

한국인의 치은연하 치태에서 *Fusobacterium nucleatum*의 분리

장현선^{1,3} · 김세훈¹ · 김화숙² · 국중기^{2,3} · 김미광² · 유소영² · 김병욱^{1,3,*}

조선대학교 치과대학 치주과학교실¹, 구강생화학교실², 구강생물학연구소³

I. 서론

양대 구강병 중 하나인 치주질환은 치태 내의 세균이 주요한 국소적 원인 인자이며, 치주조직의 손실을 동반하는 일종의 감염성 질환이다¹⁾. 치태 내에는 현재까지 알려지기로 약 400여 세균 종들이 존재하는 것으로 알려져 있으며, 파괴성 치주질환에 관련이 깊은 잠재성 병원균으로는 *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *spirochete*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Campylobacter rectus*, *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium nucleatum*, subsp. *vincentii*, *Fusobacterium nucleatum*, subsp. *nucleatum*, *Selenomonas noxia*, and *Selenomonas flueggeii* 등이 있는 것으로 보고되고 있다²⁾.

*F. nucleatum*은 치주질환 병소부위에서 검출되는 빈도가 높으며, 치주조직에 해로운 자극을 주는 butyric acid와 같은 대사 산물을 분비하고, *P. gingivalis*와 같은 병원성 세균들과 함께 작용하여 치주질환을 악화시키고, 숙주 조직에 부착능이나 침윤성, 그리고, 숙주의 면역 반응을 변형시킬 수 있는 능력

등에 의한 독립인자를 가진다는 측면에서 치주질환의 발생 및 진행에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다⁴⁾.

Knorr^{5,6)}에 의해 *Fusobacterium* 속은 처음 명명되었고, *F. polymorphum*, *F. nucleatum*, *F. plauti-vincentii*(훗날 *Leptotrichia buccalis*이라 명명됨)의 3가지 종이 보고되었다. 1930년부터 1970년대에 여러 가지 동정법을 이용한 세균의 분류학적 연구에서 위 3가지 종들이 많은 부분에서 동일한 특징을 갖는다는 것이 발견되었고, 1974년에 *F. polymorphum*과 *F. plauti-vincentii*는 *F. nucleatum*이라는 단일 종으로 편입되었다⁷⁾. 그 후 세포 또는 균락의 모양, 세균 단백질의 전기영동 패턴, 긴사슬 지방산 분석, 항원성, 효소 전기영동분석법, DNA-DNA hybridization법을 통하여 *F. nucleatum* 종 내에 다양한 균주들이 존재할 수 있다고 여러 연구자들에 의해 보고되었다^{8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18)}. Dzink 등¹⁸⁾은 *F. nucleatum*의 총 단백질을 sodium dodecyl sulfate (SDS) 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동 패턴을 기준으로 3가지 그룹으로 나누고, Group I을 *F. nucleatum* subsp. *vincentii*, Group II를 *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*, Group III를 *F. nucleatum* subsp. *poly-*

*이 논문은 2001년도 재단법인 조선대학교 치과대학교육문화재단 학술연구기금의 지원을 받아 연구되었음.

교신저자: 김병욱, 광주광역시 동구 서석동 375번지, 조선대학교 치과대학 치주과학교실, 우편번호: 501-759,

전화번호: (062) 220-3850, 팩스번호: (062) 224-4664, E-mail: bobkim@mail.chosun.ac.kr

*morphum*으로 명명하였다. Gharbia등^{19,21)}은 glutamine dehydrogenase와 2-oxoglutarate reductase 효소들의 전기영동 패턴과 DNA-DNA hybridization 패턴에 따라 *F. nucleatum*을 *nucleatum*, *polymorphum*, *fusiforme* 및 *animalis*로 구별하였다.

특정 질환과 병원성 세균간의 독립인자의 검색, 세균에 의한 숙주의 반응 등의 관계를 알아보기 위해서는 그 질환과 관련된 병원성 세균의 분리 배양이 선행되어야 한다. 이러한 이유로 치주질환과 *F. nucleatum*의 상관관계를 조사하기 위해서는 *F. nucleatum*을 치주질환에서 분리 배양한 균주가 있어야 한다. 현재 국제적으로 공인된 표준균주가 존재하지는 않지만, 그러한 표준균주는 서양인에서 분리 배양된 것으로, 한국인에서 확립된 표준균주는 없다.

