

분자생물학적 기법을 이용한 악골 골수염 병소의 세균 동정

김미성 · 김수관 · 정해만* · 김생곤* · 국중기** · 김미광** · 김화숙** · 유소영**

조선대학교 치과대학 구강악안면외과, 인체생물학교실*, 구강생화학교실**,
조선대학교 치과대학 구강생물학연구소,

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2003;29:48-55)

MOLECULAR IDENTIFICATION OF BACTERIA FROM OSTEOMYELITIS OF THE JAWS

Mi-Sung Kim, Su-Gwan Kim, Hae-Man Chung*, Sang-Gon Kim*, Joong-Ki Kook**,
Mi-Kwang Kim**, Hwa-Sook Kim**, So Young Yoo**

Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery, Dept. of Human Biology, Department of Oral Biochemistry**,
College of Dentistry, Oral Biology Research Institute, Chosun University*

The purpose of this study was to isolate and identify the bacteria in osteomyelitis lesion of 3 patients. Two lesions were due to the post-infection after extraction. The other was resulted from mal-fixation of both sides of mandibular angles. Pus samples were collected by needle aspiration from the lesion and examined by culture method. Bacterial culture was performed in three culture systems (anaerobic, CO₂, and aerobic incubator). Identification of the bacteria was performed by 16S rRNA gene cloning and nucleotide sequencing method. Our results showed that *Streptococci species* was predominantly isolated in both lesions of extraction socket. Only one species (*Proteus vulagris*) was detected in lesion of mandibular angle. This study was not sufficient to identify the causative bacteria in those osteomyelitis. However, our data may be offered the clue to solve the problem.

I. 서 론

악골 골수염은 치성원인 또는 다른 여러 원인 요인에 의해 골과 골수에 발생하는 염증성 질환이다¹⁾. 급성, 아급성 또는 만성에 따라 그 임상적 증상도 다양하다. 특히 악골에 발생한 만성 골수염의 경우 임상적 증상도 다양하고 그 원인 요인도 분명하지 않기 때문에 진단에도 여러 어려운 점이 있다. 즉, 교통사고에 의한 상하악골의 골절, 치수 및 치근단 감염, 근관치료의 실패, 결핵, 발치 후 발치와의 감염 등이 상하악골에 발생하는 골수염의 원인이다. 구강 내에 존재하는 세균은 약 500여 종(species)이라고 알려져 있고²⁾ 이들 중 구강질환과 관련된 세균의 종류가 질환에 따라 다양하다. 따라서, 여러 원인에 따라 발생한 골수염 병소에도 다양한 세균이 존재한다. 골수염의 치료에 있어서 수술 전후

에 항생제를 투여하게 된다. 이 때 각각의 환자에 맞는 올바른 항생제 선택이 예후에 있어서 중요한 역할을 차지한다. 그러므로, 골수염의 치료에 있어서 정확한 세균학적 진단이 필수적이다.

현재까지 개발된 세균 동정(identification)법으로는 세균배양법, ribotyping법, DNA-DNA hybridization, DNA fingerprinting, DNA probe, 16S 또는 23S 라이보솜 RNA(rRNA) 유전자 염기서열 결정법, 중합효소연쇄반응법 등이 이용되고 있다³⁾. 전통적인 세균배양법은 병소의 모든 세균을 배양할 수 없고, 많은 경제력 및 노동력이 필요하다는 단점은 있으나, 직접 세균을 배양하여 세균의 생화학적 특성, 유전학적 특성, 숙주와의 상호 관계, 독립인자의 검색 및 분리 등의 연구를 할 수 있다는 장점이 있다.

세균 종의 동정에 있어서 가장 신뢰할 만한 방법이 16S 또는 23S rRNA 유전자 염기서열 결정법이다. 세균의 16S 또는 23S rRNA 유전자 염기서열은 종간에 서로 상동성이 보존되어 있어 세균 분류학에 있어서 가장 신뢰할 수 있는 기준점이 된다. 특히, 16S rRNA 유전자는 23S rRNA 유전자보다 염기서열이 짧기 때문에 많은 세균 종에 대한 자료들이 있어, 미지의 세균의 종 수준에서의 동정에 가장 많이 사용되고 있다. 일반적으로 두 세균간의 16S rRNA 유전자 핵산염기서열이 약 98% 이상 상동성을 보인다면, 같은 종으로 여긴다(언제나 일치하지는 않는다).

김 수 관

501-825, 광주광역시 동구 서석동 421
조선대학교 치과대학 구강악안면외과학교실
Su-Gwan Kim
Dept. of OMFS, College of Dentistry, Chosun Univ.
421, Seosuk-Dong, Dong-Ku, Gwangju, 501-825
Tel: 82-62-220-3810 Fax: 82-62-224-9172
E-mail: SGCKIM@mail.chosun.ac.kr

* 본 연구는 과기부.과학재단지정 2003년도 조선대학교 레이저응용 신기술 개발 연구센터 지원 연구비에 의해 지원되었음.

