

# 히로시마 대학교 치과대학을 다녀와서

원광대학교 치과대학 구강미생물학교실 조교수 김강주

히로시마는 일본 중부의 중심도시로 인구 100만명의 관광 도시이다. 우리의 기억에는 1945년 원자폭탄 투하지로 잘 알려졌다. 그 당시 2만명의 한국인을 포함하여 20만명이 사망하였다. 지금도 원폭기념관 밖에 한국인 희생자를 위한 초라한 비석 하나와 몇 송이 꽃이 이국에서 산화한 원혼을 달래고 있다.

히로시마 대학은 일본 이 지역의 거점대학으로 일본내에서 가장 넓은 캠퍼스를 가지고 있고, 치과대학은 입학정원이 60명이며 한국과 마찬가지로 6년제의 학부과정, 2년 과정의 박사과정 전기와 3-4년의 박사과정 후기의 연구과정이 있으며, 2년 과정의 치과위생사학교와 치과기공사학교가 유기적 연계를 가지고 운영되고 있다 (그림1).

기초와 임상과의 유기적 연계를 갖는 일본 히로시마 대학의 치주 및 근관치료과에서 한국과학재단의 1996년도 하반기 해외방문연구지원사업으로 한일간의 구강미생물을 비교하고자 방문연구를 하였다. 히로시마 대학의 제2수복과에서 시도하는 임상검사를 중심으로 치과영역에서 임상미생물 검사의 현재와 미래의 가능성을 탐색하고자 한다.

구강질환 특히 치주질환은

가장 경제활동이 왕성한 35세 이상의 성인에 범발하는 질환으로 병원균의 병독력과 그에 따른 숙주반응으로 나타난다 (Chung 등, 1983; Kim 등, 1992). 세균과 숙주반응에 관한 연구는 바로 임상에 응용할 수 있어 실용성과 결과의 적용효율이 높다.

그러나, 그람음성 혐기성 세균이 원인이 되어 발생하는 만성 구강 감염에서 세균과 숙주의 역할과 항생제의 사용에 대한 지침이 부족하다. 메티실린(*methicillin*)에 내성을 보이는 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)뿐 아니라 반코마이신(*vancomycin*)에 내성을 보이는 세균까지 등장하여 항생제 사용에 많은 제약을 가지고 있다. 일반 의학계에서는 임상검사

실의 미생물과 면역학 검사가 일반화되고 있으나, 약제뿐 아니라 재료를 사용하여 처치하는 경우가 많은 치과질환에서는 상대적으로 세균과 숙주에 대한 검사의 중요성이 낮게 인식되고 있다.

히로시마대학의 제2수복과는 치주와 치수 관련 연구를 진행하고 있고, 교육, 임상 및 연구를 병행하고 있다. 다음과 같은 연구를 팀을 나누어 진행하고 있다.

1. 치주염의 유발에 관한



그림 1 히로시마대학교 치과대학 전경

- 면역학적 연구 (Immunologic study on the onset of periodontitis)
- 치주조직 재생분야 (Study on the regeneration of periodontal tissue)
  - 치주인대 유래 세포의 생리학적 기능과 분화 (Study on physiological function and differentiation of the cells derived from periodontal tissue)
  - 치수조직 유래 세포의 석회화와 노화 (Study on calcification and senescence of the cells derived from pulp tissue)
  - 혈소판 활성화 인자에 관한 연구 (Study on platelet-activating factor)
  - 치주질환 병원균과 숙주세포 간의 상호작용 (Study on the interaction between periodontopathic bacteria and host cells)
  - 근관치료와 치주치료에 관한 임상적 연구 (Clinical study on endodontal-periodontal therapy)

최근에 개최된 “조기에 시작되는 치주질환”에 관한 국제 워크샵에서도 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*)와 *Bacteroides forsythus* (*B. forsythus*)의 연구에 혈청학과 분자역학적 (serological and molecular epidemiological) 방법을 적용하고 있다 (Chung 등, 1989). 특히 *A. actinomycetemcomitans*의 백혈구 독소의 발현과 관련이 있는 Repeats in ToXin (RTX) 유전자의 발현에 대한 연구와 국소유년형치주염 환자에 감수성을 보이는 숙주의 IgG<sub>2</sub> 항체역가와 FcγRIIa에 대한 R131 대립유전자(allele)의 관련성이 보고되고 있다 (Lally 등, 1996; Fives-Taylor 등, 1996; Kolodrubetz, 1996; Tew 등, 1996; Wilson 과 Kalmar, 1996).

