

치근단 병소가 있는 환자에서 *Porphyromonas endodontalis* 항원에 대한 혈청 특이 항체의 면역 반응 연구

서울대학교 치과대학 치과보존학교실
김재희 · 윤수한

목 차

- I. 서론
- II. 실험재료 및 방법
- III. 실험 결과
- IV. 총괄 및 고안
- V. 결론
- 참고문헌
- 사진부도 및 설명
- 영문초록

I. 서 론

치수 및 치근단 질환의 발병과 진행에 있어서 미생물의 역할은 점차 중요시 되어왔으며^{1,2,3,4)}, 특히 혐기성 세균의 배양기술이 발달함에 따라 혐기성 세균의 비중이 증대되고 있다^{5,6)}.

이들 세균이 일으키는 면역 반응에 관한 연구가 진행되어 치수 및 치근단 병소에서 면역세포와 면역글로블린의 존재가 확인되었으며^{7,8)}, 이것은 치근단 병소내에 국소적으로 세포성 면역 반응과 체액성 면역 반응이 일어난다는 것을 시사해 준다. 또한 세균에 대한 전신적 면역 반응에 관한 연구 결과 급성 치근단 농양 환자의 혈청내에 혐기성 세균에 대한 IgG, IgM 수준이 치근단 농양이 없는 환자에 비해 높게 나타났다는 보고 있으며^{9,10)}, 다른 연구에서는 치수 및 치근단 병소가 있는 환자들에서 혐기성 세균에 대한 특정 항체가 형성되는 것이 보였으나 전체

혈청 항체 수준은 별 차이가 없었다는 보고도 있다^{11,12,13)}. 이들 연구에서 볼때 치근단 질환이 존재시 국소적 면역 반응과 전신적 면역 반응이 일어남은 확실시 되었으나 이들 연구는 대개 항체 역가를 조사하는 실험으로 세균의 각 성분에 대한 면역 반응 연구는 미흡하다.

혐기성 세균 중 Black-pigmented anaerobic rod는 감염근관에서 많이 검출되었으며^{14,15,16)}, 특히 타진 반응, 동통, 부종, 삼출액 등의 증상이 있는 경우에 더 많이 검출되었다¹⁷⁾. Black-pigmented anaerobic rod중에서 *Bacteroides melaninogenicus*의 두 strain인 *B. gingivalis*와 *B. asaccharolyticus*를 연구하던 중에 DNA homology와 enzyme test에서 다른 성질을 지닌 균을 발견하여 *Bacteroides endodontalis*라 명명하게 되었다¹⁸⁾. 최근에 이 세가지 asaccharolytic black pigmented anaerobic rod를 *Porphyromonas*로 명명하였으며¹⁹⁾ 이들 중 구강내 감염에서 주로 나타나는 것은 *P. gingivalis*와 *P. endodontalis*로 감염근관과 치주낭에서 발견되었다. 특히 *P. endodontalis*는 감염근관과²⁰⁾ 치근단 병소에서 검출되었으며^{21,22,23,24)} 타진 반응이나 악취등의 임상증상과 연관되어 나타났다²⁵⁾. 또한 다른 구강내 감염이나 구강의 감염에는 관여하지 않는다고 알려졌으나 감염근관이 없는 사람의 구강 상피나 치주낭에서도 소량 검출되었다는 보고가 있다²⁶⁾. *P. endodontalis*는 그람 음성의 절대 혐기성 간균으로²⁷⁾ 혈액 한천 배지상에 Black-pigmented colony를 형성하며 다른 Black-pigmented

* 본 연구는 1993년도 서울대학교병원 임상연구비에 의해서 이루어진 것임.

anaerobic rod보다 대기중의 산소에 더 민감하다²⁶⁾. *P. endodontalis*의 독성은 *P. gingivalis*보다는 낮으나 백서에 피하 주사시 염증의 확산이 나타나며²⁸⁾, strain에 따라 독성이 다르게 나타나리라 생각되지만 아직 확실히 알려지지 않았다²⁹⁾. *P. endodontalis*의 virulence factor는 outer membrane을 지닌 capsule에 있으며 혈청학적 연구 결과 capsule membrane의 차이로 3가지 serotype이 존재하며³⁰⁾, membrane에는 3개의 major protein과 다수의 minor protein이 존재한다고 밝혀졌다³¹⁾. 그러나 이들 protein중 어느 것이 독성 발현과 면역 반응에 주된 역할을 하는지에 관한 연구는 아직 미흡하다.

세균의 각 세포막 성분에 대한 면역 반응을 연구하여 주된 면역 반응을 일으키는 성분을 찾고 면역 반응을 평가하는 것은 질병의 발생과 진행을 이해하는데 도움을 줄 것이다³⁰⁾. 이에 저자는 감염 근관에서 다수로 나타나는 *Porphyromonas gingivalis*와 *Porphyromonas endodontalis*의 세포막 단백질과 면역 반응 양상을 비교 연구하고 이것을 토대로 치근단 병소가 있는 환자의 혈청 항체와 *Porphyromonas endodontalis* 항원의 면역 반응 양상을 연구하여 그 결과를 보고하는 바이다.

I. 실험재료 및 방법

1. 실험 세균의 배양

본 실험에 사용한 세균은 *Porphyromonas endodontalis*(ATCC 35406), *Porphyromonas gingivalis* serotype a(381), serotype b(W50), serotype c(A7A1-28)로서 균주들을 각각 5% 가토 혈액, 5µg/ml의 he-

min과 0.5µg/ml vitamin K₁이 포함된 한천배지에 접종하여 37°C 혐기성 세균 배양기에서 5~7일간 배양하여 순수분리한 후 균집락을 취하여 이를 가토 혈액 및 5µg/ml hemin과 vitamin K₁이 첨가된 Brain Heart Infusion(BHI) broth(Difco, Michigan, U. S. A.)에 접종하고 37°C의 혐기성 조건하에서 48-72 시간 배양하였다. 균주는 16,000xg, 4°C에서 15분간 원심분리하여 사용시까지 -20°C에서 보관하였다.

2. 환자 혈청의 수집

전신 질환이 없으며 치수가 피사되고 치근단 병변이 존재하는 환자 8명의 정맥혈을 채취하여 응고된 후 2500rpm으로 10분간 원심분리하여 혈청을 수집하고 사용시까지 -20°C에서 보관하였다(표 1). 대조군으로는 치근단 병소나 근관치료를 받은 경험이 없고 건강한 치주조직을 가진 서울대학교 치과대학 학생 2명의 정맥혈을 채취하여 위와 같은 방법으로 혈청을 분리하여 사용시까지 -20°C에서 보관하였다.

