

니켈-크롬 합금 보철물 주위 치은열구 내에서 발견된 니켈 내성 균주에 관한 분자생물학적 연구

경희대학교 치과대학 치과보철학교실

채영아 · 우이형 · 최부병 · 최대균 · 이성복 · 권금록

1. 서 론

치과보철 재료로는 많은 종류의 금속이 사용되고 있으며 치과용 재료로서의 생물학적 안정성 면에 관하여 지속적인 논란이 되어 왔다^{1,2)}. 특히 구강 환경에서는 이러한 생물학적 안정성이 대단히 중요시 되고 있음에도 불구하고 금 가격 상승에 따라서 실제 임상에서는 몇가지의 비금속 합금과 함께 많은 경우에 Ni-Cr 합금의 보철물이 사용되고 있다. 그러나 Ni-Cr 합금 보철물은 니켈 자체가 야기할 수 있는 조직 자극성^{3,4)}, 알러지⁵⁻⁷⁾, 과민반응^{1,8-11)} 및 세포독성¹²⁾을 나타낸다는 것이 밝혀지고 있어, 선진국에서는 니켈을 치과용 보철물로 사용하는 것을 서서히 재검토하고 있는 실정이다³⁾.

Hamano¹³⁾와 다른 여러 연구 기관에서는 니켈을 치과용 보철물로 사용함으로 야기될 수 있는 여러 생물학적 기초 연구를 실험실적 세포 배양으로 연구하였으며, 그 결과 세포의 모양과 성장에 적지 않은 영향을 끼치는 것을 보고한 바 있다^{13,14)}. 더구나 최근에는 니켈의 발암성 기전에 관해 많은 연구가 진행되고 있는 것도 주지할 만한 사실이다^{1,2,15)}.

이런 금속이 치과에서 널리 쓰일 때 환자 뿐만 아니라 치과의사나 기공사들에게 생물학적으로 안전한가에 대한 의문이 제시되어 왔다. 환자에서는 니켈-크롬 합금 보철물 장착시에 보철물 합금 표면의 부식과 교합으로 인한 마모에 의해 니켈 이온이 유리되는 것이 보고되었고^{8,13)}, 이 니켈 이온들은 점막을 통해 세포막 투과로 흡수되어 위에서 언급한 여

러 유해 작용을 일으킬 수 있고, 흡수된 니켈은 피부, 중추 신경계, 폐, 신장 등에 축적될 수 있어, 스웨덴에서는 1974년 이후로 치과용 합금에 니켈의 함유 비율을 1% 미만으로 규제하고 있다^{3,16)}. 치과의사나 치과 기공사에게는 치료실이나 치과 기공실에서 이들 금속을 다룰 때 공기 중의 니켈을 흡입할 수 있으므로, 마스크를 반드시 착용하고 고속 흡입기를 사용하도록 하며 공기 중 니켈의 농도를 제한 농도 이하로 유지되도록 환기해야 할 필요가 있으며, 미국에서 니켈의 공기 중 제한 농도를 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 이하로 규제하고 있다^{2,16)}.

또한 생태계에서 니켈에 내성을 나타내는 세균이 니켈 광산의 폐기물, 니켈금속을 다루는 공장의 냉각수, 하수 등에 오염된 지역에서 분리되었다. 이들은 주로 *Alcaligenes group*에 속하는 것들로서 *A. eutrophus* CH34, *A. denitrificans* 4a-2, *A. xyloxydans* 31A, 그리고 *A. eutrophus* KTO2 등이 있다.

이들 세균에서 니켈 내성을 나타내는 기전으로는, (i)니켈과 코발트 내성이 니켈에 의해 유도되어 진다는 *cnr system*, (ii)니켈과 코발트에 동시 내성을 나타내는 *ncc system*, (iii)낮은 농도의 니켈 내성 기전이 *A. eutrophuse*와 대장균에서 동시에 일어나는 *nre system* 등이 있는데, 이들 *system*에서 니켈에 내성을 갖는 유전자가 *chromosome*이나 *plasmid* 내에서 발견되었는데, *plasmid*란 세균 세포내에서 발견되는 *extrachromosomal DNA*로 자가복제 유전자 구조로서 원형이나 선형 이중나선 DNA 분자로 구성되며, *chromosomal DNA*와는 별도로 독립적으로 항생

제 내성(R plasmid), 접합 또는 형질도입(F plasmid), 효소, 독소, 항원생산, 당분과 다른 유기물질의 대사와 같은 특정 기능을 하는데 이들은 중금속 내성을 함께 가진다¹⁷⁻²³⁾.

한편 *Klebsiella oxytoca* 균주 또한 니켈 내성 균주로 보고되었으며, 특히 이 세균의 chromosome에서 약 4.3 Kb *Hind* III 절편이 니켈 내성 유전자로 이미 클로닝이 되었고, 이러한 니켈 내성 유전자는 plasmid DNA와 연관되어 다른 세균으로 전이되는 경우가 많다고 보고되었다²⁴⁾.

