

구강세균 *Prevotella intermedia*의 성장에 따른 polyphosphate의 영향에 관한 연구

경희대학교 치과대학 보존학교실

공희정 · 최호영 · 민병순 · 박상진 · 이진용 · 최기운

ABSTRACT

EFFECT OF POLYPHOSPHATE ON THE GROWTH OF ORAL BACTERIUM, PREVOTELLA INTERMEDIA

Hee-Joung Kong, Ho-Young Choi, Byung-Soon Min,
Sang-Jin Part, Jin-Yong Lee, Gi-Woon Choi

Department of Conservative Dentistry, Division of Dentistry, Graduate School Kyung-Hee University

Prevotella intermedia has been known as one of the important bacterial species involved in the endodontic infections and various periodontal diseases. Polyphosphate has been widely used to prevent decomposition of food and known to have an inhibitory effect on the growth of gram positive bacteria. The purpose of this study was to evaluate the effect of polyphosphate on the growth of *Prevotella intermedia*, a gram negative bacterium.

Prevotella intermedia G8GK3(ATCC 49046) was grown in the presence of polyphosphates with different chain lengths. Inhibitory effect of each polyphosphate, which was added at the beginning or at the early exponential growth phase of *Prevotella intermedia*, was determined by measuring optical density of the bacterial cells at 540nm, viable cells and lysis of *Prevotella intermedia*.

The results from this study were as follows :

1. Polyphosphate inhibited the growth of *Prevotella intermedia*.
2. The minimum inhibitory concentration(MIC) of polyphosphate appeared to be 0.05%.
3. Polyphosphates with chain lengths of 5 and 65 demonstrated the greatest inhibitory effect on the growth of *Prevotella intermedia*.
4. Polyphosphate was bactericidal to *Prevotella intermedia*, demonstrating the growth in-

hibition of the bacterium.

5. Polyphosphate induced lysis of *Prevotella intermedia*.

The overall results suggest that polyphosphate has a bactericidal effect on *Prevotella intermedia*, causing the lysis of the bacterium.

I. 서 론

1697년, Leeuwenhoek는 우식이 심한 치아의 근관내에서 세균감염 가능성에 대해 처음으로 언급하였다¹⁾. 그로부터 200년이 지난 후인 Miller(1890)²⁾에 이르러서야 현미경을 이용하여 피사된 치수조직에서 다양한 형태의 미생물이 존재함을 입증하였다. Henrici 등(1919)³⁾은 정상적인 치수는 원래 무균상태이며 근관치료는 이미 존재하고 있는 근관내 감염요소를 모두 제거하여 조직의 재감염을 방지하는 것이라고 발표하여, 근관치료학에서의 세균의 중요성을 강조하였을 뿐 아니라 이미 현대적 개념의 근관치료에 대해서도 언급하였다. 그 이후에 행해진 연구들에서도 치수 및 치근단 질환이 발병되거나 진행될 때 미생물이 중요한 역할을 한다는 것이 강조되었다⁴⁻⁶⁾.

최근에는 감염근관내 세균분포의 변화가 일정한 양상을 보이는 것으로 밝혀졌는데, 즉 감염 초기에는 통성(facultative) 세균인 streptococci나 enterococci 등이 주로 나타나지만, 치수가 피사되어 근관이 혐기성 상태로 변해감에 따라 치근단 부위에서 혐기성 세균이 크게 증가하는 것으로 보고되고 있다⁷⁾. 1970년대 이전의 연구에서는 그 방법이 부적절하고 배양기술이 미숙하여 감염근관내에서 혐기성 세균의 역할이 중요시되지 않았으나⁸⁾ 1976년, Sundqvist¹⁰⁾가 외상으로 인해 치수피사가 일어난 전치의 근관내에서 혐기성 세균이 많이 나타나며 이들 혐기성 세균이 근관감염에 중요한 역할을 한다고 보고한 이후, 혐기성 세균과 이것의 배양방법, 혐기성 세균과 호기성 세균 및 통성 세균의 상승 효과에 대한 연구가 활발히 진행되었다. Hashioka 등(1992)¹¹⁾은 임상증상이 없는 경우보다는 있는 경우에 혐기성 세균의 수와 종류가 증가한다고 보고하였다.

진행된 감염근관내에서 발견되는 혐기성 세균의 대부분은 그람 음성의 혐기성 간균으로, 혈액한천배지에서 검정색 또는 갈색의 집락을 형성한다. 그 중에서도 *Prevotella intermedia*는 치수염, 치수괴사, 치근단 농양, 치근단 치주염을 동반한 감염근관내에서 가장 많이 발견되는 세균 중의 하나이며^{6,12-16)}, 이 세균과 관련된 근관감염시에는 대개 동통, 종창, 악취 등의 증상이 나타나고 농루가 형성되기도 한다^{6,12,16)}. *Prevotella intermedia*는 증상이 있는 감염뿐만 아니라 무증상의 감염과도 연관되어 나타난다고 알려져 있는데¹⁶⁾, 특히 임상적 증상은 없고 치근단 병소만 가진 경우라도 *Prevotella intermedia*가 발견된다면 후에 임상증상이 나타날 것을 예견할 수 있다¹⁷⁾. *Prevotella intermedia*와 더불어 *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*가 같이 나타날 경우에는 화농성의 치근단 감염으로 발전할 가능성이 크다¹⁷⁾. Sundqvist(1992)¹⁸⁾, Assed 등(1996)¹⁵⁾은 만성 치근단 치주염을 가진 사람 치아의 감염근관내에서 *Prevotella intermedia*가 많이 발견된다고 하였으며, Barnett 등(1990)¹⁹⁾은 면역형광법을 이용하여 치근단 육아종에서 *Prevotella intermedia*를 검출해 낼 수 있었다고 보고하였다. 근관치료 도중 flare-up되어 급성염증이 생긴 경우에도 삼출액 등에서 *Prevotella intermedia*가 발견될 수 있다²⁰⁾.