본 연구의 목적은 치주질환을 가지고 있는 환자의 치은연하 치면세균막에서 *F. nucleatum*을 세균배양법과 16S rDNA 클로닝 및 핵산염기서열결정법으로 동정한 다음, *F. nucleatum*을 동정하는데 이용되는 몇 가지 생화학 검사를 재시행함으로써 한국인의 표준균주를 확립하기 위한 기초자료를 얻고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 치면세균막 채취 및 배양

조선대학교 치과병원에 내원한 30 명의 치주질환 환자로부터 탐침깊이가 6 mm 이상인 상하악 구치부 협면 또는 설면에서 멸균된 paper point로 치은 연하 치면세균막을 채취하여 reduced transfer fluid 1ml에 담고 이를 즉시 실험실로 옮겨 10,000배 희석하여, *F. nucleatum* 선택배지(1% tryptic soy broth, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 0.2% glucose, 0.02% L-tryptophan, 1.5% Bacto agar, 5% defibrinized sheep blood, 4 µl/ml erythromycin, 5 µl/ml crystal violet)에 면봉을 이용하여 도말한 후 37°C 혐기성배양기(85% N₂, 5% CO₂, 10% H₂, Model Bactron I, Cornelius, OR, USA)에서 2~3일 동안 배양하였다. Crystal violet에 의해 보라색을 띠는 균락을 선택하여 erythromycin이 함유된 Schaedler 배지에서 2~3

일 동안 배양하여 다음의 실험에 사용하였다.

2. 중합효소연쇄반응

*F. nucleatum*의 16S ribosomal RNA 종-특이 중합효소연쇄반응 프라이머(ALL-F6; 5'-CGG GAG GCA GCA GTG GGG AAT-3', Fn-R6; 5'-TTG CIT GGG CGC TGA GGT TC-3')를 이용하여 AccuPower® Premix(Bioneer Corp., Seoul, Korea)에 20 µl의 PCR 혼합용액이 되도록 20 pmoles 씩의 ALL-F6 및 Fn-R6 프라이머와 100 pg의 세균 genomic DNA를 넣고 PTC-200 PCR machine(MJ Research Inc., Watertown, MA, USA)을 사용하여 중합효소연쇄반응을 시행하였다.

중합효소연쇄반응의 조건은 94°C에서 2분간 pre-denaturation 시행한 후, 94°C에서 1분간 denaturation, 65°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 45초간 extension 단계를 30회 반복한 후, final extension을 위해 72°C에서 10분간 시행하였다. 선택 배양한 세균이 *F. nucleatum*이 맞는지 2 µl씩 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 그 증폭 산물을 확인하였다.

종-특이 프라이머로 확인된 세균은 16S rRNA를 증폭할 수 있는 universal PCR 프라이머(27F; 5'-AGA GTT TGA TC[A/C] TGG CTC AG-3', 1492R; 5'-TAC GG[C/T] TAC CIT GIT ACG ACT T-3')를 이용하여 중합효소연쇄반응을 시행하였다. 중합효소연쇄반응의 조건은 94°C에서 2분간 pre-denaturation을 실시한 다음 94°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension 과정을 30회 반복하여 시행하고, 마지막 extension을 72°C에서 10분간 시행하여 16S rDNA를 증폭하였다.

3. 증폭된 16S rDNA의 클로닝, 플라스미드 추출 및 핵산염기서열 결정

증폭한 16S rDNA를 pEZ-T easy vector(RNA Corp., Seoul, Korea)에 제조회사의 지시에 따라 클로닝하고, *E. coli* DH5α에 형질전환했다. 재조합된 플라스미드 DNA는 통상의 alkaline lysis법으로

AccuPrep™ Plasmid Extraction Kit(Bioneer Corp.)를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 세균배양액 1 ml를 30초간 원심분리(12,000×g)하고, 얻어진 세균 덩어리에 250 μl의 resuspension buffer를 가하여 잘 혼합한 후, 250 μl lysis buffer를 첨가하여 천천히 잘 혼합한 다음, 350 μl의 neutralization buffer를 첨가한 즉시 잘 섞은 후에 얼음에 5분간 방치하였다²²⁾. 이것을 10분간 원심분리(12,000×g)하여 상청액을 binding column tube에 옮기고, 1분간 원심분리(12,000×g)하였다. 여과액은 버리고, binding column tube에 80% 에탄올 700 μl를 넣은 후 1분간 원심분리(12,000×g)하였다. Binding column tube에 남아있을 여분의 에탄올을 제거하기 위해 여과액을 버리고, 다시 3분간 원심분리(12,000×g)하였다. Binding column을 새로운 eppendorf tube로 옮기고, 여기에 100 μl의 elution buffer를 넣고 1분간 기다린 다음 1분간 원심분리(12,000×g)하여 여과액을 -20℃에서 보관하여 핵산염기서열 결정(Bioneer Corp.)에 사용하였다.