연구 개발된 항목의 응용 정도를 높이고 임상에서의 적용성을 높이기 위하여, 미생물학 과 면역학적 방법론의 임상 응용, 다형핵백혈구의 간이 검사법 개발과 구강내 세균의 부착에 관한 연구를 1) 원판법을 이용한 간이 미생물 검사 (catalase, oxidase, benzidine test 포함)와 slide glass 응집 (agglutination) 방법에 의한 세균의 혈청형 검사(그림2, 표1과 2) (Maccani, 1981), 2) SDS-PAGE(그림3), 3) 초기감염과 이차감염을 구분할 수 있는 항체역가 (antibody titer)와 Western blot(표4와 그림4), 4) *S. aureus* Cowan I 균주를이용한 다형핵백혈구 세포에 대한 간이 탐식능 검사 (Seki 등, 1989)를 이용함으로써 구체화하고 있다.

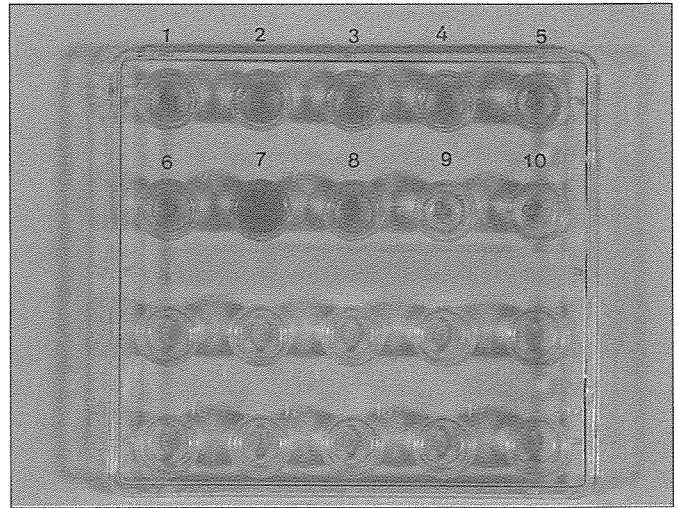


그림 2 대한민국과 일본에서 분리된 *A. actinomycetemcomitans*균주에 의한 실로스 발효, 한국인 분리균주 1종은 적색으로 실로스를 발효하지 않는 것으로 나타났으나, 다른 한국인 분리균주와 일본인 분리균주는 실로스를 발효하였다.

표 1 대한민국과 일본에서 분리된 *A. actinomycetemcomitans*균주의 생물형(biotype)

실로스 만니를 갈락토스 생물형					
대한민국	1	+	+	+	I형
분리균주	2	+	+	+	I형
	3	+	+	+	I형
	4	+	+	+	I형
	5	-	-	-	II형
일본 분리균주	1	+	+	+	I형
	2	+	+	+	II형

표 2 대한민국과 일본에서 분리된 *A. actinomycetemcomitans*균주의 혈청형(biotype)

혈 청 형			
대한민국	1	b	혈청형
	2	b	혈청형
	3	b	혈청형
	4	b	혈청형
	5	c	혈청형
일본 분리균주	1	b	혈청형
	2	c	혈청형

그림 3 8개 *A. actinomycetemcomitans* 균주의 전기영동 양상, 한국인과 일본인 분리 균주에서 21.5 kDa 이외의 밴드는 유사한 양상을 보였다. M, size marker, 5, Aa1046BM II-1:4, AaWK-1: 3, AaφD4613M: 2, Aa1M21M-1: 1, AaHagiwara

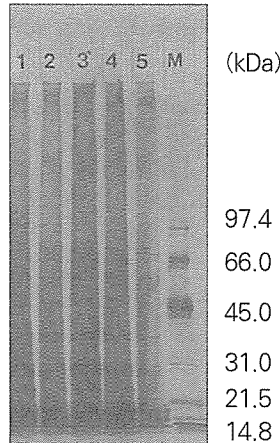


표 3 대한민국과 일본에서 분리된 *A. actinomycetemcomitans* 균주의 백혈구 독성 검사(leukocyte toxicity test)

생존세포 (×400,000)		
	60분	90분
대조군	26	13
표준균주		
AaY4	18	12
Aa67	19	7
Aa29522	20	11
대한민국		
분리균주		
Aa1M21M-1(P-LJP)	18	8
AaφD4613M(LJP)	18	4
AaWK1(AP)	19	5
Aa1046BM II-1(LJP)	23	5
일본인		
분리균주		
AaHagiwara (국소유년형 치주염환자)	20	13

그림 4 8개 *A. actinomycetemcomitans* 균주의 Western blotting 양상, 한국인과 일본인 균주에서 21.5 kDa이외의 밴드는 유사한 양상을 보였다. 5, Aa1046BM II-1: 4, AaWk-1: 3, AaφD4613M: 2, Aa1M21M-1: 1, Aahagiwara

