

# 국소적 후유년성 치주염환자에서의 Capnocytophaga 분리에 관한 연구(I)\*

전남대학교 치과대학 치주과학교실\*  
서울대학교 치과대학 치주과학교실\*\*  
정현주\* · 손성희\*\* · 정종평\*\*

## ISOLATION AND IDENTIFICATION OF CAPNOCYTOPHAGA IN LOCALIZED JUVENILE PERIODONTITIS, PRELIMINARY STUDY

Chung, H.J.\* , Son, S.\*\* and Chung, C.P.\*\*

\*Dept. of Periodontology, College of Dentistry, Chonnam National University

\*\*Dept. of Periodontology, College of Dentistry, Seoul National University

..... > Abstract < .....

Capnocytophaga is a capnophilic, gliding, Gram(-) bacteria which has been associated with localized juvenile periodontitis (LJP) and early onset, rapidly progressive periodontitis.

This study performed the isolation and identification of Capnocytophaga from 8 Korean post-LJP patients.

Isolation was carried out by using a selective medium for Capnocytophaga (TBBP medium containing 4% Trypticase soy agar, 0.1% yeast extract, 50µg of Bacitracin per ml, 100µg of Polymyxin per ml and 5% rabbit blood) and incubating under 10% CO<sub>2</sub> in air at 37°C for 72 hrs.

Surface translocating, wet-spreading colonies were selected, identified by fermentation and other biochemical tests, and classified into 3 species; *C. ochracea*, *C. sputigena*, and *C. gingivalis*.

The frequency of detection of Capnocytophaga in post-LJP patients was 7/8 in disease sites and 2/8 in relatively healthy sites.

### I. 서 론

Capnocytophaga는 agar표면에 배양시 활주성의 (gliding) 운동상을 보이는 Gram음성의 capnophilic 한 사상 또는 방추상간균으로 정상적으로도 구강내에서 발견되는 통성혐기성(facultative anaerobic)균주이다.<sup>1,2)</sup>

이 균주는 과거에 *Bacteroides ochraceus*, Group DF-1<sup>3)</sup>, *B. oralis* var. *elongatus*<sup>4)</sup>로 칭해졌으나, 1979년 형태적, 생리적인 특성규정과 함께 새로운 genus인 Capnocytophaga로 확정되었다.<sup>5,6,7,8)</sup>

이 세균은 호기성과 혐기성상태 모두에서 CO<sub>2</sub> tension을 충분히 증가시켰을때(5~10%) 잘 자라며 발효기전을 가진 것으로 알려져 있으며, 특히 중요한 점은 치주병소의 전위부(advancing front)에

\*본 연구는 1985년도 전남대학교 연구비에 의해 일부 충당되었음.

서 다수 발견되며<sup>9)</sup>, 무균동물에의 단일감염시 골과피와 함께 심한 치주질환을 야기 시켰다는 실험적 보고<sup>10)</sup>이며, 급성진행성 치주병소<sup>11)</sup> 및 유년성치주염<sup>12)</sup>에서 빈번히 발견되고 있다. 그외에도 Insulin-dependent diabetes에 관련된 치주염<sup>13)</sup>, Papillon-LeFevre Syndrome<sup>14)</sup>에서 주요역할을 담당하며 이들에서는 다형핵백혈구의 기능적 결함과 관련된 것으로 나타났다.<sup>15)</sup>

전신질환에서의 역할은 확립되어 있지 않으나 Granulocytopenia 및 면역기능저하환자에서 Capnocytophaga가 opportunistic pathogen으로 작용한다는 사실이 최근들어 보고되고 있으며<sup>16-18)</sup>, oral mucosal lesion이나 치은염증부위를 통한 세균의 유입이 그 원인으로 추정되고 있다.

이러한 Capnocytophaga의 독성요인(virulence factor)으로는 정상적인 다형핵백혈구의 활동성을 방해하는 물질의 유리<sup>19)</sup>, 섬유아세포의 증식억제요인<sup>20)</sup>, IgA나 IgG를 파괴할 수 있는 단백질분해능<sup>21)</sup>, 그리고 내독소를 들 수 있다.

