

Enzyme-linked immunosorbent assay를 이용한 국소적, 유년성 치주염 환자의 혈청내 Actinobacillus actinomycetemcomitans Y4 균주 항체역가에 관한 연구

정종평* · 정진형*** · 최선진**

* 서울대학교 치과대학 치주과학 교실

** 서울대학교 치과대학 미생물학 교실

*** 단국대학교 치과대학 치주과학 교실

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the detection of serum IgG and IgM Antibodies to Actinobacillus Actinomycetemcomitans Y4 in Localized Juvenile Periodontitis.

Chung, C.P.,* Chung, J.H.*** and Choe, S.J.**

* Dept. Periodontology, School of Dentistry, S.N.U.

** Dept. Microbiology, School of Dentistry, S.N.U.

*** Dept. Periodontology, School of Dentistry, Dan Kuk University.

..... > Abstract <

Twelve patients of localized juvenile periodontitis were evaluated to detection of serum IgG and IgM antibodies to Actinobacillus actinomycetemcomitans Y4 strain. Sera were isolated from those patients. Antibody titer of patients sera to Aa strain Y4 were determined by modified enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using sonicated and formalin-fixed whole Aa y4 strain for detection of serum IgG and IgM antibody titers. To compare with health/control and L.J.P., we used 12 healthy dental student who did not exhibited any gingivitis. Results were determined by using ELISA reader at 400nm absorbance value. Data analysis were performed with comparison of the regression functions relating absorbance to dilution and Dunnett t-test. Significant high antibody titer to Aa Y4 in L.J.P. sera were shown in this examination (281.4 Eu-G to 162.80 Eu-G, 106.0 Eu-M to 40.0 Eu-M for sonicated Aa Y4 antigen and 653.960. to 138.117 Eu-M for intact Aa Y4) and this data were also statistically significant (P<0.05).

This work was supported in part from Seoul National University Hospital Grant and Korean Science Foundation.

*본 논문의 일부는 서울대학교병원 연구비 및 한국과학재단 연구비에 의해 이루어짐.

I. 서 론

국소적 유년성 치주염은 과거에는 그 원인을 알지 못하고 단지 치주증으로 명명 되어왔다. 이 질환은 그 빈도에 있어서는 그리 많지는 않지만 청소년 특히 중·고등학교 소년 소녀에서 특발하며 또한 골조직 파괴와 염증정도가 심하면서 특이하게도 상악 전치와 제 1 대구치의 좌우가 대칭성으로 시작되며 불과 수년내에 급속히 진행되어 치아의 조기 상실을 야기하는 경우가 허다하다(Baer, 1963).

최근 세균학의 발달과 더불어 혐기성 세균의 구강내에서의 분류와 이들 균주의 특성에 따라 재분류하고 각종 치주질환과 이와 관련되어 가장 빈발하게 나타나는 균주의 분리가 활발히 진행되고 있다.

국소적 유년성 치주염의 환자의 치주낭내에서 가장 빈발히 나타나는 균인 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*는 20세기 초기에 발견되었으나 국소적 유년성 치주염 환자의 치주낭내에서 분리, 배양되기는 가장 최근의 일이다.(Newman 1977, Slots 1976).

이균은 그람 음성균으로서 capnophilic하고, 발효능력을 지니며 다형태의 모양을 가진 막대기형 간균이다.(Mandell 1981, Slots 1979, Slots 1982)

최근 몇몇 학자들의 연구에 의하여 국소적 유년성 치주염 환자의 치주낭내에서 97% 발견빈도로 보이며 건강인의 치주낭내에서는 단지 16% 발견빈도를 보이며 다른 치주염 환자의 경우 20% 정도의 발견빈도를 나타내고 있다. 이러한 발견빈도로 봐서도 이균과 국소적 치주염과의 관계를 살필수 있다. 또한 국소적, 유년성 치주염 환자의 감염된 치주낭 중 깊은 치주낭의 95% 이상에서 이균을 가지고 있음을 알수 있었다.(Slots, Zambon 1982)

혈청학적인 연구에 의하여 이균을 분류할 경우 3가지의 명확한 혈청형을 나눌수 있다. 특이한 것은 모든 국소적 유년성 치주염 환자에서 대부분이 한가지의 균주만을 가지고 있음이 발견되었다.(Slots 1982, Zambon 1983)

이들균과 면역학적인 연구가 균의 혈청형 분류와 더불어 활발히 진행되었는데 이중 Aa Y4 (serotype B)에 대해서는 대부분의 국소적, 유년성 환자의 혈청내에서 높은 항체역가를 보이고 있으며(Zamb-

on 1983), 따라서 이 Aa Y4 균과 국소적, 유년성 치주염과의 깊은 상관관계를 알수가 있다.(Ebersole 1980, Ebersole 1982)

