

근관충전의 미세누출과 혐기성세균 Anaerobic microbial leakage model

서울대학교 치과대학 보존학교실
조교수 배광식

근관치료의 목적은 근관계의 과사조직 및 미생물을 세정(cleansing)과 성형(shaping)을 통해 제거하고, 근관계를 효과적으로 밀폐(obturation)하여 미생물의 생활환경을 배제하는 것이다. 근관충전재의 근관밀폐효능은 근관치료 성공의 관건으로서 근관충전재의 밀봉효과를 평가하는 수많은 실험방법이 이용되어 왔다. 그 방법은 항상 in vitro에서 추적자(tracer)가 충전된 근관을 따라 침투되는 것을 평가하는 누출실험이 대부분이다.

최근 수십년간 누출실험연구가 폭발적인 증가추세에 있으나, 유사한 실험방법을 사용하는 경우에도 그 결과는 매우 다양하게 나타나고 있다. 그래서 누출실험방법론에 대한 더욱 많은 연구가 필요한 실정이다. 보통 사용되는 방법은 발거된 치아를 근관충전하여 추적자를 포함한 용액에 치아 일부 또는 전체부분을 담가서 용액이 근관벽과 충전재사이 혹은 충전재 자체내부로 스며드는 것을 평가하는 방법이다.

한 개의 용액용기에 실험치아를 담그거나 추적자 용액(tracer solution)을 치아의 한쪽에 연결하는 방법인 일실법(一室法 : one chamber method)은 추적자의 침투정도를 평가하기 위해 대개 실험대상을 물리적 또는 화학적 처리를 해야 하므로 각 대상에 대해 한 기간만 평가가 가능하다. 즉 시간적으로 단층적인 평가만 가능하다. 그러나 2개의 용기를 사용하는 이실법(二室法 : two chamber method)은 치아를 추적자 용액이 담긴 상저수실(上貯水室 : upper reservoir chamber)과 검침액(detecting solution)이 담긴 하실(下室 : lower chamber)사이에 위치시켜, 여러 시기에 걸쳐 하실의 용액의 변화를 관찰평가할 수 있는 이점이 있다(Fig.1 참조).

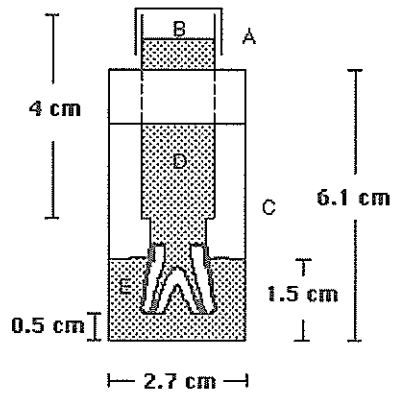


Fig. 1. Anaerobic microbial leakage model.

- A. Cap of Monoject 1 cc tuberculin syringe rigid package (Sherwood medical company; St.Louis,MO,63103 USA)
- B. Monoject 6 cc syringes with plastic luer lock tip (Sherwood medical company; St.Louis,MO,63103 USA)
- C. Disposable 20ml glass scintillation vials with screw cap (Wheaton ; Millville,NJ,USA)
- D. Upper chamber with broth
- E. Lower chamber with broth

1. 추적자(tracer)의 종류

추적자로 사용되는 것은 크게 구분하면 색소(dyes), 동위원소(radioactive isotopes), 미생물(bacteria), 미생물의 대사산물(metabolic products from bacteria) 등이다. 미생물 혹은 그 대사산물의 누출이 치근단 병소의 주원인으로 믿어지고 있다. 그러므로 근관치료의 누출 실험에서 미생물의 침투를 살피는 것이 색소나 동위원소를 추적자로 사용하는 것보다 임상에 근접한 방법이 될 수 있으며 특히 감염근관내에서 많이 발견되는 혐기

성세균을 추적자로 사용하는 것이 훨씬 입상에 가까운 조건을 제공하는 것이 될 것이다.