본 실험은 구강내 상주균의 하나로서 심한 치주질환이나 전신감염을 일으킬 수 있는 Capnocytophaga균주를 유년성치주염환자에서 분류·동정함으로써 점차 대두되고 있는 비외과적 치주치료의 일환으로 항생제투여시 선택의 근거를 마련하며 이 균주의 생물학적인 특성과 면역학적인 기능을 연구하기 위한 1차과정으로 시행케 되었다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 환자의 선택

서울대학교 치과대학병원 치주과에 내원한 환자 중 15세 이후 30세까지의 표준 구내방사선사진상 상하악 전치부 및 제 1 대구치에 국한된 치조골과피와 5mm이상의 치주낭 깊이를 나타내고, 비교적 미약한 염증을 보이거나 기타 치아에서는 3mm 이상의 치주낭 깊이를 보이지 않는 국소적 유년성치주염환자 8명을 선택하였다.

이들 환자들은 치과에 내원하기전 6개월 이내에 항생제투여 및 치주치료를 받지 않았다.

### 2. 치은연하균채취 및 세균배양

선택된 환자의 치주병소를 보이는 치주낭과 건강 치은열구, 각 2 부위씩을 택하여 치은연하 균채취하였다.

균채취를 위해 해당치아주위를 gauze로 완전히 분리시킨후 건조탈지면으로 치은연상치태를 완전히 제거하고 건조시킨후 근관치료용 paper point (Johnson Fine Absorbent Points, Johnson & Johnson East Windsor N. J. U. S. A.) 3 개를 동시에 치주낭내에 위치시키고 저항이 느껴질 때까지 삽입한 다음 약 10초가 지난후 꺼내어 즉시 2ml의 멸균된 Ringer용액이 들은 시험관내에 무균적으로 넣었다. 채취된 균채용액은 vortex mixer에서 약 60초간 혼합시킨후 Ringer용액에 10배씩 연속희석시킨 다음 비선택배지로서 혈액한천배지(녹십자)와 Capnocytophaga선택배지에 100 $\mu$ 씩 분주하여 멸균된 bent-glass rod를 이용하여 agar표면에 도말하였다. Capnocytophaga의 선택배지는 4%의 Trypticase soy agar (Difco Laboratories, Detroit Mich. U. S. A.)에 0.1% yeast extract (Difco Laboratories), 5% rabbit blood, 50 $\mu$ g/ml의 bacitracin (Sigma Chemical Co. St. Louis M. O.)와 100 $\mu$ g/ml의 polymyxin B (Sigma Chemical Co. St. Louis M. O.)를 넣어 만들었으며 제조된 배지는 4 $^{\circ}$ C에 보관하여 2주내에 사용하였다.

식균된 혈액한천배지와 선택배지는 37 $^{\circ}$ C, 10% CO<sub>2</sub>가 공급되는 배양기 내에서, 72시간 배양한후 "surface-translocating, wet-spreading" colony를 택하여 Gram염색 및 phase-contrast microscopy를 통해 잠정적으로 확인된 균주를, 형태상 다른 colony에서 채취, 혈액한천배지에 계대하고 3일간 배양한후 Trypticase Soy Broth (BBL Microbiology Systems, Locksville, Md)에 옮겨 48시간 배양하고 생화학적 검사를 실시하였으며 -70 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

### 3. 세균동정

세균의 확인 및 분류를 위해 발효능검사와 기타 생화학적 검사를 시행하였다.

#### (1) 발효능 검사

basal medium으로서 glucose나 starch가 함유되지 않은 peptone yeast broth<sup>22)</sup>를 이용하였으며 기질로서 10% glucose, xylose, mannitol, sucrose, maltose, lactose, galactose액을 멸균한 후 basal medium내 최종농도가 1%되게 하였으며 Esculin은 최종농도가 0.25%되게 희석해서 이용하였다. 37 $^{\circ}$ C, 10% CO<sub>2</sub>상태에서 48시간 배양후 Ph의 변화를 Glass electrode와 Ph meter (Horiba H7HP Model, Japan)를 사용하여 측정하였고 그 결과 당기질을

함유치 않은 control culture보다 1 단위이상 변화된 경우 양성 반응으로 처리하였다.<sup>7)</sup> 또한 Esculin hydrolysis는 1%의 Ferric ammonium citrate 수용액을 첨가하여 흑색변화유무를 관찰하였다.