치과용 재료로 사용되는 니켈 함량이 높은 Ni-Cr 합금으로 제작된 보철물을 장착한 구강 환경에서도 니켈 이온의 유리가 보고되고 있으며^{6,13,16)}, 생태계 내의 니켈 광산이나 공업 지대에서도 마찬가지로 구강내 Ni-Cr 합금 보철물이 장착된 치아 주위 치은 열구 내에서도 보철물로부터 유리되고 축적된 니켈로 인해 니켈에 내성이 있는 균주가 발견되지 않을까에 대한 의문을 제시하였으나, 아직까지 국내는 물론 외국에서도 임상을 통하여 연구된 바는 없었다.

이에 본 연구에서는 Ni-Cr 합금 보철물이 장착된 치아 주위 즉 치은 열구 내에 존재하는 균주들 중에 니켈 내성을 가진 균주가 있는가에 대한 의문을 제시하여, 미생물학적 접근 방법을 통하여 니켈 내성 균주를 분리 동정해 내고 이 균주들이 가지고 있는 특성을 분자생물학적으로 연구하여 다소의 지견을 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 균주의 분리 및 배양

K대학교 치과대학병원 보철과에 내원한 환자에서 Ni-Cr 합금으로 제작된 금속-도재 보철물을 제거한 치아에 멸균된 paper point를 치은열구내로 저항이 약간 느껴질 때까지 삽입한 다음 약 10 초간 치은열구액을 흡수하는 방법으로 20명의 환자에서 103개의 시료를 채취하여, yeast extract(5mg/ml), hemin(5 μ m/ml), vitamin K(0.2 μ m/ml)가 포함된 1.5-1 half-strength(18.5mg/ml) brain heart infusion(BHI : Difco) 액체배지 10 ml에 넣어 충분히 섞어주고 이를 원액으로 하여 10⁻¹- 10⁻²로 희석한 후, 100 μ 씩 BHI 한천배지에 도말하였다. 이를 37 $^{\circ}$ C

에서 혐기(85% N₂, 10% H₂, 5% CO₂)배양과 호기 배양을 하였다. 배양은 혐기배양기(Forma Scientific, Anaerobic system, California, USA)와 호기배양기(Sanyo electric Co., Ltd. MIR 262, Tokyo, Japan)를 이용하였다.

여기에서 성장한 집락 중 균주의 모양과 색깔 등을 구분하여 모든 개체를 NiCl₂ · 6H₂O의 최종농도가 3 mM되게 섞어준 yeast extract(5mg/ml), tryptone(10mg/ml), sodium chloride(10mg/ml), 그리고 agar(15mg/ml)가 포함된 Luria-Broth 한천 배지에 모두 옮겨서 24시간 동안 호기와 혐기배양을 시행하였다. 3mM 니켈배지에서 자란 집락을 멸균된 목봉(wood stick)을 이용하여 5mM 니켈배지로 옮긴 후 이를 다시 호기배양과 혐기 배양을 시행하였다. 여기서 자란 균주들을 계속 니켈의 농도를 높여가면서 계대배양을 시행하였다.

대조군으로는 실험군 환자의 자연치아의 치은열구액(14 sample)과 금합금으로 수복한 치아의 치은열구액(1 sample)을 채취하여 위에서 언급한 것과 같은 방법으로 실험하였다.

2. 균주의 동정

5 mM 니켈배지에서 자란 균주를 10 mM 니켈배지에 계대하여 혐기와 호기 배양기에서 배양하고, 여기서 자란 균주를 20 mM 니켈배지에 계대하는 방법으로 30, 40, 50, 그리고 60 mM 니켈배지까지 계대 배양하였으며 60 mM 농도의 니켈배지에서도 생존한 균주를 생화학적 방법으로 세균종을 동정하였다.

3. 고체 배지에서 균주의 니켈 내성 관찰

3mM 니켈배지에서 자란 균주를 5 mM 니켈배지에 옮겨 혐기와 호기배양하였고 여기서 자란 균주를 10mM 니켈배지에 계대하여 배양한 후에는 니켈의 농도를 10mM 씩 증가시키면서 110mM까지 순차적으로 계대배양하였다. 니켈배지는 60mM까지는 Luria-Broth 한천배지에 니켈을 포함하여 사용하였으며, 균주를 동정한 후에는 동정된 균주의 특성에 맞는 brain-heart infusion(19 μ m/ml), yeast extract(5 μ m/ml), glucose(5 μ m/ml), 그리고 0.1 volume의 1.0M tris (hydroxymethyl) amino-

methane(Tris : pH 8.0) 으로 조성된 BYGT 한천배지를 사용하였다. 또 3mM 니켈배지에서 성장한 균주를 분리하여, 순차적으로 니켈의 농도를 높여가며 계대배양하지 않고 바로 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 그리고 110mM 니켈 한천배지에 직접 접종하여 균주의 성장능을 관찰하였다.

