

치근단 병변에서 *Actinomyces* 종의 검정을 위한 간접 면역형광법적 연구

서울대학교 치과대학 치과보존학교실

장원정 · 윤수한 · 권오양

Abstract

INDIRECT IMMUNOFLOURESCENCE FOR THE IDENTIFICATION OF *ACTINOMYCES* SPECIES IN PATIENTS WITH PERIAPICAL LESION.

Won-Jung Chang, Soo-Han Yoon, O-Yang Kwon

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

Actinomyces are Gram-positive, non-acid-fast, anaerobic or microaerophilic filamentous bacteria. These organisms are frequently detected from infected root canals and periapical lesion. The purpose of this study was to use indirect immunofluorescence to determine the presence of select *Actinomyces* species in a survey of teeth associated with periapical lesion, to clarify the relationship between clinical symptoms of periapical lesions and the *Actinomyces* species and to study on the cross reaction among *Actinomyces*.

Actinomyces israelii serotype I (ATCC 12102), *Actinomyces israelii* serotype II (ATCC 29322), *Actinomyces viscosus* serotype II (ATCC 19246), *Actinomyces naslundii* serotype I (ATCC 12104) were cultured in anaerobic condition. Rabbit antisera were prepared by intravenous injection of formalized whole cells. Indirect immunofluorescence method was used to achieve the purpose.

The following results were obtained.

1. There was a relationship between *Actinomyces* and periapical disease.
2. *A. israelii* serotype I, II were frequently identified with Indirect Immunofluorescence and most often associated with periapical disease. In culture finding, there was no significant difference between each group.
3. Indirect Immunofluorescence is both more sensitive and more rapid than culture for

* 본 연구논문은 서울대학병원 1995년도 지정진료비에 의하여 이루어 졌음.

identification of *Actinomyces* species in patients with periapical lesion.

4. *A. israelii* serotype I, II was highly isolated in infected root canals with local swelling, *A. naslundii* serotype I was highly isolated in those with foul odor, and *A. israelii* serotype I was found in higher frequency in those with exudate than other bacteria.
5. In the Indirect Immunofluorescence (1 : 320), A positive cross reaction was obtained between *A. israelii* serotype I and *A. israelii* serotype II, also, *A. viscosus* serotype II and *A. naslundii* serotype I. There was no cross reaction between *A. israelii* serotype I, II and *A. viscosus* serotype II, *A. naslundii* serotype I.

Keywords : *Actinomyces israelii* serotype I,II, Indirect Immunofluorescence, periapical lesion

I. 서 론

치수 및 치근단 질환의 발병과 진행에 있어서 미생물의 역할은 점차 중요하게 인식되고 있다¹⁾. 혐기성 세균의 중요성에 비하여 그 연구 방법의 개발이 미진하였으나 최근 팔목할만한 연구 기법의 개발로 혐기성 세균이 치수 및 치근단 질병 발생에서 주도적인 역할을 한다는 것이 확인되었다. Craig²⁾ 등은 감염된 근관에서 *Actinomyces* species, black pigmented *bacteroides*, *Lactobacillus* species, *Peptostreptococcus* species, *Veillonella parvula*, *Bacteroides buccae*, *Eubacterium faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus mutans* 등이 주로 발견된다고 보고 하였고, Hoshino³⁾ 등은 깊은 치아 우식으로 생긴 치근단 질환에서 *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Protonibacterium*, *Peptostreptococcus* 등이 발견 된다고 보고한 바 있다.

이들중 *Actinomyces* species는 그람 양성외 혐기성 또는 미호기성의 박테리아로 우식 상아질, 치태, 치은열구, 치주낭, 감염 근관에서 많이 검출되고 있다⁴⁾. *Actinomyces*는 치수 병변의 원인균이라기 보다는 치근단 방선균증과 관계가 더 있으며, 근관 치료 도중 *Actinomyces*가 치근단 조직으로 밀려들어가거나 치아 우식증으로 인한 세균의 직접 감염에 기인하는

것으로 알려져 있다.

현재까지 *Actinomyces*를 포함한 근관 감염이나 치근단 병원성 미생물에 대한 연구는 주로 배양에 의해 검출하여 왔지만 배양에 의한 연구는 시간의 소모가 많고 어렵고 노력이 많이 들며 배양 방법에 따라 다른 결과를 초래하기도 한다.

성공적으로 세균을 동정하기 위해서는 선택 배지가 필요하고, 형태학적인 연구나 생화학적인 연구에 의한 세균 동정은 어렵고 부정확하며 비능률적이다. 이에 보다 특수한 방법에 대한 연구가 진행되면서 간접 면역형광법을 이용한 세균 검출이 최근 광범위하게 응용되고 있다⁵⁾.

간접 면역형광법은 항원 항체 반응의 특이성으로 병원균의 검출에 유용하며 빠르고, 적은 장비만으로도 가능하며 특별한 기구가 필요없고, 세균 존재의 유·무를 알려주는 민감도와 특이도가 배양법에 비해 매우 높은 장점이 있다.

Robert¹¹⁾ 등은 *Actinomyces* 를 검출하는데 있어서 간접 면역형광법은 가장 민감한 방법으로, 특히 혼합된 감염증에서의 세균 동정에서 기존의 배양에 의한 것보다 많은 장점을 갖고 있으며, 치근단 감염에서 60% 정도의 *Actinomyces* 를 간접 면역형광법에 의해 검출하였다고 보고하였다. 치근단 병변 외에 기타 다른 병소에서 *Actinomyces* 를 검출하는데 간접면역형광법은 성공적으로 사용되고 있지만, 아직까지

치근단 병소가 있는 근관에서 *Actinomyces* 를 검출하는데에 간접 면역형광법을 이용하는 것에 대한 연구는 미진하였다. 이에 저자는 치근단 병소에서 관찰되는 *Actinomyces* 의 존재를 간접 면역형광법을 사용해서 확인하고, 증상에 따른 혈청학적인 연구를 배양의 것과 비교하여 그 결과를 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험세균 배양

본 실험에 사용한 세균은 표 1과 같다.