(2) 기타 생화학적검사는

catalase유무, oxidase환원능, benzidine반응, 용혈여부, motility유무, indole 및 H<sub>2</sub>S 형성여부, gelatin분해능 및 질산환원여부에 관한 검사를 시행했다.<sup>23)</sup>

### III. 연구 결과

선택된 8명의 국소적유년성 치주염환자는 모두 후유년성 치주염환자로서 24세에서 30세의 연령분포를 보였으며, 남자 4명, 여자 4명으로서 채취 부위는 상하악 중절치나 제 1 대구치부였으며(Table 1) 분리균주는 모두 22주였다.

Table 1

patient	age/sex	sampled site	Isolate No.
S.K.Y.	28/F	/6	1,2,3,4
N.M.K.	24/F	7	5
P.C.J.	26/M	/1	6,7
		/3 (H)	8
S.J.K.	30/M	1/	9,10
P.W.K.	30/M	6/	11,12
S.Y.S.	30/M	1/	13,14
K .L.	30/F	1/	15,16,17,18
		5/ (H)	19,20,21,22
H.M.H.	25/F	6/	none

\* (H) means "relatively healthy site"

선택배지에서의 colony형태는 활주성운동상을 반영하는 "translocating, wet-spreading" colony를 보였으나 크기, 형태는 비교적 다양했으며 oblique illumination으로 잘 관찰될 수 있었다. 즉 직경 1.5~2.0mm의 작은 원형으로 변연부가 flat, irregular한 것과 5mm전후의 finger-like edge를 갖는 불규칙한 형태, 색깔은 중심부가 주황색으로 주변이 황색 또는 회색색인 convex colony와 회백색의 thin, flat colony로 나타났으며, cell mass를 끊어모았을 때 황색으로 나타났다. Gram염색결과는 전부 sle-

nder, flexible한 Gram음성의 사상균으로 관찰되었다. (Figure 1) 혈액천배지상의 용혈반응은 보이지 않았으며 액체배지내의 증식상은 시험관내면하부에 밀접하게 집중적으로 자라거나 또는 전체적으로 균일하게 자라는 것을 보였다.

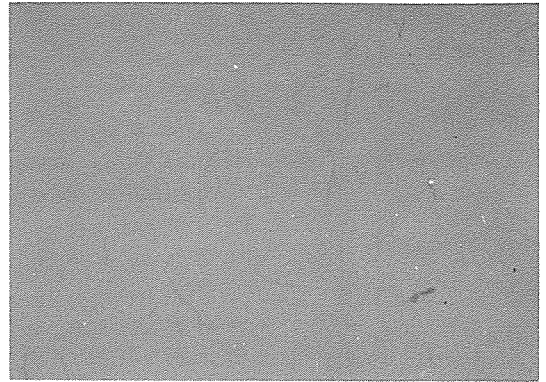


Fig. 1. Capnocytophaga (X1000).

발효능 검사에서는 대개의 분리균주가 glucose, sucrose, maltose에 강한 양성반응을 보였으며, 일부 (8/22)에서는 lactose나 galactose도 산성변화를 보였다. Esculin은 11균주에서 양성발효반응을 보였으며, hydrolysis는 11균주에서 양성을 나타냈다.