혐기 배양은 혐기성 배양기를 이용하였으며, 호기 배양은 일반 호기 배양기에서, 호기 진탕 배양은 호기 진탕 배양기(New Brunswick, Innova 4300, New Jersey, U.S.A.)에서 180 rpm으로 시행하였다. 배양 온도는 모두 37℃에서 수행하였다. 배양 시간은 접종 후 24시간마다 관찰하여 배양 배지에 육안으로 뚜렷한 성장을 보일 때까지 수행하였다. 대조군으로는 니켈의 농도가 3mM 이상에서는 자라지 못하는 *Escherichia coli* (*E. coli*) HB101을 사용하였다.

4. 균주의 성장 곡선 측정

니켈의 농도가 60mM 에서 자란 니켈 내성이 높은 균주를 5ml LB 와 BYGT 액체배지에 접종하여 37℃, 180 rpm, 1일동안 호기 진탕배양을 하였다. 배양된 5ml 액체배지로부터 1ml를 취하여 새로운 배양 배지 50ml에 접종하였다. 37℃, 180 rpm에서 배양 하면서 일정 시간마다 배양액으로부터 1ml를 취하여 10^{-1} - 10^{-2} 로 희석한 후 spectrophotometer (Pharmacia Biotech, Ultraspec 2000, Cambridge, England)를 사용하여 540nm에서 흡광도(Optical Density : O. D)를 측정하였다.

5. 액체 배지에서 니켈 농도에 따른 균주의 성장능 관찰

5ml BYGT 액체배지에 균주를 접종하여 37℃, 180 rpm, 1일 동안 호기 진탕 배양을 하였다. 배양된 5 ml 액체배지에서 200μl씩을 취하여 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 그리고 110 mM의 농도로 니켈을 넣어 준 BYGT 액체배지에 접종하고 이를 37℃, 180 rpm으로 72시간 동안 호기 진탕 배양을 하였다. 배양된 배지로부터 1ml씩을 취하여 소형 원심분리기 (Dupont, Sorvall MC12V, New Jersey, U.S.A.)에서 12,000 rpm으로 10분 동안 균체를 회수하고 멸균된 1ml의 증류수에 부유시

킨 후 10^{-1} - 10^{-2} 로 희석하고 이를 spectrophotometer를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 *E. coli* HB101을 사용하였다.

6. 분리된 균주의 항생제 내성 관찰

분리된 균주의 항생제 내성을 검사하기 위하여 항생제 disc (Sensi - disc)를 사용하였다. 5ml BYGT 액체배지에 균주를 접종한 후 37℃, 180rpm에서 12시간 동안 호기 진탕배양 한 후, 배양된 액체배지에서 100μl씩을 취하여 BYGT 한천배지에 도말 하였다. 도말된 BYGT 배지 위에 Sensi- disc 를 올려 놓고 37℃의 호기배양기에서 18시간 동안 배양한 후 각 항생제에 대하여 생김 환의 크기로 감수성과 내성을 측정하였다.

항생제 내성 검사에는 tetracycline, chloramphenicol, kanamycin, streptomycin, lincomycin, 및 clindamycin disc를 사용하였다.

7. 균주로부터 chromosome의 분리

균체에서 chromosome을 분리하기 위해서 CTAB(Cetyltrimethylammonium bromide : CTAB)/NaCl 방법을 응용하여 적용하였다⁵²⁾.

균주를 5ml BYGT 액체배지에 접종하여 37℃, 180rpm으로 18시간 호기 진탕배양 한 후 이를 다시 100ml BYGT 액체배지에 접종하여 37℃, 180 rpm으로 18시간 동안 호기 진탕배양 하였다. 배양된 100ml BYGT 액체배지를 고속 원심분리기(Dupont, Sorvall RC 5C, New Jersey, USA)에서 7000 rpm으로 20분 동안 원심분리하여 상층액을 제거하고 균체만을 회수하였다. 회수된 균체에 4.4ml의 TE 완충용액(10 mM Tris (pH 8.0), 1mM EDTA)을 첨가하여 재부유시킨 다음 480μl의 10% SDS (sodium dodecyl sulfate)와 48μl의 proteinase K (20mg/ml)를 첨가한 후 혼합하여 37℃ 항온수조(Lauda, Blauda, Germany)에서 1 시간 동안 반응시켰다. 여기에 4ml의 5M NaCl을 첨가하여 잘 섞어준 후 3.2ml의 10% CTAB / 0.7M NaCl을 첨가하고 56℃ 항온수조(New Brunswick Scientific, Model G76D, USA)에서 10분간 정치하였다. 여기에 8ml의 phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 :

1)을 첨가하고 혼합기(Scientific industries, Vortex Genie 2, NewYork, USA)를 이용하여 충분히 혼합한 후 12,000rpm에서 15분 동안 원심분리한 후 상층액을 새로운 튜브로 옮겼다. 옮긴 상층액에 12ml의 isopropanol을 첨가한 후 -70℃에서 30분간 정치시키고 12,000rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 버리고 70% ethanol로 세척하여 다시 12,000rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 버리고 건조한 후 50μl의 증류수를 첨가하여 chromosome을 용해시켰다.