각 균주들을 *Actinomyces* 선택배지(Tryptic soy broth 9.0g, Glucose 1.5g, Agar 4.5g, Calcium sulfate 1.0ml, Sodium fluoride 1.0 ml, Neutral acrifulvin 1.0ml, Potassium tellurite 0.3ml, Basic fuchsin 1.0ml, Blood 15.0ml, DDW 300.0ml) 에 접종하여 37°C 혐기성

세균 배양기(80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂, Coy Lab, Products, Michigan, U.S.A)에서 5-7 일간 배양하여 순수 분리한 후 균집락을 취하여 이를 BHI (Brain Heart Infusion) broth (Difco, Laboratories, Michigan, U.S.A)에 접종하고 37°C의 혐기성 조건하에서 48-72 시간 배양 하였다. 균주는 16,000 x g, 4°C 에서 15 분간 원심분리하여 사용시까지 -20°C 에서 보관 하였다.

2. 실험 표본 수집

1995. 3. 16-1995. 6. 29 사이에 서울 대학병원 치과진료부에 내원한 20-53세 까지의 환자중 임상 증상이 있고 1개의 근관을 가지며 치수가 피사된 15개의 치아를 실험 재료로 사용하였다(표2). 이전에 근관 치료를 받았던 치아나 근관이 타액으로 오염되었던 치아와 치주낭의 깊이가 4mm 이상 되는 치아는 제외하

Table 1. Bacterial strains used in this study

Strain	Source	Serotype
<i>Actinomyces israelii</i>		
12102	ATCC ^a	I
29322	ATCC	II
<i>Actinomyces viscosus</i>		
19246	ATCC	II
<i>Actinomyces naslundii</i>		
12104	ATCC	I

^a American Type Culture Collection

Table 2. Clinical features of patients

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Age/sex	25/M	26/M	45/F	26/F	23/M	20/M	36/M	53/F	46/F	39/F	49/F	33/F	29/M	34/F	51/F
Site	#11	#21	#11	#11	#31	#12	#22	#31	#22	#43	#34	#21	#11	#11	#21
Pain	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
Swelling	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
Sinus tract	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-
Foul odor	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Periapical radiolucency	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Percussion	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Exudate	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+

였으며, 치수 피사여부는 전기치수 검사와 방사선 사진상의 치근단 병변 유무로 판단하였고 치수 천공에 의해 확인될 수 있었다. 또한 임상적 증상은 다음과 같이 7가지 증상으로 변별하였다.

1. 급성 동통
2. 국소적 종창
3. 악취
4. 누공 형성
5. 방사선 소견
6. 삼출액
7. 타진시 파민 반응

3. 세균의 채취

세균의 채취시 먼저 치아를 방습하여 분리한 후 30% H₂O₂ 로 2분간 치아주위와 clamp를 세척 하였다. 소독된 고속 엔진 bur로 근관와동을 상아질 하방 1-2mm까지 형성하고 치아를 다시 30% H₂O₂ 로 10-15초간 세척한 후 2% iodine tincture로 1-2분간 씻어내고 이를 생리 식염수로 완전히 씻어 내었다. 그 후 저속의 엔진 bur로 근관와동을 완성한 뒤 멸균된 paper point를 근관내에 치근단 부위라고 생각되는 부위에 넣어 약 15초간 방치하였다가 2ml의 PRAS ringer액과 PBS용액에 넣고 Gas Pack Pouch TM (Becton Dickinson and Co.)에 넣어 즉시 실험실로 옮겼다.

4. 배양

Anaerobic Pack에 넣어져 옮겨진 PRAS ringer 액을 즉시 실험실의 혐기성 배양기 (Coy anaerobic chamber Michigan, U.S.A) 내로 옮겨 vortex mixer로 진탕한 후 단계적으로 10 배씩 즉 10, 100, 1000, 10000 배로 희석하여 *Actinomyces* 선택 배지에 100 μ l씩 접종하고 80% N₂, 10% H₂ 및 10% CO₂가 든 37 $^{\circ}$ C 혐기성 배양기에 넣고 72시간 배양한 후 그람염색을 하여 집락수를 세었다. 분리된 세균 집락을 *Actinomyces* 배지에 3일간 배양시킨 후 사용시 까지 보관 하였다.

5. 가토 항혈청 생산

5가지 균주를 각각 PBS(pH7.3)로 세척하고 0.5% formalin 용액에 16-24 시간 넣어 고정시킨 후 다시 PBS 로 세척하였다. 균주에 대한 항체를 얻기 위하여, 각 균주를 10mg/ml (wet weight) 되도록 PBS로 희석하고 균주별로 체중 2.5-3kg내외의 가토 2마리의 귀정맥에 균주용액을 0.3ml로 부터 0.3ml씩 이를 간격으로 용액을 증가시키며 한마리당 10번씩 (0.3 ml, 0.3ml, 0.6ml, 0.6ml, 0.9ml, 0.9ml, 1.2ml, 1.2ml, 1.5ml, 1.5ml) 주사한 후 일주일 후에 3일간 연속적으로 1.5ml 씩 booster 주사하였다. 적정 항체역가를 측정하기 위해 가토의 central ear artery에서 혈액을 채취하여 간접 면역형광법을 실시하였고 적정 항체 역가가 나온 가토는 충분한 양의 혈청을 얻고자 심장천공법 (intracardiac puncture)으로 채취한 혈액을 원심 분리로 혈청을 얻은 후 -70 $^{\circ}$ C의 deep freezer에서 사용시까지 냉동 보관하였다.