한편 특정 형태의 치주질환에는 특정 세균이 관련되는 것으로 추측되는데^{21,22)}, *Prevotella intermedia*는 급속 피사성 궤양성 치은염, 성인형 치주염, 사춘기전 치주염, 난치성 치주염 등에서 주로 나타나며, 국소 유년형 치주염과 임신성 치은염 등에서도 검출되는 것으로 보고되고 있다^{4,21-31)}. 치주염이 없는 정상적인 치주조직의 경우, 연령에 따라 *Prevotella intermedia*가 발견되는 정도가 다른데, Ashley(1988)³²⁾, Zimmer 등(1991)³³⁾의 연구에

의하면 성인보다 사춘기전 소년들에서 *Prevotella intermedia*가 더 많이 발견되는 것으로 나타나고 있다. 또한 매식치주염(peri-implantitis)이나 치아매식술의 실패시에도 많이 발견되며³⁴⁻³⁷⁾, 조직유도재생술 후 *Prevotella intermedia*에 감염된 부위는 조직재생효과가 감소된다고 알려지고 있다^{38,39)}.

Polyphosphate는 수십 또는 수백 개의 orthophosphate가 높은 에너지의 phosphoanhydride 결합으로 연결된 선상 복합체로서 세균, 곰팡이, 원생동물, 식물, 포유동물 등의 거의 모든 생물체에서 발견된다⁴⁰⁻⁴²⁾. 역사적으로 polyphosphate 입자는 의학적으로 중요한 세균인 *Corynebacterium diphtheriae*의 진단시 이용되었으며, 이러한 polyphosphate의 존재여부를 알아내는 방법으로 염색법, 광학현미경이나 전자현미경 관찰법, 핵자기공명(nuclear magnetic resonance) 분석법, 효소학적 연구법 등이 사용되고 있다⁴²⁾.

미생물에서 발견되는 polyphosphate는 다양한 기능을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다. 즉 polyphosphate kinase에 의해 polyphosphate가 ATP로 전환되어 에너지원으로 사용될 수 있고 무기인산의 저장고로 이용되며, 알칼리 이온을 중화시킴으로써 세포질내의 수소이온농도를 일정하게 유지시켜 준다. 스트레스에 대한 내성과 생존에 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 발육을 조절해 주며, 세포벽의 구성성분으로서도 중요한 역할을 한다. 또한 세균 세포벽의 중요한 구성요소인 Ca^{2+} , Mg^{2+} 등의 이온뿐만 아니라 Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} 등과도 킬레이션 반응을 한다^{41,42)}.

Polyphosphate는 인체에 무해하므로 식품첨가물로서 많이 이용되어 왔는데, 음식물을 부드럽게 연화시키거나 수분을 유지시키며 조리시 수축을 방지하기 위해 사용되었다^{43,44)}. 특히 육류에 첨가되어 수분유지, 산화에 의한 악취와 변색의 방지, 훈제시 색조를 유지시킬 목적으로 사용되고 있다^{42,45)}.

이러한 polyphosphate가 항균제로 구분되어진 적은 없으나, 몇몇 연구에서는 직접, 간접적으로 항균효과를 가진다고 보고되고 있다. Shibata 등(1982)⁴⁶⁾은 hamster의 구강내에 *Streptococcus mutans*를 접종하고 치아우식증 유발을 위해 자당이 많은 먹이를 주면서 polyphosphate를 같이 공급해 주었더니, 치태형성이 감소되고 우식활성이 저

하되는 것이 관찰되었다. 즉 치아우식은 세균의 활성 없이는 일어나지 않으므로, polyphosphate에 의한 우식정지효과는 항균효과와 연관성이 있다고 보고하였다. Lee 등(1994)⁴⁵⁾은 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균효과 실험에서, 강한 음이온을 나타내는 polyphosphate가 금속 이온의 킬레이터로 작용하여 세균 세포벽의 필수 구성요소인 Ca^{2+} , Mg^{2+} 과 킬레이션 반응을 함으로써 살균효과 및 세균 용해효과를 보인다고 보고하였다. 또한 Jen 등(1986)⁴³⁾도 *Staphylococcus aureus*의 경우, 세포막과 세포벽의 주요 성분이고 세균의 permeability barrier 유지에 중요하며 많은 효소를 활성화시킴으로써 세균 성장에 필수적인 역할을 하는 Mg^{2+} 와 polyphosphate가 매우 강한 결합을 형성하여, 세포대사에 영향을 주고 세균성장을 억제한다고 하였다.

이상과 같이 polyphosphate가 그람 양성 세균에 대해서는 성장 억제효과가 있음이 어느 정도 밝혀졌으나, 그람 음성 세균에 대해서는 항균효과가 거의 없을 것이라는 부정적인 시각들 때문에⁴⁴⁾ 그 보고가 매우 미미한 상태이다. 따라서 본 연구에서는 그람 음성 세균이면서 감염근관 뿐 아니라 여러 가지 치주질환에서 많이 발견되는 *Prevotella intermedia*에 대한 polyphosphate의 항균효과 여부를 알아봄으로써 치과임상 분야에 대한 polyphosphate의 사용 가능성을 살펴보고자 한다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 실험균주 및 배양

실험균주로는 *Prevotella intermedia* G8GK3(ATCC 49046)를 사용하였고, 배지는 half-strength brain heart infusion(BHI ; Difco) 액체배지를 이용하였다. 배지에 *Prevotella intermedia*를 접종한 후, 혐기성 배양기(85% N_2 , 10% H_2 , 5% CO_2)에서 2일간 배양하였다⁴⁷⁾.

