

치주병원균에 대한 유산균의 억제효과

정하나 · 오종석 · 김영준 · 정현주

전남대학교 치과대학 치주과학교실

전남대학교 의과대학 미생물학교실

전남대학교 치의학 연구소

I. 서론

치주질환은 임상적으로 치은출혈과 종창, 치주낭의 형성 및 치조골의 파괴 등의 다양한 증상을 나타내며, 치아상실의 주된 원인이 되고 있다¹⁾. 이의 원인으로서는 세균성 치태와 세균대사 산물을 들 수 있으며 특히 치은연하 치태 세균이 주로 관여한다고 알려져 있다²⁾.

치주질환의 병인에 있어 치태내 특이 미생물이 중요한 원인으로 여겨지고 있다. 구강내 존재하는 혐기성 세균 중 black pigmented bacteroides인 *Porphyromonas gingivalis*(*P. gingivalis*)와 *Prevotella intermedia*는 치주질환의 심도와 정비례하고 성인형 및 급속진행형 치주염의 치주낭 내에서 높은 발현빈도를 나타내는 것으로 보고되고 있다³⁾. 또한 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*(*A. actinomycetemcomitans*)는 국소 유년형 치주염과 관련이 있으며, 급속진행형 치주염과 난치성 치주염과도 관계가 있을 것으로 보고되고 있다^{4,6)}.

그러므로 Wennstrom 등⁷⁾은 이러한 세균의 치주낭내 증가 및 감소가 치주질환의 조기진단, 예방 및 예후에 중요한 인자가 된다고 하였으며, 이들 세균의 소실로 계속적인 질환의 진행이 일어나지 않는다는 예견을 할 수 있다고 하였다. 따라서 치주질환의 치료는 이러한 세균의 제거가 주목적이 되었고, 치은연

하에 존재하는 치주질환 원인균주를 조절하기 위한 많은 방법들이 사용되고 있다.

그중 치환요법을 이용한 치주질환 예방의 가능성에 대한 연구가 있었다⁸⁻¹²⁾. 이러한 치환요법은 수년 전 국소 유년형 치주염의 연구에서 처음 시작되었다⁹⁾. Hillman 등¹⁰⁾의 연구에 따르면 국소 유년형 치주염과 난치성 치주염의 주된 원인균인 *A. actinomycetemcomitans*에 효과적인 억제 균주로 *Streptococcus sanguis*와 *Streptococcus uberis*를 제시하였다. In vitro 실험에서 이들 streptococci는 과산화수소를 생성하여 *A. actinomycetemcomitans*와 다른 치주병원균의 증식을 억제한다고 하였다. 그러나 이들 균주를 이용한 치환요법을 구강내에 적용시키는데는 점종의 실패와 지속적인 집락 형성을 얻는데 어려움이 있어 보다 실제적으로 사용이 가능한 억제균주의 개발이 필요하였다⁸⁾.

본 연구에서는 건강한 어린이의 타액에서 추출한 유산균인 *Lactobacillus acidophilus*(*L. acidophilus*) V-20을 억제균주로 사용하였다. *L. acidophilus* V-20은 호기성 및 혐기성 상태에서도 과산화수소를 분비하는 유산균으로, 이 과산화수소가 *A. actinomycetemcomitans*와 black pigmented bacteroides의 억제에 작용할 수 있으리라 추측되었다.

이에 본 연구는 *L. acidophilus* V-20을 이용하여 치주질환의 주요 원인균인 *A. actinomycetemcomitans*

와 black pigmented bacteroides의 억제효과를 조사하고자 하였다. 또한 이들 치주병원균에 대한 구강내 상주균인 *S. mutans*, 과산화수소를 생성치 않는 유산균인 *Enterococcus durans*(*E. durans*), *Lactococcus lactis*(*L. lactis*), *Lactobacillus casei*(*L. casei*)의 효과도 비교 관찰하였다. 그리고, *L. acidophilus* V-20으로 만든 발효유를 유지관리단계의 치주질환자에게 구강내 흡수시켰을 때 임상적 변화 및 치은연하 치태세균인 *A. actinomycetemcomitans*와 black pigmented bacteroides에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. In Vitro

(1) 공시세균 배양

Actinobacillus actinomycetemcomitans(ATCC 33384, Rockville, MA, USA), *Porphyromonas gingivalis*(ATCC 33277, Rockville, MA, USA), *Streptococcus mutans* serotype c(Ingbritt strain), *Enterococcus durans*(KCTC 0360BP), *Lactococcus lactis*(KCTC 0415BP), *Lactobacillus acidophilus* V-20(KCTC 0361BP), *Lactobacillus casei* (ATCC 393)를 공시하였으며, *L. acidophilus* V-20과 *L. casei* 배양은 MRS (Difco, Detroit, MI, USA) broth에, 그 외 균들은 Brain Heart Infusion (BHI, Difco, Detroit, MI, USA) broth에 접종하여 배양하였다.

(2) *A. actinomycetemcomitans*와 *S. mutans*, *E. durans*, *L. lactis*와의 상호 작용

*A. actinomycetemcomitans*와 각 균을 0.5% 효모 추출물(yeast extract)을 첨가한 BHI broth에서 24시간 배양 후 각 균주 단독과 *A. actinomycetemcomitans*를 혼합하여 18시간 배양하였다. 생균수 산정을 위해서 *A. actinomycetemcomitans*는 75 μ g/ml bacitracin과 5 μ g/ml vancomycin, 0.5% 효모 추출물이 첨가된 BHI agar 배지에서, 다른 균주는 0.5% 효모 추출물이 첨가된 BHI agar 배지에서 각각 배양되었다.

(3) *A. actinomycetemcomitans*와 *L. acidophilus* V-20과의 상호 작용

*A. actinomycetemcomitans*와 *L. acidophilus* V-20을 각각 0.5% 효모 추출물이 첨가된 BHI broth 3.6 ml와 MRS broth 0.4 ml를 혼합한 배지(BY/MRS 배지)에서 24시간 배양 후 각 균주 단독과 *A. actinomycetemcomitans*와 *L. acidophilus* V-20을 혼합하여 18시간 배양하였다. 생균수 산정을 위해서 *A. actinomycetemcomitans*는 75 μ g/ml bacitracin과 5 μ g/ml vancomycin이 첨가된 BY/MRS agar 배지에서, *L. acidophilus* V-20은 BY/MRS agar 배지에서 각각 배양되었다.