또한 이 Aa Y4 균주는 (serotype B) 혈액내 다형핵 백혈구를 용해시킬수 있는 leukotoxin를 생산함을 발견하였고 이러한 Aa Y4 균주의 역할을 국소적 유년성 치주염에서 급성 진행성 치조골과피외밀접한 관계를 나타내고 있음을 보이며 국소적 유년성 치주염 환자에서 보이는 다형핵 백혈구의 화학주성 결핍의 원인 중 후천적인 기능 저하와도 어떤 연관성을 나타내고 있다고 본다.(Lavine 1979, Van Dyke 1980, McArthur 1981, Slots 1982)

이러한 국소적 유년성 치주염 환자 치주낭내에서 가장 빈발하게 나타나며 이들 환자의 혈청내에서 높은 항체역가를 보이는 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* 균주 Y4 균주 (serotype B)에 대한 한국인의 국소적 유년성 치주염환자의 혈청내 항체역가 정도를 관찰하고 이들 균주의 한국인 국소적 유년성 치주염과의 관련성을 규명하고자 modified enzyme-linked immunosorbent assay법을 이용하여 혈청내 IgG 및 IgM 항체역가를 연구하는데 그 목적을 두었다.

II. 실험재료 및 방법

세균배양: 국소적, 유년성 치주염 환자의 치주낭내에서 자주 분리된 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain Y4 균주는 혐기성 Gram 음성의 작은 막대기형 간균으로서 catalase와 benzidine positive이며 glucose, fructose 그리고 maltose를 발효시키나 galactose, lactose, sucrose, trehalose, mannitol과 xylose는 발효시키지 않는다.

최종 산물은 주로 acetic과 succinic산임을 확인 할 수 있다. 본논문에 사용된 Aa Y4 균주는 Dr. S. S. Socransky (Forsyth Dental Center, 140 Fenway, Boston, Ma, U. S. A.)로부터 동결건조상태로 기증받아서 본 서울대학교 치과대학 미생물학과에서 하기 방법으로 배양하였다.

즉 Aa strain Y4를 혐기성 상태에서 (80% N₂ + 10% CO₂ + 10% H₂) mycoplasma broth base (B. B. L)에서 48시간 키운다음 원심분리 (13,000×)시켜 3번 Phosphate-buffered sali-

ne(0.1M phosphate, P. B. S) pH 7.2로 세척한 후 3.5% Buffered formal saline으로 25°C에서 16~18시간 보관하여 이균이 죽음을 확인하였다.

세균의 초음파 파절 : 0.5% Buffered formal saline 속의 세균을 0.1M Phosphate-buffered saline으로 세번 씻어낸후 초음파 파절기(Artek system corp., Ultrasonic Dismembrator Artek system Corp, Farmingdale, N. Y. 11735, U. S. A.)로 50분간 냉각 상태에서 분쇄시킨 후 Gram염색으로 현미경 관찰하여 완전 파절여부를 확인한 후 재원심 분리(13,000×)시켜 얻은 상층액만을 0.2μm pore 크기의 여과지에 여과시켜 Lowry법에 의하여 단백질 정량을 실시한 후 사용시까지 -20°C 냉동실에 저장 보관하였다.

국소적, 유년성 치주염환자 혈청 추출 : 국소적, 유년성 치주염으로 진단된 15세에서 21세까지의 환자 12명을 택하여 말초혈액을 채취한 후 원심분리(2500×g)시켜 얻은 상층액을 분리시켜 사용시까지 -70°C 냉동실에 보관 하였다.

Modified enzyme-linked immunosorbent assay: Engvall과 Perlmann 에 의하여 처음시도된 ELISA technique은 Ruitenberg등에 의하여 보강되었으며 Voller등에 의하여 microplate에 사용되는 방법이 채택되었다.

본 실험을 위하여 disposable flat-bottom polystyrene microtiter plates(Dynatech 1-223, 29; Dynatech Laboratories, Inc., Alexandria, Va.)을 사용하였다. 초음파 파절후 얻은 항원을 0.02% NaN₃가 들어있는 0.1M Na₂CO₃Buffer(pH.9.6) 용액으로 단백질 농도를 120μg/ml로 만든다음 예비 실험을 통하여 항원을 계속 희석시켜서 plate에 부착시킨 후 적정 항원량을 조사하였던바 단백질 5μg/ml가 최하의 적정 농도로 판단되었다. 항원 부착을 위하여 microtiter plate wells에 200ul의 항원(5μg/ml)을 넣은 후 water bath에서 37°C로 2시간 부화시킨 다음 항원 coating buffer 용액이 들은 2% (wt/vol) bovine serum albumin 100ul를 첨가하여 4°C 냉장고에 사용시까지 보관하였다.