2) 실험재료 및 기구

세균배양을 위하여 half-strength BHI 액체배지에 yeast extract(5mg/ml), hemin(5 μ g/ml), vitamin

K(0.2 μ g/ml)를 첨가하여 사용하였다. Polyphosphate는 사슬길이가 각각 5, 15, 25, 35, 45, 65, 75인 sodium polyphosphate crystal과 사슬길이 13과 18의 혼합물인 Calgon을 사용하였다. 각각의 polyphosphate를 증류수에 용해시킨 후, 0.45 μ m의 syringe filter로 여과멸균하였다.

Polyphosphate와 세균을 함께 배양시킨 후, polyphosphate의 최소성장억제농도 (minimum inhibitory concentration : MIC)를 결정하기 위해 균액 1ml를 cuvette에 넣고 분광광도계(Ultraspac 2000, Pharmacia Biotech Co., England)를 사용하여 540 nm 파장에서 흡광도(optical density)를 측정하였다. 세균의 균일한 혼합을 위해 vortex mixer(Vortex-2 Genie, Scientific Industries Co., U.S.A.)를 사용하였다.

결정된 MIC에서 polyphosphate가 살균효과를 가지는지를 확인하기 위해 phosphate buffered saline(PBS)을 이용하여 *Prevotella intermedia*를 희석하였으며, BHI 액체배지에 agar 1.5%와 면양 적혈구 5%를 첨가한 혈액한천배지를 제작하여 *Prevotella intermedia*의 생균수를 측정하였다.

Polyphosphate의 세균용해능 검사를 위해 0.15M NaCl 용액, 0.06% polyphosphate, 3.4mM의 EDTA(pH8.0)를 준비하여 *Prevotella intermedia*를 부유시키고 원심분리기(Sorvall MC 12V, Dupont, U.S.A.)로 원심시킨 후, 상층액의 흡광도를 260nm에서 측정하였다.

2. 실험방법

1) MIC 결정실험

우선 BHI 액체배지를 준비하고, 각각의 polyphosphate를 증류수에 용해시킨 후 0.45 μ m의 syringe filter를 이용하여 여과멸균하였다. BHI 액체배지를 10ml씩 첨가한 tube에 *Prevotella intermedia*를 접종한 후, polyphosphate를 각각 0.03, 0.04, 0.05%씩 첨가하고 48, 72시간동안 혐기적으로 배양하였다. 그 후 각 polyphosphate 농도에 따른 세균성장 정도를 측정하고 MIC를 결정하기 위하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) 항균효과 실험

① 대수증식기에 있는 *Prevotella intermedia*의 성장 억제효과 실험

앞의 MIC 결정실험에서는 배양 초기에 polyphosphate를 첨가하여 성장 억제효과를 확인한 반면, 이번에는 polyphosphate를 *Prevotella intermedia*의 대수증식기(exponential phase)에 첨가한 후 세균 성장 억제효과가 있는지 알아보았다. 즉 *Prevotella intermedia*를 흡광도가 0.6이 될 때까지 증식시킨 후, 사슬길이 5, 65의 polyphosphate(P5, P65)를 0.03, 0.04, 0.05% 농도로 첨가하고 흡광도 변화를 관찰하였다. 흡광도 변화는 polyphosphate 첨가 12, 24, 48시간 후에 각각 관찰하였다.

② 생균수 측정(Viable cell counts)

*Prevotella intermedia*에 대한 polyphosphate의 성장 억제효과가 정균효과(bacteriostatic effect)인지, 아니면 살균효과(bactericidal effect)인지를 확인하기 위하여 생균수를 측정하였다. 이를 위해 혈액한천배지를 제작하고 각 polyphosphate 농도군에서 채취한 세균을 PBS를 이용하여 10^{-1} ~ 10^{-6} 까지 단계적으로 희석한 다음, 혈액한천배지에 희석액 100 μ l를 떨어뜨린 후, 균일한 혼합을 위해 유리구슬(glass bead)을 함께 넣고 잘 흔들어 세균을 배지 위에 균일하게 도포하였다. 혐기성 배양기에서 집락형성이 육안으로 확인될 때까지 배양한 후, 나타난 집락수를 세어 생균수를 측정하였다.

③ Polyphosphate의 세균용해능 검사

만약 *Prevotella intermedia*에 대해 polyphosphate가 살균효과를 가졌다면, 이러한 효과가 세균 용해에 의한 것인지를 알아보기 위해, *Prevotella intermedia*와 생리식염수만을 혼합한 것을 음성 대조군으로 하고 EDTA에 *Prevotella intermedia*를 부유시킨 것을 양성 대조군으로 하였다.

0.15M NaCl 용액에 polyphosphate는 최종 농도가 0.06%가 되도록, EDTA는 3.4mM(pH8.0)이 되도록 용해시킨 후 여과멸균하였다. 30시간 배양 후 7,000 \times g으로 원심시키고 세정한 *Prevotella intermedia*를 생리식염수, 0.06%의 polyphosphate, 3.4mM의 EDTA(pH8.0)에 각각 부유시키고 매 2시간마다 7,000 \times g으로 원심하였다. 그 후 상층액의 흡광도를 260nm에서 측정하여 유리된 핵산량을 비교하였다.