중합효소연쇄반응법은 가장 신속하고, 민감도가 뛰어난 방법이다. 특히, 중 수준에서의 세균 동정에 있어서 16S rRNA 유전자 핵산염기서열을 바탕으로 중-특이 프라이머를 설계하여 중합효소연쇄반응법으로 세균을 동정하는 방법이 많이 시행되고 있다. 그러나, 이 방법의 단점은 특정 세균의 존재 유무를 미리 예측하거나, 특정 질환과 연관성이 높다고 알려진 세균이 존재해야만 시행이 가능하다는 단점이 있다.

현재 우리나라에서 상하악골에 발생한 골수염 부위에 존재하는 세균에 대한 연구는 미진한 형편이다. 그러므로 본 연구의 목적은 상하악골에 발생한 골수염 병소 부위의 농 및 괴사조직을 채취하여, 세균을 배양하고, 배양된 세균의 16S rRNA 유전자를 클로닝하여 핵산염기서열을 결정한 다음, 이를 GeneBank 등의 데이터베이스를 이용하여 상동성 검색을 시행하여, 골수염 병소에 존재하는 세균을 동정하고자 시행하는 데 있다.

II. 재료 및 방법

1. 연구 대상

조선대학교 치과병원 구강악안면외과에 내원한 3명의 골수염 환자를 대상으로 하였다. 첫 번째 환자는 41세 남자 환자로서 하악 왼쪽 제1대구치(#36) 발치와에 통증을 주소로 내원한 환자였으며 방사선 사진상 잔근치 있어 발치 하였으나 발치후에도 계속적인 배농을 호소하며 골수염으로 진행되어 수술한 예이다. 두 번째 환자는 58세 남자 환자로서 상악 오른쪽 견치(#13)의 발치와에 통증을 주소로 내원한 환자였으며 심한 동통과 압통, 부종과 발적을 호소하며 배농되는 상태로 방사선 소견상 골괴괴가 관찰되며 screw fixation 상태였다. 세 번째 환자는 55세 여자 환자로서 교통사고로 하악 양쪽 우각부위의 골절로 외과수술을 받았지만, 부적절한 고정술에 의한 골수염이 발생하여 모병원을 경유하여 내원한 환자였다.

2. 골수염 부위에서의 샘플 채취 및 세균 배양

만성 골수염 환자의 병소에서 18-gauge needle을 이용하여 농을 채취한 다음, 이를 10 ml 1x PBS에 담아 구강생화학교실 세균 실험실로 옮겨서 1x PBS로 100배 희석한 다음, 5% sheep blood(KOMED CO., LTD, Seoul, Korea)가 첨가된 BHI(Difco Laboratory, Detroit, MI) 한천 배지에 희석된 샘플을 도말한 다음, 37°C 온도 조건에서 1) 공기중, 2) 10% CO₂가 첨가된 상태, 3) 혐기성 상태(5% CO₂, 85% N₂, 10% H₂) 에서 2-3일 동안 세균 배양을 실시하였다. 한천배지에 균락을 형성한 세균은 백금이를 이용하여 5 ml의 BHI 액체배지에 접종하여 1일 동안 배양한 다음, 4 ml는 20% glycerol 상태에서 -70°C에 얼려서 보관하고, 나머지 1 ml는 세균 지놈 DNA의 추출에 사용하였다.

3. 세균 지놈 DNA의 추출

세균 배양액 1 ml를 10,000 x g의 원심력을 이용하여 세균을 수확하고, 이를 G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit(iNtRON Corp., Seoul, Korea)를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 지놈 DNA를 추출하였다. 이를 간략하게 설명하자면 다음과 같다. 세균을 수확한 다음 50 µl의 Pre-incubation solution과 3 µl의 lysozyme solution을 넣고 잘 혼합한 다음 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 여기에 250 µl의 G-buffer solution을 넣고 잘 혼합한 다음 65°C에서 15분간 반응시키고, 250 µl의 Binding solution을 넣고 잘 혼합한 다음 vortexing하였다. 이러한 cell lysates를 G-spin™ column에 넣고 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. Column에 500 µl의 washing buffer A를 넣고 다시 1분간 원심분리하였다. 여기에 500 µl의 washing buffer B를 넣고 다시 1분간 원심분리하고, G-spin™ column을 새로운 eppendorf tube에 넣고 100 µl의 elution buffer를 넣고 1분간 실온에 방치한 다음 12,000 x g에서 1분간 원심분리하였다.

4. 중합효소연쇄반응을 이용한 16S rRNA 유전자 증폭

16S rRNA를 증폭할 수 있는 universal PCR primer(27F; 5'-AGA GTT TGA TC[A/C] TGG CTC AG-3', 1492R; 5'-TAC GG[C/T] TAC CTT GTT ACG ACT T-3')와 AccuPower® Premix(Bioneer Corp., Seoul, Korea)를 이용하고, PTC-200(MJ Research Inc., Watertown, MA, U.S.A) PCR machine을 이용하여 16S rRNA 유전자를 증폭하였다. 이 때 PCR의 조건은 다음과 같이 시행하였다. 20 µl의 PCR 혼합용액이 되도록, 20 pmoles 씩의 forward 및 reverse primers와 100 pg의 세균 genomic DNA를 넣고 94°C에서 2분간 초기 변성을 실시한 다음 94°C에서 1분간 변성, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension하는 과정을 30회 반복하여 증폭한 다음 마지막으로 72°C에서 10분간 extension하였다. 최종 반응물을 2 µl 씩 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 그 증폭 여부를 확인하였다.