8. 균주로부터 plasmid의 분리

균주로부터 plasmid를 분리하기 위하여 Birnboim과 Doly(1979) 및 Ish-Horowicz와 Burke(1981)의 방법의 변형인 Qiagen Kit (Qiagen Co.Ltd., California, U.S.A.) 방법을 사용하였다.

균주를 5ml BYGT 액체배지에 접종하여 37℃, 180rpm으로 18시간 호기 진탕배양한 후 이를 다시 100ml의 BYGT 액체배지에 접종하여 37℃, 180rpm으로 18시간 동안 호기 진탕배양하였다. 배양된 100ml BYGT 액체배지를 고속 원심분리기로 7,000rpm에서 5분간 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체에 4ml solution I [50mM glucose, 25mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM EDTA]을 첨가하여 재부유시킨 후 4ml solution II (0.2% NaOH, 1% SDS)를 넣고 혼합하여 균체를 용해시켰다. 여기에 4ml solution III (60ml, 5M K-acetate, 11.5ml glacial acetic acid, 23.5ml H₂O)를 넣고 혼합한 후 얼음에서 10분간 정치시키고 12,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 새로운 튜브에 옮겼다. 옮긴 상층액에 0.7 × volume의 isopropanol을 넣고 혼합한 후 -20℃, 30분 동안 plasmid DNA를 침전시킨 다음 12,000rpm에서 30분간 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 이를 다시 70% ethanol로 세척한 다음 12,000rpm에서 10분간 원심분리하고 상층액을 버리고 상온에서 건조한 후 100μl의 증류수에 plasmid DNA를 용해시켰다.

9. 분리된 plasmid DNA에 제한효소 처리

plasmid 분리후, 분리된 plasmid의 크기를 측정하

기 위하여 plasmid를 5 가지 종류의 제한효소 (*EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, *PvuII*, *SmaI*)로 절단하였다. 1.5ml 튜브에 분리된 plasmid 10μl, 각 효소의 10 × buffer 2μl, 제한효소 2μl, 멸균 증류수 6μl를 넣고 잘 혼합한 후 37℃ 항온수조에서 1시간 동안 반응을 시켰다.

10. chromosome, plasmid DNA 그리고 제한효소로 절단한 plasmid의 전기영동 확인

음전하를 띤 DNA가 크기(분자량)에 따라 양극으로 이동하는 속도의 차이를 이용한 agarose gel 전기영동을 시행하여 분리된 chromosome과 plasmid DNA 및 제한효소로 절단한 plasmid DNA를 확인하였다.

4ml의 TAE [40mM Tris-acetate (pH 8.0), 2mM EDTA] 완충용액에 0.8%의 agarose gel을 넣고 녹인 후 gel well을 제조하여 TAE 완충용액이 들어 있는 gel tank (BIO-RAD, Mini sub DNA cell, California, USA)에 넣고 DNA 시료와 10 × gel loading buffer (40% sucrose, 0.3% bromophenol blue)를 4 : 1의 비율로 섞어 well에 loading한 후 80V에서 marker가 gel 끝에 올 때까지 전기영동을 수행한 후 gel을 2μg/ml ethidium bromide 용액에서 5분간 염색하여 UV 조사한 상태에서 폴라로이드 필름으로 결과를 확인하였다.

11. DNA hybridization 방법으로 니켈 내성 유전자의 확인

ECL KIT(Amersham, RPN 3000, England)을 이용하여, 높은 농도의 니켈배지에서 내성을 나타낸 균주로부터 분리된 chromosomal DNA를 *Hind III* 제한효소로 partial digestion하여 0.8% agarose gel에서 80V에서 90분간 전기영동한 후, 전기영동이 끝난 agarose gel을 2μg/ml ethidium bromide 용액에서 5분간 염색하여 UV 조사한 상태에서 폴라로이드 필름으로 결과를 확인하였다. 이 agarose gel을 depurination solution (HCl 250mM)에서 10분 동안 처리하였다가 증류수로 세척하고, denaturation solution (NaCl 1.5M, NaOH 0.5M)에서 25분 동안 방치한 후 증류수로 세척하고, neutralization solution

[NaCl 1.5M, Tris HCl 0.5M (pH 7.5)]에서 30분 동안 방치한 후 새로운 neutralization solution으로 15분간 씻어냈다.