III. 실험 성적

1. MIC 결정

배양 시작과 동시에 polyphosphate를 첨가하고 48시간 배양한 경우(Table 1), 대조군에 비해 0.03, 0.04, 0.05%의 polyphosphate에서 모두 *Prevotella intermedia*에 대한 성장 억제효과가 나타났는데, 0.03%에서는 그 억제정도가 미약하였으나 polyphosphate 농도가 증가할수록 더 큰 억제효과

를 보였다. 72시간동안 배양한 경우(Table 2)에도 0.03, 0.04, 0.05%에서 모두 성장 억제효과가 나타났으며, 48시간 배양시와 비슷한 양상을 보였다. 48시간과 72시간 배양시 모두 0.03, 0.04%보다 0.05%에서 더 현저한 억제효과를 보였고, 0.05%에서 측정된 흡광도는 배양 시작 전 균액을 배양액에 넣자마자 측정된 흡광도와 거의 같은 수치를 나타내었다. 즉 0.05%에서는 세균이 전혀 성장하지 않았을 때와 같은 수준으로 성장이 억제되었으므로, MIC는 0.05%로 결정할 수 있었다. 한편 사슬

Table 1. Inhibitory effect of polyphosphate on the growth of *Prevotella intermedia*

Concentration (%)	Chain length of polyphosphate							
	5	15	25	35	45	65	75	Calgon
0.03	0.442 ^b	0.495	0.546	0.649	0.632	0.530	0.569	0.535
0.04	0.080	0.251	0.248	0.219	0.132	0.244	0.188	0.200
0.05	0.010	0.025	0.028	0.021	0.028	0.019	0.024	0.012

Optical density of the control at the end of the experiment was 0.947.

a : Polyphosphates were added at the beginning of the cell cultures.

b : Optical density was measured after 48 hours of the cell cultures.

Table 2. Inhibitory effect of polyphosphate on the growth of *Prevotella intermedia*

Concentration (%)	Chain length of polyphosphate							
	5	15	25	35	45	65	75	Calgon
0.03	0.482 ^b	0.595	0.608	0.743	0.680	0.595	0.624	0.608
0.04	0.092	0.279	0.258	0.302	0.184	0.328	0.219	0.224
0.05	0.004	0.015	0.016	0.010	0.012	0.008	0.011	0.005

Optical density of the control at the end of the experiment was 0.980.

a : Polyphosphates were added at the beginning of the cell cultures.

b : Optical density was measured after 72 hours of the cell cultures.

Table 3. Inhibition of the growth of *Prevotella intermedia* increasing concentrations of polyphosphates added in the exponential growth phase of the bacterium

Incubation time after polyphosphates added (h)	control	Polyphosphate : P5			Polyphosphate : P65		
		0.03%	0.04%	0.05%	0.03%	0.04%	0.05%
		0	0.600	0.600	0.600	0.600	0.600
12	1.002	0.974	0.843	0.512	0.942	0.783	0.454
24	1.142	1.121	1.052	0.544	1.101	0.852	0.389
48	1.124	1.021	0.931	0.462	0.920	0.741	0.242

a : Polyphosphate was added when the optical density of *Prevotella intermedia* reached 0.6 at 540nm. Changes of optical densities were measured with the lapse of time in the presence of 0.03, 0.04, 0.05% polyphosphates.

길이 5와 65의 polyphosphate가 가장 높은 성장 억제효과를 보였다.

2. 항균효과

1) 대수증식기에 있는 *Prevotella intermedia*의 성장 억제효과

MIC 결정실험에서 가장 큰 성장 억제효과를 보인 사슬길이 5와 65의 polyphosphate를 실험에 이용하였다. 흡광도가 0.6이 될 때까지 배양한 후 0.03, 0.04, 0.05%의 polyphosphate를 각각 첨가하고 흡광도 변화를 관찰한 결과(Table 3), 0.03%에서는 계속해서 흡광도가 증가하여 대조군과 비슷한 수치를 보였다. 반면 0.04%에서는 대조군에 비해 흡광도가 비교적 작은 정도로 증가하였으며, 0.05%에서는 크게 감소하였다. 또 사슬길이 5보다는 65에서 흡광도 수치가 더 낮게 나타났다(Fig. 1).

2) 생균수 측정

흡광도가 감소하는 이유가 *Prevotella intermedia*에 대한 polyphosphate의 살균효과 때문인지를 확인하기 위하여, 성장 억제효과 실험에서 억제효과가 가장 크게 나타난 사슬길이 65의 polyphosphate와 *Prevotella intermedia*를 혈액한천배지상에 도말한 후 생균수를 측정하였다(Table 4). 그 결과 0.03, 0.04% polyphosphate를 첨가한 배지에서는 모두 처음보다 생균수가 늘어났지만, 대조군에 비해서는 증가 정도가 현저히 낮게 나타났다. 반면 0.05% polyphosphate를 첨가한 경우는 생균수가 크게 감소하여 48시간 후에는 0.8%의 세균만이 생존하였다.

