

# 감염 근관에서 혐기성 배양법과 간접 면역 형광법 및 DNA 프로브법에 의한 *Porphyromonas endodontalis*의 검출에 관한 비교 연구

서울대학교 치과대학 치과보존학교실, 치주과학교실<sup>1</sup>

김민겸 · 윤수한 · 정종평<sup>1</sup>

## Abstract

### A COMPARATIVE STUDY ON THE DETECTION OF PORPHYROMONAS ENDODONTALIS BY ANAEROBIC CULTURE, IIF AND DNA PROBE METHOD IN INFECTED ROOT CANALS

Min-Kyum Kim, Soo-Han Yoon, Chong-Pyoung Chung<sup>1</sup>

Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Seoul National University

<sup>1</sup>Department of Periodontology, College of Dentistry, Seoul National University

There are many advantages when using IIF and DNA probe methods over anaerobic culture method in that they are time-and effort-saving, more precise and more sensitive. Furthermore, in IIF and DNA probe methods, the detection is possible only with small amount of bacteria, the quantitative analysis is possible, and the cell viability is not necessary.

The purpose of this study is to observe the incidence of *P.endodontalis* by carrying out anaerobic culture, IIF and colony lift using DNA probe method respectively, and to compare these 3 methods in terms of effectiveness and sensitivity in order to identify the most effective detection method.

30 teeth with at least one clinical symptoms, with single canal, and with pulp necrosis were sampled. For sampling bacteria, access cavity was prepared after disinfecting tooth and its surroundings. Then the paper point was inserted up to the periapical area, leave there for a while, and finally it was placed into PRAS Ringer's sol. and PBS sol. In anaerobic culture method, *P.endodontalis* was identified by biochemical tests after subculturing black and brown colonies which were produced after 7 days of incubation on BAP and Brucella BAP in anaerobic chamber. To identify *P.endodontalis* in IIF method, species-specific polyclonal rabbit-antisera of *P.endodontalis*(ATCC 35406) was reacted with sampled PBS sol. dispensed onto glass slide, and then *P.endodontalis* was examined by phase contrast microscopy

\* 본 연구논문은 서울대학교병원 1995년도 임상연구비에 의하여 이루어졌음.

after incubating with Goat anti-rabbit IgG conjugated to Fluorescein isothiocyanate. For colony lift using DNA probe method, membranes were laid over colonies on the surface of BAP and were hybridized with cloned DNA probe of *P.endodontalis*. The existence of *P.endodontalis* was then identified by the methods of chemiluminescent detection and color metric detection.

Black colony was found in 11 teeth out of 30 teeth and *P.endodontalis* was detected in 6 teeth (20%) by anaerobic culture method, 16 teeth (53%) by IIF method, and 7 teeth (23%) by DNA probe method. IIF method is significantly better in detecting *P.endodontalis* than DNA probe method and anaerobic culture method. There was no significant differences between DNA probe method and anaerobic culture method. There was significant correlation between the formation of black colony and the existence of *P.endodontalis*. The probability of detecting *P.endodontalis* when black colony being present is 2.89 times higher than when not being present. There was significant relationship between the foul odor of clinical symptoms and *P.endodontalis*. The sensitivity of existing *P.endodontalis* when foul odor being present was 93.75%, while the specificity of not existing *P.endodontalis* when foul odor not being present was 28.57%.

These results suggested that the probes of *P.endodontalis* will be used to decide the method and prognosis in endodontic treatments.

Key word : *Porphyromonas endodontalis*. Anaerobic culture. Indirect immunofluorescence DNA probe. Colony lift.

## I. 서 론

치근단 질환에서 미생물의 역할 중 배양기술의 발달로 혐기성 세균이 주목받고 있다.<sup>1,2,3,4,5,6)</sup> 1970년대 이전의 근관내 세균 연구는 부적절한 방법으로 이루어져 혐기성 세균을 중요시하지 않았으나<sup>7)</sup> 배양기술의 개선으로 치근단과 근관내 세균 대부분이 절대적 혐기성 세균(strict anaerobes)임이 밝혀졌고 혐기성 세균은 임상 증상이 있는 경우 그 숫자와 종류가 증대된다.<sup>8,9,10,12)</sup> 실험동물에서 근관을 오염시켜 치수 피사를 일으킨 연구에서 혐기성 세균이 시간이 갈수록 현저히 증가하여 결국은 세균의 대부분을 그람 음성 혐기성 세균이 차지하며 특히 *Bacteroides*의 증가가 눈에 띈다고 하였다.<sup>14)</sup> 또한 근관내 세균을 실험동물에 주입한 결과 증상이 없는 근관에 존재하는 세균들의 조합

과는 달리 증상이 있는 근관내에 존재하는 세균들의 조합은 전염성 감염을 일으켰고 black-pigmented *Bacteroides*가 반드시 포함되어 있었으므로 치근단의 화농성 염증에는 이들 세균이 필수적으로 포함되어 있어야 한다고 하였다.<sup>10)</sup> 따라서 혐기성 세균중 *Bacteroides*, 특히 black-pigmented *Bacteroides*가 치근단 질환의 주요 병인균으로 주목받았고<sup>13,14,15,16,17)</sup> 악취, 동통, 누공 형성과 관련이 있으며<sup>7,18,19)</sup> 지속적인 임상증상이 있는 경우나<sup>21)</sup> 만성 치근단 질환의 악화에 중요한 역할을 담당한다.<sup>14,15,16,20)</sup>

이들 중 asaccharolytic black-pigmented *bacteroides*의 아종으로 피사치수가 원인인 치근단 질환에서만 발견되는 세균이 발견되어 *Bacteroides endodontalis*라고 명명되었다.<sup>5,15,22)</sup> *B. endodontalis*는 black-pigmented, 혐기성, non-fermentative 그람 음성 간균 세균이며 감염

근관과 치근단 질환이 원인인 점막하 농양에서 주로 발견된다.<sup>21,23,24)</sup> *B.endodontalis*는 임상증상에 따라 치근단 질환의 치아중 4-58%의 빈도로 검출되는데<sup>5,11,12,21,25)</sup> 독성이 높고 급성의 치근단 질환에서 주로 발견되며 근관내 악취와 관련이 있다.<sup>12)</sup> *B.endodontalis*의 독성은 다른 세균과 섞여 있을 때 나타나는데, 이는 다른 세균에서 생성된 hemin, menadione (Vit.K) 같은 성장 물질을 필요로 하기 때문이다.<sup>17,24)</sup> *B.endodontalis*는 pili를 가져 다른 세균이나 치아 조직 등에 부착하며, complement factor와 면역 글로브린을 파괴하고 여러 가지 조직 파괴 효소와 cytotoxin을 만들어 강력한 독성을 가진다.<sup>11,17,24)</sup> 따라서 *B.endodontalis*는 근관내 감염과 치근단 농양의 중요한 원인균의 하나로 알려져 있다.<sup>27,28)</sup> *B.endodontalis*의 독성의 차이는 capsule 물질과 관계가 있으며<sup>24)</sup> capsule membrane의 차이로 세 가지 serotype으로 나누고 있다.<sup>41)</sup>

asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* 즉 *B.gingivalis*, *B.endodontalis*, *B.asaccharolyticus*는 최근 다른 *Bacteroides*와의 생화학적 및 화학적 특성의 차이로 인해 *Porphyromonas*로 명명되었다.<sup>22)</sup> 이 중 구강 내에서는 *P.gingivalis*와 *P.endodontalis*가 주로 발견되는데<sup>5,15)</sup> *P.gingivalis*가 더 독성이 강하며 *P.endodontalis*는 형질상 *P.asaccharolyticus*와 더 가깝다.<sup>23)</sup> *Porphyromonas* 세균은 산소에 매우 민감한 strict anaerobes인데 이중 *P.endodontalis*는 *P.gingivalis*에 비해 black pigment가 나타나는 시간이 더 걸리고, 배지에서 doubling time이 6-10 시간으로 *P.gingivalis*의 2-3배이며 더 산소에 민감하다.<sup>25,29)</sup> 또한 배지에 들어가는 Vancomycin이나 Kanamycin에 매우 민감하고 신선한 배지에서 잘 자란다.<sup>22,26)</sup> 따라서 *P.endodontalis*는 배양이 몹시 까다롭고 다른 세균과 섞여 있을 경우 순수 분리가 힘들어 최근야 발견된 세균이다.<sup>15,15)</sup> 또한 같은 종인 *P.gingivalis*나 *P.asaccharolyticus*와 생리적으로 비슷하여 배양 후의 생화학적인 검사로는 동정이 힘들다.<sup>22)</sup> 이러한 까다로운 조건들로 인해 *Porphyromonas*균, 특히 *P.endodontalis*의 검출에 있어 전