가. 색소(dye)

색소는 크기가 매우 작은 경우가 많아 실제로 누출정도가 임상에서보다 과장되어서 나타나는 경우가 많다. 현재까지 미세누출실험에 사용된 색소로는 Methylene blue, Aniline, Prussian blue, Rhodamine B, Gentian violet(Crystal violet), India ink, Pelikan ink, Eosin, Silver nitrate, Procion brilliant blue, Procion brilliant green, Carbolfuchsin, sudan III, Poly-R 등으로서 이 중 Methylene blue가 가장 많이 이용되어 왔다.

나. 동위원소(radioisotope)

³⁵S(Na₂³⁵SO₄), ¹³¹I(Na¹³¹I), ¹²⁵I(¹²⁵I-albumin), ⁸⁶Rb(⁸⁶RbCl₂), ²²Na(²²NaCl), ³²P(Na₃³²PO₄), ⁴⁵Ca(⁴⁵CaCl₂), ¹⁴C(¹⁴C-urea, ¹⁴C-glucose, ¹⁴C-human serum albumin), ³H(³H-uridine), ⁹⁹Tc(⁹⁹TcO₄Na) 등이 사용되었다.

다. 미생물

최근까지는 호기성 미생물만이 누출실험에 사용되었고, 본 필자가 Dr. Baumgartner, Dr. Nakata와 함께 혐기성 미생물을 이용한 누출실험모델을 개발하였다.

1) 호기성 세균(Aerobic bacteria)

Bacillus globigii(1955, B. subtilis var. niger : orange colony 형성), Bacillus prodigiosus(1939, Serratia marcescens : red colony 형성), Sarcina lutea(1964), Bacillus proteus(1929, Proteus mirabilis : 1980, Proteus vulgaris : 1982,1990), Bacillus coli(1929, Escherichia coli), Staphylococcus epidermidis(1990,1995), Streptococcus salivarius(1980,1982), Pseudomonas aeruginosa(1993) 등의 호기성 세균이 누출실험에 사용된 예가 있다.

2) 혐기성 세균(Anaerobic bacteria)

최근까지 혐기성 세균을 이용한 누출실험은 없었으며, 필자가 Dr. Baumgartner, Dr. Nakata와 함께 행한 실험은 다음과 같다.

표 1. Anaerobic bacterial strains used in the experiment

Gram negative rod
Fusobacterium nucleatum (VPI 10197)
Fusobacterium necrophorum (ATCC 25286)
Gram negative coccobacillus(BPB)
Prevotella nigrescens (ATCC 33563) saccharolytic
Prevotella intermedia (ATCC 25611) saccharolytic
Porphyromonas endodontalis (ATCC 35406) asaccharolytic
Gram negative coccus
Veillonella parvula (CB #6)*
Gram positive rod
Actinomyces israelii (ATCC 12102)
Gram positive coccus
Peptostreptococcus micros (ATCC 33270)
Peptostreptococcus anaerobius (ATCC 27337)

*Dr. J. Craig Baumgartner's library of Microorganisms

표 2. Broths Formula

1. BHIYHM broth
Brain Heart Infusion Broth, BBL 37 g
Yeast extract 5 g
Distilled water 1 liter
Autoclave and cool to 55°C, then add aseptically :
10 ml Hemin stock solution*
1 ml Menadione stock solution**
2. PBY(Purple BHIYHM) broth
Add 1ml Bromcresol purple stock solution# to 1 Liter BHIYHM aseptically.
3. PYG(Peptone Yeast Glucose) broth
PRAS Peptone Yeast Glucose Broth with Hungate Caps(Anaerobe systems, 2200 Zanker Road, Suite C San Jose, California 95131 Tel 408-432-9103)
4. PPYG(Purple PYG) broth
Add 0.7 ml Bromcresol purple stock solution# to 7ml PYG broth aseptically.
* Hemin stock solution : 50 mg/100 ml 0.1N NaOH
**Menadione stock solution : 100 mg/10 ml 95% ethanol
Bromcresol purple stock solution : 2 g/100 ml 0.05N NaOH (sterilization with filter)

표3. pH indicators and their useful ranges of pH

Indicator	pH range	Color(Acid)	Color(Alkali)
Thymol blue	8.0-9.6	Yellow	Blue
Phenol red	6.8-8.4	Yellow	Red
Bromthymol blue	6.0-7.6	Yellow	Blue
Bromcresol purple	5.2-6.8	Yellow	Purple
Methyl red	4.4-6.0	Yellow	Red
Bromcresol green	3.8-5.4	Yellow	Blue
Bromphenol blue	3.0-4.6	Yellow	Blue

실험은 다음과 같다.