3) Polyphosphate의 세균용해능 검사

이러한 polyphosphate의 살균효과가 세균용해에 의한 것인지를 알아보기 위해 생리식염수, 3.4mM

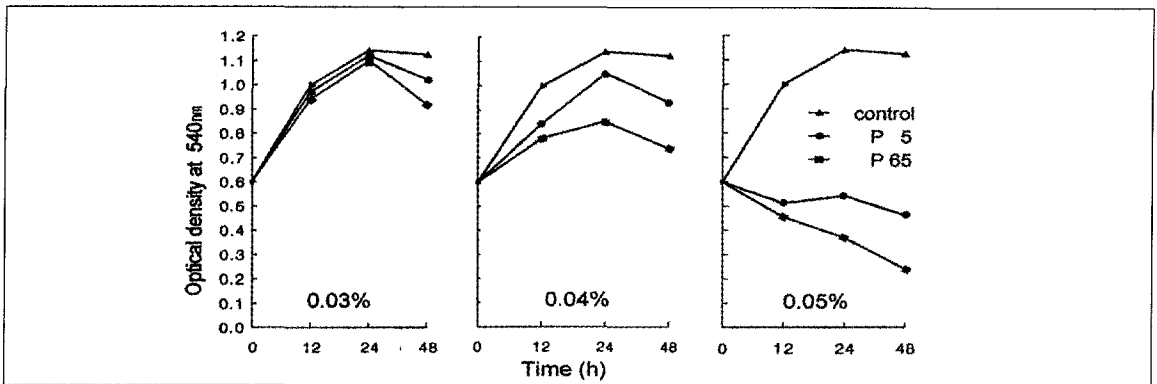


Fig. 1. Changes of optical densities with the lapse of time in the different concentrations of polyphosphates

Table 4. Viable cell counts of *Prevotella intermedia* with increasing concentrations of polyphosphate(P65) added in the exponential growth phase of the bacterium^a

Incubation time after polyphosphates added (h)	control (%)	Polyphosphate : P65 (%)		
		0.03%	0.04%	0.05%
0	100.0	100.0	100.0	100.0
12	451.4 ^b	269.0	126.9	96.9
24	871.4	407.7	300.0	17.3
48	1091.4	350.0	257.7	0.8

a : Polyphosphate was added when the optical density of *Prevotella intermedia* reached 0.6 at 540nm. Viable cell counts were determined 0, 12, 24, 48 hours after the addition of polyphosphate(P65).

b : The number was expressed as relative at 12 hours of the experiment to viable cell counts determined at the time polyphosphate was added.

Table 5. Degrees of lysis of *Prevotella intermedia* after polyphosphates added

Time (h)	control	P65 (0.06%)	EDTA (pH8.0, 3.4mM)
0	0	0	0
2	0.062	0.095	0.084
4	0.097	0.162	0.183
6	0.141	0.237	0.265
8	0.174	0.288	0.341

a : Optical density of the cell supernatant was measured at 260nm.

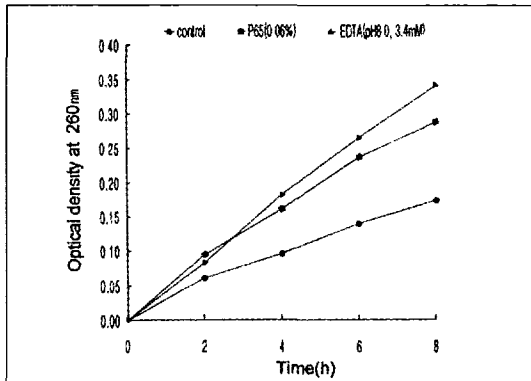


Fig. 2. Degrees of lysis of *Prevotella intermedia* after polyphosphates added (Optical density of the cell supernatant was measured at 260 nm.)

의 EDTA (pH8.0), 0.06%의 polyphosphate 각각에 *Prevotella intermedia*를 혼합하여 원침시킨 후 그 상층액의 흡광도를 260nm에서 측정하여 유리된 핵산량을 비교해 보았다. 그 결과 polyphosphate를 넣었을 때 *Prevotella intermedia*에서 유리된 핵산량은 EDTA를 이용한 양성 대조군보다는 약간 적었지만 생리식염수만을 사용한 음성 대조군보다는 훨씬 많았다 (Table 5, Fig. 2).

IV. 총괄 및 고안

*Prevotella intermedia*는 감염근관 및 여러 가지 치주질환시에 나타나는 주요 세균종으로 알려지고 있다. *Prevotella intermedia*에 효과적인 항생제로는 tetracycline, rokitamycin, quinolone, metronidazole 등으로 보고되고 있다^{48,49}. 그러나 이러한 항생제는 부작용이 많고 내성균이 출현할 수 있는 등 단점

이 있으므로, 인체에 무해하고 부작용이 없는 항균제의 개발이 시급한 것으로 생각된다.

Polyphosphate는 인체에 유해작용이 없는 안정된 물질로서 식품에 많이 이용되며, 최근 많은 연구들에서 항균효과를 가지고 있는 것으로 밝혀지고 있다. Polyphosphate의 항균효과는 그람 양성 세균에서 두드러지게 나타나고 있는데, 그 이유는 polyphosphate가 이러한 그람 양성 세균의 세포벽 안정에 필수적인 양이온들을 킬레이션시키기 때문인 것으로 보인다⁴⁰. 반면 그람 음성 세균에 대해서는 일반적으로 효과가 없는 것으로 보고되고 있으며⁴⁰, 따라서 그람 음성 세균에서 polyphosphate의 항균효과에 관한 연구는 미미한 실정이다. 이에 본 실험에서는 그람 음성 세균인 *Prevotella intermedia*에 대해 항균효과 여부를 관찰하였다.

