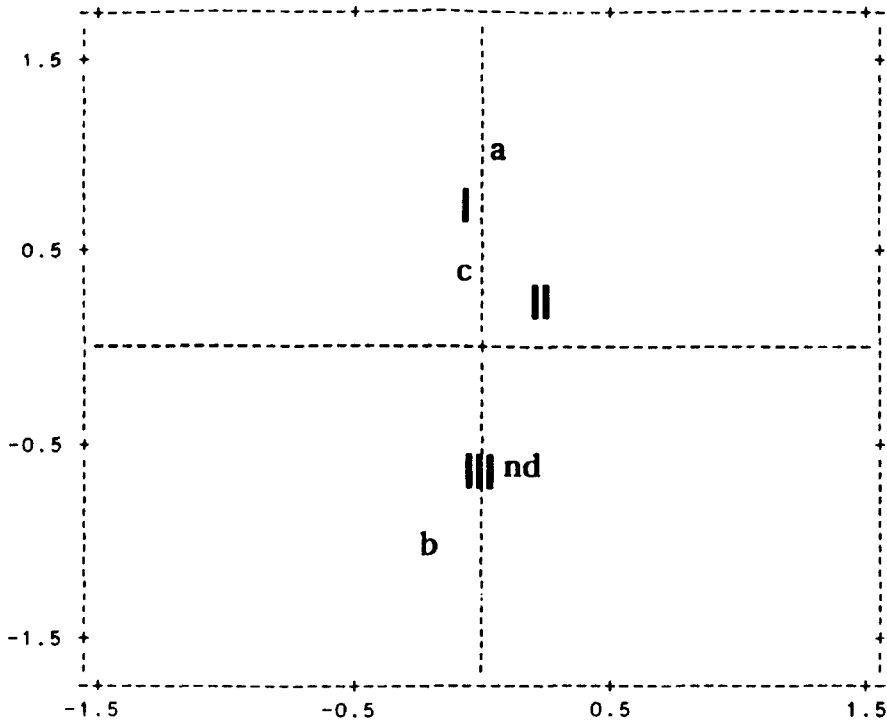
II : Disease severity group II (moderate periodontitis)

III : Disease severity group III (advanced periodontitis, RPP)

A, B, C, D, E : genotypes

NT : non-type

Fig. 2. Diagrammatic representation of the relationship between disease severity groups and the serotypes



\* correspondence analysis was done.

I : Disease severity group I (healthy, gingivitis, early periodontitis)

II : Disease severity group II (moderate periodontitis)

III : Disease severity group III (advanced periodontitis, RPP)

a, b, c : genotypes

nd : non-determined serotype

Table 5. Pocket depth and level of attachment according to the different serotypes

serotype	a	b	c	not determined
pocket depth <sup>a +</sup>	3.25 ± 2.53	8.25 ± 0.83	5.21 ± 2.29	7.21 ± 1.53
level of attachment <sup>b +</sup>	3.5 ± 3.01	9.50 ± 0.87	5.96 ± 2.95	8.79 ± 1.76

<sup>a</sup> : mean pocket depth ± s. d.(mm)

<sup>b</sup> : mean level of attachment ± s. d.(mm)

<sup>+</sup> : p-value < 0.001 by ANOVA

\* : significantly different between group by Tukey test

Table 6. Pocket depth and attachment level according to the different genotypes

genotype	A	B	C	D	E	NT
pocket depth <sup>a +</sup>	2 ± 0	8.25 ± 0.58	4.6 ± 1.82	7.22 ± 1.64	7.55 ± 0.83	7.50 ± 0.14
level of attachment <sup>b +</sup>	2 ± 0	9.5 ± 0	5.2 + 2.55	8.79 + 1.90	9.50 ± 0.50	8.67 ± 2.21