6. 면역 흡착

형광 현미경 관찰을 통해서 각 항 혈청간의 교차반응 유무를 관찰한 후 이 교차반응을 제거시키기 위하여 2ml의 항 *A. israelii* serotype I 혈청에는 *A. israelii* serotype II, *A. viscosus* serotype II, *A. naslundii* serotype I 균주 200 mg을 첨가하고 항 *A. israelii* serotype II 혈청에는 *A. israelii* serotype I, *A. viscosus* serotype II, *A. naslundii* serotype I 균주를, 항 *A. viscosus* serotype II 혈청에는 *A. israelii* serotype I, *A. israelii* serotype II, *A. naslundii* serotype I 균주를, 항 *A. naslundii* serotype I 혈청에는 *A. israelii* serotype I, II, *A. viscosus* serotype II를 각각 동일한 방법으로 첨가하여 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 15rpm의 속도로 1 시간 혼합 시킨후 4 $^{\circ}$ C 냉장고에서 12시간 보관하여 반응시켰다. 이렇게 반응된 혈청은 1시간 원심분리 (16,000kg)시켜 상층액만을 취한 후 예비실험과 동일하게 형광현미경법을 이용하여 각 균주간의 교차반응 유무를 관찰하였다.

7. 간접 면역형광법

간접 면역형광법을 실시하기 위하여 각 균주를 0.5% formalin으로 고정하고 PBS로 세번 세척한 후에 spectrophotometer(Bausch & Lomb spectronic 21 U. V. D. Rochester, N. Y. U. S. A.)를 이용하여 650nm에 0.15 O. D. 로 표준화시켜 희석하였다. 희석한 각 균주용액을 20 μ l 씩 각기 다른 받침 유리 위에 떨어뜨린 후 공기중에서 건조시켜 열처리로 고정하고 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

항혈청 용액을 PBS에 4% bovine serum albumin을 넣은 용액으로 check-board 역가측정법에 의해 배수 희석하여 사용하였다. 각 균주위에 1 : 320 으로 희석한 *A. israelii* serotype I, II, *A. viscosus* serotype II, *A. naslundii* serotype I 를 20 μ l 씩 떨어뜨려 37 $^{\circ}$ C 습실내에서 30분간 반응시킨 후 PBS 로 세척하고 fluorescein isothiocyanate로 conjugate 된 goat anti rabbit IgG (Cappel Inc, U. S. A)를 1 : 30 으로 희석하여 20 μ l 씩 slide 상에 떨어뜨려 37 $^{\circ}$ C 습실내에서 30분간 반응시킨 후 다시 세척하고 90% glycerol 로 고정하여 형광현미경하에서 관찰 하였다. 이때 사용된 현미경은 Olympus fluorescence microscope BM-2 RFL (Olympus optical Co. LTD, Tokyo, Japan)이고 Exciter filter는 UG-1, Dichronic mirror는 DM-400+1-420, Additional barrier filter는 L-435, light source는 HBO 200 수은등이며, 형광염색에 의한 판정등급은 다음과 같은 기준에 의해 0부터 4+ 까지 나누어서 검정하였으며 이중 4+ 만 positive reaction 으로 고려하였다.

0 : no fluorescence

1+ : bare fluorescence with single cells not distinguishable

2+ : faint fluorescence with single cells visible no definite of cell shape

3+ : moderate fluorescence with good envelope definition and dark cell center

4+ : brilliant fluorescence with good cell envelope definition and a dark cell center

III. 실험결과

배양에 의한 결과는 표 3과 같다.

25%의 *Actinomyces* 가 검출 되었으며 이중 *A. israelii* serotype I 항혈청에 반응을 보인 것은 11.6%이며, *A. israelii* serotype II 는 10.9%, *A. viscosus* serotype II 는 7.9%, *A. naslundii* serotype I 은 2.4%가 positive reaction을 나타냈다.

간접 면역형광법에 의한 (표 3) 검출은 52.5%를 나타냈으며 *A. israelii* serotype I 은 46.0%, *A. israelii* serotype II 는 45.7%, *A. viscosus* serotype II 는 22.5%, *A. naslundii* serotype I 는 17.6%가 검출 되었다.

간접 면역형광법과 배양의 결과를 비교해 볼때 모든 균주에서 ($P < 0.01$) 간접 면역형광법에 의한 것이 더 많은 균주가 검출 되었고 유의한 차이가 있었다(표 4).

간접 면역형광법에서(표5) *A. israelii* serotype I 이 가장 많이 검출되었으며, *A. israelii* serotype II, *A. viscosus* serotype II, *A. naslundii* serotype I 순으로 나타났고, *A. israelii*

Table 3. Results of Culture and Indirect Immunofluorescence of *Actinomyces* sp.

		AI ₁ (%)	AI ₂ (%)	AV ₂ (%)	AN ₁ (%)
Culture	M	11.6	10.9	7.9	2.4
	SD	20.3	19.0	15.5	6.3
Indirect Immunofluorescence	M	46.0	45.7	22.5	17.6
	SD	35.9	33.9	30.3	23.7

AI₁, *A. israelii* serotype I; AI₂, *A. israelii* serotype II; AV₂, *A. viscosus* serotype II; AN₁, *A. naslundii* serotype I

Table 4. Comparison of Indirect Immunofluorescence and Culture study

Variables	Mean	SD	T-value	P-value
AI ₁	0.348	0.339	3.834	< 0.0015**
AI ₂	0.381	0.315	4.530	< 0.0003**
AV ₂	0.109	0.191	2.125	< 0.0266**
AN ₂	0.151	0.210	2.685	< 0.0093**

* Statically significant(P<0.01)

AI₁, *A. israelii* serotype I ; AI₂, *A. israelii* serotype II ; AV₂, *A. viscosus* serotype II ; AN₁, *A. naslundii* serotype I

Table 5. Interrelationship of *Actinomyces* with Indirect Immunofluorescence method

Variables	Mean	SD	T-value	P-value
AI ₁ -AI ₂	0.003	0.326	0.036	< 0.4850
AI ₁ -AV ₂	0.235	0.359	2.045	< 0.0145*
AI ₁ -AN ₁	0.284	0.362	2.947	< 0.0056*
AI ₂ -AV ₂	0.233	0.442	1.966	< 0.0350*
AI ₂ -AN ₁	0.281	0.405	2.599	< 0.0110*
AV ₂ -AN ₁	0.049	0.210	0.872	< 0.1996

* Statically significant(P<0.05)

AI₁, *A. israelii* serotype I ; AI₂, *A. israelii* serotype II ; AV₂, *A. viscosus* serotype II ; AN₁, *A. naslundii* serotype I