(4) *P. gingivalis*와 *S. mutans*, *E. durans*, *L. lactis*와의 상호 작용

*P. gingivalis*와 각 균을 5 μ g/ml hemin 및 5 μ g/ml vitamin K가 포함된 BHI broth에서 24시간 배양 후 각 균주 단독과 *P. gingivalis*를 혼합하여 18시간 배양하였다. 생균수 산정을 위해서 3% 면양혈액과 5 μ g/ml hemin 및 5 μ g/ml vit.K가 첨가된 BHI agar 배지에서 각각 배양되었다.

(5) *P. gingivalis*와 *L. casei*, *L. acidophilus* V-20과의 상호 작용

과산화수소를 생성하는 *L. acidophilus* V-20과 과산화수소를 생성하지 못하는 *L. casei*를 비교하였다. *P. gingivalis*와 각 균을 5 μ g/ml hemin 및 5 μ g/ml vit.K가 첨가된 BHI broth 3.7ml와 MRS broth 0.3ml가 혼합된 배지에서 24시간 배양 후 각 균주 단독과 *P. gingivalis*를 혼합하여 18시간 배양하였다. 생균수 산정을 위해 *P. gingivalis*는 3% 면양혈액과 5 μ g/ml hemin 및 5 μ g/ml vit.K가 첨가된 BHI agar 배지에서, *L. acidophilus* V-20과 *L. casei*는 MRS agar 배지에서 각각 배양되었다.

2. In Vivo

(1) 연구대상

전남대학교병원 치주과를 내원한 환자 중 6mm이

상의 치주낭을 가진 진행된 치주질환자 중 치주치치 후 6개월 이상이 된 유지관리단계에 있는 환자 3인을 대상으로 하였다. 모든 대상자들은 전신질환이 없고 최근 3개월 이내에 항생제를 복용한 경험이 없는 환자를 대상으로 하였다.

(2) 발효유 제조

발효유는 멸균시유(135℃에서 5초간 멸균)에 MRS broth에서 배양된 *L. acidophilus* V-20을 10% 농도로 접종하여 37℃ 탄산가스 배양기에서 24시간 배양한 후, 이 배양액을 멸균시유에 최종 농도가 10%가 되도록 재접종한 다음 24시간 배양하여 사용하였다.

(3) 연구방법

실험 2주전 철저한 구강위생관리 교육과 함께 치면세마를 실시하였다. 실험 대상 부위는 잔존 치주낭 깊이가 4mm 이상인 부위를 선정하였다. 실험전 각 환자의 대상 부위에서 baseline의 임상 및 세균 검사를 실시하였다. 발효유를 4주간 하루 60cc씩 3회 60초간 흡수시킨 후 4주째 임상 및 세균 검사를 실시하였다.

임상검사로는 각 환자의 실험 대상 부위에서 치은 열구액량, 치은지수, 치주낭 깊이를 측정하였다. 치은의 염증 정도는 치은지수(Loe and Silness Gingival Index)¹¹⁾를 이용하여 실험 대상 부위에서 측정하였다. 치주낭 깊이의 측정은 정압탐침(Borodontic constant force probe, 20gm)을 각 대상 부위의 치주낭내 삽입 방향 및 위치를 일정하게 하여 0.5mm까지 계측하였다. 치은 열구액의 측정은 Periopaper strip(Pro Flow Inc., Amityville, New York, USA)을 실험 대상 부위에 20초간 삽입 후 Periotron 6000(Pro Flow Inc., Amityville, New York, USA)을 이용하여 측정하였다.

세균 검사는 실험대상 부위의 치은연하 치태세균을 배양하여 실시하였다. 검사부위의 치은연상치태를 조심스럽게 제거하고 방습한 후, #35 paper point(Diamond Dental Co, Ltd, Chon Ju, Korea) 2개를 저항감이 느껴질 때까지 치은연하로 삽입하고 30초 후 빼내어 glass beads를 함유한 2ml의 소독된

Moller's VMGA III transport medium¹²⁾이 들어있는 시험관에 옮겨 넣고 교반기로 60초간 균일하게 혼합하였다. 그 후 80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂가 들어있는 37℃ 혐기성 배양기 안에서 VMGA III dispersion액을 이용하여 10배 단계로 희석하여 세균의 종류에 따라 다음과 같은 방법을 시행하였다.

① Total colony forming unit

100 μ l의 희석용액을 5% 면양혈액을 첨가한 blood agar plate에 옮겨 7일간 배양 후 전체 세균수를 계수하였다.

② Black pigmented bacteroides

100 μ l의 희석용액을 5% 면양혈액, hemin, vit.K가 첨가된 blood agar plate에 접종하여 혐기성 세균배양기에서 37℃ 상태로 7일간 배양한 후 black pigmented bacteroides 수를 계수하였다.

③ *A. actinomycetemcomitans* colony

100 μ l의 희석용액을 *A. actinomycetemcomitans*를 위한 선택배지인 TSBV(Tryptic soy agar + 10% horse serum + 75 μ g/ml bacitracin + 5 μ g/ml vancomycin) agar 배지¹³⁾에 접종하여 37℃ 탄산가스 배양기에서 배양하였다. 3-5일 후 배지상의 집락형대를 검사한 후 세균집락을 계수하였다. *A. actinomycetemcomitans*는 한천에 부착된 작고 둥글며 불룩하고 별모양의 내부구조를 가진 집락형태와 catalase 반응에 양성인 그람 음성균으로 확인하여 구별하였다.

배양된 세균의 수는 배지상의 각 세균 종의 집락수를 희석된 배수로 곱하여 계산하였다.

(4) 통계 처리

임상지수와 세균 수의 baseline과 4주째 간의 차이는 student's t-test를 이용하여 비교하였으며 통계학적 유의성은 p value가 0.05 이하인 경우로 하였다.