3. 가토 항혈청의 생산

4가지 균주를 각각 PBS(pH7.3)로 세척하고 0.5% formalin용액에 16-24시간 넣어 고정시킨 후 다시 PBS로 세척하였다. 균주에 대한 항체를 얻기 위하여, 각 균주를 10mg/ml(wet weight)되도록 PBS로 희석하고 균주별로 체중 2.5-3kg내외의 가토 2마리의 귀정맥에 균주용액을 0.3ml 부터 0.3ml씩 격일로 용액을 증가시키며 한마리당 10번씩(0.3ml, 0.3ml, 0.6ml, 0.6ml, 0.9ml, 0.9ml, 1.2ml, 1.2ml, 1.5ml, 1.5ml) 주사한 다음, 일주일 후에 3일간 연속적으로 1.5ml씩 booster 주사하였다. 적정 항체역가를 측정하기 위

Table 1. Clinical features of patients

	1	2	3	4	5	6	7	8
Age / Sex	25 / M	26 / M	45 / M	26 / M	23 / M	20 / M	36 / F	53 / M
Pain	-	+	+	+	+	-	+	-
Swelling	-	-	-	-	+	-	-	-
Sinus	+	-	-	-	-	-	-	-
Foul odor	-	+	+	-	+	+	-	-
Periapical radiolucency	+	+	+	+	+	+	+	+
Percussion	+	+	+	+	+	+	+	+
Exudate	+	-	+	-	-	+	-	-

하여, 가토의 central ear artery에서 혈액을 채취하여 간접면역형광법을 실시하였고, 적정 항체 역가가 나온 가토는 충분한 양의 혈청을 얻고자 심장천공법(intracardiac puncture)으로 채취한 혈액을 원심분리하여 혈청을 얻은 후 -70°C의 deep freezer에서 사용시까지 냉동보관하였다.

4. 항 혈청의 검정

간접면역형광법을 실시하기 위하여, 각 균주를 0.5% formalin으로 고정하고 PBS 세번 세척한 후에 spectrophotometer(Bausch & Lomb spectronic 21 U. V. D. Rochester, N. Y., U. S. A.)를 이용하여 650 nm에 0.150. D.로 표준화시켜 희석하였다. 희석한 각 균주용액을 20μl씩 각기 다른 받침유리 위에 떨어뜨린 후 공기중에서 건조시켜 열처리로 고정하고 -20°C에서 보관하였다.

항혈청 용액을 PBS에 4% bovine serum albumin을 넣은 용액으로 check-board 역가측정법에 의해 배수 희석하여 사용하였다. 4종류의 균주위에 희석한 항 *P. endodontalis* 혈청을 20μl씩 떨어뜨린 후 30분간 습실내에서 반응시켜 PBS로 세척하고 fluorescein isothiocyanate(Isomer I. B. B. L., Microbiology systems, U. S. A.)로 conjugate된 goat anti-rabbit IgG(Meloy Laboratories, Inc., Springfield, Va., U. S. A.)를 각각 1:50 및 1:100으로 희석하여 20μl씩 slide상에 떨어뜨려 37°C에서 30분간 반응시킨 후 다시 세척하고 90% glycerol로 고정하여 형광현미경하에서 관찰하였다. 동일한 방법으로 4종류의 균주에 항 *P. gingivalis* serotype a와 b, c의 항체를 반응시켜 관찰하였다. 이때 사용된 현미경은 Olympus fluorescence microscope BH-2 RFL(Olympus optical Co., LTD., Tokyo, Japan)이고 Exciter filter는 UG-1, Dichroic mirror는 DM-400+1-420, Additional barrier filter는 L-435, light source는 HBO 200 수은등이며, 형광염색에 의한 판정등급은 다음과 같은 기준에 의해 0부터 4+까지 나누어서 검정하였다.

- 0 : no fluorescence
- 1+ : bare fluorescence with single cells not distinguishable
- 2+ : faint fluorescence with single cells visible no definite of cell shape

- 3+ : moderate fluorescence with good envelope definition and dark cell center
- 4+ : brilliant fluorescence with good cell envelope definition and a dark cell center

5. 항원의 추출

각 균주의 whole bacteria cell 100mg을 각각 15 ml의 인산완충용액에 넣어 세균의 95% 이상이 파괴되었는지를 위상차 현미경으로 확인하면서 냉각상태에서 초음파 파절(ultrasonic dismembrator, Fisher Scientific Co., PA., U. S. A.)시켰다. 세균파절 용액은 12,000xg, 4°C에서 40분간 원심분리하여 상층액을 취하여 증류수로 투석하고 냉동건조시켰다. 세균파절 용액은 Lowry등의 방법에 의하여, 단백질 정량이 3mg/ml 되게 한 후, -20°C에서 사용시까지 보관하였다.

6. *Porphyromonas gingivalis*와 *Porphyromonas endodontalis*의 항원 단백질

(1) Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis법

Laemmli 방법을 변형한 Laemmli discontinuous buffer system으로 vertical slab gel을 이용하여 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)법을 시행하였다. 각각의 표준균주 용액 15μg을 0.01M trishydrochloride 완충용액(pH 8.0, 1% SDS, 0.001M EDTA, 4% glycerol 및 5% β-mercaptoethanol)으로 4배 희석(2mg/ml)하고 10°C 항온수조에서 5분간 가열한 후 즉시 냉각하였다. 가열처리한 세균용액 20μl를 4% stacking gel과 12% separating gel 상에 분획하였으며, 분획시 전기영동완충액으로 0.1% SDS가 첨가된 tris-glycine(pH 8.3)용액을 사용하여 150V, 25mA하전하에서 2시간동안 시행하였다.

전기영동시 high molecular weight marker로는 ovalbumin(42,399d), bovine serum albumin(66,200 d), phosphorylase B(97,400d), β-galactosidase(116,250d), myosin(200,000d)을 사용하였으며, low molecular weight marker로는 bovine albumin(66,000 d), albumin egg(45,000d), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(36,000d), carbonic anhydrase(29,000d), trypsinogen(24,000d), trypsin inhibitor

(20,100d), α -lactalbumin(14,200d)을 사용하였다. 전기영동한 gel은 고정액(Methanol 400ml, acetic acid 60ml, 증류수 530ml)으로 처리후 탈이온 증류수로 3회 세척하고 염색을 시행하였다.