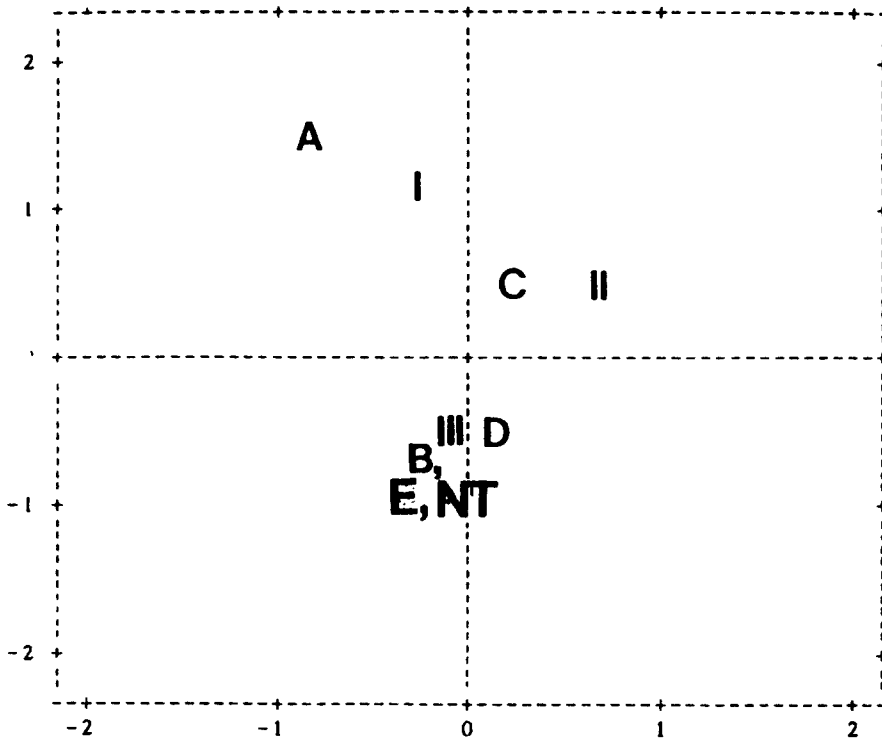
<sup>a</sup> : mean pocket depth ± s. d.(mm)

<sup>b</sup> : mean level of attachment ± s. d.(mm)

<sup>+</sup> : p-value < 0.001 by ANOVA

\* : significantly different between group by Tukey test

Fig. 3. Diagrammatic representation of the relationship between the groups of the attachment level and the genotypes



\* correspondence analysis was done.

I : level of attachment (LA) group I ( $LA < 4\text{mm}$ )

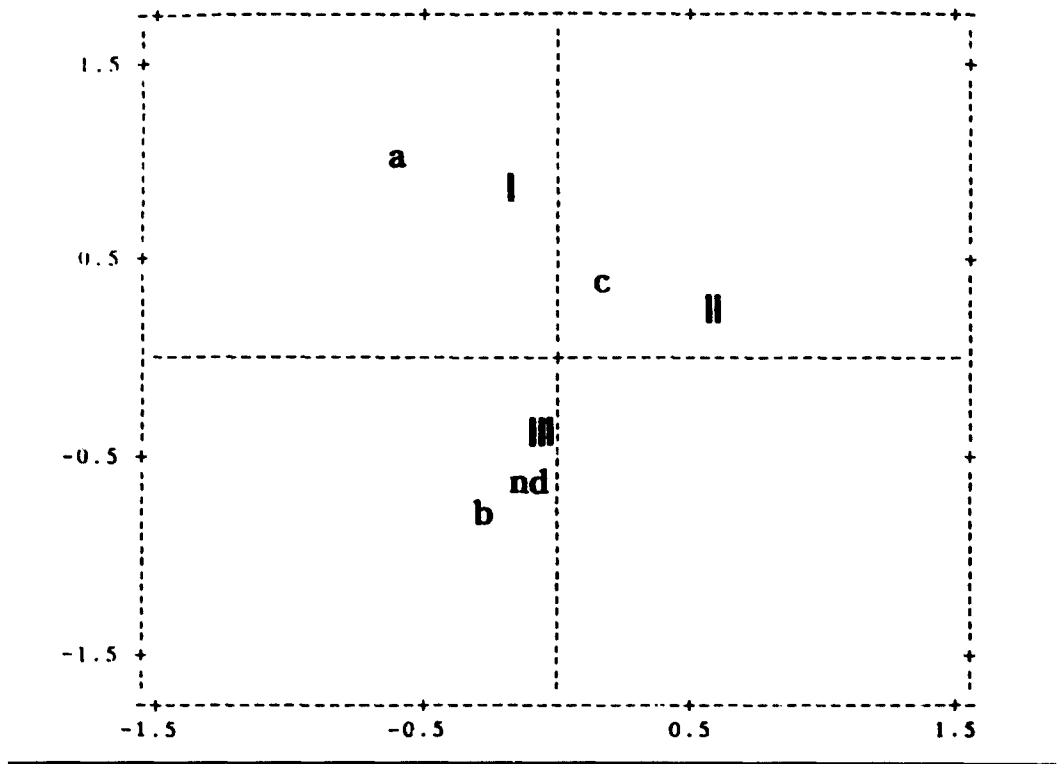
II : level of attachment (LA) group II ( $4\text{mm} < LA < 6\text{mm}$ )