용기에 20 × SSC solution(Sodium citrate 0.3M, NaCl 3M, pH 7.0)을 채운 후 용기 위에 지지대를 놓고, 길게 자른 3MM paper를 지지대 위에 올려 놓고 agarose gel, nitrocellulose membrane(Amersham, Hybond ECL : RPN2020D, England), 3 MM paper 순으로 포갠 후, 그 위에 흡수지를 10 - 15cm 높이로 올려놓고 750g 정도의 무게로 누른 상태로 흡수지를 자주 갈아주면서 6시간 이상 gel내의 DNA를 membrane에 옮긴 다음, 이 membrane을 5 × SSC로 세척하고 hybridization bottle에 넣은 후 42 °C의 hybridization incubator에서 pre-hybridization solution으로 1시간 동안 pre-hybridization시켰다. 여기에 *Klebsiella pneumoniae*에서 유래한 니켈 내성 유전자를 labelling하여 probe (labelling reagent, glucoaldehyde solution, heating)로 첨가하고 24시간 shaking하여 washing solution(Urea 6M, SDS 0.4%, final conc. 0.5 × SSC)에 씻어낸 후 Detection solution I, II로 확인하였다.

III. 실험성적

1. 균주의 분리 및 동정

Ni-Cr 합금으로 제작된 금속-도재 보철물을 제거

한 치아의 치은열구액에서 채취한 시료를 일반 세균 배양배지인 BHI 배지에서 배양하였을 때 자란 균주를 모두 니켈배지에 옮겨 배양했을 때, 니켈의 농도가 증가함에 따라 니켈배지에서 성장하는 균주의 수가 급격히 감소하여 니켈에 내성이 있는 균주들만 살아 남았고, 이 균주들은 호기에서 배양할 때가 혐기에서 배양할 때보다 더 잘 자라는 것을 관찰할 수 있었으며, 니켈 농도 60mM 이상에서도 성장한 15 균주를 분리하여 이를 생화학적 방법으로 동정한 결과, 13 균주는 *Enterococcus faecalis*로 동정되었고, 나머지 두 균주는 각각 *Klebsiella pneumoniae*와 *Enterobacter gergoviae*였다(Table 1).

그러나, 대조군으로 사용한 자연 치아나 금 합금으로 수복한 치아의 치은열구액에서 채취한 시료를 일반 세균 배양배지에서 배양하였을 때 배양된 균주를 모두 니켈 배지에 옮겨 배양했을 때, 3mM 이상의 니켈이 포함된 배지에서 성장하는 균주가 없었다.

2. 분리 동정된 균주의 니켈 내성 관찰

니켈 한천배지에서 분리된 니켈 내성이 있는 총 15균주 중에서, *Enterococcus faecalis*로 분리된 13균주가 다른 두 균주 즉, *Klebsiella pneumoniae*나 *Enterobacter gergoviae*에 비해 더 높은 니켈 내성을 보였다. 특히 *Enterococcus faecalis*로 분리, 동정된 13균주 중 1균주는 니켈 농도 110mM에서까지 성장하는 것을 확인하였고 나머지 균주들은 80mM까지 성장함을 관찰

Table 1. Biochemical characteristics of the Ni-resistant bacteria isolated from gingival crevicular fluid

Isolates	Biochemical tests									
	MAN ^a	SORB ^b	SOR ^c	ARG ^d	ARA ^e	MOT ^f	PIG ^g	SUC ^h	Lactos ^e	Esculi ⁿ
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MAN	SORB	SOR	ARG	ARA	MOT	PIG	SUC	Lactos	Esculi
	+ ^k	+	- ^l	+	-	-	-	+	-	+
<i>Enterobacter gergoviae</i>	MAN	SORB	SOR	ARG	ARA	MOT	PIG	SUC	Lactos	Esculi
	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+

^a Mannitol, ^b Sorbitol, ^c Sorbose, ^d arginose, ^e Arabinose, ^f Motility, ^g Pigmentation, ^h Sucrose

^e Lactose, ⁿ Esculin

^k:fermentation

^l:no fermentation

하였다. *Klebsiella pneumoniae*와 *Enterobacter gergoviae* 균주는 60mM까지 성장함을 관찰하였다(Table 2).

니켈이 포함된 액체배지에서의 경우에서도 니켈이 포함된 한천배지에서 나온 결과와 같이 니켈에 내성을 갖는 균주들이 확인되었다. 이들은 니켈의 농도가 증가함에 따라 성장하는 균체의 수가 줄어들어, 110 mM 농도에서는, 3mM 이상 니켈배지에서 일정한 O.D 값과 갖는 대조군으로 사용한 균주인 *E. coli* HB101의 O.D값을 같은 값을 가지게 되었다(Fig. 1).