배양 초기, 즉 세균의 성장곡선 중 성장유도기 (lag phase)에 polyphosphate를 첨가하고 혐기적으로 배양한 결과, 48시간과 72시간 후 0.03, 0.04, 0.05%의 polyphosphate에서 모두 성장 억제효과가 나타났고, 특히 0.05%에서는 배양 시작 전 균액을 배양액에 넣자마자 측정된 흡광도 수치와 거의 같은 정도로 성장이 억제되었으므로, *Prevotella intermedia*에 대한 polyphosphate의 MIC는 0.05%로 결정할 수 있었다 (Table 1, 2). 이 정도의 낮은 농도에서도 억제효과가 있었으므로, polyphosphate를 임상적으로 사용할 경우에 비교적 저농도로도 장 시간동안 세균성장 억제효과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

MIC 결정실험과는 달리, 세균이 한창 자라고 있는 대수증식기 (exponential phase)에 0.03%의 polyphosphate를 첨가하였을 때에도 polyphosphate는 *Prevotella intermedia*에 대해 강한 억제효

과를 보였다. 0.03% 농도에서는 시간이 지남에 따라 *Prevotella intermedia*의 흡광도가 대조군과 거의 비슷한 수치로 계속 증가하였으나, 0.04%의 polyphosphate를 첨가하였을 때에는 흡광도가 미미하게 증가하였고, 0.05%부터는 흡광도가 현저하게 감소하였다(Table 3, Fig. 1). 또 사슬길이 5보다는 65에서 흡광도 수치가 더 낮게 나타났으므로, 65에서 세균성장 억제효과가 더 크다는 것을 알 수 있었다. 이러한 사실을 통해서 polyphosphate는 MIC 정도의 낮은 농도로도 *Prevotella intermedia*의 성장을 억제할 수 있을 뿐만 아니라 균이 한창 자라고 있어서 균 수가 많을 때에도 성장을 억제할 수 있기 때문에 polyphosphate를 임상적으로 사용할 경우, 감염 초기뿐만 아니라 이미 진행된 감염시에도 효과적으로 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

Polyphosphate가 *Prevotella intermedia*의 성장을 잠시 억제시키는 정균효과만 가지는지, 아니면 살균효과도 가지는지의 여부는 흡광도 측정만으로는 알 수 없으므로 직접 생균수를 측정하여 균의 생사여부를 확인하였다. 그 결과 0.05% polyphosphate를 첨가한 액체배지에서는 생균수가 크게 감소하였는데, 이것은 polyphosphate가 *Prevotella intermedia*에 대해 살균효과를 가지고 있음을 보여주는 것이다.

사슬길이와 항균효과 정도의 관계에 대해서는 각기 상반된 의견이 공존하고 있다. Sofos (1986)⁵⁰⁾는 사슬길이가 긴 polyphosphate가 짧은 것보다 Ca^{2+} , Mg^{2+} 과 같은 금속 양이온과 킬레이션이 더 잘 된다고 보고한 반면, Irani와 Callis(1962)⁵¹⁾는 사슬길이가 짧은 것이 더 효과적이라고 하였다. 본 실험에서는 사슬길이가 짧아지거나 길어질 때 항균효과가 일정하게 증가 또는 감소되지는 않았고, 다만 사슬길이 5와 65에서 세균성장 억제효과가 가장 높게 나타났다. 이러한 사실로 미루어 보아 세균종류나 실험조건이 달라지면 사슬길이에 따른 polyphosphate의 성장 억제효과도 다르게 나타난다고 여겨진다.

Polyphosphate의 세균용해능 검사에서는 3.4 mM의 EDTA(pH8.0)를 사용하였는데, EDTA는 세포벽내의 금속 양이온을 제거하는 강한 킬레이터로 알려져 있다. 본 실험에 사용된 EDTA 농도와 수소이온농도는 Lee 등(1994)⁴⁹⁾의 실험에 따

른 것이다. 유리된 핵산량을 비교해 보면, polyphosphate를 첨가한 경우가 EDTA 용액보다는 그 양이 적으나 생리식염수보다는 많았다. 이는 *Prevotella intermedia*가 polyphosphate에 의해 용해되었음을 의미한다. Knabel 등(1991)⁴⁴⁾에 의하면 polyphosphate를 첨가했을 때에는 EDTA 첨가시와 비슷한 양상으로 나타난다고 하였으나, 본 연구에서는 polyphosphate를 첨가했을 때의 핵산 유리량이 EDTA보다 약간 더 적었다. 또 EDTA 첨가시 유리되는 핵산량만을 다른 연구들^{44,45)}과 비교해 보아도 그 양이 현저하게 적었다. 따라서 *Prevotella intermedia*에 대한 polyphosphate의 용해는 다른 그람 양성 세균에서처럼 킬레이션에 의해 세균이 용해되는 것 같지는 않으며, 아직 알려지지 않은 어떠한 다른 기전에 의한 것으로 보인다.

본 실험에서 polyphosphate가 그람 음성 세균인 *Prevotella intermedia*에 대하여 항균효과가 있음을 확인하였으며, 이러한 과정을 통해 polyphosphate를 수산화칼슘과 같은 근관세척제로 사용하거나 치태형성억제제, 농양을 가진 치주낭 소독시 다른 화학적 항생제를 대신하여 사용할 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 치과임상에 실제로 적용하기 위해서는 약품 제조방법이나 상업적인 측면에서 보다 폭넓은 연구가 선행되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구는 polyphosphate가 *Prevotella intermedia*의 성장에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 *Prevotella intermedia*의 성장유도기와 대수증식기에 polyphosphate를 첨가하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Polyphosphate는 *Prevotella intermedia*에 대하여 항균효과가 있었다.
2. *Prevotella intermedia*에 대한 polyphosphate의 최소성장억제농도(MIC)는 0.05%이었다.
3. *Prevotella intermedia*의 항균효과는 polyphosphate의 사슬길이 5와 65에서 가장 크게 나타났다.
4. *Prevotella intermedia*에 대한 polyphosphate의 항균효과는 살균작용에 의한 것이다.
5. Polyphosphate는 *Prevotella intermedia*의 용해를

유도하여 세포내 핵산을 유리시켰다.