III : level of attachment (LA) group III ( $LA > 6\text{mm}$ )

A, B, C, D, E : genotypes

NT : non-type

Fig. 4. Diagrammatic representation of the relationship between the groups of the attachment level and the serotypes



\* correspondence analysis was done.

I : level of attachment (LA) group I ( $LA < 4\text{mm}$ )

II : level of attachment (LA) group II ( $4\text{mm} < LA < 6\text{mm}$ )

III : level of attachment (LA) group III ( $LA > 6\text{mm}$ )

a, b, c : genotypes

nd : non-determined serotype

Table 7. Distribution of genotypes and serotypes according to the level of attachment

	slight (LA4mm)	moderate (4mm<LA<6mm)	severe (LA>6mm)
genotype (%)			
A	3 (27.27)	0 (0)	0 (0)
B	0 (0)	0 (0)	5 (17.24)
C	8 (72.73)	5 (83.33)	7 (24.14)
D	0 (0)	1 (16.67)	7 (24.14)
E	0 (0)	0 (0)	4 (13.79)
NT	0 (0)	0 (0)	6 (20.69)
serotype (%)			
a	3 (27.27)	0 (0)	1 (3.45)
b	0 (0)	0 (0)	4 (13.79)
c	8 (72.73)	5 (83.33)	11 (37.93)
nd	0 (0)	1 (16.67)	13 (44.83)

\* : p-value<0.005 by Chi-square analysis

\*\* : 0.005<p-value< by Chi-square analysis

한 치주조직에서도 *A. a.*가 빈번하게 나타나는 것으로 보아 *A. a.*는 치주조직 파괴의 임상증상 없이 오랜 기간동안 존재할 수 있으며, 이는 *A. a.* 균주의 발병력을 가진 요소가 다양하다는 의미로 생각할 수 있다. *A. a.*는 치은연하 치태 전반에 골고루 분포하지는 않고 보통 molarincisor 부위에서 빈번하게 관찰되는 것으로 나타났다.

Zambon 등<sup>13)</sup>과 McArthur 등<sup>20)</sup>에 의하면 혈청형 a와 b가 c에 비해 숙주의 방어 기전을 침범하고 구강조직에 부착 능력이 증가되어 미생물 집락에 더 용이하다고 하여 혈청형 a와 b의 출현 빈도가 더 빈번하다고 보고하고 있으나, 이 연구 결과 전체적인 출혈률은 혈청형 c가 a와 b보다 오히려 높은 빈도를 보였다. 이는 Tsai & Taichman<sup>32)</sup>와 Ohgi & Kamoi<sup>33)</sup>가 보고한 혈청형 c가 성인 환자에서 우세하게 나타난다는 보고와 일치한다. 특히 혈청형 c는 치주적으로 건강한 개체일수록 더 높은 빈도를 나타냈다. 또 치주조직 파괴가 심한 군에서는 다른 군에서보다는 혈청형 b의 빈도가 증가되었으나 이전에 연구 결과에서의 빈도보다는 저하된 비율을 보였다. 이전의 data와 다른

이러한 결과들은 유전학적으로나 환경적인 관점에서의 상이점, 연령과의 연관성, 종족의 차이, 다른 면역 반응제(immunological reagent)와 사용된 방법 등과 연관되어 생각할 수 있다. 또 연구 대상의 연령이 30세 이후가 다수를 차지하였는데, 이러한 비교적 나이가 든 개체에서는 leukotoxin positive인 *A. a.* 혈청형 b 균주보다는 non-leukotoxic strain인 혈청형 c 균주가 감염되는 경향이 있다고도 생각할 수 있으며, 또한 leukotoxic & non-leukotoxic strain이 같은 치주낭내에서 함께 존재하여 각 균주간의 계속적인 전환 또는 치주낭내에 존재하는 다른 공통항원을 가진 균주와 연관되어 나타나는 결과라고도 설명될 수 있다<sup>23)</sup>. 또한 관찰 시기의 해당 부위에 대한 질환 활성도도 관련되어 있을 것으로 생각된다.