실험전에 plates의 각 well을 washing buffer용액으로 3번 씻어낸후 Ab dilution buffer(PBS-0.05% Tween 20+0.5% B. S. A.+0.02% NaN₃) 용액

으로 적정한 정도를 계속 희석된 환자의 혈청 항체 200ul를 각 well에 넣은 후 water bath에 37°C 2시간 동안 배양시키고 부화되어 반응시킨 후 plate의 well를 washing buffer 씻어내고 conjugate dilution buffer(PBS -0.05% tween 20+0.5% B. S. A.+0.02% NaN₃)로 적정량 희석된 Alkaline phosphatase-conjugated anti-human immunoglobulin(Orion Diagnostica, Helsinki, Finland) IgG 및 IgM을 각 well에 200ul씩 넣어서 37°C water bath에서 1시간 및 1시간 반을 부화시킨 후 다시 washing buffer 용액으로 세척하고 substrate buffer 용액에 용해시킨 p-nitrophenylphosphate(type 104; Sigma chemical Co., ST. Louis, MO.)을 적정량 wells속에 넣어서 37°C water bath에서 1시간 동안 반응시킨 후 이 효소 반응을 정지시키기 위하여 50ul의 1N NaOH를 넣었다.

이렇게 반응을 정지시킨 후 일정기간 보관 하였다가 400nm absorbance ELISA Reader Colorimeter로 plate의 well 상층부에서 하단부까지로 관통하여 측정하였다. 이때 대조군으로는 substrate와 1N NaOH가 들어있는 용액을 사용하였다. 또한 conjugate 대조군과 antibody대조군도 동시에 측정하였다.

Intact Aa Y4균주 사용실험 :

Formaline에 고정시킨 Actinobacillus actinomycetemcomitance Y4 균주를 antigen coating buffer로 세척한 후 580nm absorbance의 Colorimeter를 이용하여 1.5 O.D.로부터 0.10.D까지 계속 희석시킨 후 microtiter plates well에 부착 정도를 측정하여 가장 최저의 적정농도를 찾아서 0.30.D로 희석시킨 농도를 사용하여 용액 200ul를 microtiter plates well에 넣은 후 37°C water bath에서 2시간 동안 부화시켜 부착시켰다. 항체 반응 효소반응 및 substrate반응은 초음파 파절에서 얻은 항원의 E-LISA 방법과 동일하게 하였다.

예비실험 : 실험결과에서 나온 400nm에서의 absorbance value는 .0.1이하의 수치는 포기하였고 0.1이상의 수치에서 적정량의 혈청 희석도를 구하였다.

여기에서 1/1600과 1/800의 혈청 희석도에서 안정된 값을 구할수 있었다.

conjugate의 적정한 실험 농도를 구하기 위하여 IgG 및 IgM conjugate를 1/50, 1/100, 1/200, 1/400등으로 희석하여 예비실험을 하였던

바 IgG conjugate의 경우 1/200에서 적절한 적 선형을 구할수 있었고 IgM conjugate의 경우 1/100에서 적절한 적선형을 나타내고 있었다.

Actinobacillus actinomycetemcomitans Y4 균에 대한 ELISA 특성을 위한 흡착실험: Aa Y4 균에 대한 혈청항체의 특성을 규명코져 formalinized Aa Y4 균과 혈청을 흡착시켰다.

1:25로 희석한 각 혈청을 각기다른 농도의 Aa Y4와 1:1로 섞은 후 37°C에서 2시간을 부화 시킨다음 원심분리시켜 상층혈청액을 얻은 다음 걸른 상층액을 ELISA법에 의하여 혈청내 남아있는 Aa Y4에 대한 항체역가를 실험 하는 antibody reduction test를 실시하였다.

III. 결 과

1) 항체, 항원 및 Conjugate 농도결정 실험:

예비실험을 통하여 실험에 이용되는 항체, 항원 및 Conjugate의 농도를 결정하기 위하여 항체는 1/10부터 1/1000까지 희석시킨 후 이를 예비 실험에 사용하였고 항원의 경우 초음파파절 추출항원의 농도는 18.5ug, 9.25ug, 4.63ug, 및 2.31ug을 이용하였으며 Alkaline phosphase Conjugated swine anti-human IgG, IgM conjugate는 1/100 및 1/200 으로 희석하여 각 농도를 table 1에서와 같이 실험하였

든 바 항체의 농도는 1/1000전후에서 적정 값이 나오고 있었고 이에 대한 conjugate의 농도는 1/100에서 보다 1/200에서 더 적정 값을 보이고 있었다.

따라서 본 실험에서는 항체의 경우 1/200에서 1/3200까지 희석된 혈청항체를 이용하였고 초음파파절 추출항원의 경우 4.63ug -5ug의 농도를 이용하였다.