그러나 110mM 니켈 액체배지의 균주를 니켈이 포함되지 않은 고체배지로 옮겨 배양했을 때,

Table 2. Minimal Inhibitory Concentration(MICs) of Nickel in the bacteria isolated from gingival crevicular fluid

Isolates	Concentration of nickel (mM)					
	60	70	80	90	100	110
^a <i>Enterococcus faecalis</i> 16	+ ^c	+	+	+	+	+
^b <i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	- ^a	-	-	-	-
<i>Enterobacter gergoviae</i>	+	-	-	-	-	-

a,b :Different isolates strains (From different patients)

c :growth

d :no growth

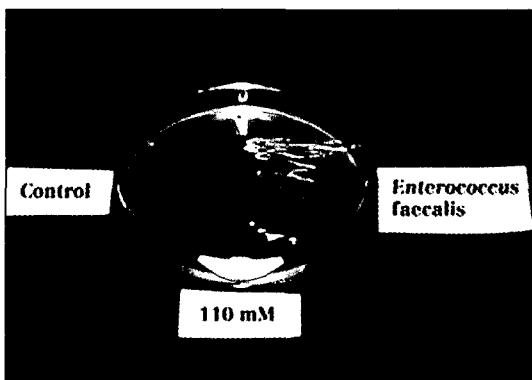


Fig. 2. Growth result of *Enterococcus faecalis* and *E.coli* HB101 at 110mM Ni-BYGT media

*Enterococcus faecalis*는 다시 성장을 하였고 *E. coli* HB101은 전혀 성장하지 않았다. 이로 미루어 볼 때 110 mM 농도에서 실험군과 대조군의 같은 O.D 값이 나타내는 의미는 달랐다. 즉 110 mM 농도에서 실험군은 성장이 저해되었을 뿐 생존하고 있었으며, 대조군은 죽은 세포였음을 의미한다.

또한 니켈의 농도를 점진적으로 높여가면서 계대 배양으로 실험하던 것과 비교하여, 3mM배지에서 최초로 분리 배양되었던 균주를 계대배양하지 않고 바로 높은 농도의 니켈 한천배지 (5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110mM)에 직접 접종하여 배양한 결과에서도 니켈에 내성이 있는 균주가 성장하였다(Fig. 2).

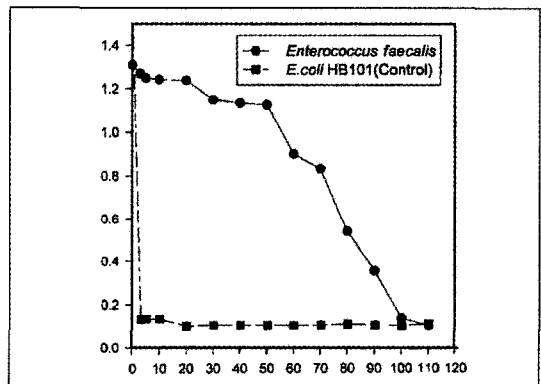


Fig. 1. The cell growth curve of *Enterococcus faecalis* in Nickel containing media

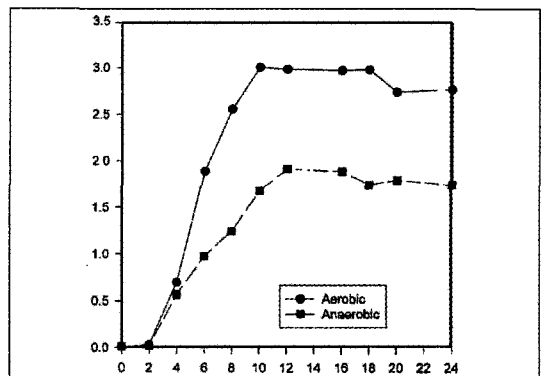


Fig. 3. The cell growth curve of *Enterococcus faecalis* in LB Media

Table 3. The antibiotic resistant of *Enterococcus faecalis* isolated from gingival crevicular fluid

Isolates	Concentration of nickel (mM)					
	60	70	80	90	100	110
^a <i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+	-	+	+
^a <i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	-	-	-	+

^a Clindamycin (2 mcg), ^b Kanamycin (30 mcg),
^c Chloramphenicol (30 mcg),
^d Tetracycline (30 mcg) ^e Streptomycin (10 mcg)
^f Lincomycin (2 mcg)
^{a, b} Different strains isolated from different patients

ⁱ: growth
^j: no growth

3. 균주의 성장 곡선 측정

분리, 동정된 균주 중 110mM에서도 성장하는 *Enterococcus faecalis* 균주에 대하여 시간에 따른 성장 상태를 확인하였다. 실험의 결과 일반 미생물과 동일한 정상적인 S-자 성장 곡선을 보이며 성장하였으며, 완전 성장 상태까지는 모두 18시간 정도가 소요됨을 확인할 수 있었고, 호기에서 배양할 때가 혐기에서 배양할 때보다 더 잘 자라는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3).