통적인 혐기성 배양으로는 세균의 채취, 이송, 배양에 어려움이 많고 이들 과정 중 산소에 노출되어 세균이 죽거나 배양 결과 중요 세균의 우선 순위가 뒤바뀔 수 있으며, 시간과 비용과 노력이 많이 들어가고 기술적으로 매우 숙달되어야 한다.<sup>11,25,26)</sup> 그러므로 신속하고 정확하며 간단하게 *P.endodontalis*의 동정이 이루어진다면 근관 치료 과정, 예후, 근관 충전 시기의 결정 등 치료에 많은 도움을 줄 수 있을 것이다.

따라서 전통적인 혐기성 배양법 이외의 다른 방법들이 시도되고 있는데, 표준 균주를 이용한 구별에 있어서 *Porphyromonas* 각 아종 간에서 *P.endodontalis*는 다른 아종에 비해 DNA의 guanine-plus-cytosine의 양이 적고 electrophoretic pattern이 틀리며 indirect fluorescent antibody staining method로 서로 구별할 수 있다고 하였고 DNA-DNA hybridization을 한 결과 *Porphyromonas* 세 아종간에는 동질성이 없거나 적다고 하였다.<sup>22)</sup> 또한 *P.endodontalis*와 *P.gingivalis*는 공통항원을 가지지 않으며, 주요 세포막 단백질을 항원으로 사용하여 면역학적인 방법으로 근관 sample에서 *P.endodontalis*의 신속한 검출을 할 수 있으리라고 하였고<sup>25,29)</sup> 전통적 배양법과 면역학적인 방법을 같이 쓰게 되면 치근단 질환의 발생 기전을 밝히는데 도움을 줄 수 있다고도 하였다.<sup>30)</sup> 따라서 *P.endodontalis*의 LPS (Lipopolysaccharide)에 대한 monoclonal antibody를 만들어 immunoslot blot assay를 한 결과 치근단 농양과 감염 근관에서 *P.endodontalis*의 검출에 아주 유용하였다는 보고가 있었고<sup>28)</sup> 감염 근관에서 세균을 채취하여 간접 면역 형광법으로 직접 *P.endodontalis*를 검출한 결과 배양법보다 3배 이상 많은 검출이 보고된 바도 있다. 간접 면역 형광법은 항원 항체 반응의 특이성으로 병원균의 검출에 유용하며 빠르고, 적은 장비와 특별한 기구가 필요 없으며 세균 존재의 유·무를 알려주는 민감도와 특이도가 배양법에 비해 매우 높은 장점이 있고 특정한 target organism을 찾아내는데 배양법보다 더 민감하고 빠르며 특히 치근단 질환에서 black-pigmented *Bacteroides*의 검출에 매우 유용하다고 하였다.<sup>25,31)</sup> 또한 최

근에 치주 영역에서 이용되기 시작한 DNA 프로브를 이용한 결과 *P. gingivalis*와 *P. intermedius*의 검출에서 배양법보다 2-3배 많은 검출이 있었고<sup>32,33)</sup> DNA 프로브와 colony lift법을 사용한 결과 이 방법이 배양법보다 민감하고 경제적이며 정량적 분석이 가능하다고 하였다.<sup>26)</sup> 그리고 구강내 *Spirochete* 검출에 클론된(cloned) DNA 제한 절편을 이용한 결과 세균 동정과 검출에 매우 민감하고 다방면으로 유용한 방법이며 생화학적 검출을 대체할 수 있을 것이라고도 하였다.<sup>35,36)</sup> DNA 프로브를 이용한 *P. endodontalis*의 검출은 아직 보고되지 않았으나 *P. endodontalis*의 검출 역시 신속하고 정확하게 세균을 동정할 수 있을 것으로 여겨진다. 이들 방법을 사용하면 전통적인 세균 배양법보다 시간과 노력이 절약되며 더 정확하고 민감하며 소량의 세균으로도 검출이 가능하고 정량적인 분석이 가능하며 세균이 죽은 경우에도 검출이 가능한 등 여러 장점이 있다.<sup>25,28)</sup>

따라서 본 연구에서는 치근단 질환과 밀접한 관련이 있으나 배양이 까다로워 발견이 늦어졌고 국내에서는 최근에야 배양에 성공한 *P. endodontalis*를 검출의 대상균으로 삼았다. 즉, *P. endodontalis*의 검출을 위하여 임상증상이 있는 피사치수에서 세균을 채취하여 한천배지에 혐기성 배양을 하고 생화학적 검사를 시행하였으며, 간접 면역 형광법으로 *P. endodontalis*의 유무를 관찰하였고, 클론된 DNA 프로브를 이용한 colony lift법을 시행하여 세 가지 방법의 민감도와 검출 빈도를 비교하고, *P. endodontalis*와 임상 증상간의 관계를 살펴 그 결과를 보고하는 바이다.

## II. 실험 재료 및 방법

### II-1 실험 재료

1995. 3. 16-1995. 6. 29 사이에 서울 대학교병원 치과 진료부에 내원한 환자 28명중 1개 이상의 임상증상이 있고 단근관을 가지며 치수가 피사된 치아 30개를 실험재료로 사용하였다. 이전에 근관치료를 받았던 치아는 제외하였으며 치수 피사 여부는 치수 천공에 의해

확인될 수 있었다.

임상증상은 다음과 같이 8가지로 나누어 증상의 유무를 기록하였다. (Table 1)

1. 급성 동통: 실험에 사용된 치아의 중등도 이상 동통의 유무
2. 국소적 종창: 치근단 부위의 swelling 유무
3. 악취: 근관내 악취의 유무
4. 누공 형성: 치근단 부위의 sinus tract 유무
5. 촉진시 과민반응: 치근단 부위의 촉진시 과민반응의 유무
6. 방사선 사진소견: 치근단 부위의 radiolucency의 존재 여부
7. 삼출액: 근관내 exudate의 존재 여부
8. 타진시 과민반응: percussion에 과민 반응의 유무

### II-2 실험 방법

#### <세균의 채취>

rubber dam으로 치아를 분리한 후 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 2분간 대상치아와 그 주위를 세척하였다. 소독된 고속 회전 bur로 상아질 하방 1-2 mm까지 외동 형성 후 치아와 그 주위를 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 10-15초간 세척한 뒤 2% iodine tincture로 1-2분간 씻어내고 이를 다시 생리식염수로 씻어내었다. 그 후 소독된 저속 회전 bur로 근관 외동을 형성한 후 멸균된 paper point를 근관내에 치근단 부위라고 추정되는 부위까지 넣어 약 15초간 방치하였다가 PRAS Ringer액과 PBS용액에 넣었다. 이를 Anaerobic Pak (BBL<sup>R</sup> Gas Pak Pouch<sup>TM</sup>, Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, U.S.A.)에 넣어 즉시 실험실로 옮겼다.

#### A. 혐기성 배양 및 생화학적 검사

Anaerobic Pak에 넣어져 옮겨진 PRAS Ringer액을 혐기성 배양기(Coy anaerobic chamber MI., U.S.A.) 내로 옮겨 2분간 Vortex mixer로 진탕한 후 단계적으로 10배씩 즉, 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> 배로 희석하여 혈액 한천 배지와 Brucella 혈액 한천 배지에 100μl씩 접종하였다.