Intact Aa Y4 실험을 위한 농도측정은 580nm의 absorbance의 분광측정기로 실시하고 2.0 O. D.로부터 0.1 O. D.까지 계차적으로 희석시켜 microtiter plate well의 부착실험을 실시한 결과 0.3~0.25 O. D.의 농도가 최저 적정농도로 판명되었으며 흡착 정도는 1시간에서 2시간 사이를 37°C water bath 및 CO₂배양기에 부화시 좋은 결과를 나타내고 있었다. 따라서 본 실험에서는 Intact Aa Y4 strain실험의 경우 0.3 O. D.의 농도를 이용하였다.

2) Intact Aa Y4 strain 국소성, 유년성 치주염 환자 혈청항체에 대한 흡착실험을 이용한 특이성 검사:

Intact Aa Y4 strain이 한국인 국소성 유년성 치주염 환자의 혈청항체와의 특이성관계를 관찰하고자 3명의 국소, 유년성 치주염환자를 임의로 택하여 ELISA방법에 의하여 실험결과 Table 2에서와 같이 정상 국소, 유년성 치주염환자 혈청항체 역가치를 100로 한 경우 200 O. D.의 농도에서 흡착시

Table 1. Antigen, conjugate Concentration determination.

| Ab. dilution Ag. dilution | 1/10 | 1/10 | 1/100 | 1/100 | 1/1000 | 1/1000* | Ab. 1/10 cont. | Conj. cont. | Subst. cont. | Conj. subst togeth 1/10 |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|--------|---------|-------------------|----------------|-----------------|----------------------------------|
| 18.5 ug | H | H | H | H | H | 1.234 | 0.893 | 1.022 | 0.909 | H |
| 18.5 ug | H | H | H | H | H | 1.220 | 0.811 | 0.826 | 0.827 | H |
| 9.25 ug | H | H | H | H | H | H | 0.980 | 0.890 | 0.891 | H |
| 9.25 ug | H | H | H | H | H | 1.687 | 0.951 | 1.045 | 0.940 | H |
| 4.63 ug | H | H | H | H | H | 1.731* | 1.101 | 0.912 | 0.841 | H |
| 4.63 ug | H | H | H | H | H | 1.757* | 0.845 | 0.891 | 0.953 | H |
| 2.31 ug | H | H | H | H | H | 1.641 | 0.993 | 0.912 | 0.643 | H |
| 2.31 ug | H | H | H | H | H | 1.684 | 0.877 | 0.866 | 0.602 | H |
| Conj. dilution | 1/100 | 1/200 | 1/100 | 1/200 | 1/100 | 1/200* | - | 1/100 | - | 1/100 |
| Substrate | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

Unit: absorbance of 400nm O.D.

킨 혈청항체의 ELISA역가치는 71.48%, 70.37% 등으로 크게 감소된 반면 다른 1명의 환자에서는 겨우 34.34%정도 감소되었으며 이들 환자들의 혈청을 0.5 O. D. 혹은 0.25 O. D.농도의 Aa Y4에 흡착시킨 후의 ELISA역가치의 감소에는 그리큰 변화를 보이지 않았다.

반면에 건강인의 경우 본 흡착 실험을 통하여 나타난 ELISA혈청 역가치는 비교적 국소, 유년성환자에서와 역가치 감소에서 큰 차이를 나타내지 않고 있으나 국소유년성 치주염 환자의 비 흡착 혈청 (1/800) 항체 ELISA 역가치는 정상인에 비하여 유의성 있게 넓은 수치를 보였다. (Table 2)

3) 국소, 유년성 치주염환자의 Aa Y4 균주에 대한 혈청 항체 역가치 실험:

조음파과절 항원추출 방법에 의한 ELISA 혈청 항체 역가치는 혈청의 농도를 1/200에서 1/3200까지 계차적으로 희석하였으며 안정된 값을 얻을수 있었다. 그중 1/1600 희석도에서 비교적 좋은 결과를 얻었으며 정상대조군에 비하여 국소, 유년성환자군에서 IgG 및 IgM 모두에서 유의성 있게 높은 역가치를 얻을수 있었으며 (Table 3, A.) 통계처리에 의한 regression function 비교에서 유년성, 국소성 치주염환자군은 비교적 안정된 slope range를 가지나 정상대조군 IgG의 경우에는 넓은 slope range를 가지므로 비교적 높은 편차치를 보였다.

즉, 몇몇 정상인의 ELISA 혈청항체 역가치가 높게 나타났다. (Table 3, A. Table 4, A)

Intact Aa Y4 strain에 대한 혈청항체 역가치의 경우 0.3 O. D.의 농도에서 적정치를 얻을수 있었으며 국소 유년성 치주염 환자군에서 IgG의 경우 몇몇 환자를 제외하고는 대부분의 높은 ELISA 역가치가 나타난 반면 정상대조군에서는 IgG에서 2~3인에서 아주 높은 Aa Y4에 대한 혈청항체 역가치를 보임으로서 큰 표준차를 나타내게 되었다. (Table 3, B.)