4. 분리, 동정된 균주의 항생제 내성 관찰

분리, 동정된 균주들의 항생제 내성을 측정하여 보았을 때 *Enterococcus faecalis* 는 다양한 항생제 내성을 가지고 있음을 확인하였다 (Table 3). 특히 60mM 이상의 니켈 농도에서 자라는 *Enterococcus faecalis* 가 여러 항생제에 내성을 나타내는 것을 관찰하였는데, 일반적으로 널리 사용되고 있는 항생제인 clindamycin, kanamycin, chloramphenicol, streptomycin, lincomycin에 대하여 내성이 있었고, tetracycline에 만 감수성을 보였다.

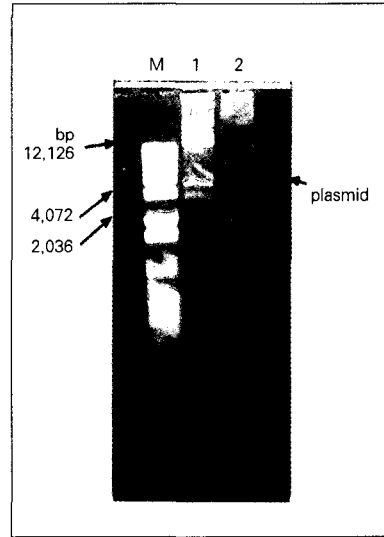


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of Nickel-resistant bacteria
M: 1kb marker
1: *Enterococcus faecalis*
2: *Enterobacter gergoviae*

5. 분리, 동정된 *Enterococcus faecalis*로부터 plasmid의 분리 및 plasmid의 제한효소 처리

*Enterococcus faecalis*로부터 plasmid를 분리하였다 (Fig. 4).

분리된 plasmid의 정확한 크기를 알기 위하여 제한 효소로 처리하여 plasmid를 부분적으로 절단하여 절단된 plasmid의 각각의 절편을 더한 결과, plasmid의 전체 크기는 standard marker와 비교 측정하였을 때 약 65-70kb로 추정되었다 (Fig. 5).

6. DNA-DNA hybridization에 의한 니켈 내성 유전자의 확인

*Enterococcus faecalis*의 니켈 내성 요인을 검색하기 위하여, 기존에 니켈 내성 유전자로 알려진 *Klebsiella pneumoniae*의 plasmid로부터 분리한 니켈 내성 유전자를 probe로 하여 *Enterococcus faecalis*로부터 분리한 chromosome과 DNA hybridization을 시행하여, 높은 농도의 니켈배지에서도 성장한 *Enterococcus faecalis*의 chromosomal DNA에 *Klebsiella pneumoniae*의

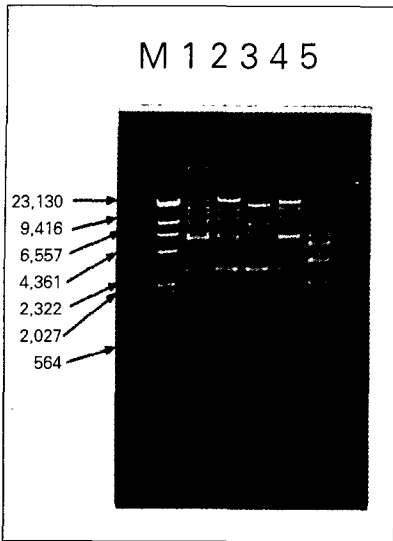


Fig. 5. Digestion of the *Enterococcus faecalis* plasmid
M: Lambda DNA HindIII Markers
1: Digestion with EcoRI
2: Digestion with BamHI
3: Digestion with SmaI
4: Digestion with HindIII
5: Digestion with PvuII

chromosome으로부터 분리한 니켈 내성 유전자와 동일하거나 유사한 유전자가 있는지 확인하여 보았다.

*Enterococcus faecalis*로부터 분리한 chromosomal DNA를 Hind III 제한효소로 partial digestion하여 전기영동하고, 같은 agarose gel상에 *Klebsiella pneumoniae*의 plasmid로부터 분리한 니켈 내성 유전자를 함께 전기영동한 후, depurination하고, denaturation한 후, neutralization한 agarose gel내의 DNA를 membrane에 옮긴 다음, pre-hybridization한 후, 여기에 *Klebsiella pneumoniae*에서 유래한 니켈 내성 유전자를 labelling하여 probe로 첨가하고 hybridization한 후 확인하였다.

*Klebsiella pneumoniae*의 니켈 내성 유전자에 형광 물질을 labelling하여 probe로 사용하여 DNA hybridization 방법으로 확인해 본 결과, *Enterococcus faecalis*로부터 분리한 chromosomal DNA에는 *Klebsiella pneumoniae*의 plasmid상에 있는 니켈 내성 유전자와 동일하거나 유사한 니켈 내성 유전자는 없었다(Fig. 6).