Table1. Clinical features of experimented teeth.(Sample teeth numbering : Two digit system)

No	Sample Tooth	Pain	Local Swelling	Foul Odor	Sinus Tract	Apical Sensitivity to Palpation	Periapical Radiolucency	Exudate	Tenderness to Percussion
1	21	-	+	+	-	-	+	+	-
2	12	-	+	+	+	-	+	+	-
3	11	-	-	-	-	+	+	-	+
4	22	+	-	-	+	+	+	+	+
5	25	+	+	+	-	+	+	+	-
6	31	+	+	-	-	+	+	-	+
7	23	+	-	+	-	+	+	+	+
8	22	-	-	+	-	-	+	+	-
9	34	-	-	+	-	-	+	+	-
10	11	-	-	+	-	+	+	+	-
11	11	+	-	+	-	-	+	-	+
12	21	+	+	+	+	-	+	-	+
13	12	+	-	+	-	+	+	-	+
14	11	-	+	-	+	+	+	+	+
15	43	-	+	+	+	+	+	-	-
16	11	-	+	+	+	+	+	+	-
17	35	-	+	+	+	+	+	+	-
18	31	-	-	-	-	+	+	-	-
19	12	-	-	+	-	-	+	+	-
20	43	-	-	+	-	-	+	-	-
21	12	-	-	+	-	-	+	+	-
22	21	-	+	+	-	-	+	+	-
23	33	-	-	+	-	-	+	+	-
24	34	-	-	+	-	-	+	+	-
25	11	+	+	+	-	+	+	+	+
26	11	-	-	+	-	-	+	+	-
27	11	-	-	+	-	-	+	+	-
28	21	-	-	+	-	-	+	+	-
29	23	-	-	+	-	-	+	+	-
30	12	-	-	+	-	-	+	-	-

+ : signs or symptoms positive

- : signs or symptoms negative

80% N<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>가 든 37°C 혐기성 배양기에 넣어 7일간 배양한 후 갈색 및 흑색 집락을 플라 계수한 뒤 임의로 약 20개씩을 플라 2회에 걸쳐 순수 분리하였다. 순수 분리된

세균 집락은 BHI(Brain Heart Infusion) broth에 3일간 배양시킨 후 다시 PY (Peptone-Yeast) broth에서 3일간 배양시켜 생화학 검사를 시행하여 동정하였다. 생화학 검사는

glucose, sucrose, cellobiose, lactose 등 당 분해 검사 및 esculine hydrolysis와 indole 검사 등을 시행하였다.

### B. 간접 면역 형광법

근관에서 채취한 paper point가 들어있는 200  $\mu$ l의 인산 완충 용액(PBS : Phosphate-buffered Saline : pH7.2)에서 20 $\mu$ l씩 세곳에 나누어 받침유리 위에 떨어뜨린 후 공기 중에서 건조시켜 열처리로 고정하고  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다. 항혈청용액을 인산완충용액에 4% bovine serum albumin을 넣은 용액으로 checker-board 역가 측정 요법으로 1 : 80, 1 : 160, 1 : 320 으로 희석하여 사용하였다.

실험에 사용한 *P. endodontalis*의 항 혈청은 ATCC 35406 (serotype O<sub>1</sub>K<sub>1</sub>)에서 유래한 가토 항 혈청이며 이전의 연구<sup>37)</sup> 의해 *P. endodontalis*와 가장 가까운 *P. gingivalis*의 여러 serotype들과도 반응하지 않고 오직 *P. endodontalis*에만 반응하는 것으로 밝혀진 polyclonal anti-sera이다. 환자에게서 채취한 sample위에 희석한 *P. endodontalis* 항 혈청을 20 $\mu$ l씩 떨어뜨린 후 30분 동안 37 $^{\circ}\text{C}$  moisture chamber에서 반응시켜 인산 완충 용액으로 세척하고 Fluorescein isothiocyanate (Isomer I. B. B. L. Microbiology systems. Cockeysville, Md., U.S. A.)로 conjugate 된 goat anti-rabbit IgG (Melog Laboratories, Inc. Springfield, Va. U.S. A.)로 각각 1 : 50 및 1 : 100으로 희석하여 20  $\mu$ l씩 slide상에 떨어뜨려 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 반응시킨 뒤 다시 세척하고 90% glycerol로 고정, 형광현미경 하에서 관찰하였다. (사용된 현미경은 Olympus fluorescence Microscope BH2-RFL (Olympus Optical Co. LTD. Tokyo, Japan)이며 Exciter filter는 UG-1, Dichroic mirror는 L-435, light source는 HBO 200 수은등이다.)

형광 염색에 의한 판정 등급은 다음과 같은 기준에 의해 0부터 4+까지 나누어서 3+에서 4+를 양성반응으로 결정하였다.

- 0 : no fluorescence
- 1+ : bare fluorescence with single cells not

distinguishable

- 2+ : faint fluorescence with single cells visible, no definition of cell shape
- 3+ : moderate fluorescence with good cell envelope definition and a dark cell center
- 4+ : brilliant fluorescence with good cell envelope definition and a dark cell center

### C. DNA 프로브를 이용한 Colony lift

DNA 프로브의 labeling과 filter의 처리, hybridization, detection등의 과정과 시약 등은 DIG System을 이용하여 DIG System User's Guide 방법에 따라 시행하였다. (Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica. Mannheim. Germany)

#### 가. Filter 의 처리

혈액 한천 배지와 Brucella 혈액 한천 배지에서 4일간 자라서 colony가 형성된 혈액 한천 배지 위에 nylon membrane을 놓아 colony가 붙게 한 후 membrane을 들어내었다. 3장의 membrane의 크기와 비슷한 blotting paper (Whatman 1M)를 비닐wrap위에 올려놓고 각각 denaturation용액, neutralization용액, 2 $\times$  SSC용액으로 적신다. 그후 colony side를 위를 보게 하여 denaturation 용액으로 적신 blotting paper에 15분, neutralization용액을 적신 paper에서 5분, 2 $\times$ SSC 용액을 적신 paper에서 15분을 두었다. 그후 nylon membrane을 120  $^{\circ}\text{C}$ 의 vacuum 오븐에서 약 30분간 열처리하여 DNA를 고정하고 colony hybridization 하는 부위 이외의 잔여 세균 세포 물질을 제거하기 위해 68 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3 $\times$ SSC/0.1% SDS 용액으로 1 시간 동안 흔든 뒤 닦아 내었다.

#### 나. 균종 특이 프로브

프로브는 *P. endodontalis* ATCC 35406 (serotype O<sub>1</sub>K<sub>1</sub>) 지놈 DNA의 EcoRI 제한효소 절편을 무작위로 클로닝 하여 0.9Kb, 1.6Kb의 크기를 갖는 2개의 지놈 DNA 절편의 클론을

프로브로 선택하였다. 이전의 연구에 의해<sup>30)</sup> *P. gingivalis*나 *P. intermedius* 등의 세균들과는 반응하지 않고 오로지 *P. endodontalis*에만 반응하는 것으로 밝혀진 DNA 프로브를 Random Primed DNA Labeling 법으로 표지 하였다.

**\* DNA 프로브 Labeling**

DNA 프로브 labeling에는 Random Primed Labeling법을 사용하였으며 이는 짧은 시간 내에 DIG(Digoxigenin : Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica. Manheim. Germany.) labeled 프로브를 만들 수 있다.

우선 DNA template를 끓는 물에 10분간 넣어 denature 시킨 후 즉시 ice/NaCl에서 냉각한다. Microcentrifuge tube에 denature시킨 DNA 1 µl, hexanucleotide 2µl, dNTD labeling mixture 2µl, Klenow enzyme 1µl을 잘 섞고 20µl가 되도록 증류수로 맞춘다. 37°C에서 20시간 배양 후 2µl의 EDTA (0.2M, PH 8.0) 용액으로 반응을 중지시켰다. Labeling 된 DNA는 2.5 µl의 LiCl과 -20°C의 ethanol 75µl로 침전시킨

후 TE buffer에 보관한다.