(2) Coomassie brilliant blue stain

전기영동 후 고정시킨 gel을 Coomassie blue 염색액(0.1% Coomassie brilliant blue, 30% methanol, 10% acetic acid)에 충분한 시간 넣어둔 후, destaining용액(methanol 25ml, acetic acid 10ml, 증류수 65ml)으로 처리하였다. 이때 destaining용액은 확실한 band가 나타날 때까지 여러번 교환하였다.

(3) Silver stain

전기영동된 gel은 즉시 20% trichloroacetic acid 정착용액에 넣어서 정착용액을 20분간격으로 세번 교환해주고 증류수로 10분간격으로 세번 세척한 후 silver equilibration 용액에 넣고 30분간 가볍게 흔들어 반응시킨 후 증류수로 10~20초간 세척하였다. developer 용액(sodium carbonate, 증류수, formaldehyde)을 gel에 붓고 진한 band가 나타날 때까지 주의해서 관찰하였다. Developer 용액을 버리고 즉시 stop용액(1% acetic acid)을 붓고 5분간 놓아둔 후, 300ml 증류수로 10분 간격으로 3번 세척하였다. 그 후 gel을 reducer용액(potassium ferricyanide 2.0ml, sodium thiosulfate 4.0ml, sodium carbonate 0.7ml, 증류수 300ml)에 10~30초간 놓아둔 후 reducer용액을 제거하고 증류수로 10분 간격으로 3회 세척하였다.

7. *Porphyromonas endodontalis* 항원에 대한 특이 항체의 면역반응(Immunoblotting법)

1) 가토 항혈청과의 반응

Laemmli discontinuous buffer system으로 SDS-PAGE법을 시행한 후 각 균주의 분리된 항원 단백질을 0.7A-2A에서 2시간동안 nitrocellulose sheet(0.045 μ m poresize)에 옮겼다. non-specific binding을 block 시키기 위해 blocking용액(1% BSA, 0.05% Tween20 in tris buffered saline)에서 반응시킨 sheet에 고도로 면역된 가토의 항 *P. endodontalis* 혈청을 1:800으로 희석하여 반응시키고, 같은 방법으로 각 균주의 항원 단백질에 각각의 항혈청을 반응시켰다. 반응시킨 strip을 Tris-buffered saline (TBS: 50mM Tris, 150mM NaCl, pH 8.5) contain-

ing 0.05% Tween 20으로 세번 세척하고 goat anti-rabbit IgG conjugated with horseradish peroxidase를 TBST에 1:1000으로 희석하여 반응시킨 후 다시 세척하였다. substrate(diaminobenzidine 1 mg/ml, 0.1M tris HCl, 0.03% H₂O₂, pH. 7.6)를 첨가하여 3-5분간 반응시켜 반응띠가 발현된 후, methanol과 acetic acid와 증류수가 5:1:5로 혼합된 용액으로 세척하여 관찰하였다. 동일한 방법으로 nitrocellulose sheet상에 각 균주의 항원 단백질을 옮긴 후 항 *P. endodontalis* 혈청과 반응시키고 동일방법으로 발색시켜 관찰하였다.

2) 환자 혈청과의 반응

위와 동일한 방법으로 nitrocellulose sheet에 *P. endodontalis*의 항원 단백질을 옮긴 후 blocking된 sheet를 0.5mm 넓이의 strip으로 만들어 환자와 대학생으로부터 얻은 혈청을 1:50으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시킨 다음 goat anti-human IgG conjugated with horseradish peroxidase로 반응시키고 동일한 방법으로 발색시켜 관찰하였다.

III. 실험 결과

1. 간접면역형광법

항 *P. endodontalis* 혈청은 *P. endodontalis* 균주에 대해서 4+의 양성반응을 보인 반면 *P. gingivalis*의 serotype a, b, c에 대해서는 양성반응을 보이지 않았고 항 *P. gingivalis* serotype a와 b, c의 혈청도 *P. endodontalis*와 양성반응을 보이지 않았다(표 2).

2. *Porphyromonas gingivalis*와 *Porphyromonas endodontalis*의 항원 단백질(Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis법)

P. endodontalis, *P. gingivalis* serotype a, b, c 균주를 초음파 파절로 추출하여 SDS-PAGE법을 시행한 후, coomassie brilliant blue 염색을 시행한 결과, *P. endodontalis*(ATCC 35406)균주는 특이하게 58kd, 43kd, 34kd에서 짙은 band가 나타났으며 70-100kd와 45-58kd 사이에서도 여러 개의 band가 나타났다. *P. gingivalis* 381(serotype a)은 68kd와 43kd에서 짙은 band가 나타났고 *P. gingivalis* W50(serotype b)은 110kd, 95kd, 59kd에서 *P. gingivalis* A7A1-28(serotype c)은 67kd, 59kd, 46kd, 43kd에서 band가 나

Table 2. Indirect immunofluorescence

Antibody	Antigen	<i>P. endodontalis</i> 35406	<i>P. gingivalis</i> serotype a	<i>P. gingivalis</i> serotype b	<i>P. gingivalis</i> serotype c
<i>P. endodontalis</i> 35406		++	-	-	-
<i>P. gingivalis</i> serotype a		-	++	+	-
<i>P. gingivalis</i> serotype b		-	+	++	+
<i>P. gingivalis</i> serotype c		-	-	+	++

Table 3. Immunoblot of *P. endodontalis* reacting with rabbit antisera and human sera

Mol. size of band (kd)	Rabbit	Control		Patients							
		1	2	1	2	3	4	5	6	7	8
100-70	++	+	+	+	+	++	+	++	+	++	+
58	++								+	+	++
47	+	+									
43	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40	+		+	+	+				+	+	
38	+		+	+				+	+	+	+
34				+	+		+	+	+		+
30	+								+		+
28	+			+		+	+		+	+	+
24	+						+				
21	+					+	+				

타났다.(그림 1)

Silver nitrate 염색을 한 결과, *P. endodontalis* 에서 coomassie brilliant blue 염색에 나타난 것 외에 31kd, 28kd, 24kd 등의 band가 더 관찰되었다.(그림 2)

3. Immunoblotting법에 의한 *Porphyomonas endodontalis* 항원에 대한 혈청 특이 항체의 면역 반응

(1) 가토 항혈청과의 반응

SDS-PAGE법을 시행한 후 고도의 면역된 가토의 항혈청과 반응시킨 결과 *P. endodontalis*(ATCC 35406)항원과 항혈청의 반응은 58kd와 43kd, 38kd, 28

kd, 21kd에서 짙은 band가 나타났으며 70-100kd 사이에 여러 개의 band가 나타났고 200kd 부근에서도 band가 나타났다. *P. gingivalis* 381(serotype a)항원과 항혈청의 반응은 68kd와 43kd에서 짙은 band가 나타났으며 *P. gingivalis* W50(serotype b)항원과 항혈청의 반응은 110kd, 95kd, 81kd, 55kd, 41kd에서 짙은 band가 나타났다. *P. gingivalis* A7A1-28(serotype c)항원과 항혈청의 반응은 78kd, 57kd, 45kd에서 짙은 band가 나타났다(그림 3).