5. 증폭된 16S rRNA 유전자의 클로닝 및 플라스미드 추출

앞에서 증폭한 16S rRNA 유전자를 pEZ-T easy vector(RNA Corp., Seoul, Korea)에 제조회사의 지시에 따라 직접 클로닝하였다. 이 때 삽입 유전자가 들어간 흰색 균락을 5 개를 선택하여 이를 5 ml의 LB broth에서 배양한 다음, 통상의 alkaline lysis법⁴⁾으로 AccuPrep™ Plasmid Extraction Kit(Bioneer Corp., Seoul, Korea)를 이용하여 제조회사의 지시대로 추출하였다. 이를 간략히 설명하면, 세균배양액 1 ml를 30초간 원심분리(12,000 x g)하고, 얻어진 세균 덩어리를 250 µl의 Resuspension buffer를 가하여 잘 현탁한 후, 250 µl Lysis buffer를 첨가하여 천천히 잘 혼합한 다음, 350 µl의 Neutralization buffer를 첨가한 즉시 잘 섞은 후에 얼음에 5분간 방치하였다. 이것을 100분간 원심분리(12,000 x g)하여 상청액을

binding column tube에 옮기고, 1 분간 원심분리(12,000 x g)하였다. 여과액은 버리고, binding column tube에 80% 에탄올을 700 µl 넣은 후 1분간 원심분리(12,000 x g)하였다. binding column tube에 남아있을 여분의 에탄올을 제거하기 위해 여과액을 버리고, 다시 30초간 원심분리(12,000 x g) 하였다. binding column을 새로운 eppendorf tube로 옮기고, 여기에 100 µl의 elution buffer를 넣고 1 분간 기다린 다음 다시 1분간 원심분리(12,000 x g)하여 여과액을 -70°C에서 보관하여 핵산염기서열 결정에 사용하였다.

6. 핵산염기서열 결정 및 핵산염기서열의 상동성 검색

핵산염기서열 결정은 바이오니아사에 의뢰하여 결정하였다. 이 때 사용되는 프라이머는 T3 promoter, T7 promoter, Seq-F1(5'-CCT ACg ggA ggC AgC Ag-3'), Seq-F2(5'-ggA TTA gAT ACC CTg g-3')를 이용하여 그 결과를 SeqMan 프로그램 (Version 5.00; DNAS-

TAR, Inc., Maidison, WI, USA)을 이용하여 분석하였다.

위에서 결정된 핵산염기서열을 GeneBank 등의 데이터 베이스를 이용하여 상동성 검색을 하고, 그 결과 98% 이상 상동성을 보이는 세균과 같은 종이라고 판정하였다.

III. 연구결과

1. 하악 왼쪽 제1대구치(#36) 발치와에 발생한 골수염

모두 40개의 세균 균락이 자라났다. 이중 29개의 균락이 Streptococci 종인 것으로 판정되었다. 또한, Neisseria 종이 5개, Veillonella 종이 2개, Abiotrophia 종이 1개, Gemella haemolysans 종이 1개, Rothia mucilaginosa 종이 1개, 새로운 종이라 생각되는 1개의 세균 종이 각각 배양되었다(Table 1-3).

Table 1. Bacteria isolated from the 1st patient (at 37°C in atmosphere condition)

Strains	Genus or species match [Gene Bank access number]	Identity(%)
ChDC* B214	<i>Neisseria pharyngis</i> NCTC 4590 [AJ239281]	97
	<i>Neisseria flava</i> U40 [AJ239301]	97
	<i>Neisseria sicca</i> Q28 [AJ239293]	97
ChDC B215	<i>Streptococcus parasanguis</i> ATCC 15912 [AF003933]	99
	<i>Streptococcus parasanguinis</i> ChDC OS49 [AF543299]	99
ChDC B216	<i>Streptococcus gordonii</i> ATCC 10558 [AF003931]	99
	<i>Streptococcus mitis</i> NCTC 3165, MAFF 911479 [AB002520]	99
ChDC B217	<i>Streptococcus parasanguis</i> ATCC 15912 [AF003933]	99
	<i>Streptococcus parasanguinis</i> ChDC OS49 [AF543299]	99
	<i>Streptococcus</i> spp. oral clone BE024 [AF385550]	99
ChDC B218	<i>Streptococcus</i> spp. oral strain T1-E5 [AF385525]	99
	<i>Streptococcus</i> spp. oral clone MCE7_144 E1 [AF481230]	99
ChDC B219	<i>Streptococcus sanguinis</i> ChDC OS38 [AF543290]	97
	<i>Streptococcus sanguis</i> ATCC 10556 [AF003928]	97
ChDC B220	<i>Neisseria mucosa</i> LNP405 [AJ239282]	99
	<i>Neisseria flava</i> U40 [AJ239301]	99
	<i>Neisseria sicca</i> Q13 [AJ239292]	99
	<i>Neisseria pharyngis</i> NCTC4590 [AJ239281]	99
ChDC B221	<i>Neisseria subflava</i> U37 [AJ239291]	98
ChDC B207	<i>Neisseria mucosa</i> M5 [AJ239279]	99
ChDC B209	<i>Rothia mucilaginosa</i> DSM [X87758]	99
ChDC B210	<i>Streptococcus salivarius</i> [AF459433]	99
	<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 13419 [M58839]	99
ChDC B212	<i>Streptococcus parasanguis</i> ATCC 15912 [AF003933]	99
ChDC B213	<i>Streptococcus parasanguis</i> ATCC 15912 [AF003933]	98
	<i>Streptococcus parasanguinis</i> ChDC OS49 [AF543299]	98