이러한 큰 표준 편차치에 의하여 slope range에서 아주 넓은 범위를 나타내게 되었다. (Table 4, B) 그러나 IgM의 경우 정상대조군 및 국소 유년성 치주염군 모두에서 상기와 같은 결과를 토대로 Dunnett t-test로 처리한 결과 항원추출 ELISA실험의 결과 Eu-G 및 Eu-M의 경우 통계적으로 유의성있게 높은 항체 역가치가 국소, 유년성환자군에서 보였으며 (281.4 대 162.8 Eu-G, 106.0 대 40.0 Eu-M) Intact Aa Y4 strain 항원 ELISA실험에서 Eu-G의 경우 351.0 대 185.6으로 국소, 유년성 치주염환자 혈청항체 ELISA 역가치가 높았으나 정상대조군의 표준편차가 크므로서 그 유의성이 상실되었다. 그러나 Eu-M의 경우 653.9 대 138.1로서 높은 항체역가치가 국소, 유년성 환자의 경우 나타났고 이는 통계적으로 유의성 있는 값이었다.

Table 2. Specificity of antibody reaction to intact *A. actinomycetemcomitans* Y4 (by adsorption procedure)

| Subj. bact. (con) | L.J.P. 1. | | L.J.P. 2. | | L.J.P. 3. | | Healthy 1. | | Healthy 2. | | Healthy 3. | |
|---------------------------------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|------------|--------|------------|--------|------------|--------|
| | absorb | reduct | absorb | reduct | absorb | reduct | absorb | reduct | absorb | reduct | absorb | reduct |
| pure sera (1/800) | 0.789 | 0% | 0.911 | 0% | 0.434 | 0% | 0.296 | 0% | 0.516 | 0% | 0.410 | 0% |
| sera \bar{c} 2.0 O.D (1/800) | 0.225 | 71.48% | 0.270 | 70.37% | 0.285 | 34.34% | 0.170 | 42.57% | 0.158 | 69.38% | 0.121 | 70.49% |
| sera \bar{c} 0.5 O.D (1/800) | 0.340 | 57.91% | 0.244 | 73.22% | 0.325 | 25.12% | 0.194 | 34.46% | 0.202 | 60.86% | 0.212 | 48.30% |
| sera \bar{c} 0.25 O.D (1/800) | 0.370 | 53.11% | 0.332 | 63.56% | 0.324 | 25.35% | 0.180 | 39.19% | 0.168 | 67.45% | 0.178 | 56.59% |

1.0ml of 1:25 dilution of the sera treated with an equal volume of the Aa Y4 and finally adjusted 1/800 dilution.

Table 3. Reciprocal antibody titers to Aa Y4 absorbance in O.D. 400nm

A. antibody titers to sonicated Aa Y4 strain

| Ab. Subject | L.J.P. IgG (1/1600) | Healthy IgG (1/1600) | L.J.P. IgM (1/1600) | Healthy IgM (1/1600) |
|-------------|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| 1 | 0.401 | 0.212 | 0.126 | 0.127 |
| 2 | 1.104 | 0.357 | 0.095 | 0.125 |
| 3 | 0.420 | 0.246 | 0.108 | 0.099 |
| 4 | 0.281 | 0.175 | 0.067 | 0.110 |
| 5 | 0.332 | 0.067 | 0.284 | 0.094 |
| 6 | 0.393 | 0.042 | 0.109 | 0.110 |
| 7 | 0.503 | 0.635 | 0.203 | 0.120 |
| 8 | 0.190 | 0.190 | 0.190 | 0.124 |
| 9 | 0.509 | 0.167 | 0.130 | 0.124 |
| 10 | 0.936 | 0.737 | 0.285 | 0.113 |
| 11 | 0.508 | 0.238 | 0.160 | 0.083 |
| 12 | 0.107 | 0.217 | 0.149 | 0.110 |

B. antibody titers to intact Aa Y4 strain

| Ab Subject | L.J.P. IgG (1/1600) | Healthy IgG (1/1600) | L.J.P. IgM (1/1600) | Healthy IgM (1/1600) |
|------------|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| 1 | 0.345 | 0.139 | 0.121 | 0.073 |
| 2 | 0.364 | 0.116 | 0.170 | 0.185 |
| 3 | 0.210 | 0.341 | 0.285 | 0.130 |
| 4 | 0.235 | 0.174 | 0.131 | 0.168 |
| 5 | 0.308 | 0.116 | 0.416 | 0 |
| 6 | 0.877 | 0.188 | 0.356 | 0.155 |
| 7 | 0.036 | 0.879 | 0.170 | 0.100 |
| 8 | 0.216 | 0.141 | 0.133 | 0.028 |
| 9 | 0.469 | 0.185 | 0.124 | 0 |
| 10 | 0.601 | 0.683 | 0.285 | 0 |
| 11 | 0.280 | 0.011 | 0.171 | 0 |
| 12 | 0.258 | 0.389 | 0.107 | 0.026 |

Table 4. Comparison of the regression functions relating absorbance to dilution of the healthy and of high-titer serum samples from L.J.P.