Table 6. Interrelationship of *Actinomyces* with Culture method

Variables	Mean	SD	T-value	P-value
AI ₁ -AI ₂	0.006	0.225	0.107	< 0.4586
AI ₁ -AV ₂	0.037	0.194	0.714	< 0.2437
AI ₁ -AN ₁	0.091	0.180	1.899	< 0.0406*
AI ₂ -AV ₂	0.030	0.124	0.919	< 0.1873
AI ₂ -AN ₁	0.084	0.215	1.476	< 0.0819
AV ₂ -AN ₁	0.054	0.178	1.132	< 0.0138*

* Statically significant(P<0.05)

AI₁, *A. israelii* serotype I ; AI₂, *A. israelii* serotype II ; AV₂, *A. viscosus* serotype II ; AN₁, *A. naslundii* serotype I

serotype I 와 II 사이에는 유의한 차이가 없었으며, *A. viscosus* serotype II 와 *A. naslundii* serotype I 사이에도 유의한 차이가 없었다(AI₁ = AI₂ > AV₂ ≥ AN₁). 배양에 의한 것에서는 각 균주간에 유의한 차이가 없었다(표 6).

각 균주간에 Cross-reaction test (1 : 320) 를 한 결과(표 7) *A. israelii* serotype I 과 *A. israelii* serotype II 사이에 유의수준 5%에서 상관관계를 보였고, *A. viscosus* serotype II 와

A. naslundii serotype I 사이에서도 유의수준 5%에서 상관관계를 보였다. 이 교차 반응을 제거하기 위해 면역흡착을 시행하였고, 그 후에 다시 교차 반응 유무를 관찰한 결과 미약하게 *A. israelii* serotype I, II 사이에 교차 반응이 있었으며, *A. viscosus* serotype II, *A. naslundii* serotype I 사이에서도 미약한 교차 반응을 나타내었다(표 8).

A. israelii serotype I, II 와 *A. viscosus* se-

Table 7. Summary of stastical analysis for cross tabulation

	AI ₁	AI ₂	AV ₂	AN ₁
AI ₁		0.565	0.054	0.044
AI ₂	0.565*		0.421	0.321
AV ₂	0.054	0.421		0.720*
AN ₁	0.044	0.321	0.720*	

* Stastically significant(P<0.05)

AI₁, *A. israelii* serotype I ; AI₂, *A. israelii* serotype II ; AV₂, *A. viscosus* serotype II ; AN₁, *A. naslundii* serotype I

Table 8. Cross reactivity between *Actinomyces* species after immunoadsorption

	AI ₁	AI ₂	AV ₂	AN ₁
AI ₁		±	—	—
AI ₂	±		—	—
AV ₂	—	—		±
AN ₁	—	—	±	

AI₁, *A. israelii* serotype I ; AI₂, *A. israelii* serotype II ; AV₂, *A. viscosus* serotype II ; AN₁, *A. naslundii* serotype I

Table 9. Relationship between symptoms and bacteria used in this study

	pain	swelling	sinus tr	foul odor	percussion	exudate
AI ₁	—	+*	—	—	—	+*
AI ₂	—	+*	—	—	—	—
AV ₂	—	—	—	—	—	—
AN ₁	—	—	—	+*	—	—

* Stastically significant(P<0.05)

AI₁, *A. israelii* serotype I ; AI₂, *A. israelii* serotype II ; AV₂, *A. viscosus* serotype II ; AN₁, *A. naslundii* serotype I

rotype II, *A. naslundii* serotype I 사이에서는 교차 반응을 일으키지 않았다.

각 증상과 세균과의 관계를 살펴보면 국소적 종창이 존재하는 경우에 *A. israelii* serotype I, II가 다른 세균에 비해 많이 검출되었고, 약취가 있을 경우에는 *A. naslundii* serotype I 이, 삼출액이 존재하는 경우에 *A. israelii* serotype I 이 다른 세균에 비해 많이 검출 되었으며, 기타 다른 증상과 특정 세균과의 연관성은 발견되지 않았다(표 9).

IV. 총괄 및 고안

혐기성 세균의 검출 기술이 발달함에 따라서 치근단 질환에서 혐기성 세균은 염증과 동통을 야기시키는데 있어 중요한 원인이고, 특히 혼합 근관 감염에서는 호중구 주화성과 식작용을 방해하며 지속되는 동통이 있는 치근단 감염시의 효소와 내독소의 생성을 야기한다고 알려져 있다¹²⁾.

*Actinomyces*는 그람양성의 혐기성 혹은 미호기성 박테리아로 우식 상아질, 치태, 치은열구, 치주낭, 구강내 감염 근관에서 자주 발견되고 있으며, succinic, lactic acids 등의 유기산을

생성하고 다른 박테리아와의 interaction이 중요한 균으로서 구강내에서 주로 *A. israelii* 가 독성이 가장 크고 주도적인 역할을 하고 있다¹⁶⁻¹⁹⁾. 또한 guiding organism으로 black-pigmented bacteroides, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas* species 와 함께 polymicrobial infection을 일으킨다. *Actinomyces*는 치수의 initiator 라기 보다는 치근단 방선균증에 더 관여한다고 알려져 있다. 치근단 방선균증은 *Actinomyces*에 의해 치근단 부위에 생기는 만성, 아급성, 육아성 병변으로 화농과 농양형성, 누공형성, 종창을 주로 호소하고 여성에 비해 남성에 3-4배정도 많이 존재하며 특히 상악중절치, 하악구치에 주로 발생한다²⁰⁻²²⁾.

본 연구에서 치근단 병소가 있는 환자에서의 *Actinomyces* 존재는 기존배양에 의한 것보다 간접 면역형광법에 의한 것에서 상당히 증가하는 것을 알수있었다. 임상실험에서 *Actinomyces* 를 배양에 의해 검출하려는 것은 어려운 것임이 알려져 있으며 특히, 형태학적, 생리화학적 검증은 상당히 어렵고 시간의 소비 또한 크기에 *A. israelii* 등은 치근단 감염에 중요한 세균임에도 불구하고 현재까지 세균적 배양방법에 의해 쉽게 검출되지 못했다⁷⁾.