20명의 환자중 2명에서 *A. a.* 혈청형을 하나 이상 가지는 것으로 나타났다. 이는 Zambon 등<sup>13)</sup>의 환자당 단지 하나의 혈청형만 나타난다는 이전의 연구와는 다르나, William 등<sup>21)</sup>, Chung 등<sup>19)</sup>, DiRienzo 등<sup>29)</sup>이 보고한 2~3개의 *A. a.* 혈청형을 가진다는 의견과 일치한다. 이런 결과는 최근에 여러 혈청형과 동시성으로 또는

일련의 순서로 접촉하거나 공통항원을 가진 균주간의 교차반응에 의한 항체 형성의 유도로 나타날 수 있고, 또한 질환이 소멸단계에 있거나 긴 감염 기간동안 혈청형의 변이(“shift”)로 인한 결과이거나 A. a 균주가 strain serotype determinant를 바꿀 수 있는 가능성을 가지고 있다고도 설명될 수 있으나, 여기에 대해 아직 증명되지는 않았다.

이상에서 여태까지 연구된 미국이나 유럽 국가와 한국인간의 혈청형 분포의 차이나 한 개인에서의 다수 혈청형 존재 여부의 차이는 실험 방법에 있어서의 차이에서도 비롯될 수 있으나, 치주상태나 인구 집단, 나이, 인종에 따른 역학적인 관점에서의 차이 때문인 것으로도 생각된다. 한 예로 A. a. 혈청형 b와 c에 대한 항체 반응은 종족과 연관된 것으로 생각되어지고 있으며, 따라서 흑인에서는 더 강한 항체 반응이 일어난다고 보고 있다. 또한 Asikainen 등<sup>37)</sup>은 515 균주중 혈청형 a가 25%, v가 25%, c가 41%를 차지하였으며, 혈청형 d가 3%, e가 3%, 미결정형이 3% 정도 관찰된 것을 보고하고 있는데, 질환의 정도에 있어 차이는 있으나, 이 연구에서의 미결정형 중에도 상당수 d와 e형이 포함되어 있으리라 추측되는데, 이들은 치주질환의 심도가 깊어질수록 그 비율이 증가되는 양상을 보이나 혈청형 d & e와 질환의 심도에 대한 연관성에 대해서는 더 자세한 연구가 있어야 할 것 같다.

같은 혈청형에서는 대부분(86.96%) 고유의 유전자 지문양상(DNA fingerprinting pattern)을 나타내는 같은 유전자형을 얻었으나, 일부(13.04%)에서는 혈청형과 유전자형이 일치하지 않은 경우도 있었다. 따라서 *Neisseria meningitidis*나 *Escherichia coli*에서 보여진 이전 연구 결과와 같이 이 연구에서 사용된 A. a. 균주에서도 같은 혈청형 균주라고 반드시 유전학적으로 관련이 있다고 볼 수 없으며, 반대로 유전적으로 관련된 균주라도 다른 혈청형을 가질 수 있는 것으로 나타났다.

유전자형의 질환별 분포 결과 A와 C형은 비교적 치주조직 파괴가 덜한 부위에서 우세하게 나타났는데, 특히 C의 빈도가 높은 경향을

보였다. 이는 혈청형 a와 c를 나타내는 표준 균주의 유전자 지문 형태를 각각 유전자형 A와 C로 규정하고 임상 분리 균주를 비교한 결과로써, 혈청형 a와 c가 건강한 개체에서 C형이 우세한 것은 C형의 독성이 덜하거나 면역 반응이 더 일찍 형성되어 치주병인균으로서의 가능성을 줄일 수 있다고 추측할 수 있다.