감염근관내에서 흔히 발견되는 9종의 혐기성 세균(표 1 참조)이 4가지의 배양액(표2 참조) 즉 Brain Heart Infusion Broth with Yeast extract, Hemin and Menadione의 배양액(BHIYHM)과 Peptone-Yeast extract-Glucose broth 배양액(PYG)에서의 viability, turbidity를 관찰하고, 또한 위의 2 개의 배양액에 pH 변

화에 따른 chromogenic indicator(표3 참조)인 Bromcresol purple 0.02mg/L을 첨가한 배양액(PBY와 PPYG)에서의 색변화 및 viability를 관찰하였다.

라. 기타의 추적자

Kersten(1988)이 미생물의 대사산물인 0.5% butyric acid and 0.1% valeric acid 또는 Endotoxin(E.coli 055 : B5 lipopolysaccharide)을 사용한 예가 있고, Electrolyte 를 사용한 예도 있다.

2. Turbidity와 Chromogenic indicator

현재까지 세균을 이용한 누출실험에서 누출을 검사(Detect)하는 방법은 호기성 세균의 성장으로 인한 배양액의 탁도(turbidity)를 관찰하는 방법과 균 성장에 따른 산도변화시에 색변화를 나타내는 Phenol red(pH 6.8-yellow, pH 8.4-red))를 사용하는 방법이 사용되어 왔다. 그러나 혐기성 세균 배양액은 Anaerobic chamber내에서 균 성장 없는 환원신선배양액(fresh reduced broth : pH 6.8)이 이미 황색을 띠게 되어 Phenol red를 chromogenic indicator로 사용할 수가 없다. 그래서 필자가 여러 가지의 pH chromogenic indicator를 가지고 전단계 실험을 한 결과, 혐기성 세균 배양액에 적합한 Chromogenic indicator인 Bromcresol purple(pH 5.2-yellow, pH 6.8-purple)을 개발하였다.

3. 결 어

Fusobacterium nucleatum과 Fusobacterium necrophorum은 4가지의 배양액 모두에서 2주 이상 생활력을 유지하고, 하루만에 turbidity와 색변화를 보였다. Veillonella parvula in PBY or BHIYHM과 Peptostreptococcus anaerobius in PPYG or BHIYHM은 2주이상 생활력을 유지했으며 1-2일만에 turbidity와 색변화를 보였다. Peptostreptococcus micros는 네 가지 배양액 모두에서 2주 이상 생활력을 보였으나, BHIYHM에서 3일후에 turbidity를 보일 뿐 나머지 배양액에서는 전혀 turbidity와 색변화를 보이지 않았다.

Porphyromonas endodontalis는 bromcresol purple이 첨가된 배양액에서 살지 못하였다.

필자는 Dr. J. Craig baumgartner, Dr. Todd T. Nakata와 함께 2실(two chamber)을 갖춘 fig.1의 모델에 BHIYHM, PBY, PYG, PPYG 등(표2)의 broth를 배양액으로 상실(upper chamber)에 혐기성 세균을 접종해서, 하실(lower chamber)에 turbidity나 Bromcresol purple의 색변화(color change)를 관찰함으로써 근관충전의 미세누출을 감지할 수 있는 실험법을 개발하여 1996년 5월 미국근관치료학회에서 발표하였으며, 이 방법으로 Dr. Nakata와 필자, Dr. Baumgartner가 치수강저(pulpal chamber floor)의 천공을 아말감과 Mineral trioxide aggregate(Loma Linda 치과대학의 Dr. Mahmoud Torabinejad 가 개발한 충전재)로 충전한 후 Fusobacterium nucleatum을 이용해 미세누출실험을 행한 바 있으며 곧 미국근관치료학회에서 발표할 예정이다.