A. antibody titers to sonicated Aa Y4 strain

IgG

| group | n | slope range | r range |
|---------------|----|-----------------|-----------------|
| Healthy Adult | 12 | - 0.293 - 1.962 | - 0.925 - 0.999 |
| L.J.P | 12 | - 0.691 - 1.969 | - 0.951 - 1 |

IgM

| group | n | slope range | r range |
|---------------|----|-----------------|-----------------|
| Healthy Adult | 12 | - 0.252 - 0.802 | - 0.071 - 0.994 |
| L.J.P | 12 | - 0.397 - 1.110 | - 0.932 - 0.996 |

B. antibody titers to intact Aa Y4 strain

IgG

| group | n | slope range | r range |
|---------|----|-----------------|-------------|
| Healthy | 12 | - 2.282 - 0.255 | -1 - 0.912 |
| L.J.P | 11 | - 1.385 - 0.382 | - 1 - 0.885 |

IgM

| group | n | slope range | r range |
|---------|----|-----------------|-----------------|
| Healthy | 12 | - 1.302 - 0.332 | - 1 - 0.885 |
| L.J.P | 11 | - 1.162 - 0.193 | - 0.994 - 0.813 |

Table 5. Level of serum immunoglobulins reactive with Aa Y4 in healthy and L.J.P.

A. antibody titers to sonicated Aa Y4 strain.

| group | Mean Eu-G \pm S.E | P* | Mean Eu-M \pm S.E. | P* |
|---------------|-----------------------|--------|----------------------|--------|
| Healthy adult | 162.807 \pm 10.612* | P<0.05 | 40.014 \pm 2.363 | P<0.05 |
| L.J.P | 281.415 \pm 12.672* | | 106.062 \pm 5.580 | |

B. antibody titers to Y4 intact Aa y4 strain.

| group | Mean Eu-G \pm S.E. | Mean Eu-M \pm S.D. | P* |
|---------|----------------------|-----------------------|--------|
| Healthy | 185.637 \pm 26.658 | 138.117 \pm 10.614* | P<0.05 |
| L.J.P | 351.034 \pm 25.310 | 653.960 \pm 53.255* | |

* Significance in 0.05 level (Dunnett t test)

* Dunnett t-test with mean \pm S.E.

IV. 총괄 및 고안

한국인의 국소성 유년성 치주염환자 12명의 혈청 항체의 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 균주에 대한 항체역가 실험을 Enzyme-linked immunosorbent assay법을 이용하여 실시한 결과 혈청 희석도가 1/1600에서 가장 안정된 값들이 나오고 있으며 특히 정상대조군에서 2명만이 평균 역가치 보다는 특이하게 높은 역가치를 보였다. 또한 IgM의 경우 국소성 유년성환자 12명중 7명에서 정상대조군의 평균치보다 월등히 높은 역가치를 보이고 있다.

이러한 결과는 세포 파절후 항원을 추출한 경우 세포벽의 항원 및 세포질 항원까지 포함되게 되며 이러한 항원들에 대해 유의성 있게 국소성, 유년성환자의 항체역가치가 높음이 증명되고 있다. 그러나 IgG의 경우 정상대조군에서 2명이 아주 높은 항체역가를 나타내고 있는데 이는 이들 정상대조인들이 이들균에 대해 이미 높은 항체역가를 가지면서도 질환에 이환이 되지 않았다고 볼 수 있다. 또한 완전한 세균 Aa Y4 전체 세포벽 항원을 이용한 ELISA실험에서는 IgM의 경우 12명중 9명에서 정상대조군에 비해 월등히 높은 항체역가를 나타내고 있다. 그러나 정상대조군의 IgG 역가치는 12명중 4명에서 아주 높은 항체역가치를 나타내고 있으며 그중 2명은 세포파절 항원추출 및 완전한 세균 벽 항원을 이용한 실험에서 아주 높은 항체역가치를 나타내고 있다. 이러한 대조군의 높은 역가치는 이들의 나이가 이미 25세를 넘음으로서 Aa 균주에 감염된 후일 가능성을 배제할 수 없다. (Slots 1982, Zambon 1983)