**다. Hybridization**

20ml의 standard prehybridization buffer (5 × SSC, 1.0% (w/v) Blocking Reagent for nucleic acid hybridization, 0.1% N-lauroylsarcosine, 0.02% SDS)가 든 비닐 bag에 membrane을 넣고 봉한다. 이를 42°C 오븐 내에서 1시간 동안 prehybridization 하였다. DIG 표지가 된 *P. endodontalis* 균종 특이 프로브를 끓는 물에서 10분간 변성시키고 즉시 얼음에 냉각한 뒤 hybridization 용액과 membrane이 있는 비닐 bag에 넣고 밀봉 후 42°C 오븐 내에서 밤새 (overnight) hybridize 하였다.

**라. 검출**

라-1 Chemiluminescent Detection (화학 발광의 검출)

Buffer 1 (100mM maleic acid, 150mM NaCl) 용액으로 상온에서 1분간 세척하였다.

Table 2. Solutions for Colony Hybridizations and Detections.

Solution	Description
Denaturation sol. 1	0.5N NaOH, 1.5M NaCl
Denaturation sol. 2	0.5N NaOH, 1.5M NaCl, 0.1% SDS
Neutralization sol. 2	1.0M Tris-HCl, pH7.5 : 1.5M NaCl
Standard prehybridization buffer	5×SSC, 1.0% (w/v) Blocking Reagent for nucleic acid hybridization. 0.1% N-lauroylsarcosine, 0.02% sodium dodecyl sulfate(SDS)
Standard hybridization buffer	DIG-labeled probe diluted in standard prehybridization buffer
2×wash sol.	2×SSC containing 0.1% SDS
0.1×wash sol.	0.1×SSC containing 0.1% SDS
Buffer 1	100mM maleic acid, 150mM NaCl : pH7.5(+20°C)
Buffer 2	1% (w/v) Blocking Reagent for nucleic acid hybridization dissolved in buffer 1. If necessary, treat with dimethylidicarbonate or DEPC to destroy RNases. Autoclave the solution, and store at room temperature, +4°C or -20°C
Buffer 3	100mM Tris-HCl, pH9.5(+20°C), 100mM NaCl, 50mM MgCl <sub>2</sub>
TE-buffer	10mM Tris-HCl, 1mM EDTA : pH8.0(+20°C)

Post-hybridization washing 후 1%의 blocking reagent (Proteolytic fragments of casein)가 포함된 Buffer 1이 들어있는 bag속에서 membrane을 30분간 흔들며 주고 100ml의 buffer 2 (1% blocking reagent in buffer 1 : Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica. Mannheim. Germany.) 에서 30분간 흔들며 blocking 하였다. Buffer 2를 제거한 후 membrane을 AP용액 (anti-DIG-alkaline phosphatase 1 : 10,000 in buffer 2)에서 30분간 배양하고 0.3% Tween 20 (ICI Americas Inc., U.S.A.) 이 포함된 buffer 1으로 15분간 2번 세척하였다. Membrane을 2장의 비닐 bag 사이에 넣고 buffer 3에 담근 후 1.5ml의 희석된 Lumigen™PPD (1 : 100 in buffer 3) (Lumigen, Inc., Detroit, MI, U.S.A.)를 첨가한 뒤 15분간 반응시킨 후 X-ray film에 1시간 30분간 노출시켜 현상 하였다.

#### 라-2 Color metric Detection (발색 반응의 검출)

Membrane을 buffer 1에서 1분간 담근 후 다시 buffer 2가 있는 비닐 bag에서 30분간 흔들며 주고 A-P 용액에서 30분간 배양한 뒤 membrane을 새 bag에 옮긴다. 그 후 buffer 1으로 15분간 세척하고 buffer 3에 2분간 담근 후 10 ml의 Color Substrate 용액(10ml의 buffer 3에 45 $\mu$ l NBT 용액과 35 $\mu$ l의 X-Phosphate를 섞음)을 membrane에 적시고 비닐 bag에 봉한 뒤 배양한다. 점이 나타나면 50ml의 buffer 1로 5분간 씻어낸다.

#### \*\* 혈액 한천 배지 (BAP : Blood Agar Plate)

5% 가토 혈액, 5.0mg/ml hemin 및 0.5 mg/ml의 menadione이 첨가된 Trypticase soy agar(B. B. L. Microbiology systems, Cockeysville, Md., U. S. A.)

#### \*\* Brucella 혈액 한천 배지

1당 5% sheep blood, 10.0mg의 menadione, 10mg의 hemin, Pancreatic digest of casein 1%, peptic digest animal tissue 1%,

yeast extract 0.2%, Dextrose 0.1%, Sodium chloride 0.5%, Sodium bisulfite 0.01% 가 첨가된 Brucellar agar(Difco. Lab., Detroit. Mich, U. S. A.)

### III. 실험 성적

28명의 30개의 치아 중 11개의 치아에서 black colony가 발견되었으며 전통적인 혐기성 배양과 생화학 검사로는 6개의 치아에서 *P. endodontalis*가 검출되었고 간접 면역 형광법으로는 16개의 치아에서 검출되었다. Colony lift는 2가지의 클론된 DNA 프로브(1.6Kb, 0.9Kb)를 사용하였는데 0.9Kb 프로브를 사용한 경우 3개 치아에서, 1.6Kb 프로브에서는 5개 치아에서 *P. endodontalis*가 검출되었으며 1개의 치아에서 1.6Kb, 0.9Kb프로브 모두 *P. endodontalis*가 검출되어 모두 7개 치아에서 *P. endodontalis*가 검출되었다. (Table 3) 따라서 세 가지 방법을 사용한 결과 간접 면역 형광법을 사용한 경우 가장 많은 53%에서 *P. endodontalis*의 검출이 있었으며 그 다음이 DNA 프로브법으로 23%에서, 그리고 혐기성 배양법으로 20%의 순이었다. (Table 4) 총 16개의 치아에서 *P. endodontalis*의 존재가 확인되었고 *P. endodontalis* 검출에 있어 세 가지 방법중 간접 면역 형광법이 가장 빠르고 효과적이며 민감한 방법이었다.

*P. endodontalis*의 검출에서 각 실험 방법들과의 차이가 있는지 알아보기 위한 Z test 결과 간접 면역 형광법과 혐기성 배양법과는 유의한 차이가 있었고 ( $Z=2.846$   $P<0.05$ ) 간접 면역 형광법과 colony lift법간에도 유의한 차이가 있었으나 ( $Z=2.474$ ,  $P<0.05$ ) 혐기성 배양법과 colony lift법간에는 유의한 차이가 없었다. (Table 5) 또한 black colony의 형성과 *P. endodontalis*의 존재 여부에 대한 관계를 알아보기 위해  $X^2$  test를 한 결과 black colony와 *P. endodontalis*의 존재와는 서로 유의한 관련성을 가지고 있었다. ( $X^2=10.129$ ,  $df=1$ ,  $P<0.05$ ) 그리고 black colony가 나타났을 때 *P. endodontalis*가 존재하는 민감도(sensitivity)는 90.9%였고 black colony가 없을 때 *P. endodontalis*도



Table 3. Positive Detection of *P.endodontalis* by Anaerobic Culture, IIF and Colony Lift

No	Black Colony	IIF	Culture	Colony Lift	
				0.9Kb	1.6Kb
1					
2	*	*	*	*	
3					
4	*				
5		*			
6	*	*	*	*	*
7					
8					
9		*			
10		*			
11	*	*			
12		*			
13					
14					
15	*	*	*		*
16					
17	*	*	*		*
18					
19	*	*			*
20					
21	*	*			*
22					
23					
24					
25	*	*	*	*	
26					
27		*			
28		*			
29	*	*	*		
30	*	*			
Total	11	16	6	3	5
				7	

\* : Positive detection

Table 4. Detection of *P.endodontalis* in Endodontic Lesions by Culture, IIF & Colony Lift

Source	Black Colony	IIF	Culture	Colony lift	
				0.9Kb	1.6Kb
Infected canal (n=30)	11(37)	16(53)	6(20)	3(10)	5(17)
				7(23)	

Number of Sample

( ) : Percent of Sample.