기타 생화학적 검사에서 catalase 반응은 대개 음성으로 나타났으나 일부에서는 약한 양성반응을 보이기도 했다. oxidase에 대해서는 모두 음성이었으며, benzidine검사는 모두 양성으로 iron porphyrin의 존재를 보였다. motility유무에 대해서는 2균주에서만 양성반응을 나타냈으며 indole, H<sub>2</sub>S를 생성하는 균주는 발견되지 않았다. 질산환원능 에서는 16균주에서 양성반응을 보였으며, 1균주에서는 complete reduction이 관찰되었다. 이상의 검사결과에 근거하여 3 species로 분류될 수 있는바 C. ochracea 13균주, C. sputigena 8균주, 그리고 C. gingivalis 1균주로 나타났다. (Table 2 참조)

### IV. 총괄 및 고안

Capnocytophaga의 운동성은 액체배지에서는 관찰되지 않고, 고체배지에서만 나타나는 것으로 보고되어 있으며<sup>1)</sup> flagella는 갖지 않는 것으로 밝혀졌다. 본 실험에서의 motility test의 결과는 2/22에서 양성으로 나타났으며, agar표면에서의 colony의

Table 2. Results of Biochemical tests

Colony No.	Gram stain	Hem.	Mot.	Cat.	Oxi.	Benz.	Ind.	H <sub>2</sub> S	Nit. Red.	Fermentation						Esc. hydrol.	Gelatin hydrol.	Species
										Glu.	Xyl.	Man.	Lac.	Gal.	Suc.			
1.	-	-	±	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	C.O.
2.	-	-	±	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	C.S.
3.	-	-	±	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	C.O.
4.	-	-	±	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	C.O.
5.	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	C.O.
6.	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	C.O.
7.	-	-	±	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	C.O.
8.	-	-	±	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	C.O.
9.	-	-	-	-	-	+	-	-	C.R.	+	-	+	+	+	+	+	-	C.O.
10.	-	-	±	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	C.O.
11.	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	C.O.
12.	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	C.S.
13.	-	-	±	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	C.O.
14.	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	C.S.
15.	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	C.G.
16.	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	C.S.
17.	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	C.S.
18.	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	C.O.
19.	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	C.O.
20.	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	C.S.
21.	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	C.S.
22.	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	C.S.

C.R : Complete reduction

C.O : *Caphocytophaga ochracea*

C.O : *Caphocytophaga sputigena*

C.G : *Caphocytophaga gingivalis*

크기에 있어서 소형이 대다수로 나타났는데, 3%의 agar를 함유한 배지에서 maximum spread를 보이며, blood를 포함한 배지를 이용하는 경우 agar의 농도를 감소시킴과 함께 세균의 이동성에 억제적 효과가 가능한 것으로 보고된 바<sup>4)</sup>, 본 실험에서 사용한 선택배지내 1.5% agar 및 5% blood의 함유를 그 이유로 들 수 있겠다. 한편 선택배지와 비선택배지상의 전체 colony수에 있어서 선택 배지상에서 1/15~1/20의 비율로 기타세균을 억제하는 것을 관찰할 수 있었으며 성장가능한 세균으로는 *Capnocytophaga* 이외에 *Streptococcus*, *Veillonella* 로서 colony모양, Gram stain등으로 쉽게 구별할 수 있었다.

비슷한 gliding motility를 갖는 균주로서 감별을 요하는 *Cytophaga*는 strict aerobe로서 catalase, oxidase양성이며, 발효후 acid end product로서 succinate, acetate, lactate, propionate와 butyrate를 생성하는 것으로 알려져 있다. 이에 반해 *Capnocytophaga*는 succinate와 acetate만을 생성한다.<sup>5)</sup>

*Bacteroides*, *Fusobacterium*은 colony형태가 상이하며 benzidine음성인 strict anaerobe로 충분한 CO<sub>2</sub>를 함유한다 해도 대기에서는 자라지 않으며 acid end product로서 butyrate와 소량의 acetate, propionate를 형성하는 것으로 알려져 있다.<sup>7)</sup> 이들과는 달리 혐기성, 호기성조건 모두에서 CO<sub>2</sub> 농도가 충분히 높은 경우 잘자라는 flexible, gliding bacteria라는 의미의 "*Capnocytophaga*"는 형태적, 생리적, 핵산동질성면에서 독립된 균주이다.

이 gliding bacteria가 관심을 모으는 이유는 치은연상에 존재하던 세균이 치근면을 따라 진행중인 치주낭의 좁은 간격을 뚫고 치근단방향으로 깊이 침투, 성장, 서식할 수 있다는 것과, 이균주에 의해 비운동성 세균이 역시 치은연하로 운반될 수 있다는 가능성으로<sup>24)</sup> mixed anaerobic infection의 이해에 중요한 요인이 될 수 있다.