미생물 혹은 그 대사산물의 누출이 치근단 병소의 주원인으로 믿어지고 있는만큼, 혐기성 세균을 이용한 누출 실험 모델 개발이 필연적이며 향후 이 모델을 이용한 많은 누출실험이 이루어질 것으로 기대된다. 근관치료 후 미생물의 누출이 거의 없는 근관치료법과 충전재를 구명해냄으로써 완벽한 근관치료에 한 걸음 접근할 수 있을 것으로 사료된다.

References

1. Al-Ajam ADK, McGregor AJ. Comparison of the sealing capabilities of Ketac-Silver and extra high copper alloy amalgam when used as retrograde root canal filling. J Endodon 1993; 19 : 353-356.
2. Wu MK, Wesselink PR. Endodontic leakage studies reconsidered. Part 1 Methodology, application and relevance. Int Endod J 1993; 26 (1) : 37-43.
3. Torabinejad M. Mediators of acute and chronic periradicular lesions. Oral Surg 1994; 78 (4) : 511-523.
4. Baumgartner JC. Microbiologic and pathologic

- aspects of endodontics. *Current Opinion in Dentistry* 1991; 1 (6) : 737-743.
5. Kakehashi S, Baer PN, White CL. Comparative pathology of periodontal disease. *Oral Surg* 1963; 16 (4) : 397 - 406.
 6. Miller AJR, Fabricius L, Dahl n G, hman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res* 1981; 89 : 475-484.
 7. Fabricius L. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Sand J Dent Res* 1982; 90 : 200-205.
 8. Haapasalo M, Ranta H, Rantah K, Shah H. Black-pigmented *Bacteroides* spp. in human apical periodontitis. *Infect Immun* 1986; 53 : 149-153.
 9. Sundqvist G, Johansson E, Sj gren U. Prevalence of black-pigmented *Bacteroides* species in root canal infections. *J Endodon* 1989; 15 : 13-19.
 10. Baumgartner JC, Falkler WA, Jr. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. *J Endodon* 1991; 17 (8) : 380-379.
 11. Baumgartner JC, Falkler WA Jr., Beckerman, T. Experimentally induced infection by oral anaerobic microorganisms in a mouse model. *Oral Micro and Immun* 1992; 7 : 253-256.
 12. Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J* 1994; 27 (6) : 291-298.
 13. Kersten HW, Moorer WR. Particles and molecules in endodontic leakage. *Int Endod J* 1989; 3 (May) : 118-124.
 14. Kersten HW, Ten Cate JM, Exterkate RAM, Moorer WR, Thoden van Velzen S. A standarized leakage test with curved root canals in artificial dentine. *Int Endodon J* 1988; 21 : 191-199.
 15. Luomanen M, Tuompo H. Study of titanium screws as retrograde fillings using bacteria and dye. *Scand J Dent Res* 1985; 93 : 555-559.
 16. Goldman LB, Goldman M, Kronman JH, Letourneau JM. Adaptation and porosity of poly-HEMA in a model system using two microorganisms. *J Endodon* 1980; 6 (8) : 683-686.
 17. Kos WL, Aulozzi DP, Gerstein H. A comparative bacterial microleakage study of retro-filling materials. *J Endodon* 1982; 8 (8) : 355-358.
 18. Torabinejad M, Ung B, Kettering JD. In vitro bacterial penetration of coronally unsealed endodontically treated teeth. *J Endodon* 1990; 16 (12) : 566-569.
 19. Torabinejad M, Rastegar AF, Kettering JD, Pitt Ford TR. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. *J Endodon* 1995; 21 (3) : 109-112.
 20. Wong WS, Rosenberg PA, Boylan RJ, Schulman A. A comparison of the apical seals achieved using retrograde amalgam fillings and the Nd : YAG laser. *J Endodon* 1994; 20 (12) : 595-597.