임상실험에서 세균을 성공적으로 얻기 위해서는 혐기성 조건하에서 많은 배양표본이 필요하고 또 성장을 위한 충분한 시간이 요구되며 분지가 없거나 적은 경우에는 다른 세균으로 오해되거나 식별되지 못하는 경우도 많다.

여러 학자들의 배양에 의해 *Actinomyces* 를 검출하려는 연구를 보면 치근단 감염에서도 마찬가지로 *Actinomyces* 가 배양에 의해 검출되는 경우는 상당히 적은 것으로 알수있다. Richtmeir 와 Johns⁷⁾ 등은 25% 에서 (+) culture 를 보였으며 Brown⁷⁾ 등은 67 case 중에 16 sample에서 검출하였고, Wittgow 와 Sabiston⁹⁾의 연구에서는 0.03%, Sabiston⁴⁾은 0.05%, Happonen 과 Viander⁸⁾ 는 20%, Kantz 와 Henny²⁵⁾ 은 21%, Zabistoski²¹⁾ 는 4.3%, Oguntebi²⁶⁾ 는 30%, Yoshida¹⁰⁾ 등은 19%, Weir 과 Buck²⁹⁾ 은 20% 정도의 *Actinomyces*를 배양으로 검출하였다고 보고한바 있다.

본 연구에서는 간접 면역형광법에 의한 경우에 *Actinomyces*가 62.5% 정도 검출된것에 비해 배양에 의한 것은 25% 를 나타내었다. 임상증상과 각 균주와의 관계에 대한 연구를 살펴보면 자발통이 있는 경우 *A. israelii* 가 1.8%, 자발통이 없는 경우에 2.0% 가 발견 되었고³⁰⁾, percussion이 있는 치근단 질환에서 *A. israelii* 가 0.56%, percussion과 exudate가 존재하는 경우에 7.54%의 *A. israelii* 가 발견 되었으며¹⁰⁾, 증상이 없고 치근단 병변이 있는 경우에 주로 *A. israelii*, *A. viscosus*, *A. naslundii* 등이 검출된다고 보고된바 있다⁴⁾.

본 연구에서는 국소적 종창이 있는 경우에는 *A. israelii* serotype I, II 가 다른 세균에 비해 많이 검출되었고, 악취가 존재하는 경우에는 *A. naslundii* serotype I, 삼출액이 있는 경우에는 *A. israelii* serotype I 이 다른 세균에 비해 많이 검출 되었으며 ($p < 0.05$), 기타 다른 증상과 특정 세균과의 연관성은 발견되지 않았다.

신속하고도 민감도가 높은 미생물 동정방법은 미생물학 연구나 실제 감염성 질환에서 진단양자에 모두 필수적이다. 간접 면역형광법은 항원 항체 반응을 이용하여 병원균을 검출하는 방법으로서 세균 검출에 시간이 짧게 걸리며 특별한 기구가 필요 없고 세균 존재의 유무를 알려주는 민감도와 특이도가 배양법에 비해 매우 높은 장점이 있다. 또한, 세균이 죽어도 검출이 되고 세균의 모양으로 판별하므로 false-positive reaction 을 알수있고 배양 회복술이 필요없이 근관 내용물을 연구하는데 성공적으로 사용되고 있다. 간접 면역형광법은 치근단 감염에서 *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* 등을 검출하는데 널리 사용되고 있으며 치주 영역에서도 현재 많이 사용되고 있는 방법이다. 면역화학적 방법으로 균을 검출하려는 시도는 *A. israelii* 와 다른 *Actinomyces* species 사이의 공통항원 연구를 기초로 이루어 졌다.

Gerenscer 와 Slack³¹⁾ 은 *Actinomyces* 사이에 상당히 높은 혈청학적 상관관계가 존재 하며 그 상관 관계를 구별하기 위해서는 종간의 특이한 항혈청을 사용하여 간접 면역형광법으로

검출 해야 한다고 보고하고 있으며, Fillery³²⁾는 *A. viscosus* 와 *A. naslundii* 는 생리학적 특성이 유사하고 antigenic cross reaction을 보이고 있으나, 둘사이에는 특이한 항원이 존재하고 둘사이 존재하는 혈청학적인 차이는 면역형광법에 의해 알수 있다고 보고한 바 있다.

*Actinomyces*의 항원 구조는 neutral cell wall carbohydrate와 charged Ag 을 포함한 polypeptide로 구성되어 있으며, cell wall carbohydrate는 중간의 특이한 반응과 cross reaction에 의 역할을 하고 있다. *A. israelii* serotype I 의 cell wall에는 lysine, ornithine, glucosamine, galactose 가 존재하고, *A. israelii* serotype II 에는 galactosamine, rhamnose가 존재한다³³⁾.

Happonen³⁴⁾는 치근단 감염에서의 *Actinomyces* 존재를 immunocytochemical method를 사용해서 검출한 연구에서 *Actinomyces*는 복합 치근단 감염에서 상당히 중요한 역할을 하고 있으며, 그중 *A. israelii*가 가장 causative하고 *A. naslundii*와 *A. viscosus* 는 서로 cross reaction을 보였으나 (1:100) antibody dilution을 더 시켜 (1:200) 간접 면역형광법으로 관찰한 결과 cross reaction 은 일어나지 않았다고 보고하였다.

Johnson^{35,36)}은 *A. viscosus* serotype II 와 *A. naslundii* serotype II, III 는 상당히 유사하여 *A. naslundii* serotype I 은 *A. naslundii* genotype I 으로 *A. viscosus* serotype II, *A. naslundii* serotype II, III 를 *A. naslundii* genotype II 로 구분해야 한다고 보고하였고 phenotype으로는 *A. viscosus* 와 *A. naslundii* 를 구별할 수 없으며 오직 혈청학적인 차이로 구별이 가능하나 더 많은 연구가 필요하다고 하였다.

Putnins³⁷⁾ 등은 agglutination 과 Immunoblotting 으로 *Actinomyces* 의 antigenic relatedness 를 관찰한 결과, *A. viscosus* serotype II 와 *A. naslundii* serotype II 는 39% 정도 유사함을 보였으며, *A. howellii* 와 *A. denticola* 는 39-72% 정도가 *A. naslundii* 나 *A. viscosus* 와 유사하다고 보고 하였다.