ChDC; Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University

Table 2. Bacteria isolated from the 1st patient (at 37°C in CO₂ enriched condition)

Strains	Genus or species match [Gene Bank access number]	Identity(%)
ChDC B180	<i>Streptococcus gordonii</i> ATCC 10558 [AF003931]	99
	<i>Streptococcus mitis</i> NCTC 3165, MAFF 911479 [AB002520]	99
ChDC B181	<i>Streptococcus anginosus</i> 367 [AF145239]	99
	<i>Streptococcus anginosus</i> 1204 [AF145240]	99
ChDC B182	<i>Streptococcus</i> spp. oral clone BW009 [AY005042]	98
ChDC B183	<i>Streptococcus mitis</i> 209 [SMI295853]	98
	<i>Streptococcus mitis</i> 127R [SMI295848]	98
ChDC B184	<i>Streptococcus salivarius</i> [AF459433]	98
	<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 13419 [M58839]	98
ChDC B185	<i>Streptococcus parasanguis</i> ATCC 15912 [AF003933]	99
ChDC B186	<i>Streptococcus</i> spp. 2056B [AF316593]	98
	<i>Streptococcus mitis</i> ATCC 49456 [AF003929]	98
ChDC B187	<i>Streptococcus salivarius</i> [AF459433]	99
	<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 13419 [M58839]	99
	Human oral bacterium C23 [AF202012]	99
ChDC B192	<i>Neisseria subflava</i> U37 [AJ239291]	99
ChDC B193	<i>Streptococcus gordonii</i> ATCC 10558 [AF003931]	99
	<i>Streptococcus mitis</i> NCTC 3165, MAFF 911479 [AB002520]	99
ChDC B194	<i>Streptococcus</i> spp. oral strain H3-M2 [AF385523]	99
ChDC B195	<i>Streptococcus parasanguis</i> ATCC 15912 [AF003933]	99
	<i>Streptococcus parasanguinis</i> ChDC OS49 [AF543299]	99
ChDC B196	<i>Streptococcus</i> spp. oral clone DN025 [AF432131]	98

Table 3. Bacteria isolated from the 1st patient (at 37°C in anaerobic condition)

Strains	Genus or species match [Gene Bank access number]	Identity(%)
ChDC B227	<i>Streptococcus</i> spp. oral strain H3-M2 [AF385523]	98
	<i>Streptococcus</i> spp. oral clone DN025 [AF432131]	98
ChDC B228	<i>Granulicatella adiacens</i> 10/833 [AJ312375]	98
	<i>Abiotrophia para-adiacens</i> TKT1 [AB022027]	98
	<i>Abiotrophia adiacens</i> GIFU12706 (ATCC49175) [D50540]	98
ChDC B229	<i>Streptococcus</i> spp. oral strain H3-M2 [AF385523]	99
	<i>Streptococcus mitis</i> ATCC 49456 [AF003929]	99
	<i>Streptococcus oralis</i> ATCC 35037 [AF003932]	99
ChDC B230	<i>Eikenella corrodens</i> [AF320620]	90
ChDC B231	<i>Streptococcus mitis</i> 209 [SMI295853]	99
	<i>Streptococcus mitis</i> ATCC 49456 [AF003929]	99
ChDC B232	<i>Streptococcus anginosus</i> 367 [AF145239]	99
	<i>Streptococcus anginosus</i> 1204 [AF145240]	99
ChDC B233	<i>Gemella haemolysans</i> ATCC 10379 [L14326]	98
ChDC B234	<i>Streptococcus salivarius</i> [AF459433]	98
	<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 13419 [M58839]	98
ChDC B235	Uncultured <i>Veillonella</i> spp. clone BU083 [AF366266]	98
	<i>Veillonella parvula</i> CIP 60.1 [AF439640]	98
ChDC B236	<i>Streptococcus</i> spp. oral strain T1-E5 [AF385525]	97
	<i>Streptococcus intermedius</i> ATCC27335 [AF104671]	97
ChDC B239	<i>Streptococcus</i> spp. oral strain T1-E5 [AF385525]	98
	<i>Streptococcus mitis</i> ATCC 49456 [AF003929]	98
ChDC B241	<i>Streptococcus gordonii</i> ATCC 10558 [AF003931]	99
	<i>Streptococcus mitis</i> NCTC 3165, MAFF 911479 [AB002520]	99
ChDC B242	<i>Streptococcus mitis</i> 209 [SMI295853]	99
	<i>Streptococcus mitis</i> ATCC 49456 [AF003929]	99
	<i>Streptococcus oralis</i> ATCC 35037 [AF003932]	99
ChDC B243	Uncultured <i>Veillonella</i> spp. clone BU083 [AF366266]	99

2. 상악 오른쪽 견치(#13)의 발치와에 발생한 골수염

Prevotella 종이 1개씩 배양되었다(Table 4-6).