4가지 균주에 항 *P. endodontalis* 혈청을 반응시킨 결과 *P. endodontalis*균주의 항원과만 반응하여 band가 나타났으며 다른 균주와의 반응은 나타나지 않았다(그림 4).

(2) 환자 혈청과의 반응

P. endodontalis 항원에 immunoblot 시킨 결과 환자와 대조군 모두에서 200kd 부근에 band가 나타났으며 43kd와 70-100kd 사이에 다수의 band가 공통적으로 나타났다. 대조군 1에서는 47kd에서, 대조군 2에서는 40kd에서 band가 나타났다. 환자 1은 43kd와 40kd, 38kd, 34kd, 20kd에서 band가 나타났고 환자 2는 43kd외에 40kd와 34kd에서도 band가 나타났다. 환자 3은 43kd와 28kd, 21kd에서 band가 나타났고 70-100kd 사이에도 여러개의 진한 band가 나타났다. 환자 4는 43kd외에 34kd, 28kd, 24kd, 21kd에서 band가 나타났으며 환자 5는 43kd와 70-100kd 사이에 여러개의 진한 band와 43kd, 38kd, 34kd, 28kd에서 band가 나타났다. 환자 6은 58kd, 43kd, 40kd, 38kd에서 진한 band가 나타났고 환자 7은 70-100kd 사이에 여러 개의 진한 band와 58kd, 43kd, 40kd, 38kd에서도 band가 나타났으며 환자 8은 58kd, 43kd, 38kd, 34kd, 28kd에서 band가 나타났다 (표 3, 그림 5).

IV. 총괄 및 고안

*Porphyromonas endodontalis*는 Black-pigmented anaerobic rod로 주로 감염 근관과 치근단 병소에서 검출된다. 1984년 Steenbergen과 Winkelhoff¹⁸⁾는 *B. gingivalis*와 *B. asaccharolyticus*를 연구하던 중에 DNA homology와 enzyme test에서 다른 성질을 지닌 균을 발견하여 *B. endodontalis*라 명명하였으며 후에 Haapasalo도 균의 존재를 확인한 바 있다. 그후 Winkelhoff²¹⁾는 치근단 농양에서 *P. endodontalis*를 검출하였고 Haapasalo²²⁾는 급성감염이 있는 환자에서 검출하였으며 Sundqvist²³⁾는 치근단 병소가 있는 환자에서 *P. intermedia*와 *P. endodontalis*가 가장 흔히 발견된다고 보고하였다.

여러 연구에서 *P. endodontalis*의 존재를 입증했지만 *P. endodontalis*는 대기중의 산소에 민감하여 배양이 어려우므로 치근단 병소에서 검출하지 못한 경우도 있다⁴⁾. 따라서 다른 면역학적 방법으로 균을 검출하려는 시도가 이루어져 Pantera³³⁾ 등은 간접면역형광법과 배양법으로 감염근관에서 *P. endodontalis*를 검출하는 방법을 비교 연구하였으며 그 결과 간접면역형광법으로 더 많은 균을 검출할 수 있었

다고 보고한 바 있다.

면역학적 방법으로 균을 검출하려는 시도는 *P. endodontalis*와 다른 black-pigmented anaerobic rod 사이의 공통항원 연구를 기초로 이루어졌다. Steenbergen¹⁸⁾ 등은 간접면역형광법으로 연구한 결과 *P. endodontalis*와 *P. gingivalis*, *P. asaccharolytica* 사이에 공통 항원이 존재하지 않는다고 하였으나, 후에 Winkelhoff²⁶⁾는 *P. endodontalis*와 *P. gingivalis* 사이에는 공통항원이 없으나 *P. endodontalis*와 *P. asaccharolytica* 사이에는 공통항원이 존재한다고 보고하였다. 이상의 연구 결과로 볼때 *P. endodontalis*와 *P. gingivalis* 사이에 공통항원이 존재하지 않는다는 사실은 일치하며 *P. endodontalis*와 *P. asaccharolytica* 사이에 공통항원의 존재여부는 논란이 있으나 *P. asaccharolytica*는 대부분 구강의 감염에서 나타나므로 본 연구에서는 고려하지 않았다. 간접면역형광법으로 관찰한 결과, *P. endodontalis*와 *P. gingivalis* 사이에 공통항원이 존재하지 않았으며 이것은 위 두 연구와 일치한다. 따라서 면역학적 방법을 이용하여 임상적으로 *P. endodontalis*를 검출하는 방법을 시도해 볼 수 있을 것으로 사료된다.

*Porphyromonas endodontalis*의 세포막 단백질과 면역 반응 양상에 관한 연구는 Herweijer와 Ogawa, Hanazawa 등에 의해 이루어 졌으며, Herweijer²⁹⁾는 SDS-PAGE로 *P. endodontalis* ATCC 35406, HG 181, HG 413의 세포막 단백질을 연구한 결과 3개의 major protein(59kd, 43kd, 41kd)이 존재하며 다수의 minor protein은 strain과 성장 환경에 따라 다르게 나타난다고 보고하였다. Herweijer는 이들 major protein의 양상은 다른 그람 음성 세균과는 다르므로 SDS-PAGE를 균감별의 수단으로 이용할 수 있을 것으로 보고하였다. 이것은 본 연구에서 *P. endodontalis*의 세포막 단백질은 *P. gingivalis*와 비교한 결과 단백질 양상이 다르게 나타난 것과 일치한다. Herweijer는 *P. gingivalis* 381에서 43kd의 단백질이 fimbriae의 구조인 fimbrellin으로 알려졌으므로³⁴⁾ *P. endodontalis*에서도 43kd의 단백질이 fimbriae의 monomer나 porin 구조의 subunit로 추측할 수 있다고 하였다²⁹⁾. 한편, Ogawa³⁶⁾ 등은 *P. endodontalis*(ATCC 35406)의 세포막 단백질(outer membrane protein-OMP)을 OMP-I과 OMP-II로 나누어 연구한 결과 OMP-I에는 31kd와 40.3, 51.4, 67, 71.6kd인 단백질이 존재하고,