사용된 프라이머는 ChDC-F(5'-AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCG AA-3')와 ChDC-R(5'-CCT CAC TAA AGG GAA CAA AAG C-3'), 27F, 1492R, Seq-F1(5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3')를 이용하여 결정하였으며, 그 결과는 SeqMan 프로그램(Version 5.00; DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA)으로 분석하였다.

이와 같이 결정된 핵산염기서열을 GenBank 등의 데이터 베이스를 통하여 상동성 검색을 하여 기존에 알려진 *F. nucleatum*의 16S rDNA의 염기서열과 98% 이상 상동성을 보이는 것만 본 연구에 사용하였다.

4. 생화학 검사 (Indol test, Catalase test 및 Esculin test)

1) Indol test

Indole test는 tryptophan의 아미노기를 분해하여 indole을 생산할 수 있는 세균의 능력을 평가하는 것으로, 세균에 의해 생성된 indole을 Ehrlich 제제(95 ml of 95 ethanol, 1 gm of *p*-dimethylaminobenzald-

hyde, 20 ml of concentrated HCl)나 Kovács 제제 (150 ml of isoamyl alcohol, 10 gm of *p*-dimethylaminobenzaldehyde, 50 ml of concentrated HCl)로 검출하는 실험이다²³⁾. 표준균주 및 치주염 환자에서 분리한 *F. nucleatum* 균주를 0.05% L-tryptophan(Research organics Inc., Cleveland, OH, USA)이 함유된 Schaedler 한천 고형배지에 도달하여 37℃ 혐기성배양기에서 24시간 배양하였다. Schaedler 한천 고형배지에서 자라난 *F. nucleatum* 균락 하나를 멸균된 이쑤시개로 따서 100 μl의 Kovács 제제를 떨어뜨린 Whatman No. 2 paper에 문지른 다음 2분내에 파란색 또는 녹색이 나타날 경우 양성(+)으로, 아무런 색깔 변화가 없으면 음성(-)으로 판정하였다.

2) Catalase test

선택배지에서 48시간 배양한 *F. nucleatum* 세균 균락을 조심히 멸균된 백금으로 떼어낸 다음, 이를 3% 과산화수소수 (H₂O₂)에 넣어 산소가 발생할 경우 양성(+), 아무런 반응이 없는 경우 음성(-)으로 판정하였다.

3) Esculin test

Esculin을 가수분해할 수 있는 세균의 능력을 알아보기 위해 시행하는 실험으로, 먼저 erythromycin이 함유된 Schaedler 배지에서 24시간 *F. nucleatum*를 배양하고, 이들 세균배양액 20 μl를 1% Trypticase soy broth(Difco, Lab., Detroit, MI, USA), 0.5% yeast extract, 0.05% ferric citrate, 0.5% sodium chloride 및 0.1% esculin이 혼합된 배지 200 μl에 접종하여 48시간 동안 37℃ 혐기성배양기에서 배양하여 색깔의 변화를 관찰하였다. 이 때 검정색에 가까운 짙은 갈색을 띠면 양성(+)으로, 아무런 색깔 변화가 없으면 음성(-)으로 판정하였다.

5. *F. nucleatum*에서의 플라스미드 추출

Erythromycin이 함유된 Schaedler 배지에서 24시간 배양하여 통상의 alkaline lysis법으로 AccuPrep™

Plasmid Extraction Kit (Bioneer Corp.)를 이용하여 제조회사의 지시대로 추출하였다.

III. 연구결과

1. *F. nucleatum* 선택배지에서 세균배양, 16S rDNA 핵산염기서열 결정법을 통한 *F. nucleatum*의 동정

*F. nucleatum*의 선택배지에서 보라색을 띠는 세균 균락 98개를 선택하여 *F. nucleatum* 종-특이 프라이머를 이용한 중합효소연쇄반응법을 시행하여 양성 반응을 보인 균주를 16S rDNA의 클로닝과 핵산염기서열 결정법을 시행하여, 기존에 알려진 표준균주 *F. nucleatum*들의 16S rDNA 핵산염기서열과 98%이상 상동성을 보이는 17 균주의 *F. nucleatum*들을 얻었다(Table 1).