III. 연구성적

1. In Vitro

(1) *A. actinomycetemcomitans* 증식에 미치는 영향
*E. durans*와 *A. actinomycetemcomitans*의 혼합 배

양에서 *A. actinomycetemcomitans* 생균수가 단독 배양시 ml 당 4×10^9 개에서 혼합배양시에는 2.2×10^8 개로 미약한 감소를 보였다(Figure 1b). *S. mutans*, *L. lactis*와 *A. actinomycetemcomitans*의 혼합 배양시를 단독 배양과 비교하였을 때 *A. actinomycetemcomitans*의 생균수가 단독 배양시 ml 당 4×10^9 개에서 혼합 배양시에는 1.16×10^9 개, 5.0×10^9 개로 거의 영향을 미치지 않았다(Figure 1a, c). 그러나 *L. acidophilus* V-20과의 혼합 배양에서는 *A. actinomycetemcomitans* 생균수가 단독 배양시 ml 당 $3.5 \times$

10^7 개에서 혼합배양시에는 전혀 증식되지 않아 큰 감소를 보였다(Figure 1d).

(2) *P. gingivalis* 증식에 미치는 영향

E. durans, *L. lactis*와의 혼합 배양시 *P. gingivalis* 생균수는 단독 배양시 ml 당 1.36×10^9 개에서 혼합 배양시에는 5.0×10^7 개, 4.0×10^6 개로 약간의 감소를 보였다(Figure 2b, c, Figure 3). 그러나 *S. mutans*와 *L. acidophilus* V-20과의 혼합 배양시에는 단독 배양시와 비교할 때 전혀 증식되지 않아 큰 감소를 보였

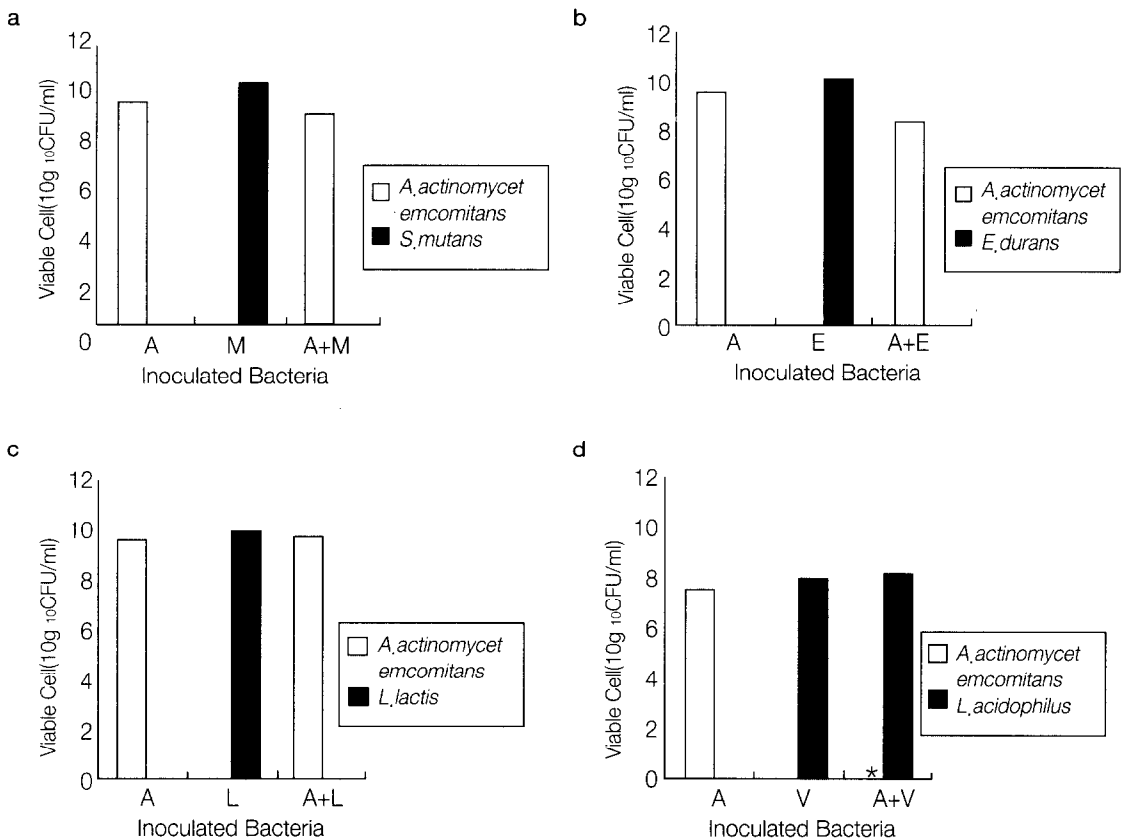


Figure 1(a-d). The cell concentration of *A. actinomycetemcomitans*, *S. mutans*, *E. durans*, *L. lactis*, *L. acidophilus* V-20 in the culture of *A. actinomycetemcomitans* and /or *S. mutans*, *E. durans*, *L. lactis*, *L. acidophilus* V-20.

A: *A. actinomycetemcomitans* only, M: *S. mutans* only, A+M: *A. actinomycetemcomitans*+*S. mutans* mixed, E: *E. durans* only, A+E: *A. actinomycetemcomitans*+*E. durans* mixed, L: *L. lactis* only, A+L: *A. actinomycetemcomitans*+*L. lactis* mixed, V: *L. acidophilus* V-20 only, A+V: *A. actinomycetemcomitans*+*L. acidophilus* V-20 mixed.