유전자형 B, D와 E는 급속 진행형 치주염 일수록, 깊은 치주낭과 부착소실이 많은 부위 일수록 그 빈도가 증가되는 것으로 보인다. 이런 결과는 급속 진행형 치주염으로 인해 단기간에 깊은 치주낭과 부착소실이 많은 부위일수록, 조직에 대한 세균 독성이 더 강하게 집중적으로 작용한다고 보아지며, 따라서 유전자형 B, D와 E의 빈도증가는 이들 유전자형이 조직파괴 정도를 반영해 준다고 설명될 수 있다. 그러나 이러한 결과 해석에 있어 몇가지 제한점이 있다. 특히 D형의 빈도 증가를 보였는데, 유전자형 A와 D는 유전자 지문양상이 거의 유사하게 나타나 판별이 모호한 것이 많았다. 여기에서는 혈청형 a이면서 A와 D가 모호한 것을 A로 보고, 그외에는 D로 처리했는데, D형의 빈도 증가에는 아마 A형이 일부 포함되어 있을 수도 있다. 또한 급속 진행형 치주염과 전반적인 유년성 치주염의 판별기준이 모호할 때가 있어 이들 급속 진행형 치주염에 일부 포함되어 있을 수 있다. 아울러, 새로 분류된 D와 E형에 속하는 균주의 여러 독성에 대한 연구가 더 이루어져야 할 것이다.

이상의 결과로 미루어 볼때, leukotoxin을 생성하는 혈청형 b와 그에 대한 유전자형 B의 출혈 빈도가 기대했던 것보다 낮은 것은 치주질환의 유형을 포괄적으로 포함했다는 점에서 차이가 있을 수도 있지만, A. a 독성 요소중 가장 포괄적이고 중요한 요소라고 생각되고 있는 것은 leukotoxin으로 leukotoxin-positive인 혈청형 b 유형의 증가가 치주조직에 중요하다고 생각되어 왔으나, A. a 병원론에 있어 leukotoxin외에 여러 인자가 작용하는 것으로 생각되며, 혈청학적 분포가 A. a 독성을 반드시 반영하는 것은 아니라고 생각할 수 있다. 또한 혈청형 분포는 여러 요인에 의해서 차이가 날 수



있고 A. a 균주는 여러 다른 공통 항원을 가져 공통 항원 균주와 연관된 혈청형이 나타날 수도 있기 때문에 혈청형을 기준으로한 질환 심도의 판정보다는 유전자형과의 관계가 더 자세한 정보를 제공해 주리라 생각된다. 유전자형 B, D와 E가 조직 파괴가 많을수록 증가하고, 그중 B와 E가 많을수록 뚜렷이 증가하는 양상을 보이는데, 특히 아직 연구가 되지 않은 질환에 따른 D와 E에 대한 빈도 연구가 더 이루어져야 한다고 생각된다. A. a의 구강내 선택적인 집락화와 연관된 요소의 결정은 이들 세균의 예방과 심화를 막는데 유용하리라 생각된다. 따라서 구강내 감염되는 유전자형 subset 연구에 더 많은 노력이 필요하리라 생각되며, 이 연구에서는 Saarelae등에 의해 첨가된 혈청형 d와 e를 첨가시켜 5개로 세분화하여 표준 균주를 사용하였으나, 실제 미결정형이 아직 남아있으며 이에 대한 더 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

## V. 결 론

혈청형과 치주질환의 심도에 따른 연관성을 기존 연구들과 비교하고, 유전자형과 질환의 심도와의 관계를 고찰한 본 연구에서 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 대상 환자를 기준으로 볼때 대응분석 결과, 유전자형(A와 C), (NT), (B, D, E)가 치주질환의 심도에 따른 분류군 I군, II군, III군과 각각 I & II군, III군과 관계가 있었다.  $X^2$  검정 결과 혈청형과 유전자형 모두 각 군간에 유의성 있는 차이를 보였다 ( $p < 0.005$ ).
2. 혈청형 b와 유전자형 b& E가 가장 깊은 치주낭 깊이와 많은 부착소실을 보이는 부위와 관련이 있었다.
3. 대상 부위의 부착수준을 기준으로 볼때 대응분석 결과, 유전자형 A는 경미한 부착소실 군에서, C는 중증도의 부착소실 군에서, B, D, E, NT는 심한 부착소실을 보이는 군에서 빈번하게 나타났다. 혈청형 a와 c는 경미한 부착소실 군과 중증도 부착소실 군

에서, b와 nd는 심한 부착소실 군에서 빈번하게 나타났다.  $X^2$  검정 결과 혈청형과 유전자형 모두 각 군간에 유의성 있는 차이를 보였다( $p < 0.01$ ).

4. 치주질환의 심도와 이후 질환 진행에 대한 예견지표로서의 판정기준을 설정할 때 혈청정보보다는 유전자형을 기준으로 판별하는 것이 더 자세한 정보를 제공해 준다고 생각된다.