본 연구에서 분리한 각각의 *F. nucleatum*에서 클로닝한 16S rDNA의 핵산염기서열과 기존에 알려진 *F. nucleatum* 표준균주들의 16S rDNA의 핵산염기서

열 상동성을 바탕으로 phylogenetic tree를 만들어본 결과 45개 이내의 염기가 서로 다른 경우를 한 군으로 분류하면 10개의 그룹으로 나눌 수 있었다(Figure 1). 그룹 I은 *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953, ChDC PV-F42, ChDC PV-F65이며, 그룹 II는 ChDC PV-F46, 그룹 III은 ChDC PV-F67, ChDC PV-F49, ChDC PV-F63, 그룹 IV는 ChDC PV-F53, ChDC PV-F61, ChDC PV-F45, 그룹 V는 ChDC PV-F48, ChDC PV-F55, 그룹 VI는 *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586, ChDC F37, ChDC F38, 그룹 VII에는 *F. nucleatum* subsp. *animalis* NCTC 12276, ChDC PV-F58, 그룹 VIII에는 *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256, ChDC F8, 그룹 IX에는 ChDC PV-F37, 그룹 X에는 ChDC F47이 속하였다.

2. 환자에서 분리 동정한 *F. nucleatum*의 생화학 검사

생화학 검사결과 ChDC F38 균주는 indole test에

Table 1. Homology search of 16S rDNA nucleotide sequence of *F. nucleatum* isolated from sub-gingival plaque of patients

Strains	Genus or species match [Gene Bank access number]	Identity(%)
ChDC F8	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>vincentii</i> ATCC 49256 [AJ006964]	99
ChDC F37	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586 [AE010497]	99
ChDC F38	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586 [AE010497]	99
ChDC F47	<i>F. subsp.</i> oral clone CZ006 [AF287810]	98
ChDC PV- F37	<i>F. naviforme</i> NCTC 11464 [AJ006965]	99
	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586 [AE010497]	98
ChDC PV- F42	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> ATCC 10953 [AF287812]	98
ChDC PV- F45	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> ATCC 10953 [AF287812]	98
ChDC PV- F46	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586 [AE010523]	98
ChDC PV- F48	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586 [AE010523]	98
ChDC PV- F49	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> ATCC 10953 [AF287812]	98
ChDC PV- F53	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> ATCC 10953 [AF287812]	98
ChDC PV- F55	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> ATCC 10953 [AF287812]	98
ChDC PV- F58	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586 [AE010523]	98
ChDC PV- F61	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586 [AE010523]	98
ChDC PV- F63	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> ATCC 10953 [AF287812]	98
	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586 [AE010523]	98
ChDC PV- F65	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586	98
ChDC PV- F67	<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> ATCC 10953 [AF287812]	98

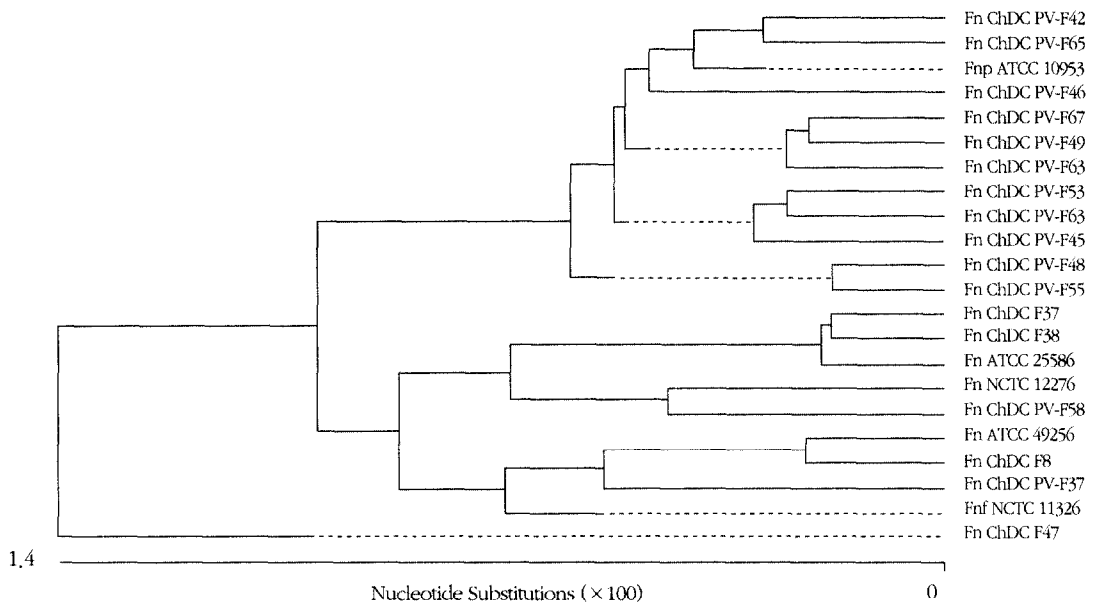


Figure 1. Dendrogram derived from homology analysis from 16S rDNA sequence of *F. nucleatum* isolated from subgingival plaque of Korean periodontitis patients