* : no growth

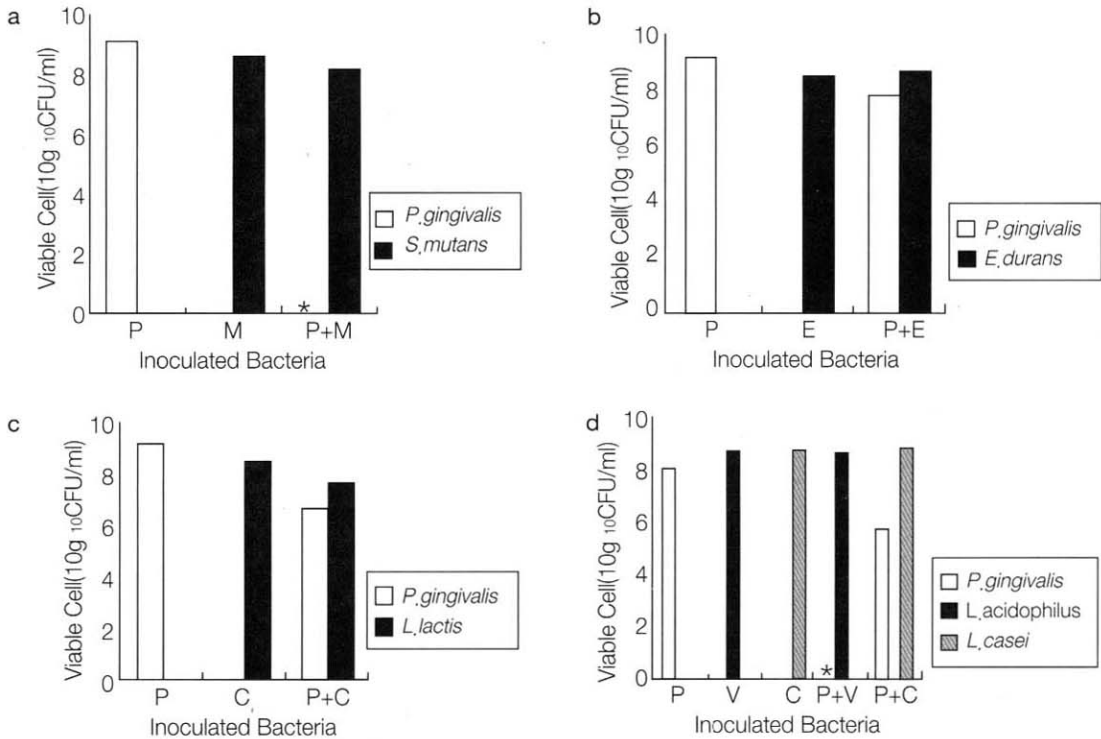


Figure 2(a-d). The cell concentration of *P. gingivalis*, *S. mutans*, *E. durans*, *L. lactis*, *L. acidophilus* V-20, *L. casei* in the culture of *P. gingivalis* and /or *S. mutans*, *E. durans*, *L. lactis*, *L. acidophilus* V-20, *L. casei*. P: *P. gingivalis* only, M: *S. mutans* only, P+M: *P. gingivalis*+*S. mutans* mixed, E: *E. durans* only, P+E: *P. gingivalis*+*E. durans* mixed, L: *L. lactis* only, P+L: *P. gingivalis*+*L. lactis* mixed, V: *L. acidophilus* V-20 only, P+V: *P. gingivalis*+*L. acidophilus* V-20 mixed, C: *L. casei*, P+C: *P. gingivalis*+*L. casei* mixed. *: no growth

다 (Figure 2a, Figure 4). 또한 과산화수소를 생성하지 못하는 *L. casei*와의 혼합 배양시 ml 당 9.6×10^7 개에서 5.2×10^5 개로 약간의 감소만이 관찰되었으나, 과산화수소를 생성하는 *L. acidophilus* V-20과의 혼합 배양시에는 전혀 증식하지 않아 단독 배양시의 ml 당 9.6×10^7 개에서 큰 감소를 보여 과산화수소의 효과를 관찰할 수 있었다(Figure 2d).

2. In Vivo

(1) 임상검사

L. acidophilus V-20으로 만든 발효유의 효과를 보기 위해 유지관리단계에 있는 치주질환자 3인에게 하

루 3회, 4주간 구강내 흡수시킨 후 4mm이상의 치주낭 깊이를 보이는 9부위에서 임상지수를 측정하여 baseline과 비교하였다. 치주낭 깊이는 5부위에서 감소, 1부위에서 증가를 보였으며, 3부위에서 변화가 없었다. 치은열구액량은 2부위에서 증가, 7부위에서 감소하였다. 치은지수는 5부위에서 감소를 보였으며, 4부위에서 변화가 없었다. 또한 치은열구액량만이 baseline과 비교시 유의성 있는 감소를 보였으며 ($p < 0.05$), 치주낭 깊이와 치은지수에는 유의성 있는 차이를 보이지 않았다(Table 1).

(2) 세균 검사

치은연하 치태세균에서 *A. actinomycetemcomi-*

Table 1. Clinical recording at baseline and at 4 weeks following gargling with fermented milk made from *L. acidophilus* V-20 for 1 month; mean and standard deviation; N=9

Clinical recording	Baseline	4 weeks
GCF	72.7±30.2	42.0±38.2*
Probing depth(mm)	5.0±0.8	4.61±1.24
Gingival index	2.0	1.0

* p<0.05 for differences between baseline and 4 weeks.

Table 2. Viable cell number(log10CFU/ml) of microorganisms at baseline and 4 weeks following gargling with fermented milk made from *L. acidophilus* V-20 for 1 month; mean and standard deviation; N=9

Microorganism	Baseline	4 weeks
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	1.924±1.27	0.743±1.38*
Black pigmented bacteroides	3.22±1.4	1.28±1.34*
Total viable cell	5.190±0.949	5.557±0.493

* p<0.05 for differences between baseline and 4 weeks.

*tans*와 black pigmented bacteroides의 생균수를 baseline과 비교하였다. *A. actinomycetemcomitans* 생균수는 6부위에서 감소를, 1부위에서 증가를 보였다. black pigmented bacteroides의 생균수는 7부위에서 감소를, 1부위에서 증가를 보였으며, 1부위에서 변화가 없었다. 총 생균수의 변화는 6부위에서 증가를, 3부위에서 감소를 보였다. 총 생균수만이 통계학적으로 차이가 없었으며, *A. actinomycetemcomitans*

와 black pigmented bacteroides는 유의성 있게 감소하였다(p<0.05)(Table 2).

IV. 총괄 및 고찰

여러 연구에서 구강 질환을 예방하기 위한 치환요법의 유용성이 보고되었다¹⁴⁻¹⁷. 이들 연구의 기본 개념은 균 자체가 질환을 유발하지 않고 특정 병원균에 대한 감염에 보다 민감하게 반응하여 숙주가 이

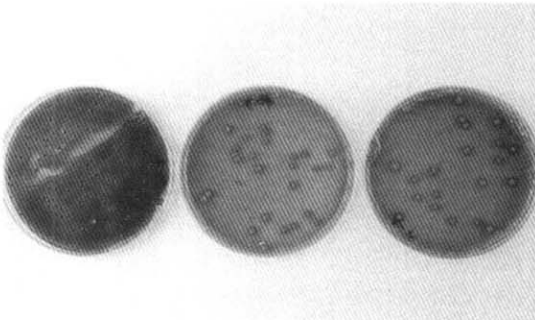


Figure 3. Effect of *E. durans* on the replication of *P. gingivalis*. Left: *P. gingivalis* only, Right: *E. durans* only, Center: Mixed *P. gingivalis* with *E. durans*, Counting was done on BHI agar plate contained 5 μ g/ml hemin and 5 μ g/ml vit.K.