Table 5. Difference among IIF, Colony Lift & Culture by Z Test

	IIF	Colony Lift	Culture
IIF		Z=2.474 P<0.05	Z=2.856 P<0.05
Colony Lift	Z=2.474 P<0.05		*
Culture	Z=2.846 P<0.05	*	

5-a : Difference between IIF & Culture result

		IIF Result		
		-	+	
Culture Result	+	0	6	Z=2.846 P<0.05 : significant difference was being
	-	14	10	
				<i>Total 30 Teeth</i>

5-b : Difference between IIF & Culture result

		IIF Result		
		-	+	
Colony Lift Result	+	0	7	Z=2.474 P<0.05 : significant difference was being
	-	14	9	
				<i>Total 30 Teeth</i>

5-c : Difference between Culture & Colony lift result

		Colony Lift Result		
		-	+	
Culture Result	+	1	5	Z= * : significant difference was not being
	-	22	2	
				<i>Total 30 Teeth</i>

(+ : Positive Detection - : Negative Detection)

\* Table 내의 숫자는 IIF, Culture, Colony Lift 결과 각각 Positive나 Negative로 나온 치아의 갯수임

Table 6. Correlation between Black Colony & *P.endodontalis*

		<i>P.endodontalis</i>		
		+	-	
Black Colony	+	10	1	X <sup>2</sup> =10.129, df=1, P<0.05 Sensitivity : 90.0 % Specificity : 68.4 %
	-	6	13	
				<i>Total 30 Teeth</i>

\* Table 내의 숫자는 각각 *P.endodontalis*가 검출되거나 검출되지 않은 치아 갯수와, Black Colony가 나오거나 나오지 않은 치아 갯수임

Table 7. Correlation between Foul Odor & *P.endodontalis*

		Foul Odor			
		-	+		
<i>P.endodontalis</i>	-	4	10	Sensitivity : 93.75 % Specificity : 28.57 %	
	+	1	15		

Total 30 Teeth

\* Table 내의 숫자는 각각 근관내 악취가 있거나 없는 치아 갯수와, *P.endodontalis*가 검출되거나 검출되지 않은 치아의 갯수임

없는 특이도(specificity)는 68.4%이다. (Table 6) Black colony가 없을 때보다 black colony가 있을 때 *P.endodontalis*가 검출될 확률은 2.89배 높다.

임상증상과 *P.endodontalis*의 관련 여부를 알기 위해 8가지 임상증상과 *P.endodontalis*의 존재를 logistic 회귀분석(regression)한 결과 근관내 악취와 *P.endodontalis*는 서로 유의한 관련성을 가지고 있었다. 악취가 있을 때 *P.endodontalis*가 존재할 민감도(sensitivity)는 93.75%였고 악취가 없을 때 *P.endodontalis*도 없는 특이도(specificity)는 28.57%이다. (Table 7)

#### IV. 총괄 및 고안

치근단 질환에서는 80여종 이상의 세균이 발견되는데 대부분이 혐기성 세균이다.<sup>1,2,3,4,5</sup> 1970년대 이전에는 여러 세균이 혼합되어 있는 경우 혐기성 세균들은 채취와 이송, 까다로운 배양 방법 등으로 인해 분리, 동정이 어려웠으나 혐기성 배양 기술의 발달로 치근단 질환에서 발견되는 세균의 대부분이 혐기성 세균으로 밝혀졌다.<sup>7,11,12</sup>

이들 혐기성 세균 중 black-pigmented *Bacteroides* 특히 *B.endodontalis*, *B.intermedius*, *B.gingivalis* 등이 임상 증상과 관련이 있다고 했는데<sup>8,13,24,25</sup> 이들은 nonmotile, non-spore forming, strict anaerobic 그람 음성 bacilli이다.<sup>5,15,22</sup> Black-pigmented *Bacteroides*의 발현 빈도를 살펴보면 Haapalsalo<sup>21</sup>등은 임상증상이 있는

경우에서는 54%, 임상증상이 없는 경우는 44%의 발현 빈도를 보였으며 Brook<sup>9</sup>등은 75%에서, Anderholt<sup>40</sup>등은 68%라고 하였고 Sundqvist<sup>11</sup>는 급성 환자의 73%라 하였으며 Winkelhoff<sup>6</sup>등은 치근단 농양 환자의 90% 이상에서 발견하였다고 하여 50% - 90%까지의 발현 빈도를 보였다.<sup>9</sup>

Black-pigmented *Bacteroides* 중 *B.endodontalis*가 1984년 가장 최근에 Steenbergen<sup>22</sup>등에 의해 발견되었는데 가장 산소에 민감하고 배양기간이 더 걸리며 신선한 배지에서만 잘 자라는 등 특별히 까다로운 배양 조건 때문이었다.<sup>26</sup> 이 세균은 감염 근관이 원인인 치근단 질환에서만 특이하게 검출되었는데<sup>5,15,22</sup> *B.gingivalis*나 *B.asaccharolyticus* 등과 공통항원을 공유하지 않았고 단백질 electrophoretic pattern도 매우 틀려 Winkelhoff<sup>15</sup>등은 특이 항 혈청이 *B.endodontalis*의 신속한 검출에 유용하리라 하였다. 1988년 세 가지 asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* 즉 *B.gingivalis*, *B.asaccharolyticus*, *B.endodontalis* 등은 다른 *Bacteroides* 아종들과의 현격히 다른 화학적, 생화학적 차이들로 인해 *Porphyromonas*로 명명하게 되었다.<sup>23</sup>

*P.endodontalis*는 열에 안정한 capsule의 차이로 세 가지 serotype 즉 O,K<sup>-</sup>, O,K<sub>2</sub>, O,K<sup>+</sup>으로 나뉜다.<sup>41</sup> 그런데 이들이 서로 각각 틀린 pathologic potential을 가지고 있는지는 명확치 않다.<sup>29</sup> *P.endodontalis*는 혼합 감염인 경우 급성염증을 일으키는데<sup>20</sup> *P.gingivalis*보다는

독성이 약한 편이다.<sup>23)</sup> *P. endodontalis*는 Ig G, M, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub> complement factor를 분해할 수 있다.<sup>11, 17, 24)</sup>

*P. endodontalis*의 발현 빈도를 보면 1985년 Winkelhoff<sup>25)</sup> 등은 치성 농양 환자의 17case중 9예(53%)에서 발견하였고 1986년 Haapasalo<sup>21)</sup> 등은 32개의 치아 중 2개에서 발견하였다. 1988년 Pantera<sup>26)</sup>가 간접 면역 형광법으로 화농성 치근단 병소의 20%에서 *P. endodontalis*를 검출하였다. 1989년 Sundqvist<sup>11)</sup>는 72개의 치아 중 5예에서, 1992년 Sundqvist<sup>42)</sup>는 9%였다. 1992년 Hashioka<sup>12)</sup>는 임상증상에 따라 혐기성 세균 중 *P. endodontalis*가 차지하는 비율이 4% - 58%라고 하였다. Sundqvist<sup>11)</sup>는 실험마다 *P. endodontalis*의 검출에 차이가 많은 이유는 *P. endodontalis*가 천천히 자라서 black pigment가 나타나는데 7일 이상이 걸리며 산소에 민감하고 Vancomycin에 약한 등 배양에 어려움이 많아 높은 기술을 요하기 때문이라고 하였다. 이렇게 *P. endodontalis*의 검출에는 채취, 이송, 배양에 많은 어려움이 있으므로 보다 쉽고 신속하며 정확도가 높은 세균 동정 방법이 필요하게 되었다. 그 중 하나가 간접 면역 형광법인데 뇌막염을 일으키는 Hemophilus influenzae 등 세균성 감염 인자의 검출에 널리 쓰인다.<sup>41)</sup> 이는 항원 항체 반응을 이용하여 병원균을 검출하는데, 장점으로는 세균 검출에 시간이 짧게 걸려 전통적인 배양법이 5-7일 걸리는데 비해 2-3시간 정도면 된다. 또한 장비와 공간이 적게 들고 세균이 죽어도 검출이 되며 세균의 모양으로 판별하므로 false-positive reaction을 알 수 있다.<sup>25, 28)</sup> 1988년 Pantera<sup>26)</sup> 등은 치근단 질환에서 *P. endodontalis* 등의 검출에 배양법과 간접 면역 형광법의 검출 빈도를 비교하였는데 증상에 따라 배양법은 0-1%에서, 간접 면역 형광법은 16-20%로 10배 이상 간접 면역 형광법으로 많은 검출을 하였다.