이러한 정상대조군에서 높은 항체역가가 나타남으로서 완전 세균벽 항원을 이용한 ELISA의 IgG 항체역가치에서는 유의성이 없는 결과를 나타내고 있다. 또한 세포파절 항원을 추출하여 사용한 경우의 가장 높은 항체역가치와 정상대조군의 가장 낮은 항체역가치 사이에는 약 20배의 차이를 보이며 완전세포벽 항원을 이용한 실험에서 동일한 결과를 보이나 통계적인 처리를 통하여 ELISA Unit로 계산한 12명의 국소성 유년성환자의 Aa Y4에 대한 혈청항체역가는 정상대조군에 비하여 유의성 있는 높은 수치를 보이나 Ebersole(1980, 1982)등의 결과에 비하여 상당히 낮은 수치를 보이고 있다. 그러

나 IgM의 경우 세포파절, 항원추출한 경우나 완전한 세포벽 항원을 이용한 경우나 공히 약 3~4배 이상의 높은 항체역가치를 국소성 유년성환자에서 보이고 있다.

이러한 결과는 이들 세균에 대해서 한국인의 국소, 유년성 환자들이 감염되고 있으며 초기 감염후의 항체형성이 활발히 진행되고 있음을 보이고 있다. 그러나 이러한 유의성 있는 항체형성은 Aa Y4의 완전 세포벽 항원의 흡착 실험을 통하여 3명의 국소성, 유년성환자의 혈청 항체의 이들 균에대한 특이성 검사에서는 정상대조군에 비하여 IgG 항체역가는 높으나 항체역가 감소율은 동일한 것으로 나타나고 있어 이들 Aa Y4가 한국인의 국소, 유년성 치주염환자에서는 미국인의 경우보다 크게 특이성을 지니고 있지 않음을 보이고 있다. (Ebersole 1980, 1982) 이는 Aa Y4 균주가 Dr. Socransky (1977, 1979, 1981)로부터 기증받은 것임으로 이러한 결과가 나타날수 있다고 생각되며 이와 더불어 Aa Y4 아닌 다른 Aa 균주에 대한 혈청항체역가가 실험이 진행되어야 할 것이다. 또한 한국인 국소, 유년성 치주염환자 구강내에서 분리된 Aa 균주를 사용할 경우는 보다 다른 결과가 나타날리라 볼수 있다. 이러한 예상은 음식물종류 습관 및 구강내 조건이 서구인과 크게 다르므로 치주낭내 균의 특이항원성도 약간씩 다르리라고 보기 때문이다.

또한, 본 실험에 이용된 국소유년성 치주염 환자들은 16세에서 19세 사이로서 평균 연령이 18세 정도이나 정상대조군의 경우 평균연령이 25세로서 연령상의 차이가 이들 정상대조군의 몇몇에서 높은 Aa Y4에 대한 항체역가를 나타낸다고 보며 만일 동일 연령의 정상대조군을 이용한다면 보다 유의성 있는 결과를 얻으리라고 생각된다.

또한 본 실험에 사용된 완전 세포벽 항원을 이용한 실험의 경우 Aa Y4 균주 세포 자체의 microtiter plate well 부착에 약간의 균일성을 상실하는 경우가 나타나고 있으며 이는 보다 안전한 부착방법이 개발되어야 한다고 볼 수 있다. 상기와 같은 문제점이 개선된다면 ELISA 방법에 의한 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* 균주에 대한 한국인의 국소, 유년성환자의 혈청항체에 대한 연구는 보다 큰 진전을 보일것이며 이러한 연구를 통하여 이들 환자들이 이들 균에 감염되지 여부를 조기에 진단 함으로서 치료 및 예방에 크게 기여하리라 생각된다.

V. 결 론

한국인의 국소성 유년성 치주염환자 12명 에서 Actinobacillus actinomycetemcomitans Y4 균주에 대한 혈청 항체역가를 측정하기 위하여 Enzyme-linked immunosorbent assay법을 이용하여 관찰 하였든바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Aa Y4 sonicate항원을 이용한 ELISA 항체역가 측정에서는 L. J. P 환자에서 정상인에 비하여 유의성 있게 높은 역가치를 관찰할 수 있었다.

(L. J. P. 281.415 to healthy 162.807 Eu-G)

(L. J. P. 106.062 to healthy 40.014 Eu-M)

2. Aa Y4 intact bacteria 항원을 이용한 ELISA 항체역가 측정에서는 L. J. P. 환자에서 정상인에 비하여 L. J. P의 경우 유의성있는 증가치를 관찰할 수 있었다.

(L. J. P. 653.960 to 138.117 Eu-M)

상기와 결과를 볼때 Aa Y4에 대한 유의성 있는 항체역가치가 L. J. P 환자의 혈청내에서 나타남을 알수 있으나 많은 다른 균주에 대한 보다 광범위한 연구를 필요로 한다고 본다.