Table 2. Biological test of *F. nucleatum* clinical isolates

Strains	Indole test	Catalase test	Esculin test
ATCC* 25586	+	-	-
ATCC* 10953	+	-	-
ChDC** F8	+	-	-
ChDC F37	+	-	-
ChDC F38	-	-	-
ChDC F47	+	-	-
ChDC PV-F37	+	-	-
ChDC PV-F42	±	-	-
ChDC PV-F45	+	-	±
ChDC PV-F46	+	-	±
ChDC PV-F48	+	-	-
ChDC PV-F49	+	-	-
ChDC PV-F53	+	-	-
ChDC PV-F55	+	-	-
ChDC PV-F58	+	-	-
ChDC PV-F61	+	-	±
ChDC PV-F63	+	-	-
ChDC PV-F65	±	-	-
ChDC PV-F67	+	-	-

* American Type Culture Collection (University Boulevard, Manassas, VA, USA)

** Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University

+: Positive reaction

±: Weak positive reaction

-: Negative reaction

음성 반응을 보였고, ChDC PV-42와 ChDC PV-F65가 약한 양성 반응을 나머지 균주는 모두 양성 반응 보였다(Table 2). Catalase test에는 모든 균주가 음성 반응을 보였다(Table 2). Esculin 가수분해능 실험에서는 ChDC PV-F45, ChDC PV-F46 및 ChDC PV-F61 균주가 약한 양성 반응을 보였고, 나머지는 모두 음성 반응을 보였다(Table 2).

3. *F. nucleatum*에서의 플라스미드 추출

본 실험에서 분리 동정한 *F. nucleatum*들에서는 플라스미드가 추출되지 않았다.

IV. 고안

현재까지 개발된 세균 동정(identification)법으로는 세균배양법, ribotyping법, DNA-DNA hybridization, DNA fingerprinting, DNA probes, 16S 또는 23S 라이보솜 RNA(rRNA) 유전자 염기서열 결정법, 종합 효소연쇄반응법 등이 이용되고 있다^{24,25}. 이러한 방법들 중 세균 종의 동정에 있어서 가장 신뢰할 만한 방법이 16S 또는 23S rDNA 염기서열 결정법이다²⁴. 세균의 16S 또는 23S rDNA 염기서열은 종간에 서로 상동성이 보존되어 있어 세균 분류학에 있어서 가장 신뢰할 수 있는 기준점이 된다. 특히, 16S rDNA는 23S rDNA보다 염기서열이 짧기 때문에 많은 세균 종에 대한 자료가 있어, 미지의 세균에 대한 종 수준에서의 동정에 가장 많이 사용되고 있다. 일반적으로 두 세균간의 16S rDNA 핵산염기서열이 약 98% 이상 상동성을 갖으면 예외는 있지만 같은 종으로 여긴다.

본 연구에서도 환자로부터 분리 배양된 세균의 동정에 있어서 16S rDNA 클로닝 및 핵산염기서열결정법을 기준으로 *F. nucleatum*을 동정하였으며, 각각의 균주에서 클로닝한 16S rDNA의 핵산염기서열을 표준균주들과 상동성 비교를 한 결과 98% 상동성을 기준으로 10개의 그룹으로 나뉠 수 있었다. 16S rDNA 핵산염기서열을 바탕으로 둔 분류학적 측면에서, 이러한 결과는 다른 연구자들에 의해 최근 3개

내지 4개의 아종으로 분류되었던 것보다 더 많은 종류의 아종이 존재할 가능성을 시사할 것으로 사료된다^{18,19,20,21}.

한편, *F. nucleatum* 아종의 표준균주간의 16S rDNA 핵산염기서열의 상동성을 비교해보면, *F. nucleatum* subsp. polymorphum ATCC 10953과 *F. nucleatum* subsp. vincentii ATCC 49256 간의 상동성이 95.4%로 가장 낮고, *F. nucleatum* subsp. nucleatum ATCC 25586과 *F. nucleatum* subsp. vincentii ATCC 49256 간의 상동성이 97.6%로 가장 높았다(Figure 1). 또한 본 연구에서 분리한 임상 균주들간의 16S rDNA 핵산염기서열의 상동성도 95.9%(ChDC PV-F46, ChDC PV-F65, ChDC F47)과 *F. nucleatum* subsp. fusiforme NCTC 11326)로부터 99.7%(ChDC F37과 ChDC F38 및 ChDC PV-F48과 ChDC PV-F55)까지 다양하였다(Figure 1). 이러한 결과들을 종합할 때 16S rDNA 핵산염기서열 결정법을 이용한 분류학적 측면에서 *F. nucleatum*의 여러 아종들은 새로운 종으로 재분류도 가능하다고 사료된다.