간접 면역 형광법 이외에 최근에 DNA 프로브를 이용한 기술이 다양하게 이용되고 있는데 이 역시 배양법보다 빠르고 민감하며 specific하고 용이하게 많은 sample의 세균을 한꺼번에 동정할 수 있다.<sup>36, 43, 45)</sup> 이 방법의 장점은 매우

정밀한 특이성을 가지며 다른 여러 종의 세균과 섞여 있는 경우 검출하고자 하는 세균이 극미량 존재하여도 검출이 가능하다. 그리고 간접 면역 형광법과 마찬가지로 까다로운 생화학적 검사 없이 신속하게 세균을 찾을 수 있다.<sup>43)</sup> 1987년 Savitt<sup>32)</sup> 등은 혐기성 배양법과 DNA 프로브를 이용하여 *P. gingivalis*와 *P. intermedius*를 검출하고 그 결과를 비교한 결과 DNA 프로브법이 1.5-3배 많은 검출을 보였으며 1993년 Kojima<sup>33)</sup> 등은 DNA 프로브를 이용하여 dot blot 방법으로 *P. gingivalis*를 검출한 결과 74%의 검출 결과를 보여 21%의 검출을 보인 배양법 결과보다 3배 이상의 정밀도를 보였다. 또한 Tanner<sup>43)</sup> 등은 1991년 *P. gingivalis*의 검출에 있어 DNA 프로브법으로 88.8%, 배양법으로는 23.8%의 검출 결과를 보고하였다. DNA 프로브법은 최소  $3 \times 10^3$ 의 세균이 있어야 검출이 가능하다. 이에 비해 배양법은 이론적으로는  $2 \times 10^8$ 의 세균 이상이 있어야 한다고 하지만 실제로는  $2 \times 10^6$  이상의 세균이 있어야 검출이 가능하다.<sup>43)</sup> Dot blot법 말고도 배양된 세균 집락의 colony lift를 DNA 프로브로 검출하기도 하는데 이 방법은 전체 세균에 대한 특정 세균의 비율을 함께 알 수 있고 적은 양의 sample을 증폭시킬 수 있으나 배지에 세균이 자라지 않는다면 민감도가 떨어질 수가 있고 세균간의 상호 억제 작용에 의해 세균의 배양 및 검출에 실패할 수 있다.<sup>34)</sup>

1992년 Tay<sup>26)</sup> 등은 전통적인 혐기성 배양법과 직접적 DNA 프로브법, 그리고 colony lift법으로 *P. gingivalis*를 검출한 결과, 총 77개의 치아 중 전통적 혐기성 배양법에서는 40개 치아에서, colony lift법에서는 54개, 직접 DNA 프로브로 검출한 경우 가장 많은 61예에서 *P. gingivalis*를 검출하였는데 colony lift법이 직접적 DNA 프로브법보다 검출율이 떨어지는 이유는 직접법에 비해 배양 배지가 필요하고 세균의 배양중 여러 세균간 상호 억제 작용이 나타나기 때문이라 하였다. 또한 이송 시간이 길수록 전통적 혐기성 배양법과 다른 방법간의 격차가 커진다고 하여 이송 과정중의 세균의 손실에 대하여도 언급하였다.

이번 연구 결과 간접 면역 형광법으로 16개의

치아(53%)에서 *P. endodontalis*를 검출하여 세 가지 방법중 가장 많은 검출을 하였고 그 다음이 colony lift와 DNA 프로브법으로 7개 치아(23%)에서 그리고 마지막으로 혐기성 배양법으로 6개 치아(20%) 순이었다. 따라서 간접 면역 형광법이 감염 근관에서 *P. endodontalis*의 검출에 있어 배양법보다 약 2.7배 많은 검출을 보여 가장 민감하고 정확한 방법임을 알 수 있다. 그 이유는 간접 면역 형광법이 직접 도말 표본상에서 형광 현미경으로 감별하므로 세균 배양에 따른 실패가 적고 또한 세균이 죽은 경우에도 검출이 가능하기 때문이라고 여겨진다. 특히 *P. endodontalis*는 산소에 매우 민감하므로 세균 채취나 이송 과정 중 죽어버리는 경우가 많을 것으로 생각되고 이것이 *P. endodontalis* 검출 실패의 가장 큰 원인이 될 수 있는데 간접 면역 형광법은 이런 경우에도 *P. endodontalis*를 검출할 수 있으므로 다른 방법들과는 달리 월등히 많은 검출을 할 수 있었던 것으로 사료된다.

Colony lift와 DNA 프로브법으로 *P. endodontalis*를 검출한 것이 혐기성 배양법보다 약간 많은 검출을 보였다. Colony lift법의 단점은 Gunaratnam<sup>34)</sup>이 지적했듯이 혐기성 배양법과 같이 선택배지에서 세균이 자라지 않으면 검출이 안된다. 그런데 *P. endodontalis*는 채취, 이송 과정 뿐 아니라 배지에서도 잘 자라지 않는 세균이므로 이 과정 중에 세균이 죽어버려 간접 면역 형광법과 많은 차이가 난 것으로 여겨진다. 그러나 DNA 프로브법이 혐기성 배양법보다 *P. endodontalis* 검출에 효율적인데 그 이유는 혐기성 배양법으로 *P. endodontalis*를 검출하려면 생화학 검사를 하기 위해 다시 2회에 걸쳐 순수 분리해야 하며 BHI broth와 PY broth에서 배양시켜야 하므로 이 과정중 *P. endodontalis*가 죽거나 오염되어 결과에 영향을 미칠 수 있다. 이렇게 생화학적 검사 과정이 생략되므로 DNA 프로브법이 혐기성 배양법 보다는 효율적이다.

*P. endodontalis*의 검출에 걸린 시간을 비교하여 보면 간접 면역 형광법은 3-4시간이 소요되었고, DNA 프로브법은 세균채취와 배양에 4일 colony lift에 1일 hybridization과 검출에

2일이 걸려 총 7일이 소요되었으며, 혐기성 배양법은 생화학 검사까지 몇 주가 소요되었다. 이로써 *P. endodontalis*의 검출에 걸린 시간에서도 간접 면역 형광법이 가장 효과적임을 알 수 있다. 따라서 감염 근관에서 *P. endodontalis*의 검출에 있어 가장 민감하고, 간편하고, 빠른 방법은 간접 면역 형광법임을 알 수 있다.

임상 증상이 있는 치아에서 *P. endodontalis*의 검출 결과 57%인 16개의 치아에서 *P. endodontalis*를 검출하였는데 이는 *P. endodontalis*의 검출에 있어 가장 많은 검출율을 보인 Winkelhoff의 53%와 비슷한 결과였다. 이로써 국내 환자의 임상 증상이 있는 감염 근관에도 상당한 비율로 *P. endodontalis*가 존재함을 확인할 수 있었다.

1988년 저자<sup>46)</sup>도 15개의 괴사된 치아에서 배양법으로 세균을 검출했으나 *P. endodontalis*는 검출하지 못했다. 그런데 이번 연구에서는 혐기성 배양 및 생화학적 검사로 *P. endodontalis*를 동정하기 전에 colony lift로 *P. endodontalis*의 유무와 배지상에서의 위치를 미리 알 수 있었기 때문에 어떤 치아 표본에 *P. endodontalis*가 있는지 미리 알 수 있었고 생화학 검사를 위하여 colony를 선택할 때 수많은 흑색, 갈색 colony중 어느 것을 고를지 판단하기가 매우 용이하였다. 따라서 일반적인 혐기성 배양법 결과도 DNA 프로브와 colony lift법을 병용하면 쉽고 정확하게 *P. endodontalis*가 검출되어 DNA 프로브법과 배양법의 결과가 많은 차이가 나지 않았다고 여겨진다. 그러므로 배양법으로 특정 세균을 순수 분리하고자 할 때 DNA 프로브와 colony lift법을 병용하면 훨씬 쉽고 빠르고 정확한 결과가 나오리라 사료된다.