모두 8개의 세균 균락이 자라났다. 이중 4개의 균락이 *Streptococci* 종인 것으로 판정되었다. 또한, *Neisseria* 종이 1개, *Abiotrophia* 종이 1개, *Actinomyces odontolyticus* 종이 1개,

3. 하악 양쪽 우각부위의 부적절한 고정술에 의한 골수염
Proteus vulgaris 종만이 검출되었다(Table 7 & 8).

Table 4. Bacterium isolated from the 2nd patient (at 37°C in atmosphere condition)

Strains	Genus or species match [Gene Bank access number]	Identity(%)
ChDC B315	<i>Streptococcus</i> spp. oral clone FN051 [AF432135]	98
	<i>Streptococcus parasanguis</i> ATCC 15912 [AF003933]	98
	<i>Streptococcus parasanguinis</i> ChDC OS49 [AF543299]	98
ChDC B316	<i>Neisseria mucosa</i> M5 [AJ239279]	98
	<i>Neisseria perflava</i> U15 [AJ239295]	98
	<i>Neisseria flavescens</i> LNP444 [AJ239280]	98
	<i>Neisseria subflava</i> NJ9703 [AF479578]	98
ChDC B317	<i>Streptococcus</i> spp. oral strain T1-E5 [AF385525]	97

Table 5. Bacteria isolated from the 2nd patient (at 37°C in CO₂ enriched condition)

Strains	Genus or species match [Gene Bank access number]	Identity(%)
ChDC B338	<i>Streptococcus oralis</i> ATCC 35037 [AF003932]	98
	<i>Streptococcus mitis</i> ATCC 49456 [AF003929]	98
ChDC B339	<i>Abiotrophia para-adiacens</i> TKT1 [AB022027]	98

Table 6. Bacteria isolated from the 2nd patient (at 37°C in atmosphere condition)

Strains	Genus or species match [Gene Bank access number]	Identity(%)
ChDC B400	<i>Prevotella</i> spp. oral clone BI027 [AY005064]	99
ChDC B401	<i>Actinomyces odontolyticus</i> CCUG 32834 [AJ234042]	99
ChDC B402	<i>Streptococcus oralis</i> ATCC 35037 [AF003932]	99
	<i>Streptococcus mitis</i> ATCC 49456 [AF003929]	99

Table 7. Bacterium isolated from the 3rd patient (at 37°C in CO₂ enriched condition)

Strains	Genus or species match [Gene Bank access number]	Identity(%)
ChDC B156	<i>Proteus vulgaris</i> IFAM 1731 [X07652]	99
	<i>Proteus vulgaris</i> CIP103181T(ATCC 29906) [AJ301683]	99

Table 8. Bacterium isolated from the 3rd patient (at 37°C in anaerobic condition)

Strains	Genus or species match [Gene Bank access number]	Identity(%)
ChDC B169	<i>Proteus vulgaris</i> IFAM 1731 [X07652]	99
	<i>Proteus vulgaris</i> CIP103181T(ATCC 29906) [AJ301683]	99

IV. 총괄 및 고안

과거에 골수염의 경우 80-90%가 *Staphylococcus aureus*의 감염에 의하여 발생한다고 알려졌었는데, 이는 과거 하악골 골수염에 대한 미생물학 연구에서 조직 내에서 빠져나온 농을 채취하여 배양하였기 때문에 포도상구균에 오염되었고 또한 혐기성 조건에서 농배양을 시행하였으므로 호기성 세균이 배양되지 않은 결과이다. 그러나 최근의 미생물학적 연구에 의하면 치성감염을 일으키는 세균과 유사하다. 즉 연쇄상구균, *peptostreptococcus* 같은 혐기성 구균, *fusobacterium*과 *bacteroides*와 같은 그람 음성 간균들이 주 원인 세균들이다. 따라서 하악골 골수염은 포도상구균이 원인 세균인 다른 골의 골수염과는 근본적으로 다르다고 할 수 있다.

김 등³⁾에 의하면 만성골수염에서 가장 흔히 배양되는 세균들로는 *Streptococci*, *Staphylococci*, *Bacteroides* species 였으며, 골수염을 일으키는 pathogenic organisms으로는 normal oral flora, *Staphylococcus aureus*, aerobic Gram-negative bacilli 등이었으며 Multiple microbes와 anaerobes가 대부분의 병소에서 중요한 역할을 담당한다고 보고하고 있다.