본 연구에서 cross reaction test(1:320)를 시행한 결과 *A. israelii* serotype I 과 *A. israelii* serotype II 사이에서는 유의수준 5%에서 상관관계를 보였고, *A. viscosus* serotype II 와 *A. naslundii* serotype I 사이에서도 유의수준 5%에서 상관관계를 나타내었으며, *A. israelii* serotype I, II 와 *A. viscosus* serotype II, *A. naslundii* serotype I 사이에서는 교차반응이 나타나지 않았다.

이상의 연구결과로 *Actinomyces* 는 치근단 병변과 감염근관에서 발견되는 중요한 원인균이며, 특히 *A. israelii* 가 가장 causative 하다는 것을 알수 있었다. 또한 간접 면역형광법은 항원, 항체 반응의 특이성으로 병인균의 검출에 유용하며 빠르고, 특별한 기구가 필요없고 세균의 존재 유무를 알려주는 민감도와 특이도가 배양법에 비해 매우 높은 장점이 있으나, 간접 면역형광법에 의해서만 검출하는것은 strain type이나 혹은 같은 균주내의 serotype 을 확신하기에는 부족함이 있었다. 이에 치근단 질환에서 중요한 원인균인 *Actinomyces* 를 검출하는데 가장 쉽고 빠르고 민감한 방법에 대하여 연구가 더 필요할 것으로 생각되며, 특정 세균 검출에 유용한 여러 방법을 서로 병용하여 치근단 질환에서 임상증상과 병인 관계에 대한 연구가 행해져야 하겠고, 그외 기타 여러 문제점에 대해서는 좀 더 연구가 필요한 것으로 사료된다.

V. 결 론

치근단 병변이 있는 환자에서 *Actinomyces* species 항원에 대한 연구를 위해 *A. israelii* serotype I (ATCC 12102), *A. israelii* serotype II (ATCC 29322), *A. viscosus* serotype II (ATCC 19246), *A. naslundii* serotype I (ATCC 12104)를 혐기성 조건하에서 배양한 후, 4균주를 가토 귀정맥에 주사하여 항혈청을 얻었으며 4가지 항혈청을 각 균주와 반응시켜 간접 면역형광법으로 관찰하여 배양에 의한 것과 비교 하였고, 임상증상과 각 균주와의 관계를 살펴 보았으며, 4가지 균주사이에 cross

reaction test를 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 치근단 병변이 있는 환자에 있어 *Actinomyces* species가 다수 발견 되었다.
2. *A. israelii* serotype I, II는 간접 면역형광법으로 관찰한 결과 감염 근관이나 치근단 병변에서 유의하게 많이 검출 되었고 ($P < 0.01$), 배양에서는 각 구간 유의성이 없었다.
3. 간접 면역형광법은 치근단 병소가 있는 환자에서 *Actinomyces* species를 검출하는데 있어 배양에 의한 것보다 상당히 신속하고 민감하며 비교적 정확도가 높았다($P < 0.01$).
4. 임상 증상과의 관계에 있어서 국소적 종창이 존재하는 경우에 *A. israelii* serotype I, II가 많이 검출 되었고, 악취가 있는 경우에 *A. naslundii* serotype I, 삼출액이 존재하는 경우에 *A. israelii* serotype I이 많이 검출 되었으며, 기타 다른 증상과 특정 세균과의 연관성은 발견되지 않았다($P < 0.05$).
5. 간접 면역형광법으로 관찰한 결과 1 : 320으로 희석한 경우 *A. israelii* serotype I 과 *A. israelii* serotype II 사이에 유의수준 5%에서 상관관계를 보였으며, *A. viscosus* serotype II 와 *A. naslundii* serotype I 사이에서도 유의수준 5%에서 상관 관계를 보였고, *A. israelii* serotype I, II 와 *A. viscosus* serotype II, *A. naslundii* serotype I 사이에서는 교차반응이 일어나지 않았다.

참고문헌

1. Kakehashi, S, Stanley H.R. Fitzgerald R. J : The effect of surgical exposure of dental pulp in germ-free and conventional laboratory lab. Oral Surg 20 : 340-349, 1965
2. James Zavistoski, Jo Anne Dzink : Quantitative bacteriology of endodontic infection. Oral Surg 49 : 171-174, 1980

3. Griffiee M.B, Samuel S.P. : The relationship of *Bacteroides melaninogenicus* to symptoms associated with pulpal necrosis. J Oral Surg 50 : 457-461, 1980
4. Fukushima. H, Yamamoto k. : Localization and identification of root canal bacteria in clinically asymptomatic periapical pathosis. J Endodon 16 : 534-538, 1990
5. J. Craig Baumgartner : Reactivity of IgG from explant cultures of periapical lesions with implicated microorganism. J Endodon 17 : 5 : 207-212, 1991
6. E. Hoshino, N. Ando, M. Sato : Bacterial invasion of non-exposed dental pulp. Int Endo J 25 : 2-5, 1992
7. Robert J. Gohean, Eugene A. Pantera : Indirect immunofluorescence microscopy for the identification of *Actinomyces* sp. in Endodontic disease. J Endodon 16 : 7 : 318-322, 1990
8. Happonen R-P, Viander M : Comparison of fluorescent antibody technique and conventional staining method in diagnosis of cervicofacial actinomycosis. J Oral Patho 11 : 417-25, 1982
9. Wittgow WC, Sabiston CB : Microorganisms from pulpal chambers of intact teeth with necrotic pulps. J Endodon 5 : 168-71, 1975
10. Masahiro Yoshida, Hisanori Fukushima : Correlation between clinical symptoms and microorganisms isolated from root canals of teeth with periapical pathosis. J Endodon 13 : 1 : 24-28, 1987
11. Pantera E. A. Jr, Jamton JJ, Shin-Levine M. : Indirect immunofluoresence for the detection of *Bacteroides* species in human dental pulp. J Endodon 14 : 218-23, 1988
12. Balow A. et al : Manual of clinical microbiology 5th ed. American society of microbiology Washington D.C.
13. C.L.Hahn, W.A. Falkler Jr. : Microbiologi-