## 참고문헌

1. Socransky, S. : Relationship of Bacteria to Etiology of Periodontal Disease. J. Dent. RE-s., 49 : 203, 1970.
2. Socransky, S. S. : Microbiology of Periodontal Disease : Present Status and Future Consideration. J. Periodontol., 48 : 497, 1977.
3. slots, J. and Genco, R. J. : Black Pigmented and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Human Periodontal Disease : Virulence Factor in Colonization, Survival and Tissue Destruction. J. Dent. Res., 63 : 411, 1984.
4. Koga, K., Nishihara, Y. & Amano, K. : Chemical and Biological Properties of Cell-Surface Components of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* : Periodontal Disease. Pathogens & Host Immune Response : 177, 1991.
5. Slots, J. : Bacterial Specificity in Adult Periodontitis : A Summary of Recent Work. J. Clin. Periodont., 13 : 912, 1986.
6. Preus, H. R. : Treatment of Rapidly Destructive Periodontitis in Pappillon-Lefevre Syndrom : Laboratory and Clinical Observation. J. Clin. Periodontol., 15 : 639, 1988.
7. Tanner, A. C., Haffer, C. & Bratthall, G. T. : A Study of Bacteria Associated With Advancing Periodontitis in Man. J. Clin.

- Periodontol., 6 : 278, 1979.
8. Slots, J., Reynolds, H. S. & Genco, R. J. : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Human Periodontal Disease : Cross-Sectional Microbiological Investigation. *Infect. & Immun.*, 29 : 1013, 1980.
  9. Alaluusua, S. & Asikainen, S. : Detection and distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in The Primary Dentition. *J. Perionotol.*, 59 : 504, 1988.
  10. Zambon, J. J. : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Human Periodontal Disease. *J. Clin. Periodontl.*, 12 : 1, 1985.
  11. Zambon, J. J., Christersson, L. A. & Slots, J. : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Human Periodontal Disease : Prevalence in Patient Groups and Distribution of Biotypes and Serotypes Within Families. *J. Periodontol.*, 54 : 707, 1983.
  12. Zambon, J. J. Slots, J. & Genco, R. J. : Studies of Leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Using the Preomycelocytic HL-60 Cell Line. *Infect. & Immun.*, 41 : 205, 1983.
  13. Zambon, J. J. Slots, J. & Genco, R. J. : Serology of Oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and Serotype Destribution in Human Periodontal Disease. *Infect. & Immun.*, 41 : 19, 1983.
  14. Saarela, M., Asikainen, S., Alaluusua, S. : Frequency and Stability of Mono-or Poly-Infection by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Serotypes a, b, c, d, c. *Oral Microbiol. Immunol.*, 7 : 277, 1992.
  15. Oppenheim, K. & Shneyour, M. : Enhancement of DNA Synthesis and cAMP Content of Mouse Thymocytes by Mediators Derived from Adherent Cell. *J. Immunol.*, 116 : 1466, 1976.
  16. Asikainen, S., Lai, C-H. & Alaluusua, s. : Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Serotypes in Periodontal Health and Disease. *Oral Microbiol. Immunol.*, 6 : 115, 1991.
  17. Ebersole, J. L. & Sandobal, S. : Serum Antibody in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Infected Patients With periodontal Disease. *Infect. & Immun.*, 59 : 1975, 1991.
  18. Song, E-J. Son, S. & Chung, C-P. : Serology and Ultrastructure of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* SNUDC Strains Isolated from LJP. *J. Koreasn Avad. periodntol.*, 14 : 87, 1984.
  19. Chung, H-J., chung, C-P. & son, S-H. : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Serotypes and Leukotoxicity in Korean LJP. *J. Periodontol.*, 60 : 506, 1989.
  20. mcArthur, W. P., Tsai, C., Baehni, P. E. & Genco, R. J. : Leukotoxic Effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Modulation by Serum Components. *J. Periodntol. Res.*, 16 : 159, 1981.
  21. Williams, S. & Ebersole, J. L. : Assessment of Serum Antibody pattern and Analysis of Subgingival Microflora of Members of A Family With A High Prevalence of Early-Onset periodontitis. *Infect. & Immun.*, 49 : 742, 1985.
  22. Zambon, J. J. & Slots, J. : Purification and Characterization of Serotype c Antigen from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. & Immun.*, 44 : 22, 1984.
  23. Zambon, J. J. Sunday, G. J. & Smutko, J. S. : Molecular Genetic Analysis of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Epidemiology. *J. Periodontol.*, 61 : 75, 1990.
  24. DiRienzo, J. M. & Comell, S. : Probe-Specific DNA Fingerprinting Applied to The Epidemiology of LJP. *Oral Microbiol. Immunol.*, 5 : 49, 1990.
  25. Genco, R. J. & Loss, S. : The Use of Genomic DNA Fingerprinting in Studies of The Epidemiology of Bacteria in Periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, 18 : 390, 1991.