최근 nutritionally variant streptococci 종들이 *Abiotrophia* 종으로 새롭게 명명되었다⁵⁾. *Abiotrophia* 종은 구강내 정상 세균총의 일종으로 심근내막염의 원인세균이라고 알려져 있으며, 안(眼)감염된 부위에서도 검출된다. *Abiotrophia* 종에는 *A. adiacens*, *A. defectiva*, *A. elegans*가 포함되어 있는 데, 근자에 *A. adiacens*, *A. balaenopterae*, *A. elegans* 등이 새로운 *Granulicatella* 속으로 재분류되었다⁷⁾. Heath 등⁸⁾과 Rosenthal 등⁹⁾은 척추 골수염에서 *G(Abiotrophia)*. *adiacens*과의 관련성을 보고하였다.

*Veillonella parvula*는 혐기성의 그람 음성 구균으로 사람의 정상 세균총의 일종으로 사람에게 있어서 병원성이 드문 것으로 알려져 있지만, 병원성과 연관성이 있다고 가장 흔히 보고되는 질환이 골수염이다¹⁰⁻¹³⁾. 본 연구에서도 #36번 발치와에 발생한 골수염 환자의 샘플에서 1 균주의 *V. parvula*와 1 균주의 *Veillonella* 종이 검출되었다.

Gemella 속은 구강 또는 상기도의 정상 세균총의 일종이다. *G. haemolysans*는 심근내막염¹⁴⁾, 내수막염¹⁵⁾과 관련성이 있다는 보고가 주로 많았지만, 최근 골수염^{16,17)}과 연관이 있다는 보고도 있다.

최근 Collins 등¹⁸⁾에 의해서 *Stomatococcus mucilaginosus*종이 *Rothia mucilaginosus* 종으로 재명명되었다. *Rothia* 속에는 *R. dentocariosa*, *R. nasimurium*, *R. mucilaginosus* 등의 3가지 종이 존재하게 되었다¹⁸⁾. *Rothia dentocariosa*는 형태가 다양한 그람 양성 간균으로 구강내의 정상 세균총의 일종으로 알려져 있고, 특정질환과 연관성이 있다는 보고는 드물다¹⁹⁾. 비록 *R. dentocariosa*가 독력은 약하지만 몇몇 연구에 의하면 심근내막염의 원인균이라는 결과도 있다^{19,20)}. 본 연구에서 검출된 *R. (Stomatococcus) mucilaginosus*의 사람의 감염성 질환과의 관계에 대한 보고는 아직까지는 없다.

악골의 발치와에 발생한 골수염에서 검출된 세균 중 대부분은 *Streptococcus* 종들이었다. 이들 *Streptococcus* 종들은 정상 세균총에 속하였으며, 현재까지 이들 종들과 골수염간의 인과관계가 성립된 보고는 없었다. 본 연구에서는 검출되지 않았지만 Group B streptococcus에 속하는 *S. agalactiae*가 골수염과 관련이 있다는 보고는 있다²¹⁾. *Streptococcus* 종들은 16S ribosomal RNA(rRNA) 유전자 핵산염기서열을 바탕으로 'anginosus', 'mitis', 'mutans', 'salivarius', 'bovis', 및 'pyogenic' 그룹으로 나눌 수 있는 데^{22,24)}, 본 연구에서 검출된 세균들은 모두 mitis 그룹(*S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. parasanguinis*, *S. crista*, *S. oralis* 및 *S. pneumoniae*), anginosus 그룹(*S. anginosus*, *S. constellatus* 및 *S. intermedius*), salivarius 그룹(*S. salivarius*, *S. vestibularis* 및 *S. thermophilus*) 등의 3가지 그룹에 속하였다.

ChDC B182, ChDC B196 및 ChDC B218 균주는 16S rRNA 유전자 핵산염기서열로는 중 수준에서 명확한 동정이 어려웠다. 또한 ChDC B180, ChDC B193, ChDC B216 균주들의 16S rRNA 유전자 핵산염기서열들이 *S. gordonii* 및 *S. mitis*와 같은 수준의 상동성을 보여 명확히 동정을 할 수 없었지만, GeneBank에 등재된 다른 균주들간의 상동성을 비교해 볼 때 *S. gordonii*일 확률이 높다고 생각된다. 앞으로 ChDC B180, ChDC B193, ChDC B216 균주들의 생화학 검사를 시행하는 실험을 추가할 계획이다. *S. gordonii* ATCC 10558과 *S. mitis* NCTC 3165의 16S rRNA 유전자 핵산염기서열의 상동성이 99%일 것으로 보아 둘 중 한 균주에 대한 동정이 잘못 되었을 수도 있을 것으로 사료된다. 이는 아마도 16S rRNA 유전자 핵산염기서열에 의한 세균의 분류가 되기 전에 각각의 세균들이 명명되었기 때문인 것으로 생각되며, 이들의 재분류가 필요하리라 사료된다.

본 연구에서 검출된 *Neisseria* 속에 속하는 세균 종들은 대부분 골수염과 연관성이 없는 것들이며, 비병원성 세균들이었다.