OMP-II에는 14, 15.5, 27, 44kd인 단백질이 존재한다고 보고하였다. OMP-I은 porin 성질을 나타내며, 치근 낭중에 OMP-II에 대한 IgG를 형성하는 세포는 존재하지만, OMP-I이나 lipopolysaccharide에 대한 항체를 형성하는 세포는 존재하지 않는다고 보고하였다. 또한, Hanazawa³⁷⁾ 등은 *P. endodontalis*의 lipopolysaccharide(LPS)를 분리하고 여기에 대한 항체를 얻어 LPS가 *P. endodontalis*의 항원으로 작용한다고 밝혔으며 LPS를 이용한 Immunoslot blot 방법으로 치근단 병소 추출물에서 *P. endodontalis*의 반응을 연구한 결과 전형적인 'repetitive ladder' 양상이 나타나므로 LPS가 항원으로 작용한다고 보고하였다.

본 연구에서 사용한 Immunoblotting법은 radioimmunoassay법이나 enzyme-linked immunoabsorbant assay법과 달리 다양한 antigenic component를 전기영동법으로 분리하여 각 항원을 분석하고 각 antigenic component에 대한 항체의 반응을 분석할 수 있는 매우 sensitive한 방법이다. 또한 수백가지 항체에 동시에 혈청을 반응시킬 수 있으므로 임상적 응용가치가 높고, membrane에 단백질을 옮김으로써 단백질이 안정되고 고정되므로 gel 상에서 분석하기 어려운 소량의 단백질도 쉽게 분석할 수 있는 장점이 있다³⁵⁾.

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis로 *P. endodontalis*의 세포막 단백질을 연구한 결과 58kd, 43kd, 34kd에서 짙은 band가 나타났으며 약 20개의 가는 band가 나타났다. 또한, coomassie brillante blue 염색보다 silver nitrate 염색에서 더 많은 band가 관찰되었다. 이것은 coomassie brillante blue 염색은 단지 단백질 성분만 염색되는 반면 silver nitrate 염색에서는 lipopolysaccharide나 peptidoglycan, lipid도 염색되므로 더 많은 band가 관찰된 것으로 사료된다.

본 연구에서 고도로 면역된 가토의 항 혈청은 *P. endodontalis*의 antigenic determinant를 최대한으로 분석하기 위하여 사용하였다. 가토 항혈청과의 반응결과, 사람 혈청과의 반응에서 나타나는 band가 모두 나타나므로 가토 항혈청이 *P. endodontalis*의 항원 연구에 유용하다고 사료되며 대조군과 환자 모두 다양한 면역반응이 나타난 것은 개인마다 항원 수용기가 다르게 작용하기 때문이라 사료된다. 또한

대조군에서도 *P. endodontalis*에 대한 면역 반응이 나타났으므로 Winkelhoff등²⁰⁾이 보고한 대로 *P. endodontalis*가 치주낭이나 설면등의 구강 상피내 상주군으로 존재한다는 사실을 확인할 수 있었다. 또한, 고도로 면역된 가토의 항 *P. endodontalis* 혈청과 *P. endodontalis* 항원의 반응은 항 *P. gingivalis* 혈청과 *P. gingivalis* 항원의 반응과는 다른 양상을 보였으며, *P. gingivalis* 항원에 항 *P. endodontalis* 혈청을 반응시킨 결과 *P. gingivalis* 세균주는 모두 음성 반응을 보여 *P. endodontalis*와 *P. gingivalis* 사이에는 공통 항원이 없다는 사실도 알 수 있었다.

가토에서와 마찬가지로 사람에서도 *P. endodontalis*의 다수의 antigenic component에 항체가 결합한 양상을 보이므로 *P. endodontalis*에 대한 면역 반응은 단일 면역 반응이 아니고 여러개의 antigenic component가 복합적으로 작용한다는 것을 알 수 있었다. 대조군에 비해 환자에서만 나타나는 특별한 band를 찾을 수는 없었으나 환자군이 전체적으로 더 진한 band를 보였다. 이것은 더 많은 항체가 형성되어 더 강한 면역 반응을 일으킨 것이라 할 수 있겠다. 또한 환자군 중 일부에서는 대조군에 비해 43kd 이하의 낮은 분자량에서 더 많은 band가 관찰되었으며 일부 환자는 70-100kd 사이에서 여러개의 진한 band를 보였다. 따라서 이들 항원이 *P. endodontalis*의 독성 발현에 기여하리라 사료되지만, 환자마다 다른 반응 양상이 나타났으며 대조군과의 명확한 차이는 발견하기 어려웠으므로, 어떤 antigenic component가 작용하는지 명확히 밝힐 수 없었다. Kettering과 Byun등은 치근단 병소가 있는 환자의 혈청내에 혐기성 세균에 대한 IgG, IgM 수준이 병소가 없는 환자에 비해 높다고 보고했으나^{9, 10)} Keudell등은 혐기성 세균에 대한 특정 항체가 형성되는 것을 보였으나 전체 혈청항체 수준은 별 차이가 없다고 보고하였다^{11, 12, 13)}. 치근단 병소는 여러가지 세균이 복합적으로 작용하고 또한 구강내에서 국소적으로 일어나는 질환이므로, *P. endodontalis* 한가지 세균에 대한 전신 면역 반응상의 뚜렷한 변화를 찾는 것은 어려운 것으로 사료된다.