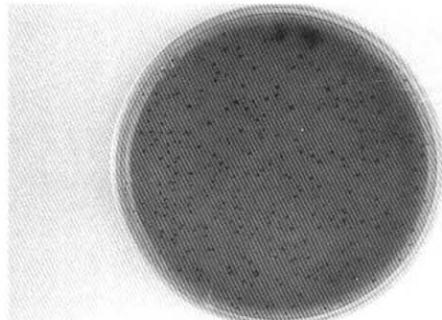


Figure 4. Effect of *S. mutans* on the replication of *P. gingivalis*. Mixed culturing of *S. mutans* and *P. gingivalis* was done on BHI broth contained 5 μ g/ml hemin and 5 μ g/ml vit.K. *P. gingivalis* was not replicated at all.

러한 병원균에 노출되었을 때 이의 감염을 방지하는 세균 즉, "effector strain" 을 사용하는 것이다²⁸).

치주 영역에서 치환요법을 적용시키는 것은 1982년 Hillman과 Socransky²⁸⁻²⁹의 국소 유년형 치주염의 연구에서부터 시작되었으며, 난치성 치주염에도 이용되었다. *A. actinomycetemcomitans*는 유년형 치주염의 주된 원인균으로 알려져 있는데 유년형 치주염 환자의 병소에서 전체 세균의 70%이상의 높은 비율로 나타난다¹⁸). Hirschfeld¹⁹), Haffajee²⁰)과 Lundstrom²¹)의 보고와 같이 적절한 치료와 철저한 구강위생교육에도 불구하고 치주낭에서 결합조직의 부착이 소실되고 치조골 높이가 감소하는 질환이 재발할 수 있으며, 이러한 부위에서는 *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *B. forsythus*, *S. intermedius*, *P. micros*, *F. nucleatum*, *W. recta*등이 주로 배양된다²²⁻²³). 치주치치 후 치은연하 치태내 치주병원균의 재집락하는 염증의 재발과 지속적인 부착소실을 가져오기 때문에 치주병원균의 재집락화를 예방할수 있는 치료방법에 관심이 모아지고 있다.

Hillman²⁹)은 건강한 사람과 국소 유년형 치주염을 가진 환자의 제1대구치 부위에서 치은연하 치태 표본을 채취하여 관찰한 결과, 건강한 부위에서는 *A. actinomycetemcomitans*의 증식을 억제하는 세균이 존재하고 있다고 보고하였다. 따라서 국소 유년형 치주염 환자의 병소 부위에서는 이러한 세균이 존재하지 않았고 국소 유년형 치주염 환자라도 임상적으로 건강한 부위에서 채취한 치태에서는 건강한 사람에서 채취한 것과 유사한 억제세균이 존재한다고 보고하였다. 또한 국소 유년형 치주염 환자에서와 유사하게 난치성 치주염 환자의 병소에서 이러한 억제세균을 거의 볼 수 없었다고 보고하였다.

Hillman¹⁰)은 *A. actinomycetemcomitans*의 증식을 억제하는 균을 건강한 치주조직으로부터 얻은 치태에서 동정하였는데, 그 균들은 *Streptococcus sanguis*와 *Streptococcus uberis*였으며 이들 세균에 의한 *A. actinomycetemcomitans*의 억제는 과산화수소의 생성에 있다고 하였다.

이러한 보고를 배경으로 *A. actinomycetemcomi-*

*tans*와 *S. sanguis* 사이의 강한 억제관계가 건강한 부위와 병소의 치태를 배양한 연구에서 밝혀졌다²⁴⁻²⁵).

Westergren²⁶)과Svanberg²⁷)은 건강한 사람의 구강에 *S. sanguis*를 접종하는데 성공하였다고 보고하였다. 그러나 이 연구에서 *S. sanguis*는 접종 후 점차 감소하여 5주째에는 거의 사라졌는데, 이러한 결과는 특히 난치성 치주염 환자의 경우 두드러졌다. 이렇게 *S. sanguis* 집락 형성에 실패한 원인으로는 *A. actinomycetemcomitans*나 다른 치주병원균들이 bacteriocin을 생성하여 *S. sanguis*의 증식을 억제하기 때문이라고 하였다²⁸⁻²⁹). 따라서 치주질환을 예방하고 치료하기 위해 치환요법을 적용시에는 보다 효과적인 억제균을 개발할 필요성이 대두되었다.

세균 간의 상호작용은 세균의 성장을 억제 혹은 촉진하는 방향으로 일어날 수 있기 때문에 구강내 세균의 집락 형성 및 세균 분포의 변화를 일으키는 중요한 요인이 되는데, 치주질환에 관련된 세균은 매우 다양하기 때문에 매우 복잡한 상호작용이 나타날 것으로 생각된다. 이중 상호억제 작용에는 수많은 요인이 관련되어 있으나 그들 요인 중 이미 밝혀진 것은 과산화수소³⁰⁻³¹), 지방산³⁰), bacteriocin³²) 등을 들 수 있다.

이중 과산화수소는 발생기 산소를 방출하는 능력 때문에 중등도의 항균 성질을 지닌다고 알려져 있다³³). 과산화수소의 효과에 대해서는 뚜렷하지는 않으나, 산소분자가 거품으로 방출되면서 치태와 음식물 잔사들을 제거하는 기계적 효과와 그 자체로서의 항균 효과 그리고 국소 조직 손상부위에 산소를 공급함으로써 이로운 화학적 조직 치유 작용 등이 제안되고 있다³⁴). 일부에서는 과산화수소가 세균 내독소의 활성을 억제시킨다는 보고도 있다³⁵). 임상적으로도 과산화수소를 분비하는 합수제를 매 식후 사용하여 치태내의 치주질환 원인균들인 나선균, 사상균, 운동성 간균 등의 증식을 억제하였고 2주간 합수제만을 사용하여도 치태지수와 치은염지수가 현저히 낮아짐을 보고하였다³⁶).