Actinomyces 종들은 구강내 정상 세균총을 이루고 있으며, actinomycosis의 중요한 원인균으로 알려져 있고, *A. israelii*, *A. naeslundii*, *A. viscosus*, *A. odontolyticus*, *A. meyeri*, *A. turicensis*, *A. radingae* 및 *A. neuii*. 등이 사람에게 있어서 기회감염성 병원체로 잘 알려져 있다²⁵⁾. 이들 중 *A. neuii*와 *A. naeslundii*가 골수염과 연관성이 있는 것으로 보고되었다^{26,27)}. 그러나 본 연구결과 검출된 *A. odontolyticus*는 아직까지 골수염과의 상관관계가 밝혀진 보고는 없다.

교통사고에 의한 하악 우각부 골절부위의 고정술이 부적절하여 발생한 골수염 환자에서는 *Proteus vulgaris* 종만이 검출되었다. *Proteus* 속은 장내세균이며, *P. vulgaris*를 포함하여 10가지 종이 존재하며 주로 요로 감염과 관련성이 높다. Friedlander²⁸⁾가 처음으로 *P. vulgaris*가 골수염에 관여한다는 보고가 있었지만, 그리 흔하게 골수염과 관련이 있는 세균은 아니다. 본 연구 결과 세균 배양법에 의해서 *P. vulgaris*만이 검출되었다고 해서 직접적인 원인균이라 하기는 어려울 것 같다. 왜냐하면, 아직까지 모든 세균을 배양할 수 있는 세균 배양 기술이 개발되지 않았기 때문이다.

본 연구결과 아직까지 분류가 되지 않은 2 균주가 발견되었다. ChDC B230 균주는 *Eikenella corrodens*와 16S rRNA 유전자 핵산염

기서열의 상동성이 90% 정도밖에 되지 않기 때문에 *E. corrodens* 라 할 수는 없다. 또한, ChDC B400 균주도 *Prevotella* 종(*Prevotella* spp. oral clone BI027)과 상동성이 99%이지만, *Prevotella* spp. oral clone BI027 균주 역시 아직 확실하게 분류되지 않았기 때문에 어떤 종이라고 말할 수 없을 것으로 사료된다. 그러므로, 이들의 동정에 대한 연구가 필요하다.

본 연구에서 발치와에 발생한 골수염 부위에서 다양한 세균 종이 검출되어서 골수염에 관여하는 세균 종이 다양하다는 기존의 견해와 일치한 결과를 얻었다. 하지만, 하악 우각부의 부적절한 고정술에 의한 골수염에서는 *P. vulgaris*만이 검출되어, 이 경우에 있어서 원인 세균일 가능성이 높으며, 이를 증명하기 위해서는 추후 적절한 연구가 시행되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

조선대학교 치과병원 구강악안면외과에 내원한 #36 발치와에 발생한 골수염, #13의 발치와에 발생한 골수염, 하악 우각부의 부적절한 고정술에 의한 골수염을 주소로 내원한 각각의 환자의 골수염 부위로부터 농을 채취하여 공기상태, 5% CO₂가 첨가된 상태 및 혐기성 상태에서 세균을 배양하고, 배양된 세균들의 16S rRNA 유전자의 핵산염기서열을 결정하여 중 수준에서 동정하여 다음의 결과들을 얻었다.

1. #36 발치와에 발생한 골수염부위에서 40개의 세균 균락이 자라났으며, 이 중 29개의 균락이 *Streptococci* 종이었으며, 5 균주의 *Neisseria*, 2 균주의 *Veillonella*, 1 균주의 *Abiotrophia*, *Gemella haemolysans* 및 *Rothia mucilaginosa* 종이 검출되었다.
2. #13의 발치와에 발생한 골수염부위에서 모두 8개의 세균 균락이 자라났으며, 이 중 4개의 균락이 *Streptococci* 종이었으며, 각각 1균주의 *Neisseria*, *Abiotrophia*, *Actinomyces odontolyticus* 및 *Prevotella* 종이 배양되었다.
3. 하악 양쪽 angle부위의 부적절한 고정술에 의한 골수염부위에서는 *Proteus vulgaris* 종만이 검출되었다.

본 연구에서는 발치와에 발생한 골수염 부위에서 다양한 세균 종이 검출되어서 골수염에 관여하는 세균 종이 다양하다는 기존의 견해와 일치한 결과를 얻었다. 하지만, 하악 우각부의 부적절한 고정술에 의한 골수염에서는 *P. vulgaris*만이 검출되어, 이 경우에 있어서 원인 세균일 가능성이 높으며, 이를 증명하기 위해서는 추후 적절한 연구가 시행되어야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Bernier S, Clermont S, Maranda G, Turcotte JY : Osteomyelitis of the jaws. J Can Dent Assoc 1995;61:441-442, 445-448.
2. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, et al : Bacterial diversity in human subgingival plaque. J Bacteriol. 2001;183:3770-3783.
3. Kim SG, Jang HS : Treatment of chronic osteomyelitis in Korea. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endol 2001;92:394-398.

4. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T : Molecular cloning: a laboratory manual. Ed 2nd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.
5. Kawamura Y, Hou XG, Sultana F, Liu S, Yamamoto H, Ezaki T : Transfer of *Streptococcus adiacens* and *Streptococcus defectiva* to *Abiotrophia* gen. nov. as *Abiotrophia adiacens* comb. nov. and *Abiotrophia defectiva* comb. nov., respectively. Int J Syst Bacteriol 1995;45:798-803.
6. Christensen JJ, Gruhn N, Facklam RR : Endocarditis caused by *Abiotrophia* species. Scand J Infect Dis 1999;31:210-212.
7. Collins MD, Lawson PA : The genus *Abiotrophia* (Kawamura et al.) is not monophyletic: proposal of *Granulicatella* gen. nov., *Granulicatella adiacens* comb. nov., *Granulicatella elegans* comb. nov. and *Granulicatella balaenopterae* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol 2000;50(Pt 1):365-369.
8. Heath CH, Bowen SF, McCarthy JS, Dwyer B : Vertebral osteomyelitis and discitis associated with *Abiotrophia adiacens* (nutritionally variant streptococcus) infection. Aust N Z J Med 1998;28(5):663.
9. Rosenthal O, Woywodt A, Kirschner P, Haller H : Vertebral Osteomyelitis and Endocarditis of a Pacemaker Lead Due to *Granulicatella* (*Abiotrophia*) *adiacens*. Infect 2002;30(5):317-319.
10. Barnhart RA, Weitekamp MR, Aber RC : Osteomyelitis caused by *Veillonella*. Am J Med 1983;74(5):902-904.
11. Eyrich GK, Langenegger T, Bruder E, Sailer HF, Michel BA : Diffuse chronic sclerosing osteomyelitis and the synovitis, acne, pustulosis, hyperostosis, osteitis (SAPHO) syndrome in two sisters. Int J Oral Maxillofac Surg 2000;29:49-53.
12. Fisher RG, Denison MR : *Veillonella parvula* bacteremia without an underlying source. J Clin Microbiol 1996;34:3235-3236.
13. Singh N, Yu VL : Osteomyelitis due to *Veillonella parvula*: case report and review. Clin Infect Dis 1992;14(1):361-363.
14. La Scola B, Raoult D : Molecular identification of *Gemella* species from three patients with endocarditis. J Clin Microbiol 1998; 36(4):866-871.
15. May T, Amiel C, Lion C, Weber M, Gerard A, Canton P : Meningitis due to *Gemella haemolysans*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1993;12(8):644-645.
16. Nonaka Y, Kiyofuji C, Takano Y, Ito K : Pyogenic vertebral osteomyelitis caused by *Gemella haemolysans*. Nippon Naika Gakkai Zasshi 2000;10;89:980-982.
17. van Dijk M, van Royen BJ, Wuisman PI, Hekker TA, van Guldener C : Trochanter osteomyelitis and ipsilateral arthritis due to *Gemella morbillorum*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999;18:600-602.
18. Collins MD, Hutson RA, Baverud V, Falsen E : Characterization of a *Rothia*-like organism from a mouse: description of *Rothia nasimurium* sp. nov. and reclassification of *Stomatococcus mucilaginosus* as *Rothia mucilaginosa* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol 2000;50(Pt 3):1247-1251.
19. Larkin J, Montero J, Targino M, Powers A, Accurso C, Campbell M : *Rothia dentocariosa* Endocarditis. Clin Microbiol News let 2001;23:13-15.
20. Kong R, Mebazaa A, Heitz B, De Briel DA, Kiredjian M, Raskine L, et al : Case of triple endocarditis caused by *Rothia dentocariosa* and results of a survey in France. J Clin Microbiol 1998;36:309-310.
21. Solis-Garcia del Pozo J, Martinez-Alfaro E, Abad L, Solera J : Vertebral osteomyelitis caused by *Streptococcus agalactiae*. J Infect 2000;41:84-90.
22. Bentley RW, Leigh JA, Collins MD : Intrageneric structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences. Int J Syst Bacteriol 1991;41:487-494.
23. Kawamura Y, Hou XG, Sultana F, Miura H, Ezaki T : Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. Int J Syst Bacteriol 1995;45:406-408.
24. Kilian M : *Streptococcus* and *Lactobacillus*. In: Balows, A. and Duerden, B.I. (Eds.), Topley and Wilson's Microbiology and

- Microbial Infection. Arnold, London, 1998.
25. Mello KA, Snyderman DR, Arora S : Capnocytophaga infection involving a portal-systemic vascular shunt, Digestive Diseases and Sciences. 1990;35:909-911.
 26. Soto-Hernandez JL, Morales VA, Lara Giron JC, Balderrama Banares J : Cranial epidural empyema with osteomyelitis caused by actinomyces, CT, and MRI appearance. Clin Imaging 1999;23:209-214.
 27. Vandeveld AG, Jenkins SG, Hardy PR : Sclerosing osteomyelitis and Actinomyces naeslundii infection of surrounding tissues. Clin Infect Dis 1995;20:1037-1039.
 28. Friedlander AH : Proteus vulgaris osteomyelitis of the mandible. Report of a case. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1975;40:39-44.