F. nucleatum 종은 일반적으로 catalase 활성과 esculin 가수분해능은 없고, indole 합성능은 있는 것으로 보고되었고, 본 연구의 결과 임상에서 분류한 모든 균주들은 catalase test에 음성을 보여서 여러 보고들과 같은 결과를 보여주었다^{26,27}. 그러나 indole 합성능 실험과 esculin 가수분해능 실험 결과 몇몇 균주에서 차이가 있었다. 특히, *F. nucleatum*은 esculin을 가수분해시키지 못한다고 보고되었지만, 3개의 임상 분류 균주가 미약한 양성 반응을 보였다(Table 2). 다른 연구 결과들과 차이를 보이는 본 연구 결과의 원인을 현재로서는 단정할 수 없으나, 숙주의 인종에 따른 차이를 고려할 수 있다. 즉, 동양인과 서양인의 구강에 존재하는 *F. nucleatum*의 표현형의 차이에 의한 것을 추정할 수 있으며, 지금까지 국내에서 *F. nucleatum*의 임상 분류 균주의 확립이나, 특성에 대한 보고가 없다는 점을 미루어 볼 때 그 가능성을 검증하는 실험이 필요하리라 사료된다.

Dzink 등¹⁸)은 *F. nucleatum*이 파괴성 치주질환과 연관이 있으면서 치료가 성공적으로 끝났거나, 건강한 치주조직의 치은연하 치태에서도 많은 수가 검출

된다는 점과 *F. nucleatum* 종이 여러 측면에서 이질성이 있다는 점을 고려하여, *F. nucleatum* 내에 여러 아종이 존재하고, 이들 중 특정 아종이 치주질환에 연관성이 깊고, 다른 아종들은 치주질환과 관련성이 적어 건강한 부위에 존재하리라고 제안하였다. Gharbia 등²⁸⁾은 치주질환이 있는 부위의 치면세균막에서 분리한 *F. nucleatum*의 11 균주 중 9 균주가 *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*이었으며, 건강한 부위에서 분리한 균주들은 2 균주의 *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*을 제외하고, 모두 *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* 또는 *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* 이었다고 보고하였으나, 연구 샘플 수가 너무 적었다는 제한점을 가지고 있다.

본 연구는 한국인의 치면세균막에서 분리된 각각의 균주를 아종 수준에서 16S rRNA 유전자의 핵산염기서열을 바탕으로 핵산염기서열분석 프로그램인 MegAlign으로 분석할 때, 2 균주의 *F. nucleatum* subsp. *polymorphum*, 2 균주의 *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*, 1 균주의 *F. nucleatum* subsp. *vincentii*, 1 균주의 *F. nucleatum* subsp. *animalis*, 어떠한 아종으로도 분류가 되지 않는 11 균주가 검출되었다(Figure 1). 그러나, 단순히 16S rDNA 핵산염기서열의 상동성을 기준으로 살펴본다면, 8 균주의 *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*, 6 균주의 *F. nucleatum* subsp. *polymorphum*, 1 균주(ChDC F8)의 *F. nucleatum* subsp. *vincentii*, 1 균주(ChDC F63)의 *F. nucleatum* subsp. *nucleatum/polymorphum*이 검출된 결과로 분석되었다. 이러한 두 데이터의 차이점은 전자의 경우 16S rRNA 유전자 핵산염기서열의 구조적인 측면을 고려한 것이고, 후자의 경우 단순히 상동성만을 비교한 것의 차이로 MegAlign 프로그램으로 이용하여 분석한 전자의 경우가 더욱 신뢰성이 있다고 할 수 있다.

치면세균막내 *F. nucleatum* 아종의 분포양상은 여러 연구자들에 의해 다양하게 보고되었는데, 치은열구에서 *F. nucleatum* subsp. *vincentii*, *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*, *F. nucleatum* subsp. *polymorphum*이 각각 7:3:2의 비율로 존재한다는 것이다^{28,29)}. 그러나 본 연구 결과는 상이한 결과를 보임으

로서 한국인의 구강에 존재하는 *F. nucleatum*은 유전학적 측면에서 서양인에서 분리된 것과 많은 차이점이 있으며, 현재로서는 단정할 수 없으나 숙주의 인종에 의한 차이가 존재하리라 사료된다.