26. Syed, S. A. & Loesche, W. J. : Survival of Human Dental Plaque Flora in Various Transport Media. *Appl. Microbiol.*, : 638, 1972.
27. Slots, J. : Selective Medium for The Isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Clin. Microbiol.*, 15 : 606, 1982.
28. Van Steenberghe, T. J. M. : Comparison of Two selective Media from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* *J. Clin. Microbiol.*, 24 : 636, 1986.
29. Di Rienzo, J. M., Slots, J. & Sixou, S. : Specific Genetic Variants of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Correlate With Disease and Health in A Regional Population of families with LJP. *Infect. & Immun.*, 62 : 3058, 1994.
30. Hanahan, S. : Studies on Transformation of *Escherichia coli* With Plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166 : 557, 1983.
31. Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. : *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor, New York, 1989.
32. Tsai, S. & Taichman, K. : Dynamics of Infection by Leukotoxic Strains of *A. a.* in Juvenile Periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, 13 : 330, 1986.
33. Ohgi, S. & Kamoi, K. : *A. a.* in Humans Subgingival Plaque and Distribution of Serotype. *J. Japan Assoc. Periodontol.*, 32 : 450, 1990.
34. Ebersole, J. L., Frey, D. E., Taubman, M. A. & Smith, D. J. : Antibody Response Patterns An Infection in Periodontal Disease. *J. Dent. Res.*, 63 : 177, 1984.
35. Ebersole, J. L., Taubman, M. A., Frey, D. E., Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. : Human Serum Antibody Responses to Oral Microorganisms(IV). *Oral Microbiol. Immunol.*, 2 : 53, 1987.
36. Ebersole, J. L., Cappelli, D. & Sandoval, M-N. : Subgingival Distribution of *A. a.* in Periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, 21 : 65, 1994.
37. Asikainen, S., Saarela, M., Alaluusua, S. : Infection by *A. a.* Serotypes a, b, c, d or e. *J. Dent. Res.*, 71 : 884, 1992.

## THE RELATIONSHIP BETWEEN PERIODONTAL DISEASE SEVERITY AND *Actinobacillus actinomycetemcomitans* SEROTYPE & GENOTYPE DISTRIBUTION

Eun-Gyoung Kim, Sung-Jo Kim, Jeom-Il Choi

*Dept. of Periodontology, College of Dentistry, Pusan National University.*

The present study was performed to evaluate the relationship between the serotype or the genotype of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. a.*) and the severity of periodontal disease. Total 64 *A. a.* clinical isolates were sampled from 46 sites of 20 subjects classified into the group I (1 periodontally healthy subject, 2 gingivitis patients, 5 early adult periodontitis patients), group II (3 moderately adult periodontitis patients) and group III (1 advanced adult periodontitis patient, 8 RPP patients). Southern blot hybridization (fingerprinting) patterns of the five reference strains, *A. a.* strain ATCC 29523 (serotype a), ATCC 29522 (Serotype b), ATCC 43719 (serotype c), IDH 781 (serotype d) and IDH 1705 (serotype e), were used as the five basic genotypic patterns (A, B, C, D, E). NT type was designated as one which did not represent any of those five basic types. The serotypes were determined by ELISA technique with the serum samples from pre-immunized rabbit.

Based on subject-based analysis, it was noted that genotypes A and C, NT, and B, D, E were significantly related to the disease groups I, II, and III, respectively. It was also noted that both the serotypes a and c were significantly related to the disease group I and II, while serotypes were significantly related to group III, and serotypes b and d were frequently found in sites with severe attachment loss (LA > 6mm).

The results indicated that the significant relationship can be delineated between the genotypes and the serotypes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and the periodontal disease severity. The results also indicated that genotyping can provide more detailed information on its relationship with the disease severity based on both the patient-based and the site-based analyses.