환자의 임상 증상과 면역 반응 양상의 비교를 시도했으나, 본 연구에서는 연관성을 찾기 어려웠으며 이 부분에 대해서도 더 많은 연구가 이루어져야 할 것이다. Hashioka²⁵⁾는 *P. endodontalis*가 타진 반응

이나 악취등의 임상 증상과 연관이 있다고 보고한 바 있다. 본 연구에서는 모든 환자에서 타진 반응이 있었으며 환자 2, 3, 5, 6에서 악취의 임상 증상이 있었으나 면역 반응 양상과 임상 증상 사이에 어떤 연관성을 찾기는 어려웠다. 다양한 임상 증상을 나타내는 더 많은 환자에 대해 Immunoblotting을 실시해 볼 필요가 있을 것이며, 치근단 병소는 여러균이 복합적으로 작용하므로 *P. endodontalis*외의 다른 혐기성 세균에 대해서도 Immunoblotting을 실시해 볼 필요가 있을 것으로 사료된다.

이상의 연구 결과로 *P. endodontalis*와 *P. gingivalis* 사이에 공통항원이 존재하지 않는다는 사실을 알 수 있었으며 *P. endodontalis*의 면역 반응에 각기 다른 antigenic determinant가 작용하고 치근단 병소가 있는 환자에서 더 다양한 반응이 나타나며 대조군에 비해 낮은 분자량의 단백질과 더 강한 반응이 나타난다는 것을 알 수 있었다. 그러나 이들 항원의 성분과 면역 반응에서의 역할을 규명하기 위해서는 좀 더 많은 연구가 이루어져야 할 것이며 *P. endodontalis*에 대한 전신적 면역외에도 치근단 병소에서 일어나는 국소적인 면역 반응 양상을 연구하거나 치료전과 치료후의 전신 면역 반응을 비교하는 것도 의미있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis법과 Immunoblotting법으로 *Porphyromonas gingivalis*와 *Porphyromonas endodontalis*의 세포막 단백질과 면역 반응 양상을 비교 연구하고 치근단 병소가 있는 환자의 혈청 항체와 *Porphyromonas endodontalis* 항원의 면역 반응 양상을 연구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. *Porphyromonas endodontalis*의 항원에는 다수의 antigenic component가 있으며 치근단 병소가 있는 환자와 병소가 없는 사람 모두에서 이에 대한 면역 반응이 나타났다.
2. 치근단 병소가 없는 사람과 치근단 병소가 있는 환자에 있어서 개인마다 면역 반응 양상에 차이를 보였으나 공통적으로 43kd의 단백질에서 반응이 나타났다.
3. 치근단 병소가 없는 사람에 비해 병소가 있는

환자에서 더 다양한 반응이 나타났으며 일부 환자에서는 낮은 분자량의 단백질에서 더 강한 반응이 나타났다.

4. 간접면역형광법과 Immunoblotting법으로 관찰한 결과 *Porphyromonas endodontalis*와 *Porphyromonas gingivalis*의 serotype a, b, c 사이에는 공통 항원이 없었다.

참고문헌

1. Kakehashi, S., Stanley H. R., Fitzgerald R. J. : The effects of surgical exposure of dental pulp in germ-free and conventional laboratory lab. Oral Surg. 20 : 340-349, 1965.
2. Zavistoski, J. et al : Quantitative bacteriology of endodontic infection. Oral Surg. 49 : 171-174, 1980.
3. Griffee, M. B. et al : The relationship of *Bacteroides melaninogenicus* to symptoms associated with pulpal necrosis. J. of Oral Surg. 50 : 457-461, 1980.
4. Fukushima, H. et al : Localization and identification of root canal bacteria in clinically asymptomatic periapical pathosis. J. Endo. 16 : 534-538, 1990.
5. Attebery, H. R. et al : An acute anaerobic infection following endodontic treatment. J. Endo. 6 : 793-795, 1980.
6. Kannagara, D. W. et al : Bacteriology and treatment of dental infections. Oral Surg. 50 : 103-109, 1980.
7. Kettering, J. D., Torabinejad, M. : Specificity of antibodies present in human periapical lesions. J. Endo. 17 : 213-216, 1991.
8. Chin-Lo, Hahn : Antibodies in normal and diseased pulp reactive with microorganisms isolated from deep caries. J. Endo. 18 : 28-31, 1992.
9. Kettering, J. D. : Concentration of immune complex IgG, IgM, IgE and C3 in patients with acute apical abscess. J. Endo. 10 : 417-421, 1984.

10. 변호영, 임성삼 : ELISA를 이용한 급성 치근단 농양 및 급성 치수염 환자에서의 혈청 항체 수준에 관한 실험적 연구. 대한치과보존학회지 16 : 236-244, 1991.
11. Keudell, K. et al : A review of microbial and immunologic aspects of endodontics. J. Oral Medicine. 36 : 39-43, 1981.
12. Keudell, K. et al : Humoral antibodies to anaerobic bacteria isolated from patients with pulpal-periapical disease. Oral Surg. 53 : 194-197, 1982.
13. Kettering, J. D. et al : Concentrations of immunoglobulin E in patients with chronic periapical lesions. J. Endo. 12 : 306-308, 1986.
14. Matusow, R. J. et al : Anaerobic isolates in primary pulpal-alveolar cellulitis cases : endodontic resolutions and drug therapy consideration. J. Endo. 9 : 535-543, 1983.
15. Yoshida, M. et al : Correlation between clinical symptom and microorganisms from root canal of teeth with periapical pathosis. J. Endo. 13 : 24-28, 1987.
16. van Winkelhoff et al : The role of black-pigmented Bacteroides in human oral infection. J. Clin. Periodontol. 15 : 145-155, 1988.
17. Sundqvist, G. et al : Bacterial study of necrotic pulps. Umea. Univ. Odontologic Dissertation No. 7 Umea Sweden, 1976.
18. van Steenberg, van Winkelhoff, D. Mayrand, D. Grenier, J. de Graaff : Bacteroides endodontalis sp. nov, and Asaccharolytic Black-pigmented Bacteroides species from infected dental root canals. Int. J. of Systematic Bact. 34 : 118-120, 1984.
19. H. N. Shah, M. D. Collins : Proposal for reclassification of Bacteroides asaccharolyticus, Bacteroides gingivalis, and Bacteroides endodontalis in a new Genus Porphyromonas. Int. J. of Systematic bact. 38 : 128-131, 1988.
20. Baumgartner, C. et al : Bacteria in the apical 5mm of infected root canals. J. Endo. 17 : 380-383, 1991.
21. van Winkelhoff et al : Bacteroides endodontalis and other Black-pigmented Bacteroides Species in odontogenic abscesses. Inf. & Immunity 49 : 494-497, 1985.
22. Haapasalo, M. et al : Black-pigmented bacteroides spp. in human apical periodontitis. Inf. & immunity 53 : 149-153, 1986.
23. Sundqvist, G. : Prevalence of black-pigmented bacteroides species in root canal infections. J. Endo. 15 : 13-19, 1989.
24. Sundqvist G. : Associations between microbial species in dental root canal infections. Oral Microbiol. Immunol. 7 : 257-262, 1992.
25. Hashioka, K. et al : The relationship between clinical symptoms and anaerobic bacteria from infected root canals. J. Endo. 18 : 558-561, 1992.
26. van Winkelhoff et al : Porphyromonas endodontalis : Its role in endodontal infection. J. Endo. 18 : 431-434, 1992.
27. Balows, A. et al : Manual of clinical microbiology. 5th ed. American society of microbiology. Washington D. C.
28. van Steenberg et al : Virulence of Black-pigmented Bacteroides strains from periodontal pockets and other sites in experimentally induced skin lesion in mice. J. periodontal res. 17 : 41-49, 1982.
29. Sundqvist, G. et al : Phagocytosis of Bacteroides melaninogenicus and Bacteroides gingivalis in vitro by human neutrophils. J. periodontal res. 17 : 113-121, 1982.
30. van Winkelhoff et al : Serological characterization of black-pigmented bacteroides endodontalis. Inf. & immunity 51 : 972-974, 1986.
31. Herweijer, J. A. et al : Characterization of total membrane proteins of Porphyromonas endodontalis. J. Endo. 18 : 620-624, 1992.
32. Reed, M. J. : Antigenic studies of oral and nonoral black-pigmented Bacteroides strains. Inf. & Immun. 39 : 565-574, 1980.
33. Pantera, E. A. et al : Indirect immunofluoresce-