또한 시간적, 경제적 그리고 노동력적인 측면에서 많은 어려움이 있는 기존의 세균 배양법 및 16S rDNA 핵산염기서열 결정법보다는 좀더 신속하고 경제적인 방법을 모색하여, 치주조직이 건강한 부위, 치은염이 발생한 부위 그리고 진행된 치주질환이 발생한 부위의 다양한 치면세균막에서 *F. nucleatum* 아종의 분포에 대한 연구를 수행한다면 좋은 역학 자료를 얻을 수 있으리라 사료된다.

V. 결론

한국인의 치은연하 치태에 존재하는 *F. nucleatum*을 분리하기 위해 세균배양법과 16S rDNA 클로닝 및 핵산염기서열결정법으로 동정한 다음, 이를 다시 한 번 확인하기 위해 *F. nucleatum*을 동정하는데 이용되는 몇 가지 생화학 검사를 시행하였다. 그 결과 GenBank 등의 데이터베이스를 통하여 98% 이상의 상동성을 보이는 균락을 *F. nucleatum* 라고 판정하였고, 총 98 균락을 검색한 결과 17 균주의 *F. nucleatum*을 얻을 수 있었다. 이 균주를 *F. nucleatum* 표준 균주들의 16S rDNA의 핵산염기서열 상동성을 바탕으로 phylogenetic tree를 만들어본 결과 45개 이내의 염기가 서로 다른 경우를 한 군으로 분류하면 10개의 그룹으로 나눌 수 있었다.

이러한 결과를 종합할 때 16S rDNA의 핵산염기서열결정법을 이용한 분류학적 측면에서 *F. nucleatum*의 여러 아종들은 새로운 종으로 재분류도 가능하다고 여겨지고, 앞으로 치주조직이 건강한 부위, 치은염이 발생한 부위 그리고 진행된 치주질환이 발생한 부위의 치면세균막에서 *F. nucleatum* 아종의 분포에 대한 연구를 수행한다면 좋은 역학 자료를 얻을 수 있으리라 사료된다. 그리고 확립된 *F. nucleatum* 균주는 한국인의 치은연하 치면세균막에서 이 세균 종의 역할 등의 연구에 이용될 수 있으리라 사료된다.

VI. 참고문헌

1. Socransky SS, Haffajee AD, Dzink JL. Relationship of subgingival microbial complexes to clinical features at the sampled sites. *J Clin Periodontol* 1998;15:440-444.
2. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 2001;183:3770-3783.
3. Darveau RD, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol* 2000 1997;14:12-32.
4. Bolstad AI, Jensen HB, Bakken V. Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clin Microbiol Rev* 1996;9:55-71.
5. Knorr M. Über die fusospirillare Symbiose, die Gattung *Fusobacterium* (K. B. Lehmann) und *Spirillum sputigenum*. (Zugleich ein Beitrag zur Bakteriologie der Mundhöhle). I. Mitteilung: die Epidemiologie der fusospirillaren Symbiose, besonders der Plaut-Vincentischen Angina. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt. 1 Orig* 1922;87:563-545.
6. Knorr M. Über die fusospirillare Symbiose, die Gattung *Fusobacterium* (K. B. Lehmann) und *Spirillum sputigenum*. (Zugleich ein Beitrag zur Bakteriologie der Mundhöhle). I. Mitteilung: die Gattung *Fusobacterium*. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt 1 Orig* 1923;89:4-22.
7. Moore WEC, Holdeman LV. *Fusobacterium* Knorr 1922, p. 404-407. In: Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. (Eds.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1974.
8. Tanner AC, Haffer C, Bratthall GT, Visconti RA, Socransky SS. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J Clin Periodontol* 1979;6:278-307.
9. Calhoun DA, Mayberry WR, Slots J. Cellular fatty acid and soluble protein profiles of oral fusobacteria. *J Dent Res* 1983;62:1181-1185.
10. Moore WEC, Hash DC, Holdeman LV, Cato EP. Polyacrylamide slab gel electrophoresis of soluble proteins for studies of bacterial floras. *Appl Environ Microbiol* 1980;39:900-907.
11. Jantzen E, Hofstad T. Fatty acids of *Fusobacterium* species: taxonomic implications. *J Gen Microbiol* 1981;123(Pt 1):163-171.
12. Falkler WA, Jr, Lai R et al. The ELISA system for measuring antibody reactive to *Fusobacterium nucleatum* in the sera of patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* 1982;53:762-766.
13. Hofstad T, Skaug N, Bjørnland T. O-antigenic cross-reactivity in *Fusobacterium nucleatum*. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect B* 1979;87:371-374.
14. Kaufman J, DiRienzo JM. Evidence for the existence of two classes of corn cob (coaggregation) receptor in *Fusobacterium nucleatum*. *Oral Microbiol Immunol* 1988;3:145-152.
15. Kristoffersen T, Maeland JA, Hofstad T. Serologic properties of lipopolysaccharide endotoxins from oral fusobacteria. *Scand J Dent Res* 1971;79:105-112.
16. Gharbia SE, Shah HN. Characteristics of glutamate dehydrogenase, a new diagnostic marker for the genus *Fusobacterium*. *J Gen Microbiol* 1988;134(Pt 2): 327-332.
17. Potts TV, Holdeman LV, Slots J. Relationships among the oral fusobacteria assessed by DNA-DNA hybridization. *J Dent Res* 1983;62:702-705.
18. Dzink JL, Sheenan MT, Socransky SS. Proposal of three subspecies of *Fusobacterium nucleatum* Knorr 1922: *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* subsp. nov., comb. nov.; *Fusobacterium nucleatum* subsp. *polymorphum*