REFERENCES

Baer, P.N., Stanley, H.R., Brown, K., Smith, L., Gamble, J., and Swendlow, H.: Advanced Periodontal disease in adolescent (periodontosis). J. Periodontol. 34:533-539, 1963.

Chung, C.P., Nisengard, R.J., Slots, J., and Genco, R.J.: Bacterial IgG and IgM antibody titers in acute necrotizing ulcerative gingivitis. J. Periodontol. 54:557-562, 1983.

Doty, S.L., Lopatin, D.E., Syed, S.A., and Smith, F.N.: Humoral immune response to oral microorganisms in periodontitis. Infect. Immun. 37:499-505, 1982.

Ebersole, J.L., Frey, D.E., Taubman, M.A., and Smith, D.J.: An ELISA for measuring serum antibodies to Actinobacillus actinomycetemcomitans. J. Periodont. Res. 15: 621-632, 1980.

Ebersole, J.L., Taubman, M.A., Smith, D.J., Genco, R.J., and Frey, D.E.: Human immune responses to oral micro-organisms 1. association of localized juvenile periodontitis (L.J.P) with serum antibody responses to Actinobacillus actinomycetemcomitans. Clin. exp. Immunol 47:43-52, 1982.

Hillman, J.D., and Socransky, S.S.: Bacterial interference in the oral ecology of Actinobacillus actinomycetemcomitans and its relationship to human periodontosis. Arch. Oral. Biol. 27:75-77, 1982.

Irving, J.T., Newman, M.G., Socransky, S.S., and Heeley, J.D.: Histological changes in experimental periodontal disease in rats monoinfected with a Gram-negative organism. Arch. Oral. Biol. 20:219-220, 1975.

Lavine, W.S., Maderazo, E.G., Stolman, J., Ward, P.A. and Cogen, R.B.: Impaired neutrophil chemotaxis in patients with juvenile and rapidly progressing periodontitis. J. Periodont. Res. 14:10-19, 1979.

Mandall, R.L., and Socransky, S.S.: A selective medium for Actinobacillus actionomyce-temcomitans and the incidence of the organism in juvenile periodontitis. J. Periodontol. 52:593-598, 1981.

Mashimo, P.A., Yamamoto, Y., Slots, J. Park, B.H., and Genco, R.J.: The periodontal microflora of juvenile diabetes-culture, immunofluorescence, and serum antibody studies. J. Periodontol. 54:420-430, 1983.

Mcarthur, W.P., Tsai, C-C., Baehin, P.G., Genco, R.J., and Taichman, N.S.: leukotoxic effects of Acinobacillus actinomycetemcomitans. J. Periodont. Res. 16:159-170, 1981.

Mouton, C., Hammond, P.G., Slots, J., and Genco, R.J.: Serum antibodies to oral bacteroides asaccharolyticus (Bacteroides

- gingivalis): Relationship to age and periodontal disease. *Infect. Immun.* 31:182-192, 1981.
- Newman, M.G., and S.S. Socransky. Predominant cultivable microbiota in periodontosis. *J. Periodont. Res.* 12:120-128, 1977.
- Slots, J., Reynolds, J.S., and Genco, R.J.: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. *Infect. Immun.* 29:1013-1020, 1979.
- Sundqvist, G., and Johansson, E.: Bactericidal effect of pooled human serum on *Bacteroides melaninogenicus*, *Bacteroides asaccharolyticus* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Scand. J. Dent. Res.* 90:29-36, 1982.
- Slots, J.: The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. *Scand. J. Dent. Res.* 84:1-10, 1976.
- Slots, J., Zambon, J.J., Rosling, B.G., Reynolds, H.S., Christersson, L.A., and Genco, R.J.: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: association, serology, leukotoxicity and treatment. *J. Periodont. Res.* 17:447-448, 1982.
- Slots, J.: Salient biochemical characters of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Arch. Microbiol.* 131:60-67, 1982.
- Tanner, A.C.R., Haffer, C., Bratthall, G.T., Visconti, R.A., and Socransky, S.S.: A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J. Clin. Periodontol.* 6:278-307, 1979.
- Tolo, K., Schenck, K., and Brendtzaeg, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay for human IgG, IgA, and IgM. antibodies to antigens from anaerobic cultures of seven oral bacteria. *J. Immunol. Methods.* 45:27-40, 1981.
- Van Dyke, T.E., Horoszewicz, H.U., Cianciola, L.J., and Genco, R.J. Neutrophil chemotaxis dysfunction in human periodontitis. *Infect. Immun.* 27:124-132, 1980.
- Zambon, J.J., Deluca, C., Slots, J. and Genco, R.J.: Studies of leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* using the promyelocytic HL-60 cell line. *Infect. Immun.* 40:205-212, 1982.
- Zambon, J.J., Slots, J., and Genco, R.J.: Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. *Infect. Immun.* 41:19-27, 1983.