- nce for the detection of bacteroides species in human dental pulp. *J. Endo.* 14 : 218–223, 1988.
34. Yoshimura, F. : Purification and characterization of a Novel type of fimbriae from the oral anaerobe *Bacteroides gingivalis*. *J. of Bact.* 160 : 949–957, 1984.
35. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. : Molecular cloning. CSHL press 2nd ed. 1989 U. S. A.
36. Ogawa, T. et al : Immunochemical and biological characterization of outer membrane proteins of *Porphyromonas endodontalis*. *Inf. & Immunity* 60 : 4528–4533, 1992.
37. Hanazawa, S. et al : Monoclonal antibody against *Porphyromonas (Bacteroides) endodontalis* lipopolysaccharide and application of the antibody for direct identification of the species. *J. of clinic. Microbiol.* 29 : 2550–2553, 1991.
38. Stott, D. I. : Immunoblotting and dot blotting. *J. of immunol. methods.* 119 : 157–187, 1989.

EXPLANATIONS of FIGURES

Figure 1. : SDS-PAGE patterns of sonicated whole cells of *Porphyromonas endodontalis* and *Porphyromonas gingivalis*(coomassie brilliant blue stain)

lane 1 : low molecular weight marker lane 4 : *P. gingivalis* 381
lane 2 : *P. endodontalis* ATCC 35406 lane 5 : *P. gingivalis* A7A1-28
lane 3 : *P. gingivalis* W50

Figure 2. : SDS-PAGE patterns of sonicated whole cells of *Porphyromonas endodontalis* and *Porphyromonas gingivalis*(silver nitrate stain)

lane 1 : low molecular weight marker lane 4 : *P. gingivalis* 381
lane 2 : *P. endodontalis* ATCC 35406 lane 5 : *P. gingivalis* A7A1-28
lane 3 : *P. gingivalis* W50

Figure 3. : Immunoblot analysis of *Porphyromonas endodontalis* and *Porphyromonas gingivalis* with rabbit antisera raised against the autologous antigen

lane 1 : *P. endodontalis* ATCC 35406 lane 3 : *P. gingivalis* W50
lane 2 : *P. gingivalis* 381 lane 4 : *P. gingivalis* A7A1-28

Figure 4. : Immunoblot analysis of *Porphyromonas endodontalis* and *Poryphyromonas gingivalis* with rabbit antisera against *Porphyromonas endodontalis*

lane 1 : *P. endodontalis* ATCC 35406 reacting with antisera against *P. endodontalis*
lane 2 : *P. gingivalis* 381 reacting with antisera against *P. endodontalis*
lane 3 : *P. gingivalis* W50 reacting with antisera against *P. endodontalis*
lane 4 : *P. gingivalis* A7A1-28 reacting with antisera against *P. endodontalis*

Figure 5. : Immunoblot analysis of *Porphyromonas endodontalis* with rabbit antisera and human sera

lane 1 : *P. endodontalis* ATCC35406 reacting with rabbit antisera
lane 2, 3 : *P. endodontalis* ATCC35406 reacting with sera of student
lane 4-11 : *P. endodontalis* ATCC35406 reacting with sera of patient