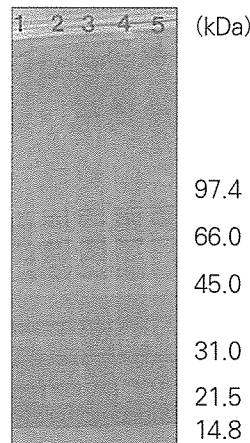


표 4 한국인과 일본인의 *A. actinomycetemcomitans* 균주에 대한 IgG 항체역가

표준균주에 대한 IgG 항체역가	
한국인 분리혈청	a혈청형 ≡ b혈청형 ≡ c혈청형
일본인 분리혈청	a혈청형 ≡ b혈청형 ≡ c혈청형

초기 치주질환 환자의 미생물학적 연구를 분자역학적인 측면에서 진행하여 *A. actinomycetemcomitans*의 세균학적 특성을 제한효소분석 (restriction endonuclease analysis)과 pulse-field gel electrophoresis (PFGE)로 규명하고, 그에 따른 항체 반응 특히 IgG<sub>2</sub>에 대한 면역반응을 효소흡착면역흡착법 (enzyme-linked immunosorbent assays)과 Western blot analysis로 확인하고자 하고 있다. 그러나 질환활성을 보이는 환자에서 공통으로 나타나는 라이보타이핑 (ribotyping)이나 특이소식자 (specific probe)를 이용한 탐색이 필요한 것으로 생각된다. 이에 대한 연구가 결실을 맺게 될 경우 질환활성과 관련된 세균의 동정과 세균의 동일 구강내, 배우자간, 모자간 및 인종간의 전파 (transmission)를 추정하는 데 도움을 줄 것으로 기대된다.

구체적인 연구 결과로는 1) 치주염환자에서 *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*)의 *L-arginine*에 감수성을 보이는 적혈구응집소(hemagglutinin)에 대한 항체 (Ozaki 등, 1990; Takemoto 등, 1993; 1995), 2) 교원질 겔(collagen gel) 속으로 치주인대유래세포의 침입양상 (Higashi 등, 1997) 및 3) 인체 치수세포에서 성장인자의 분화작용 (Shiba 등, 1997) 등이다.

히로시마 대학 이외에도 동경치과대학 Okuda 교수는 일본인에서 분리된 세균의 혈청학적 특이성의 존재에 관하여 보고하고 있고, 나고야시의 Aichi-Gakuin대학교 치과대학의 Yoshimura 교수는 현재 여러 그룹에서 진행중인 *A. actinomycetemcomitans* 균주의 섬모(fimbriae)에 관한 연구가 구조적 유사성이 있는 것으로 추정된다고 주장하였다.

과거와는 달리 성인형치주염과 관련된 *B. forsythus*의 분리를 위하여 *F. nucleatum*과 *B. forsythus*를 co-culture하였으나 현재는 *B. forsythus*만을 단독으로 배양할 수 있는 배지를 제작하여 분리하며 (Lai 등, 1987), PFGE 기법을 이용한 세균의 분리 동정과 역학조사에 응용가능하다.

일본인에서 드물게 분리되는 *A. actinomycetemcomitans* serotype b 형의 특성에 관한 연구가 요구되며 (표2), SDS-PAGE와 Western blot analysis를 통하여 강한 반응성을 보인 분획에 대한 연구가 필요하다 (그림2, 3). 제한효소분석 (restriction endonuclease analysis)을 위하여 전기영동한 겔 (gel)을 Southern blot analysis를 시행한 후, 라이보타이핑과 특이소식자로 탐색하여 유전자 수준의 *A. actinomycetemcomitans*에 관한 연구도 필요할 것으로 생각된다.

히로시마 대학의 제2수복과에서는 다음과 같은 영역의 연구가 진행될 것으로 예상된다.

- 1) 조기 유발 치주염, 특히 병독력을 보이는 *A. actinomyces-temcomitans*
- 2) 다형핵백혈구, 치주인대세포와 치수세포의 기능, 생리학 및 신호전달
- 3) *F. nucleatum*과 *B. forsythus*를 포함하는 구강내 세균과의 상호응집반응

이렇게 개발된 실험실 자료는 임상 검사로 적용해 볼 수 있을 뿐만 아니라, 의료보험의 항목으로 반영하기 위하여 일본정부의 관련위원회에 의견을 반영하고 있다. 국내에서도 소비자 주권시대의 의료분쟁에 대비한 보험요양과 의료수요의 개발을 위하여 간이 검사의 활성화가 필요할 것으로 생각된다.

구강질환이 구강 세균의 항상성이 깨어져 일어나는 점을 고려하여 볼 때, 세균학과 면역학적인 검사 결과에서 전신적인 소인이나 감염성이 높은 세균이 존재한다면 35세 이전 환자의 경우 항생제의 사용을 적극 권장할 수 있고, 질병의 진행에 대한 예측도 가능할 것으로 추정된다.