*Capnocytophaga*의 이환률은 개인마다 다르나 통기성상태에서 0.05~4.0%로 나타났으며 질환부위에서는 7/8에서, 건강치은열구부에서는 2/8의 비율로 발견되었다.

분류된 각 species의 colony형태상의 차이를 비교하면 항상 일치하지는 않았으나 회백색의 불규칙하고 넓게 퍼진 wet spreading colony의 경우 *C. ochracea*가 대부분이었으며 황색 또는 황백색의 원형 colony는 *C. sputigena*나 *C. gingivalis*로 이루어진 것

으로 관찰되었다. 세포형태에서도 별 차이를 볼수 없었으며 모두 long thin, filament로 나타났으나 액체배지내 배양후에는 변형된 rod형태가 주종을 이루었다. 이것은 성장 및 보관상태를 변경시킴으로써 cell의 크기, 형태가 변화될 수 있다는 보고<sup>5)</sup>와 부합된다. 각 species별의 분포상태는 좀더 많은환자를 대상으로 균태를 채취하고 임상적계수와 상관시킴으로써 의의가 높아질 것이나 본 실험에서는 *C. ochracea*의 분포율이 높게 (13/22) 나타났다. 독성이 가장 강한 것으로 알려진 *C. sputigena*<sup>10, 20)</sup>는 8/22의 비율로 나타났으며 장차 임상계수와외 관계와 면역학적기전에 대해서 더욱 많은 연구가 진행되리라 생각된다. 특히 enzyme activity에 관한 연구는 현재 활발히 연구가 이루어지는 영역으로 점차 본 실험과 같은 과정에 포함되어야 할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

국소적 유년생 치주염 환자에서 자주 나타나는 균주로 알려진 *Capnocytophaga*의 분리를 위해 8명의 후유년생 치주염환자의 질환병소 및 비교적 건강 강한 치은열구 부위에서 paper point를 이용하여 세균을 채취한후|혈액한천배지와 *Capnocytophaga*선택배지에 식균한 뒤 10% CO<sub>2</sub>가 제공되는 CO<sub>2</sub> 배양기에서 72시간 배양한 후 생화학적 검사를 시행한 바 다음의 결과를 얻었다.

1. Gram염색결과 모든 균주는 Gram음성의 slender, flexible filament 형태를 갖고 있었으며 위상차현미경상은 활주성운동상을 나타냈다.
2. 생화학적 검사 결과, glucose, sucrose, maltose에 양성발효반응을 보였으며, lactose, galactose의 발효능을 가진 경우도 나타났다.
3. 국소적 후유년생 치주염 환자에서의 *Capnocytophaga*발현률은 질환병소에서는 7/8, 건강치은열구부에서는 2/8로 관찰되었다.