본 연구에서 사용한 *L. acidophilus* V-20은 건강한 어린이의 타액에서 추출한 유산균으로 혐기성 상태에서 과산화수소를 발생하는 것으로 알려졌다. *L.*

acidophilus V-20의 *A. actinomycetemcomitans*와 *P. gingivalis*의 성장억제에 대해 조사하기 위해 단독 및 혼합 배양하였을 때 *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* 단독 배양시에 비해 *L. acidophilus* V-20과 혼합 배양시 *A. actinomycetemcomitans*와 *P. gingivalis*의 증식이 완전히 억제됨을 보였다. 하지만 *A. actinomycetemcomitans*와 *P. gingivalis*가 *L. acidophilus* V-20의 성장을 억제시키지는 못하였다 (Figure 1d, 2d).

*A. actinomycetemcomitans*는 과산화수소에 대한 LD₅₀이 약 1mM 정도로 *S. sanguis*는 1mM 이상의 과산화수소를 발생한다고 하였다³⁷⁾. 최근 in vitro 실험에서 과산화수소를 생성하지 않는 *S. sanguis*의 변이종은 *A. actinomycetemcomitans* 증식을 억제하는 능력이 상실되었다³⁸⁾. Shiver³⁹⁾의 연구에 따르면 쥐의 구강을 *S. sanguis*로 감염시키면 *A. actinomycetemcomitans* 수가 약 25배 정도 감소하였고, 반대로 과산화수소를 생성하지 못하는 *S. sanguis*의 변이종을 사용한 경우에는 *A. actinomycetemcomitans* 수에 변화가 없었다.

L. acidophilus V-20이 *A. actinomycetemcomitans*와 *P. gingivalis*를 억제하는 기전을 알아보기 위해 본 연구에서 과산화수소를 생성하지 않는 유산균인 *L. casei*와 혼합 배양시 *P. gingivalis* 균수에 거의 변화가 없었으나 *L. acidophilus* V-20과의 혼합 배양시는 *P. gingivalis* 증식이 완전히 억제되었음이 관찰되었다(Figure 2d). 이로써 *A. actinomycetemcomitans*와 *P. gingivalis*에 대한 억제작용은 *L. acidophilus* V-20에 의해 분비된 과산화수소 때문인 것으로 여겨진다.

S. mutans, *E. durans*, *L. lactis*와 *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*의 혼합 배양 결과 *P. gingivalis*와 *S. mutans*의 혼합 배양시를 제외하고는 *A. actinomycetemcomitans*와 *P. gingivalis* 생균수에 거의 변화가 없었음을 관찰하였다. Perrot등⁴⁰⁾은 *S. mutans*의 *P. gingivalis* 증식억제 작용이 유산 형성으로 pH가 낮아지는 것에 의한다고 하였다. 일반적으로 *S. mutans*는 포도당이 있는 혐기성 환경조건에서의 대사산물인 유산 생성 증가로 pH가 낮아져 *P.*

*gingivalis*의 증식이 억제된다고 추론할 수 있으나, Donughue등⁴⁰⁾은 당분이 없는 경우 *S. mutans*는 *P. gingivalis* 증식을 억제하는 정도의 산 생성이 되지 않기 때문에 증식 억제와 관련된 과산화수소 생성이나 다른 증식 억제물질에 의한 요인을 고려해야 한다고 하였다.

본 실험에서는 임상적으로 *L. acidophilus* V-20으로 만든 발효유의 효과를 보고자 유지관리단계에 있는 치주질환자에게 하루 1분씩 3회, 4주간 구강내 함수시킨 후 치주낭 깊이가 4mm이상인 부위에서 임상 지수 및 치은연하 치태세균 중 *A. actinomycetemcomitans*와 black pigmented bacteroides의 생균수 변화를 관찰하였다. 치주낭 깊이는 5부위에서 감소하고 치은열구액량은 7부위에서, 치은지수는 5부위에서 감소하였다. 몇 부위에서는 오히려 증가된 곳도 있었는데 이는 구강위생관리능력이 떨어지는 부위와 연관이 있다고 생각되어진다. 또한 치은연하 치태세균에서 *A. actinomycetemcomitans*와 black pigmented bacteroides의 생균수를 baseline과 비교 시 총 9부위 중 *A. actinomycetemcomitans*는 6부위, black pigmented bacteroides는 7부위에서 감소하였다. 세균검사 시에도 *A. actinomycetemcomitans*는 1부위, black pigmented bacteroides는 2부위에서 증가된 수치가 측정되었는데 이는 치주낭이 깊은 부위와 관련하여 발효유가 도달하지 못하였거나 구강위생과 관련하여 임상상태가 좋지 못한 곳과 관계가 있는 듯 보인다. 통계학적으로 baseline과 4주제를 비교하면 치은열구액량과 *A. actinomycetemcomitans*와 black pigmented bacteroides의 생균수는 유의성 있는 감소를 보였으나, 치은지수와 치주낭 깊이, 총 생균수는 별다른 차이를 보이지 않았다.

세균의 상호 억제에는 과산화수소, 지방산, bacteriocin 등과 같은 증식 억제물질 형성 외에도 영양분이나 pH 같은 비교적 간단한 환경적 요인들도 치태내의 세균 분포에 관여하게 된다. 그러나 본 연구의 in vitro 실험에서는 과산화수소 이외의 요인들은 고려하지 않았으므로 또 다른 성장 억제물질이나 요인을 고려해야 할 것으로 보인다. 그러므로 구강내 적용시에는 본 연구의 in vitro 실험에서 고려하지 않은

여러 요인들의 복합적인 작용으로 억제효과가 나타날 것으로 생각된다.

앞으로 치주 영역에서 이러한 치환요법을 적용하기 위해서는 건강한 치주조직에서 질환상태로 변화하는 과정에 관련된 요인과 세균의 증식 억제 및 생태학 분야에 대한 더 많은 연구와 이해가 필요하리라 생각된다.