이상의 결과로 미루어 볼 때 polyphosphate는 *Prevotella intermedia*에 대해 직접적인 살균효과가 있었으며, *Prevotella intermedia*에 대한 polyphosphate의 용해능력은 이러한 살균효과를 반영하는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Spangberg L.S.W. : Experimental endodontics, p132, In CRC Press, Inc., 1990.
2. Miller W.D. : Microorganisms of the human mouth, S.S. White Dental Co., Philadelphia, 1890.
3. Henrici A.T. and Hartzell T.B. : The bacteriology of vital pulp. Res. J., 1:419-422, 1919 (cited from the reference No.7).
4. Kakehashi S., Stanley H.R. and Fitzgerald R.J. : The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats, Oral Surg., Oral Med. and Oral Pathol., 20:340-349, 1965.
5. Zavistoski J., Dzink J.B.S., Onderdonk A. and Bartlett J. : Quantitative bacteriology of endodontic infections, Oral Surg., 49:171-174, 1980.
6. Griffe M.B., Patterson S.S., Miller C.H., Kafrawy A.H. and Newton C.W. : The relationship of *Bacteroides melaninogenicus* to symptoms associated with pulpal necrosis, Oral Surg., 50:457-461, 1980.
7. Dahl n G. and Moller A.J.R. : Microbiology of endodontic infections, p444-475, In J. Slots and M.A. Taubman (ed.), Contemporary oral microbiology and Immunology, Mosby-Year book, Inc., St. Louis, 1992.
8. Haapasalo M. : Black-pigmented gram-negative anaerobes in endodontic infections, FEMS Immunol. Med. Microbiol., 6:213-218, 1993.
9. Baumgartner C. and Falkler W.A. : Bacteria in the apical 5mm of infected root canals, J. Endodon., 17:380-383, 1991.
10. Sundqvist G. : Bacteriological studies of necrotic dental pulps. Thesis. Ume University, Odontology, Dissertation No.7, 1976.
11. Hashioka K., Yamasaki M., Nakane A., Horiba N. and Nakamura H. : The relationship between clinical symptoms and anaerobic bacteria from infected root canals, J. Endodon., 18:558-561, 1992.
12. Haapasalo M. : *Bacteroides* spp. in dental root canal infections, Endod. Dent. Traumatol., 5:1-10, 1989.
13. Massey W.L.K., Romberg D.M., Hunter N. and Hume W.R. : The association of carious dentin microflora with tissue changes in human pulpitis, Oral Microbiol. Immunol., 8:30-35, 1993.
14. Tanner A. and Stillman N. : Oral and dental infections with anaerobic bacteria: clinical features, predominant pathogens and treatment, Clin. Infect. Dis., 16(Suppl 4):S304-S309, 1993.
15. Assed S., Ito I.Y., Leonardo M.R., Silva L.A.B. and Lopatin D.E. : Anaerobic microorganisms in root canals of human teeth with chronic apical periodontitis detected by indirect immunofluorescence. Endod. Dent. Traumatol., 12:66-69, 1996.
16. Haapasalo M., Ranta H., Ranta K. and Shah H. : Black-pigmented *Bacteroides* spp. in human apical periodontitis, Infect. and Immun., 53:149-153, 1986.
17. Sundqvist G., Johansson E. and Sj gren U. : Prevalence of black-pigmented *Bacteroides* species in root canal infections, J. Endodon., 15:13-19, 1989.
18. Sundqvist G. : Associations between microbial species in dental root canal infections, Oral Microbiol. Immunol., 7:257-262, 1992.
19. Barnett F., Stevens R. and Tronstad L. : Demonstration of *Bacteroides intermedius* in periapical tissue using indirect immunofluorescence microscopy, Endod. Dent. Traumatol., 6:153-156, 1990.
20. Attebery H.R., Kimura J.T. and Carroll G.W. :