## REFERENCES

1. Finegold, S.M. and Martin, W.J.: Diagnostic Microbiology. 6th ed., Mosby, pp. 372-374, 1982.

2. Davies, R.M., Jensen, S.B., Schiott, G.R., Loe, H., and Theilade, J.: Anaerobic gliding bacteria isolated from the oral cavity. *Acta path microbiol scand. Section B.* 80: 397-403, 1972.
3. Newman, M.G., Sutter, V.L., et al.: Detection, identification and comparison of Capnocytophaga, Bacteroides ochraceus, and DF-1. *J Clin Microbiol.* 10: 557-562, 1979.
4. Loesche, W.J., Socransky, S.S., and Gibbons, R.J.: Bacteroides oralis, proposed new species isolated from the oral cavity of man. *J Bacteriol* 88: 1329-1337, 1964.
5. Leadbetter, E.R., Holt, S.C., and Socransky, S.S.: Capnocytophaga: new genus of Gram-negative gliding bacteria. I. General characteristics, Taxonomic considerations and Significance. *Arch. Microbiol.* 122: 9-16, 1979.
6. Holt, S.C., Leadbetter, E.R., and Socransky, S.S.: Capnocytophaga: new genus of Gram-negative gliding bacteria. II. Morphology and Ultrastructure. *Arch. Microbiol.* 122: 17-27, 1979.
7. Socransky, S.S., Holt, S.C., Leadbetter, E.R., Tanner, A.C.R., Savitt, E., and Hammond, B.F.: Capnocytophaga: new genus of Gram-negative gliding bacteria. III. Physiological characterization. *Arch. Microbiol.* 122: 29-33, 1979.
8. Williams, B.L. and Hammond, B.F.: Capnocytophaga: new genus of Gram-negative gliding bacteria. IV. DNA base composition and sequence homology. *Arch. Microbiol.* 122: 35-39, 1979.
9. Slots, J.: The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. *Scand J Dent Res.* 84: 1-10, 1976.
10. Irving, J.T., Socransky, S.S., et al: Periodontal destruction induced by capnocytophaga in gnotobiotic rats. *J Dent Res.* 55 (Special Issue B); B257, 1976.
11. Newman, M.G., and Socransky, S.S.: Predominant cultivable microbiota in periodontitis. *J. Perio Res.* 12: 120-128, 1979.
12. Newman, M.G., Socransky, S.S., et al.: Studies of the microbiology of periodontitis. *J Periodontol* 47: 373-379, 1976.
13. Mashimo, P.A., Yamamoto, Y., Slots, J. Park, B.H., and Genco, R.J.: The periodontal microflora of juvenile diabetics: culture, immunofluorescent identification and serum antibody response studies. *J. Periodontol* 54: 420-430, 1983.
14. Newman, M.I., Angel, I., Karge, H., Weiner, M., et al.: Bacterial studies of the Papillon-LeFevre syndrome. *J Dent Res* 56: 545, 1977.
15. VanDyke, T.E., Levine, M.J., and Genco, R.J.: Periodontal disease and neutrophil abnormalities. pp. 235-245. In R.J. Genco and S.E. Mergenhagen, Host-parasite interactions in periodontal diseases. American Society for Microbiology.
16. Gorlenza, S.W., Newman, M.G., Lipsey, A.I., Siegel, S.E., and Blachman, U.: Capnocytophaga sepsis: A newly recognized clinical entity in granulocytopenic patients. *Lancet* i: 567-568, 1980.
17. Appelbaum, P.C., Ballard, J.C., and Eyster, M.E.: Septisemia due to Capnocytophaga (Bacteroides ochraceus) in Hodgkin's disease. *Ann Intern Med.* 90: 716, 1979.
18. Gandola, C., Butler, T., Badger, S., Cheng, E., and Beard, S.: Septisemia caused by Capnocytophaga in agranulocytopenic patient with glossitis. *Arch Intern Med.* 140: 851-852, 1980.
19. Shurin, S.B., Socransky, S.S., and Sweeney, E.: A neutrophil disorder induced by Cap-

- nocytophaga, a dental micro-organism. N Engl J Med 301: 849-854, 1979.
20. Stevens, R.H., Sela, M.N., Shapira, J., and Hammond, B.F.: Detection of a fibroblast proliferation inhibitory factor from Capnocytophaga sputigena. Infect. Immun 27: 246-254, 1980.
  21. Nakamura, M. and Slots, J.: Aminopeptidase activity of Capnocytophaga. J Perio Res 17: 597-603, 1982.
  22. Mashimo, P.A., Yamamoto, Y., Nakamura, M., and Slots, J.: Selective recovery of oral capnocytophaga spp. with sheep blood agar containing bacitracin and polymyxin B. J Clin Microbiol 17: 187-191, 1983.
  23. Gerhardt, P. et al.: Manual of methods for general bacteriology. American Society for Microbiology, 1981.
  24. Poirier, T.P., Tonelli, S.J., and Holt, S.C.: Ultrastructure of gliding bacteria; Scanning electron microscopy of Capnocytophaga sputigena, Capnocytophaga gingivalis, and Capnocytophaga ochracea. Infect. Immun. 26: 1146-1158, 1979.
-