V. 결론

이 연구는 치주질환의 주요 원인균인 *A. actinomycetemcomitans*와 black pigmented bacteroides에 대한 과산화수소 생성 유산균인 *L. acidophilus* V-20의 효과를 조사하고자 하였다. 이를 위해 *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* 단독 배양과 *L. acidophilus* V-20과의 혼합 배양 후 생균수를 비교하였다. 또한 이들 치주병원균에 대한 구강내 상주균인 *S. mutans*, 과산화수소를 생성하지 않는 유산균인 *E. durans*와 *L. lactis*, *L. casei*의 효과도 관찰하였다.

그리고, *L. acidophilus* V-20으로 만든 발효유를 유지관리단계의 치주질환자에게 구강내 함수시켰을 때 임상적 변화 및 치은연하 치태세균인 *A. actinomycetemcomitans*와 black pigmented bacteroides에 미치는 영향을 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *L. acidophilus* V-20과 *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*의 혼합 배양시 단독 배양에 비해 *A. actinomycetemcomitans*와 *P. gingivalis*의 증식이 완전히 억제되었다.
2. *S. mutans*, *E. durans*, *L. lactis*와 *A. actinomycetemcomitans*의 혼합 배양시 단독 배양에 비해 *A. actinomycetemcomitans* 생균수에는 거의 변화가 없었다.
3. *E. durans*, *L. lactis*, *L. casei*와 *P. gingivalis*의 혼합 배양시 단독 배양에 비해 *P. gingivalis* 생균수에는 거의 변화가 없었으나, *S. mutans*와 *P. gingivalis* 혼합 배양시에는 *P. gingivalis*의 증식이 완전히 억제되었다.
4. *L. acidophilus* V-20으로 만든 발효유를 유지관

리단계에 있는 치주질환자에게 하루 3회, 4주간 구강내 함수시킨 후 임상적 변화를 baseline과 비교시 치주낭 깊이, 치은지수는 별 차이가 없었으나, 치은열구액량은 유의성 있게 감소하였다 ($p < 0.05$).

5. 치은연하 치태세균에서 *A. actinomycetemcomitans*와 black pigmented bacteroides의 생균수를 baseline과 비교시 총 생균수는 변화가 거의 없었으나, *A. actinomycetemcomitans*와 black pigmented bacteroides는 유의성 있게 감소하였다 ($p < 0.05$).

이상의 결과로 *L. acidophilus* V-20이 치주질환의 주요 원인균인 *A. actinomycetemcomitans*와 black pigmented bacteroides의 성장을 억제함을 알 수 있었다. 또한 *L. acidophilus* V-20으로 만든 발효유로 구강내 함수 사용시 치은연하 치태세균인 *A. actinomycetemcomitans*와 black pigmented bacteroides에 효과적으로 작용되었음을 관찰하였다.

VI. 참고 문헌

1. Socransky SS : Microbiology of periodontal disease - present status and future consideration. J Periodontol 48:497-504, 1977.
2. Newman MG : Current concepts of the pathogenesis of periodontal disease. Microbiology emphasis. J Periodontol 56:734-739, 1985.
3. White DD, Mayrand D : Association of oral bacteroides with gingivitis and adult periodontitis. J Periodontal Res 16:259, 1981.
4. Zambon JJ : Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal diseases. J Clin Periodontol 12:1-20, 1985.
5. Zambon JJ, Slots J, Genco RJ : Serology of oral Actinobacillus actinomycetemcomitans and serotype distribution in human periodontal diseases. Infect Immun 41:19-27, 1983.
6. Mandell RL : A longitudinal microbiological investigation of Actinobacillus actinomycetem-

- comitans and *Eikenella corrodens* in juvenile periodontitis. *Infect Immun* 45:778-780, 1984.
7. Wennstrom JL, Dahlen C, Svensson J, Nyman S : *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius*. Predictor of attachment loss? *Oral Microbiol Immunol* 2:158-163, 1987.
 8. Hillman JD, Socransky SS : Replacement therapy for the prevention of dental disease. *Adv Dent Res* 1:119-125, 1987.
 9. Hillman JD, Socransky SS : Bacterial interference in the oral ecology of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and its relationship to human periodontosis. *Arch Oral Biol* 27:75-77, 1982.
 10. Hillman JD, Socransky SS, Shivers M : The relationships between Streptococcal species and periodontopathic bacteria in human dental plaque. *Arch Oral Biol* 30:791-795, 1985.
 11. Loe H, Silness J : Periodontal disease in pregnancy. *Acta Odontol Scand* 21:533, 1963.
 12. Moller AJR : Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Thesis. *Odontologisk Tidskrift* 74:1-380, 1966.
 13. Slots J : Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol* 15:606-609, 1982.
 14. Hillman JD : Lactate dehydrogenase mutants of *Streptococcus mutans*: Isolation and preliminary characterization. *Infect Immun* 21:206-212, 1978.
 15. Tanzer JM, Kurasz AB, Clive J : Competitive displacement of mutans streptococci and inhibition of tooth decay by *Streptococcus salivarius* Tove-R infection. *Infect Immun* 48:44-50, 1985.
 16. Tanzer JM, Kurasz AB, Clive J : Inhibition of ecological emergence of mutans streptococci and inhibition of tooth decay by *Streptococcus salivarius* Tove-R infection. *Infect Immun* 49:76-83, 1985.
 17. Abhyankar S, Sandham HJ, Chan KH : Serotype C *Streptococcus mutans* mutable to lactate dehydrogenase deficiency. *J Dent Res* 64:1267-1271, 1985.
 18. Haffajee AD, Socransky SS, Ebersole JL, Smith DJ : Clinical, microbiological, and immunological features associated with the treatment of active periodontosis lesions. *J Clin Periodontol* 11:600-618, 1984.
 19. Hirschfeld L, Wasserman B : A long-term survey of tooth loss in 600 treated periodontal patients. *J Periodontol* 49:225-231, 1978.
 20. Haffajee AD, Socransky SS, Ebersole JL : Survival analysis of periodontal sites before and after periodontal therapy. *J Periodontol* 12:553-567, 1985.
 21. Lundstrom A, Johansson LA, Hamp SE : Effect of combined systemic antimicrobial therapy and mechanical plaque control in patients with recurrent periodontal disease. *J Clin Periodontol* 11:321-330, 1984.
 22. Haffajee AD, Socransky SS, Dzink JL, Taubman MA, Ebersole JL : Clinical, microbiological and immunological features of subjects with refractory periodontal disease. *J Clin Periodontol* 15:390-398, 1988.
 23. Socransky SS, Haffajee AD, Dzink JL : Relationship of subgingival microbial complexes to clinical features at the sample sites. *J Clin Periodontol* 15:440-444, 1988.
 24. Wolff LF, Liljemark WF, Bloomquist CG, Pihlstrom BL : The distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human plaque. *J Periodontal Res* 20:237-250, 1985.
 25. Socransky SS, Haffajee AD, Dzink JL, Hillman