- subsp. nov., nom. nev., comb. nov.; and *Fusobacterium nucleatum* subsp. *vincentii* subsp. nov., nom. rev., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1990;40:74-78.
19. Gharbia SE, Shah HN. *Fusobacterium nucleatum* subsp. *fusiforme* subsp. nov. and *Fusobacterium nucleatum* subsp. *animalis* subsp. nov. as additional subspecies within *Fusobacterium nucleatum*. *Int J Syst Bacteriol* 1992;42:296-298.
 20. Gharbia SE, Shah HN. Glutamate dehydrogenase and 2-oxoglutarate reductase electrophoretic patterns and deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization among human oral isolates of *Fusobacterium nucleatum*. *Int J Syst Bacteriol* 1989;39:467-470.
 21. Gharbia SE, Shah HN. Heterogeneity within *Fusobacterium nucleatum*, proposal of four subspecies. *Lett Appl Microbiol* 1990;10:105-108.
 22. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Ed, 2nd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.
 23. Lauderdale TL, Chapin KC, Murray PR: Reagents. In: Murray ER, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, and Tenover RH. (Eds.), *Manual of CLINICAL MICROBIOLOGY*, 7th ed. ASM press Washington, 1999:1668.
 24. Krieg NR. Identification of Prokaryotes. In: Bergeys Manual of Systematic Bacteriology (Garrity, G., Ed.), Vol. 1, second ed. Springer Verlag New York, 2001:33-38.
 25. Kook JK, Kim MK, Seong, JH, Kim DK, Kim BO, Park JC, Kim KK, Choe SJ, Min BM. A new method for rapid screening of bacterial species- or subspecies-specific DNA probes. *FEMS Microbiol Lett* 2003;219:121-127.
 26. Roberts GL. Fusobacterial infections: an underestimated threat. *Br J Biomed Sci* 2000;57:156-62.
 27. Jousunues-Sinerm HR, Summanen PH, Finegold SM. *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, and other anaerobic gram-negative rods and cocci. In: Murray, E.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C. and Tenover, R.H. (Eds.), *Manual of CLINICAL MICROBIOLOGY*, 7th ed. ASM press Washington, 1999:690-711.
 28. Gharbia SE, Shah HN, Lawson PA, Haapasalo M. Distribution and frequency of *Fusobacterium nucleatum* subspecies in the human oral cavity. *Oral Microbiol Immunol* 1990;5:324-327.
 29. Moore WEC, Moore LVH. The bacteria of periodontal disease. *Periodontology* 2000;5:66-77.

Isolation of *Fusobacterium nucleatum* from subgingival plaque in Korean

Hyun-Seon Jang^{1,3}, Seo-Hoon Kim¹, Hwa-Sook Kim², Joong-Ki Kook^{2,3},
Mi-Kwang Kim², So-Young Yoo², Byung-Ock Kim^{1,3}

Department of Periodontology¹, Department of Oral Biochemistry²,
Oral Biology Research Institute³, College of Dentistry, Chosun University

The purpose of this study was to isolate and characterize the *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) from subgingival plaque in Korean periodontitis patients. The subgingival plaque samples of periodontitis patient were collected with sterilized paper point. The paper point was put into reduced transfer medium and then immediately transferred to laboratory. The subgingival samples were diluted by 10,000 folds and plated on *F. nucleatum*-selective media agar plate. The plates were incubated at 37°C in an anaerobic chamber for 3 days. The violet-colored colonies were selected and subjected to further verification whether those are *F. nucleatum* or not. For further confirmation, 16S rRNA genes (rDNA) were cloned from each of bacterial clones and determined sequence of 16S rDNA. In this study, we found 17 distinct clinical isolates of *F. nucleatum* from subgingival plaque. The clinical isolates will be a useful in various studies in periodontology.