1.6Kb와 0.9Kb의 2가지 DNA 프로브는 같은 *P. endodontalis* ATCC 35406으로부터 추출한 클론된 제한 절편이며 *P. endodontalis*에만 hybridization되는 프로브인데 서로 각각 2개 치아와 4개 치아에서 *P. endodontalis*를 검출하였고 1개 치아에서만 모두 hybridization되는 양상을 보였다. 그 이유는 *P. endodontalis*가 3가지 혈청형(O<sub>1</sub>K<sub>1</sub>, O<sub>1</sub>K<sup>-</sup>, O<sub>1</sub>K<sub>2</sub>)이 있기 때문이라고 생각되어진다. 1992년 Winkelhoff<sup>20)</sup> 등은 *P. en-*

*dodontalis* 각 strain의 DNA에 대하여 제한 효소 분석법(restriction endonuclease analysis)으로 연구를 하였는데 각각 heterogenety를 나타낸다고 하였다. 즉 이번 실험에서는 O<sub>1</sub>K<sub>1</sub>에서 추출한 DNA 프로브들을 사용하였는데 하나는 O<sub>1</sub>K<sub>1</sub>, O<sub>1</sub>K<sup>-</sup>에만 hybridization되고 또 하나는 O<sub>1</sub>K<sub>1</sub>, O<sub>1</sub>K<sub>2</sub>에만 hybridization되는 프로브일 수 있다. 이때 2종의 프로브 모두에서 hybridization된 치아의 *P. endodontalis*는 O<sub>1</sub>K<sub>1</sub>이라고 하고 나머지 2개는 O<sub>1</sub>K<sup>-</sup>, 4개는 O<sub>1</sub>K<sub>2</sub>라면 본 실험과 같은 결과가 나오게 된다. 이러한 가정에 대한 더 이상의 확실한 증거는 O<sub>1</sub>K<sup>-</sup>, O<sub>1</sub>K<sub>2</sub> type의 *P. endodontalis* 표준 균주가 없으므로 확인할 수 없다. 아직까지 O<sub>1</sub>K<sub>1</sub> 즉 ATCC 35406인 *P. endodontalis* 이외의 두 아종 세균이 ATCC (American Type of Culture Collection Rockville, Md., U.S.A.)에서 등록되어 판매되지 않으므로 구할 수 없었다. 따라서 위의 가정을 확인하려면 O<sub>1</sub>K<sup>-</sup>, O<sub>1</sub>K<sub>2</sub> 두 종의 *P. endodontalis* 표준 균주를 확보하거나 아니면 배양법으로 검출한 *P. endodontalis*를 DNA fingerprinting이나 SDS-PAGE(Sodium dedecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 분석 등으로 검증하는 방법 등이 생각되어질 수 있다.

1992년 Hashioka<sup>12)</sup> 등은 *Porphyromonas* 종은 근관내 악취와 깊은 관련이 있다고 하였다. 본 실험에서도 여러 가지 임상 증상 중 악취와 *P. endodontalis*의 존재가 유의한 관련성을 가지고 있었다. 즉 근관내 악취가 있을 때 *P. endodontalis*가 존재할 확률이 93.75%이다. 따라서 근관 치료 시 근관 폐쇄 시기의 결정에 악취의 여부가 중요하리라 생각된다.

이번 실험에서는 위의 세 가지 방법 이외에도 환자에게서 직접 채취한 sample에서 DNA 프로브를 이용한 dot blotting을 시행하였다. 그러나 최소한 3×10<sup>3</sup>개 이상의 세균이 있어야 하고 실제적으로는 1×10<sup>4</sup>개 이상의 세균이 있어야 하는데 채취된 세균의 양이 너무 적어서인지 모두 음성반응을 나타내었다.

*P. endodontalis*의 검출에 가장 쉽고 빠르고 민감한 방법에 대하여 완전한 연구가 이루어 지려면 3종의 serotype을 모두 구비하는 것이

필요하리라 여겨진다. 그리고 특정한 세균 검출에 유용한 여러 방법을 서로 병용하여 치근단 질환에서 임상 증상과 병원균 간의 관계에 대한 연구가 행하여져야 하며 또한 환자에게서 분리 배양한 *P. endodontalis*에 대한 지속적인 연구가 진행되어야 할 것이다.

## V. 결 론

치근단 질환에서 중요한 역할을 하는 *P. endodontalis*의 검출 빈도와 효과적인 검출 방법을 알아보기 위하여 30개의 임상증상이 있는 치아에서 균주를 채취하여 혐기성 배양 및 생화학 검사를 하고 간접 면역 형광법과 클론된 균종 특이 DNA 프로브를 이용한 colony lift법을 시행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

28명의 30개 치아 중 11개의 치아에서 black colony가 나타났으며 혐기성 배양에서는 6개(20%), 간접 면역 형광법으로는 16개(53%), DNA 프로브법으로는 7개 치아(23%)에서 *P. endodontalis*의 존재가 확인되었다.

간접 면역 형광법이 혐기성 배양법이나 DNA 프로브법보다 *P. endodontalis*의 검출에 있어 유의하게 많은 검출을 보였으나 DNA 프로브법과 혐기성 배양법과는 유의한 차이가 없었다(P<0.05).

Black colony의 형성과 *P. endodontalis*의 존재와는 유의한 관련성을 나타내었다(P<0.05). Black colony가 없을 때보다 있을 때 *P. endodontalis*가 검출될 확률이 2.89배 높다.

임상 증상 중 근관내 악취와 *P. endodontalis*는 서로 유의한 관련성을 가지고 있었다. 악취가 있을 때 *P. endodontalis*가 존재할 민감도(sensitivity)는 93.75%였고 악취가 없을 때 *P. endodontalis*도 없는 특이도(specificity)는 28.57%이다.

## REFERENCE

1. Zavistoski, J.: Quantitative bacteriology of endodontic infections. J. Oral Surg. 49: 171-174. 1980.

2. Griffee, M.B. : The relationship of *Bacteroides melaninogenicus* to symptoms associated with pulpal necrosis. J. Oral Surg. 50 : 457-461. 1980.
3. Attebery, H. R. : An acute anaerobic infection following endodontic treatment. J. Endodon. 6 : 793-795. 1980
4. Itzhak Brook. : Bacteriology of acute periapical abscess in children. J.Endodon. 7 : 378-380. 1981
5. van Winkelhoff, A.J : *Bacteroides endodontalis* and other black-pigmented *Bacteroides* species in odontogenic abscesses. Infect. Immun. 494-497. 1985
6. Keudell, K. : Humoral antibodies to anaerobic bacteria isolated from patients with pulpal-periapical disease. Oral Surg. 53 : 194-197. 1982.
7. Baumgartner, C. : Bacteria in the apical 5mm of infected root canals. J. Endodon. 17 : 380-383. 1991.
8. Gomes : Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. J.Int Endodon. 27 : 291-298. 1994
9. Matusow, R.J. : Anaerobic isolated in primary pulpal-alveolar cellulitis cases. : endodontic resolutions and drug therapy considerations. J.Endodon. 9. : 535-543. 1983
10. Sundqvist, G. : Capacity of anaerobic bacteria from necrotic dental pulps to induce purulent infections. Infect. Immun. 25 : 2 : 685-693. 1979
11. Sundqvist, G. : Prevalence of black-pigmented *Bacteroides* spp. in human apical periodontitis. Infect. Immun. 53 : 13-19. 1989.
12. Hashioka, K. : The relationship between clinical symptoms and anaerobic bacteria from infected root canals. J. Endodon. 18 : 558-561. 1992.
13. Hashioka. : Relationship between clinical symptoms and enzyme-producing bacteria isolated from infected root canals. J.Endodon. 20 : 75-77. 1994.
14. Fabricius, L. : Predominant indigenous oral bacterial isolated from infected root canals after varied times of closure. J. Dent. Res. 90 : 134-144. 1982.
15. van Winkelhoff, A.J. : Further characterization of *Bacteroides endodontalis*, an asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species from the oral cavity. J.Clinic.Micro. 75-79. 1985.
16. Yoshida, M. : Correlation between clinical symptoms and microorganisms from root canals of teeth with periapical pathosis. J.Endodon. 13 : 24-28. 1987.
17. van Winkelhoff, A. J. : The role of black-pigment *Bacteroides* in human oral infections. J. Clin. Periodontol. 15 : 145-155. 1988.
18. Sundqvist, G. : Bacterial study of necrotic pulps. Umea University Odontological Dissertation 7. Umea, Sweden. University of Umea. 1976.
19. Slots, J. : Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease, virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. J. Dent. Res. 63. : 412-421. 1984
20. Fukushima, H. : Localization and identification of root canal bacteria in clinically asymptomatic periapical pathosis. J. Endodon. 16 : 534-538. 1990.
21. Haapasalo, M. : Black-pigment *Bacteroides* spp. in human apical periodontitis. Infect. Immun. 149-153. 1986.
22. van Steenberg, T.J.M. : *Bacteroides endodontalis* sp. nov., an asaccharolytic black pigmented *Bacteroides* species from infected dental root canals. Int. J. Syst. Bact. 118-120. 1984.