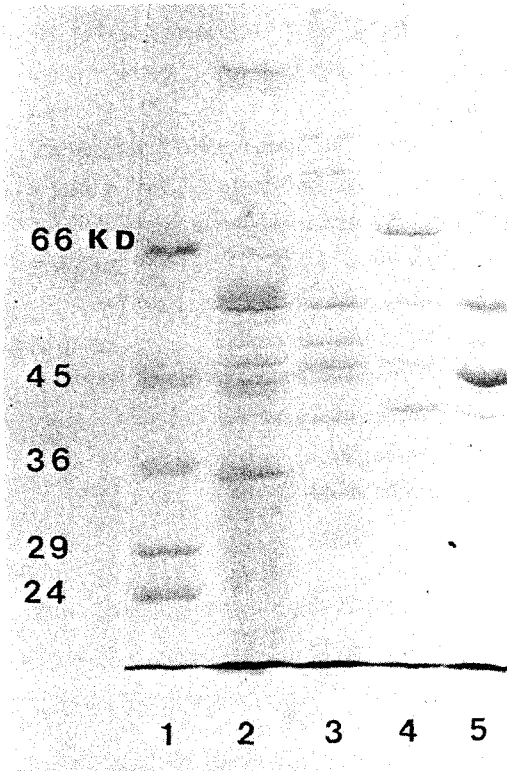


Fig. 1

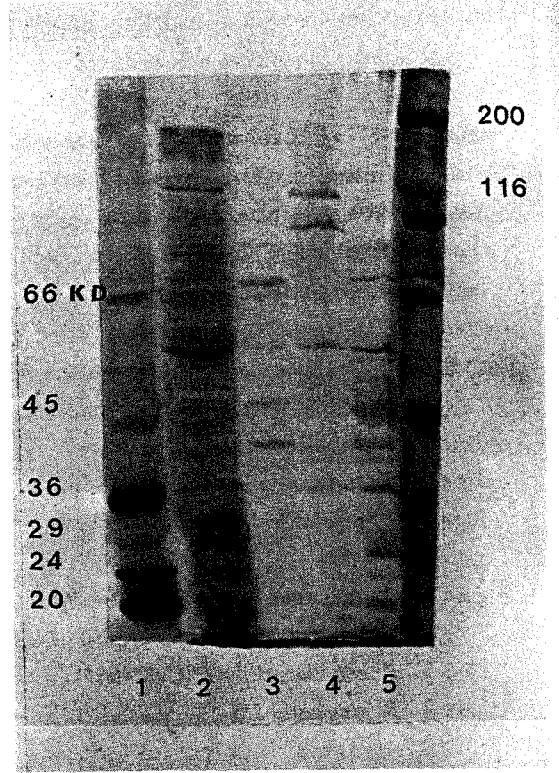


Fig. 2

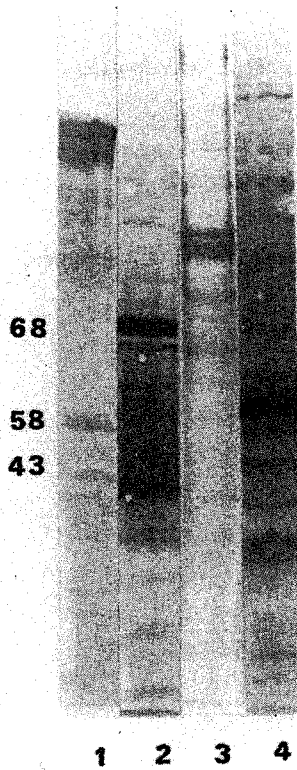


Fig. 3

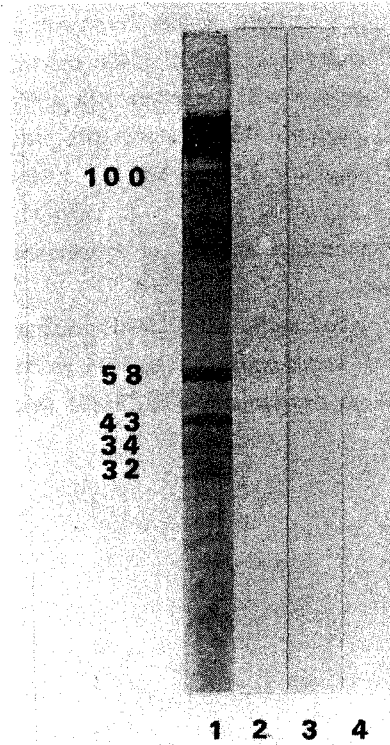


Fig. 4

논문사진부도

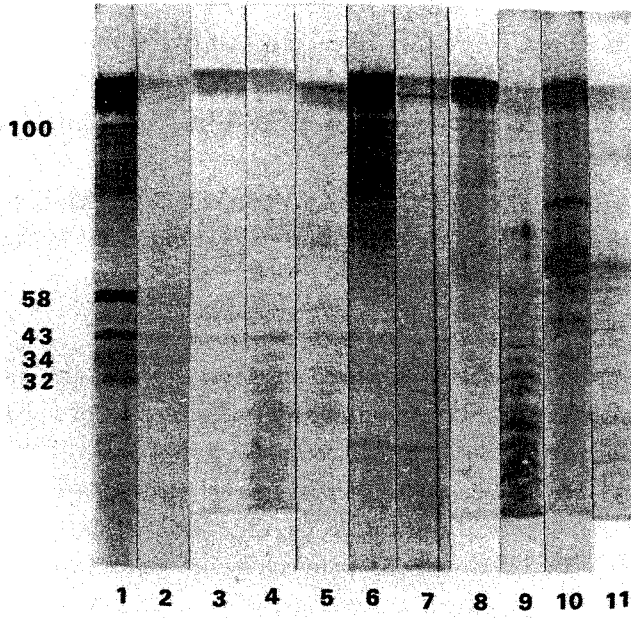


Fig. 5

IMMUNE REACTION OF SPECIFIC SERUM ANTIBODIES TO
PORPHYROMONAS ENDODONTALIS ANTIGEN
IN PATIENTS WITH PERIAPICAL LESION

Jae-Hee Kim, D. D. S., Soo-Han Yoon, D. D. S., M. S. D. Ph. D.

Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Seoul National University

Porphyromonas endodontalis is a black-pigmented anaerobic Gram-negative rod which is associated with endodontal infections and this microorganism possesses a potential for pathogenicity. The purpose of this study was to compare the membrane components of *Porphyromonas endodontalis* and *Porphyromonas gingivalis* and to study the immune reaction patterns of *Porphyromonas endodontalis* with patients with periapical lesion. *Porphyromonas endodontalis* (ATCC 35406), *Porphyromonas gingivalis serotype a* (381), *serotype b* (W50), *serotype c* (A7A1-28) were cultured in anaerobic condition. Rabbit antisera were prepared by intravenous injection of formalized whole cells and human sera were obtained from patients and dental students. Indirect immunofluorescence method was used to study on the cross reaction between *Porphyromonas endodontalis* and *Porphyromonas gingivalis serotype a, b, c* antigen. Total membrane protein profiles of *Porphyromonas endodontalis* antigen were studied by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and the reactivity of antigenic components of *Porphyromonas endodontalis* against sera of patients and rabbit anti-*Porphyromonas endodontalis* antisera were assessed by Immunoblotting method.

The following results were obtained :

1. Antigens of *Porphyromonas endodontalis* has multiple antigenic components, and both patients with periapical lesion and normal healthy individual showed immune response to this.
2. Patients group and healthy individual group showed a diversity of immune reaction pattern but they showed immune response against 43kd protein.
3. Patients with periapical lesion showed more diverse immune response than healthy individual and in some patients, much more bands appeared to lower molecular weight protein.
4. According to indirect immunofluorescence and Immunoblotting study, *Porphyromonas endodontalis* did not share common antigen with *Porphyromonas gingivalis serotype a, b, c*.

Key words : *Porphyromonas endodontalis*, periapical lesion, Immunoblotting, indirect immunofluorescence, immune response