- cal studies of carious dentin from Human teeth with irreversible pulpitis. Arch oral Biol 36 : 2 : 147-153, 1991
14. J craig Baumgartner, William A. Falkler, Jr. : Bacteria in the apical 5mm of infected root canals. J Endodon 17 : 380-83, 1991
 15. Kenneth kendell, Gregory Powell : Humoral antibodies to anaerobic bacteria isolated from patients with pulpal-periapical disease. Oral Surg 53 : 2 : 194-97, 1982
 16. Ellen, R.P, Onose, H. : pH Measurements of *Actinomyces viscosus* colonies grown on media containing dietary carbohydrate. Arch Oral Biol 23 : 105-111, 1978
 17. Hamilton, I.R, Ellwood, D.C. : Carbohydrate metabolism by *Actinomyces viscosus* growing in continuous culture. Inf Imm 42 : 19-26, 1983
 18. Masuda N, Ellen R.P, Fillery E.D. : Chemical and immunologically comparison of surface fibrils of strains representing 6 taxonomic groups of *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naslundii*. Inf Imm 39 : 1325-1333, 1983
 19. Cisar J.O, Vatler A.E. : Mutants of *Actinomyces viscosus*. T14V lacking type I, type I, or both types of fimbriae. Inf Imm 56 : 2984-2989, 1988
 20. Pekovic D.D, Adankiewicz V.W. : Identification of bacteria in association with immune components in human carious dentin. J Oral Pathol 16 : 223-233, 1987
 21. H. Steven Fergus, Ervin G. Sarord : Actinomycosis involving a periapical cyst in the anterior maxilla. Oral Surg 49 : 5 : 390-93, 1980
 22. Wesley RK, Osborn TP, Dylewski JJ : Periapical actinomycosis : Clinical considerations. J Endodon 3 : 352-5, 1977
 23. Levine S, Friedman S, Ivevin A.J : Mycotic infection in necrotic pulp tissue, a histologic report. Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol 59 : 414-17, 1985
 24. Sabiston CB Jr, Gringsby WR : Bacterial study of pyogenic infections of dental origin. Oral Surg 41 : 430-5, 1976
 25. Kantz WE, Henry CA : Isolation and classification of anaerobic bacteria from intact pulp chambers of non-vital teeth in man. Arch Oral Biol 19 : 91-6, 1974
 26. Oguntebi B, Slee AM, Tanzer JM, Langeland K : Predominant microflora associated with human dental periapical abscess. J Clin Microbiol 15 : 964-6, 1982
 27. Williams BL, McCann GF, Schoen knecht FD : Bacteriology of dental abscess of endodontic origin. J Clin Microbiol 18 : 770-4, 1983
 28. Matusow RJ, Good all LB : Anaerobic isolates in primary pulpal-alveolar cellulitis cases endodontic resolutions and drug therapy consideration. J Endodon 9 : 535-43, 1983
 29. Weir JC, Buck WH. : Periapical actinomycosis. Oral Surg 54 : 336-40 1982
 30. Kazuko Hashioka, Kazuyoshi Suzuki : Relationship between clinical symptoms and enzyme-producing bacteria isolated from infected root canals. J Endodon 20 : 2 : 75-77, 1994
 31. Gerencser MA. Slack JM : Serologic identification of *Actinomyces* using fluorescent antibody techniques. J Dent Res 55 A : 184-91, 1976
 32. Firtel M, Fillery ED : Distribution of antigenic determinants between *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii*. J Dent Res 67 : 15-20, 1988
 33. Bowden GH, Hardie JM, Fillery ED : Antigens from *Actinomyces* species and their value in identification. J Dent Res 5S(Special issue A) : A 192-204, 1976
 34. Happonen R-P, Soderling E, Viander M, Linko-kettunen L : Immunocytochemical

- demonstration of *Actinomyces* species and *Arachnia propionica* in periapical infections. J Oral Pathol 14 : 405–13, 1985
35. G. Bowden, J. Johnson : Characterization of *Actinomyces* with genomic DNA fingerprints and rRNA gene probes. J Dent Res 72 : 8 : 1171–79, 1993
36. Johnson JL, Moore LVH : *Actinomyces georgiae* sp. nov, designation of two genospecies of *Actinomyces naslundii* and inclusion of *A. naslundii* serotype II and III into *A.naslundii* genospecies 2. Int J Syst Bacteriol 40 : 273–286, 1990
37. E. Putinins and G. H. Bowden : Antigenic relationships among oral *Actinomyces* isolates, *Actinomyces naslundii* genospecies 1 and 2, *Actinomyces howellii*, *Actinomyces denticolens*, and *Actinomyces slackii*. J Dent Res 72 : 10 : 1374–85, 1993

EXPLANATIONS of FIGURES

- Figure 1. : Relationship between pain and *Actinomyces* species.
Figure 2. : Relationship between local swelling and *Actinomyces* species.
Figure 3. : Relationship between sinus tr. and *Actinomyces* species.
Figure 4. : Relationship between foul odor and *Actinomyces* species.
Figure 5. : Relationship between percussion to tenderness and *Actinomyces* species.
Figure 6. : Relationship between exudate and *Actinomyces* species.
Figure 7. : *A. israelii* serotype I (ATCC 12102) with Indirect Immunofluorescence
Figure 8. : *A. israelii* serotype II (ATCC 29322) with Indirect Immunofluorescence
Figure 9. : *A. viscosus* serotype II (ATCC 19246) with Indirect Immunofluorescence
Figure 10. : *A. naslundii* serotype I (ATCC 12104) with Indirect Immunofluorescence

논문 사진부도 ①

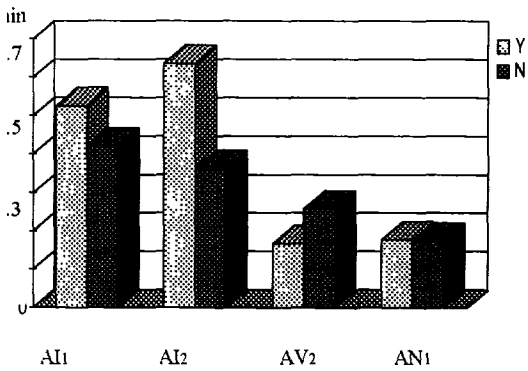


Figure 1.