23. Shah, H. N. : Proposal for reclassification of *Bacteroides asacchrolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a new genus *Porphyromonas*. : Int J. Syst. Bact. 38 : 128-131. 1988.
24. van Winkelhoff, A.J. : *Porphyromonas endodontalis* : Its role in endodontal infection. J. Endodon. 18 : 431-434. 1992.
25. Pantera, M. J. : Antigenic studies of oral and nonoral black-pigmented *Bacteroides* strains. Infect. Immun. 39 : 565-574. 1980.
26. Tay, F. : Evaluation of a non-radioactive DNA probe for detecting *P.gingivalis* in subgingival specimens. Oral Microb. Immun. 7 : 344-348. 1992.
27. Ogawa, T. : Immunochemical and biological characterization of membrane proteins of *Porphyromonas endodontalis*. Infect. Immun. 60 : 4528-4533. 1992.
28. Hanazawa, S. : Monoclonal antibody against *Porphyromonas(Bacteroides) endodontalis* lipopolysaccharide and application of the antibody for direct identification of the species. J. Clin. Microbiol. 29 : 2550-2553. 1991.
29. Herweijer, J. A. : Characterization of total membrane proteins of *Porphyromonas endodontalis*. J. Endodon. 18 : 620-624. 1992.
30. Kettering, J. D., Torabinejad, M. : Specificity of antibodies present in human periodontal lesions. J. Endodon. 17 : 213-216. 1991.
31. Robert, J. : Indirect immunofluorescence microscopy for the identification of *Actinomyces* sp. in endodontic disease. J.Endodon. 16 : 318-322. 1990.
32. Savitt, E. D. : Comparison of cultural methods and DNA probe analysis for the detection of *A.actinomycetemcomitans*, *B.gingivalis*, and *B.intermedius* in subgingival plaque samples. J.Periodontol. 59 : 431-438. 1988.
33. Yasui, S : Rapid identification of *P.gingivalis* by bisulfite-modified DNA probe method. J. Periodont. Res. 28 : 98-101. 1993.
34. Gunaratnam : Enumeration of subgingival species on primary isolation plates using colony lift. Oral Microbiol. Immun. 7 : 14-18. 1992.
35. Rienzo, D. : Use of randomly cloned DNA fragments for the identification of oral *Spirochetes*. Oral Microbiol. Immun. 6 : 88-96. 1991.
36. Quivey, R. G. : The use of DNA probes in dental diagnosis and therapy. Adv. Dent. Res. 99-108. 1987.
37. 김재희 : 치근단 병소가 있는 환자에서 *P. endodontalis* 항원에 대한 혈청 특이 항체의 면역 반응 연구. 대한 치과 보존학회지 19 : 485-498. 1994.
38. 엄원석 : 무작위로 클로닝한 *P.endodontalis* ATCC 35406 지놈 DNA의 제한 절편 hybridization법에 의한 세균 동정. 대한 치과 보존학회지 20 : 645-654. 1995.
39. Wadsworth. : Anaerobic bacteriologic manual. Dept of Continuing Education in Health Science. UCLA. USA. 1-53. 1975.
40. Aderhold, L. : The bacteriology of dentogenous pyogenic infections. Oral Surg. 583-587. 1981
41. van Winkelhoff, A.J. : Serological characterization of black-pigmented *Bacteroides endodontalis*. Infect. Immun. 51 : 972-974. 1986.
42. Sunqvist G. : Associations between microbial species in dental root canal infections. Oral Microbiol. Immun. 7 : 257-262 1992.
43. Maiden : Tetracycline fiber therapy monitored by DNA probe and cultural methods. J.Periodont. Res. 26 : 452-459.



1991.

44. Smith G. L. S. : Reverse DNA hybridization method for the rapid identification of subgingival microorganisms. *Oral Microbiol. Immun.* 4 : 141-145. 1989.
45. Smith G. L. S. : Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms. *Oral Microbiol. Immun.* 4 : 47-51. 1989.
46. 김민겸 : 감염 근관에서의 주요 병원균과 임상 증상간의 관계에 관한 연구. 대한 치과 보존학회지 14 : 815-96. 1989.

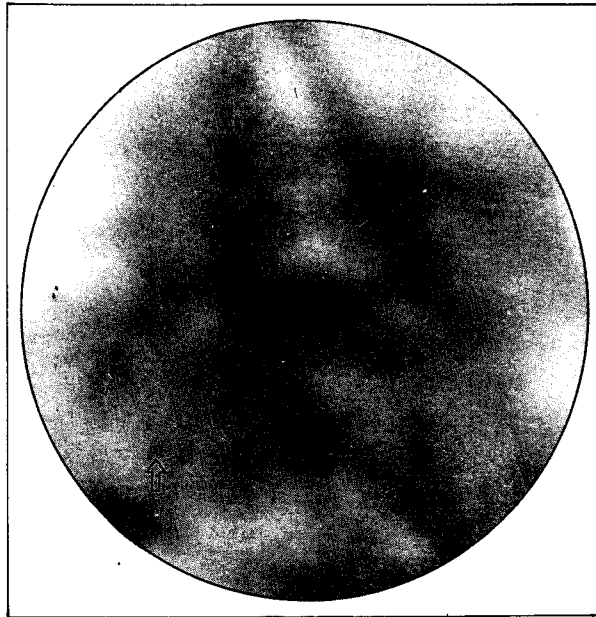


Fig 1. The Result of Chemiluminescent Detection.  
↑ indicate the colony of *P.endodontalis*  
on the X-ray film.

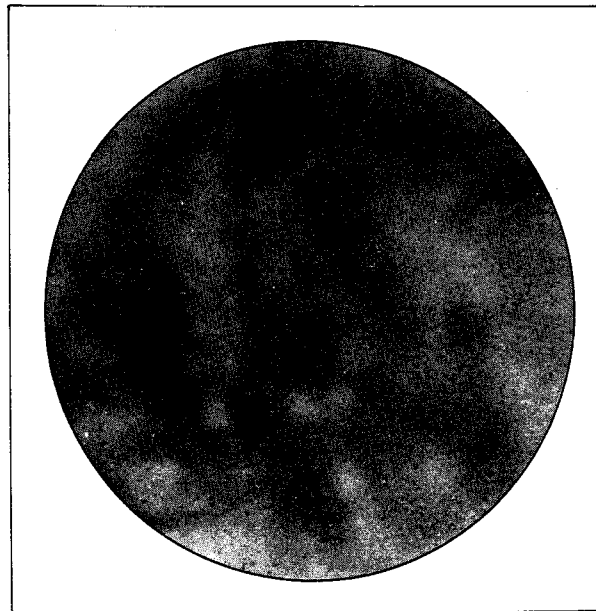


Fig 2. The Result of Color Metric Detection.  
↑ indicate the colony of *P.endodontalis*  
on the nylon membrane.