- JD : Microbiota of destructive periodontal disease, II. Probable beneficial species. *J Dent Res* 65:247, Abst. No.699 (AADR).
26. Westergren G, Svanberg M : Implation of transformant strains of the bacterium *Streptococcus sanguis* into adult human mouths. *Arch Oral Biol* 28:729-733, 1983.
 27. Svanberg M, Westergren G : Persistence and spread of the orally-implanted bacterium *Streptococcus sanguis* between persons. *Arch Oral Biol* 31:1-4, 1986.
 28. Hammond BF, Stevens RH, Bonner P, Lillard SE : Toxicity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa) extracts for crevicular bacteria. *J Dent Res* 63:263, Abst. No.830, 1984.
 29. Stevens RH, Lillard SE, Hammond BF : Partial purification of a bacteriocin-like *Actinobacillus* inhibitory factor. *J Dent Res* 64:372, Abst. No.1775, 1985.
 30. Donoghue HD, Tyler JE : Antagonism amongst *Streptococcus* isolated from the human oral cavity. *Arch Oral Biol* 20:381-387, 1975.
 31. Holmberg K, Hallander HO : Production of bacterial concentrations of hydrogen peroxide by *Streptococcus sanguis*. *Arch Oral Biol* 18:423-434, 1973.
 32. Turner JW, Jordan HV : Bacteriocin-like activity with the genus *Actinomyces*. *J Dent Res* 60:1000-1007, 1981.
 33. Boyd RL : Effects of gingivitis of daily rinsing with 1.5% hydrogen peroxide. *J Clin Periodontol* 16:557-562, 1989.
 34. Milton VM, Lewis PC, Stuart LF : Hydrogen Peroxide: A review of its use in dentistry. *J Periodontol* 66:786-796, 1995.
 35. DeRenzis FA : Endotoxin-inactivating potency of hydrogen peroxide : effect on cell growth. *J Dent Res* 60:933-935, 1981.
 36. Wennstrom J, Lindhe J : Effect of hydrogen peroxide on developing plaque and gingivitis in man. *J Clin Periodontol* 6:11-130, 1979.
 37. Miyasaki KT, Wilson ME, Reynolds HS, Genco RJ : Resistance of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and differential susceptibility of oral *Haemophilus* species to the bactericidal effects of hydrogen peroxide. *Infect Immun* 46:644-648, 1984.
 38. Shivers M, Hillman JD : Hydrogen peroxide deficient mutants of *Streptococcus sanguis*. *J Dent Res* 65:853, Abst. No.1144(IADR), 1986.
 39. Shivers M, Hillman JD, Socransky SS : In vivo interaction between *S. sanguis* and *A. actinomycetemcomitans*. *J Dent Res* 66:195, Abst. No.712, 1987.
 40. Parrot M, Charest M, Lavoie MC : Production of mutacin-like substances by *Streptococcus mutans*. *J Microbiol* 35:366-372, 1989.

The inhibitory effect of lactic acid bacteria to periodontal pathogens

Ha-Na Jeong, Jong-Suk Oh, Young-Jun Kim, Hyun-Ju Chung

Department of Periodontology, College of Dentistry, Chonnam National University

Department of microbiology, College of Medicine, Chonnam National University

Institute of Dentistry, College of Dentistry, Chonnam National University

This study was performed to evaluate the effect of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus acidophilus* V-20 on the replication of periodontal pathogens, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. When *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* were incubated alone and in the combination with *L. acidophilus* V-20, the viable cell numbers of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* were compared between those cultures. The effect of *S. mutans*, *E. durans*, and *L. lactis* on the replication of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* was also evaluated.

The change of periodontal indexes (probing depth, gingival index, GCF volume) and the viable cell numbers of *A. actinomycetemcomitans* and black pigmented bacteroides in subgingival plaque sample were evaluated following gargling of fermented milk made from *L. acidophilus* V-20 for 1 month on patients with periodontal disease in maintenance phase.

In the mixed culture of *L. acidophilus* V-20 and *A. actinomycetemcomitans* or *P. gingivalis*, the replication of *A. actinomycetemcomitans* or *P. gingivalis* was completely inhibited. But in the mixed culture of *P. gingivalis* and hydrogen peroxide-nonproducing *Lactobacillus casei*, the viable cell numbers of *P. gingivalis* was not decreased when compared with the numbers in the mixed culture of *P. gingivalis* and *L. acidophilus* V-20.

In the mixed culture of *A. actinomycetemcomitans* and *S. mutans*, *E. durans*, or *L. lactis*, the viable cell number of *A. actinomycetemcomitans* was not almost changed when compared with the numbers in the culture of *A. actinomycetemcomitans* alone. And in the mixed culture of *P. gingivalis* and *E. durans* or *L. lactis*, the viable cell numbers of *P. gingivalis* was not almost changed compared with the counts in the culture of *P. gingivalis* alone. But the replication of *P. gingivalis* was completely inhibited in the mixed culture of *P. gingivalis* and *S. mutans*.

When the change of periodontal indexes following gargling of fermented milk was compared with baseline, probing depth and gingival index were not changed, but GCF volume was significantly decreased ($p < 0.05$). And when the viable cell numbers of microorganisms in subgingival plaque sample were compared with baseline, total viable cell number was almost unchanged and the viable cell numbers of *A. actinomycetemcomitans* and black pigmented bacteroides were significantly decreased ($p < 0.05$).

These results suggest that *L. acidophilus* V-20 inhibit the replication of *A. actinomycetemcomitans* and black pigmented bacteroides by the formation of hydrogen peroxide.