40 대 초반의 젊은 주임교수인 Kurihara 교수는 산학협력을 위하여, 과내에서 매달 산업체의 제품 설명회를 개최하고, 임상연구를 위한 일정한 수자 이상의 환자 규모를 유지하는 등 실질적인 내실을 기하고 있다. 국제협력을 위하여 미국의 Boston 대학의 Van Dyke 교수와 다형핵백혈구의 신호전달에 관한 상호 교류를 추진중이고, 오카야마 대학에서 선진기술을 도입하고 있고, 오사카 대학과도 상호 세미나를 교환하고 있다.

임상과 기초와의 연계가 부족한 국내의 현실에서 임상환자로부터의 시료 채취를 기초와 연계하여 과학적이고 효율적으로 수행하고, 개발된 미생물과 면역학적 개발 기법을 적용하는 것이 산학협력과 기술개발에 도움이 될 것으로 생각된다. 또한, 미래의 치료영역으로 생각되는 국소유년형치주염환자의 감수성과 관련된 숙주의 결합요소에 대한 유전자치료(gene therapy), 창상치유와 관련된 cytokine therapy 및 특정세포의 기능을 강화시키는 ex-vivo therapy에 관한 분야도 준비하여야 할 것으로 생각된다.

#### 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 1996년도 하반기 외국방문연구 지원 사업(96-2-07-03)에 의하여 이루어 졌음.

## 참고 문헌

1. Chung C.P, Nisengard R.J, Slots J, Genco R.J. Bacterial IgG and IgM antibody titers in acute necrotizing ulcerative gingivitis. J Periodontol 54:557-562, 1983.
2. Chung H.J, Chung C.P, Son S. *Actinobacillus actinomyces-temcomitans* serotypes and leukotoxicity in Korean localized juvenile periodontitis. J Periodontol 60:506, 1989.
3. Fives-Taylor P, Mintz M.K. Virulence factors of the periodontopathogen *Actinobacillus actinomyces-temcomitans*. J Periodontol 67(3):291-297.
4. Higashi T, Doi N, Shiba H, Ogawa T, Kurihara H. Intrusive behavior of periodontal ligament cells into collagen gel. J Dent Res 75:354 (Abstract # 2728), 1996.
5. Kim K.J, Kim D.K, Chung C.P, Son S. Longitudinal monitoring for disease progression of localized juvenile periodontitis. J Periodontol 63:806-811, 1992.
6. Kolodrubetz D. Molecular genetics and the analysis of leukotoxin in *Actinobacillus actinomyces-temcomitans*. J Periodontol 67(3):309-316, 1996.
7. Lai C-H, Listgarten M.A, Shirakawa M, Slots J. Bacteroides forsythus in adult gingivitis and periodontitis. Oral Microbiol Immunol 2:152-157, 1987.
8. Lally E.T, Kieba I.R, Golub E.E, Lear J.D, Tanaka J.C. Structure/function aspects of *Actinobacillus actinomyces-temcomitans* leukotoxin. J Periodontol 67(3):298-308, 1996.
9. Maccani J.E. Rapid presumptive identification of *Cryptococcus neoformans* by staphylococcal coagglutination. J Clin Microbiol 13(5):828-832, 1981.
10. Seki K, Murai M, Sakurada J, Shirahige A, Kobayashi N, Hwang S.M, Masuda S. A simple method for observation of phagocytosis on bacterial thin-layer. Microbiol. Immunol. 33(1):81-85, 1989.
11. Shiba H, Fujita T, Doi N., Nakanishi K, Shibata K, Ogawa T, Higashi T, Kurihara H, Kato Y. Differential actions of growth factors in human pulp cells. J Dent Res 75:293 (Abstract # 2239), 1996.
12. Takemoto K, Shibata K, Doi N, Yoshino H, Kurihara H, Dohi T. Platelet-activating factor as a potential clinical marker in periodontal disease. J Dent Res 75:211 (Abstract # 1547), 1996.
13. Tew J.G., Zhang J-B, Quinn S, Tangada S, Nakashima K, Gunsolley J.C, Schenkein H.A, Califano J.V. Antibody of the IgG2 subclass, *Actinobacillus actinomyces-temcomitans*, and early-onset periodontitis. J Periodontol 67(3):317-322, 1996.
14. Wilson M.E. Kalam J.R. FcγIIa (CD32): A potential marker defining susceptibility to localized juvenile periodontitis. J Periodontol 67(3):323-331, 1996.
15. Zambon J.J, Haraszthy V.I., Hariharan G., Lally E.T., Demuth D.R. The microbiology of early-onset periodontitis: Association of highly toxic *Actinobacillus actinomyces-temcomitans* strains with localized juvenile periodontitis. J Periodontol 67(3):282-290, 1996.