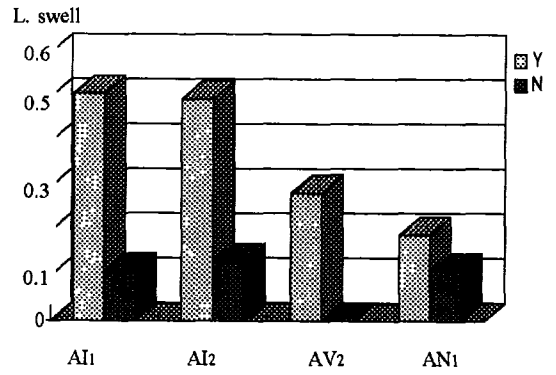


Figure 2.

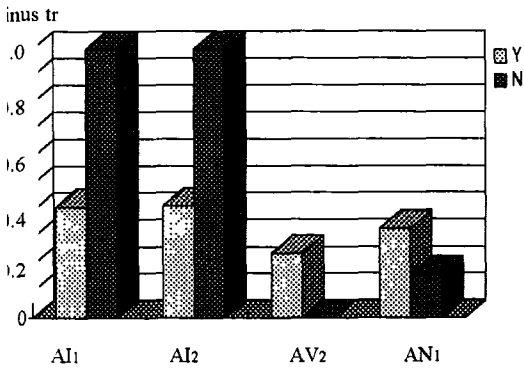


Figure 3.

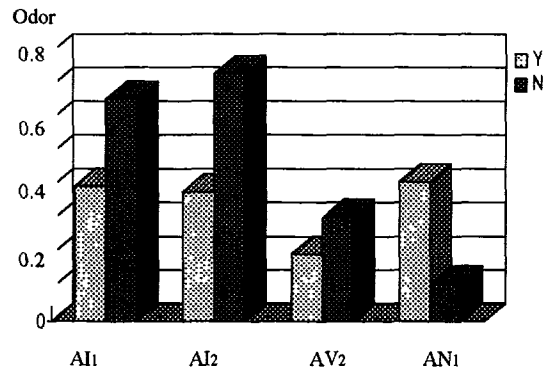


Figure 4.

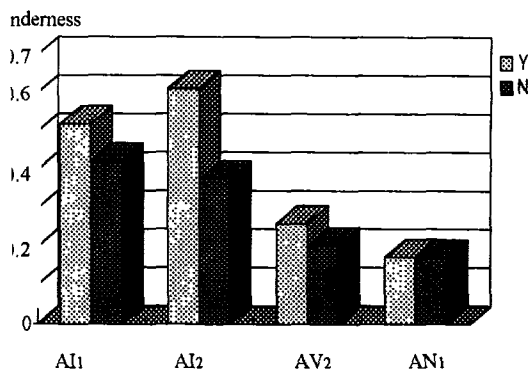


Figure 5.

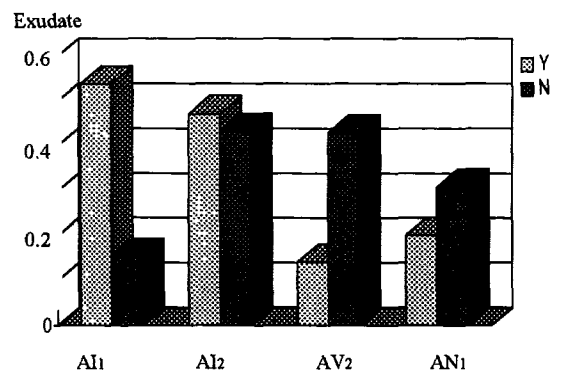


Figure 6.

논문 사진부도 ②



Figure 7.

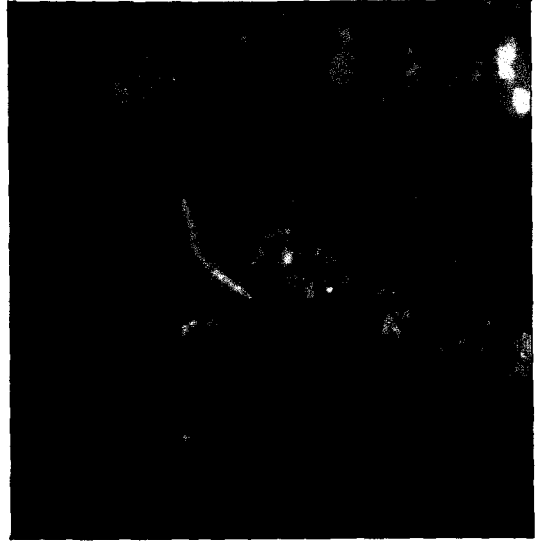


Figure 8.



Figure 9.

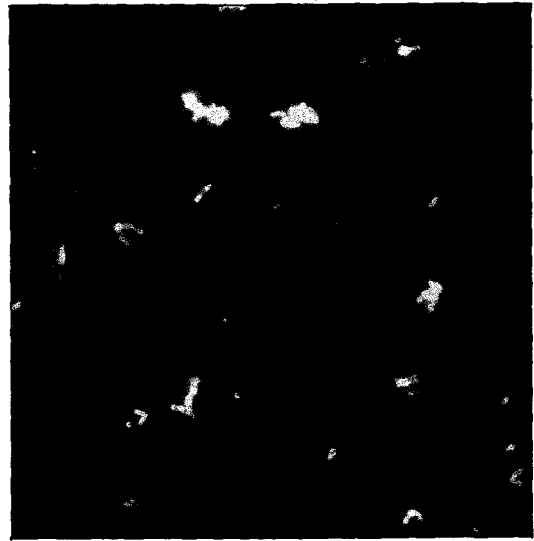


Figure 10.