- An acute anaerobic infection following endodontic treatment. *J. Endodon.*, 6:793-795, 1980.
21. 치주과학 교수협의회 : 치주과학. p244-266, 군자출판사, 1996.
 22. Bollen C.M.L. and Quirynen M. : Microbiological response to mechanical treatment in combination with adjunctive therapy. A review of the literature. *J. Periodontol.*, 67:1143-1158, 1996.
 23. Christersson L.A., Fransson C.L., Dunford R.G. and Zambon J.J. : Subgingival distribution of periodontal pathogenic microorganisms in adult periodontitis. *J. Periodontol.*, 63:418-425, 1992.
 24. Raber-Durlacher J.E., van Steenberghe T.J.M., van der Velden U., de Graaff J. and Abraham-Inpijn L. : Experimental gingivitis during pregnancy and post-partum:clinical, endocrinological and microbiological aspects. *J. Clin. Periodontol.*, 21:549-558, 1994.
 25. van der Weijden G.A., Timmerman M.F., Reijerse E., Wolffe G.N., van Winkelhoff A.J. and van der Velden U. : The prevalence of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *P. intermedia* in selected subjects with periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, 21(9):583-588, 1994.
 26. Kamma J.J., Nakou M. and Manti F.A. : Predominant microflora of severe, moderate and minimal periodontal lesions in young adults with rapidly progressive periodontitis. *J. Periodont. Res.*, 30:66-72, 1995.
 27. Teanpaisan R., Douglas C.W.I. and Walsh T.F. : Characterisation of black-pigmented anaerobes isolated from diseased and healthy periodontal sites. *J. Periodont. Res.*, 30:245-51, 1995.
 28. Lopez N.J., Mellado J.C., Giglio M.S. and Leighton G.X. : Occurrence of certain bacterial species and morphotypes in juvenile periodontitis in Chile. *J. Periodontol.*, 66:559-567, 1995.
 29. Lie M.A., Danser M.M., van der Weijden G.A., Timmerman M.F., de Graaff J. and van der Velden U. : Oral microbiota in subjects with a weak or strong response in experimental gingivitis. *J. Clin. Periodontol.*, 22:642-647, 1995.
 30. Lopez N.J., Mellado J.C. and Leighton G.X. : Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in juvenile periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, 23:101-105, 1996.
 31. Yoshida-Minami I., Suzuki A., Kawabata K., Okamoto A., Nishihara Y., Minami T., Nagashima S., Morisaki I. and Ooshima T. : Alveolar bone loss in rats infected with a strain of *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium nucleatum* isolated from a child with prepubertal periodontitis. *J. Periodontol.*, 68:12-17, 1997.
 32. Ashley F.P., Gallagher J. and Wilson R.F. : The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and spirochaetes in the subgingival microflora of adolescents and their relationship with the amount of supragingival plaque and gingivitis. *Oral Microbiol. Immunol.*, 3:77-82, 1988.
 33. Zimmer W., Wilson M., Marsh P.D., Newman H.N. and Bulman J. : *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the plaque of children without periodontitis. *Microbial Ecology in Health and Dis.*, 4:329-336, 1991.
 34. Ong E.S.M., Newman H.N., Wilson M. and Bulman J.S. : The occurrence of periodontitis related microorganisms in relation to titanium implants. *J. Periodontol.*, 63:200-205, 1992.
 35. Leonhardt A., Adolfsson B., Lekholm U., Wikström M. and Dahlén G. : A longitudinal microbiological study on osseointegrated titanium implants in partially edentulous patients. *Clin. Oral Impl. Res.*, 4:113-120, 1993.
 36. Shordone L., Barone A., Ramaglia L., Ciaglia R.N. and Iacono V.J. : Antimicrobial susceptibility of periodontopathic bacteria associated with failing implants. *J. Periodontol.*, 66: 69-74, 1995.

37. Becker W., Becker B.E., Newman M.G. and Nyman S. : Clinical and microbiological findings that may contribute to dental implant failure, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 5:31-38, 1990.
38. Machtei E.E., Grossi S.G., Dunford R., Zambon J.J. and Genco R.J. : Long-term stability of Class II furcation defects treated with barrier membranes, *J. Periodontol.*, 67:523-527, 1996.
39. Fritz M.E., Eke P.I., Malmquist J. and Hardwick R. : Clinical and microbiological observations of early polytetrafluoroethylene membrane exposure in guided bone regeneration. Case reports in primates, *J. Periodontol.*, 67:245-249, 1996.
40. Kulaev I. S. : The biochemistry of inorganic polyphosphates. In John Wiley and Sons, Inc., New York, 1979.
41. Wood H.G. and Clark J.E. : Biological aspects of inorganic polyphosphates, *Ann. Rev. Biochem.*, 57:235-260, 1988.
42. Kornberg A. : Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable, *J. Bacteriol.*, 177(3):491-496, 1995.
43. Jen C.M.C. and Shelef L.A. : Factors affecting sensitivity of *Staphylococcus aureus* 196E to polyphosphates, *Appl. and Environ. Microbiol.*, 52(4):842-846, 1986.
44. Knabel S.J., Walker H.W. and Hartman P.A. : Inhibition of *Aspergillus flavus* and selected gram-positive bacteria by chelation of essential metal cations by polyphosphates, *J. Food Prot.*, 54(5):360-365, 1991.
45. Lee R.M., Hartman P.A., Stahr H.M., Olson D.G. and Williams F.D. : Antibacterial mechanism of long-chain polyphosphates in *Staphylococcus aureus*, *J. Food Prot.*, 57(4):289-294, 1994.
46. Shibata H. and Morioka T. : Antibacterial action of condensed phosphates on the bacterium *Streptococcus mutans* and experimental caries in the hamster, *Archs Oral Biol.*, 27:809-816, 1982.
47. Lee J.Y., Sojar H.T., Bedi G.S. and Genco R.J. : *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* fibrillin: size, amino-terminal sequence and antigenic heterogeneity, *Infect. and Immun.*, 59:383-389, 1991.
48. Miyake Y., Tsuruda K., Okuda K., Widowati, Iwamoto Y. and Suginata H. : In vitro activity of tetracyclines, macrolides, quinolones, clindamycin and metronidazole against periodontopathic bacteria, *J. Periodont. Res.*, 30:290-293, 1995.
49. Mombelli A., Tonetti M., Lehmann B. and Lang N.P. : Topographic distribution of black-pigmenting anaerobes before and after periodontal treatment by local delivery of tetracycline, *J. Clin. Periodontol.*, 23:906-913, 1996.
50. Sofos J.N. : Use of phosphates in low-sodium meat products, *Food Technol.*, 40(9):52-68, 1986.
51. Irani R.R. and Callis C.F. : Calcium and magnesium sequestration by sodium and potassium phosphates, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 39:156-159, 1962.