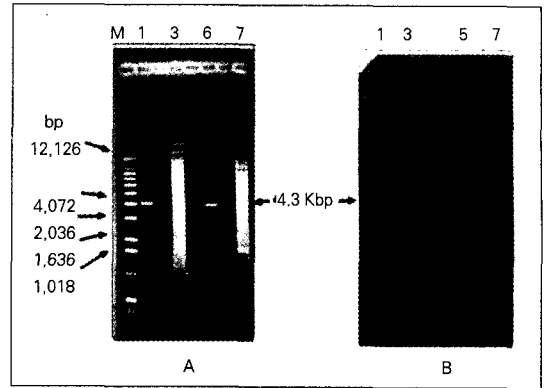


Fig. 6. Results of DNA-DNA hybridization
A) Agarose-gel running pattern of the DNA
M: 1kb marker
1,3: *Klebsiella pneumoniae* plasmid
5,7: *Enterococcus faecalis* chromosome
B) Southern hybridization of the probe DNA

IV. 총괄 및 고안

치과 보철 재료로 쓰이는 금속은 크게 귀금속 합금(noble metal)과 비금속 합금(base metal)로 분류할 수 있다. 특히, 심미 보철 수복에 널리 이용되는 금속-도재관에 사용되는 합금으로 귀금속 합금에 금-백금-팔라듐 합금, 금-백금-tantalum 합금, 금-팔라듐-은 합금, 팔라듐-은 합금 등이 있고, 비금속 합금에 니켈-크롬 합금, 코발트-크롬 합금 등으로 구성된다.

여러 합금을 살펴보면 귀금속 합금중 금-백금-팔라듐 합금이 도재-금속 결합의 영구성, 우수한 구조적합성과 물리적 강도 등으로 가장 우수하지만, 가격과 기계적 강도 때문에 비금속 합금으로 대체하게 된다. 비금속 합금으로 가장 널리 쓰이는 니켈-크롬 합금의 니켈 함량은 68 - 80% 이고 Cr, Mn, Mo, Mg, Al, Si, Be, C, Fe, Ti, Cu 등을 소량 함유한다. 니켈-크롬 합금은 항복 강도와 탄성 계수가 높아 얇게 제작하여 사용이 가능하고 가격이 저렴한 장점을 가지고 있으나, 주조의 정확성이 결여되고 변연이 짧거나 거칠어지며 산화물 형성으로 도재-금속 결합이나 색조에 영향을 끼치며, 도재-금속 결합의 영구성이 확인되지 않은 상태이다. 더구나 니켈 과민성

환자에게는 독성이 있으며, 재수복을 위해 제거시 힘든 단점 등이 제시되어 왔다²⁵⁾.

본 연구에서는 금속 도재관 중에서 비금속 합금으로 제작된 도재 전장 보철물의 치은 열구액을 실험균으로 사용하였고, 대조균으로는 자연 치아와 금합금으로 수복한 치아의 치은 열구액을 채취하여 니켈에 내성이 있는 세균이 있는가를 분석하였다.

연구 결과에서와 같이 자연 치아와 금 합금으로 수복한 치아의 치은 열구액에서 채취한 시료에서는 니켈이 함유되지 않은 배지에서 세균의 성장을 확인할 수 있었으나, 니켈이 3mM 이상 함유된 배지에서는 균이 성장하지 않아서 니켈에 내성이 있는 세균의 성장이 없음을 확인할 수 있었고, 비금속 합금으로 제작된 금속-도재 보철물로 수복한 치아의 치은 열구액에서 채취한 시료에서만 니켈이 포함되지 않은 배지와 니켈이 포함된 배지 모두에서 성장이 가능한 균주가 발견되었으며, 이 균주의 시간별 성장능과 성장 상태를 확인하였는데, 실험 결과 일반 미생물과 동일한 정상적인 S-자 성장 곡선을 보이며 성장하였으며, 완전 성장 상태까지는 모두 18시간 정도가 소요됨을 확인할 수 있었고, 호기에서 배양할 때가 혐기에서 배양할 때보다 더 잘 자라는 것을 관찰할 수 있었고, 일반 세균과 비교시 특별한 특이성은 발견하지 못하였다.

이 니켈에 내성을 갖는 균주들을 니켈의 농도를 높여가며 계대 배양하여 니켈의 농도 60mM 이상의 배지에서 성장 가능한 균주들을 동정한 결과, 대다수가 *Enterococcus faecalis*로 나타났고 나머지 경우가 각각 *Klebsiella pneumoniae*나 *Enterobacter gergoviae*로 동정되었다. *Enterococcus faecalis*로 분리, 동정된 균주 중 1 균주는 110mM 니켈 배지에서까지 성장하는 것이 확인되었는데 이는 종래에 니켈 광산에서 채취한 니켈 내성 균주의 MIC(Minimal Inhibitory Concentration)가 니켈 농도 20mM이었던 것에 비교했을 때 5배에 해당하는 높은 내성도였다²⁴⁾.

또 3mM 니켈 배지에서 자란 균주들을 니켈 함유 배지에서 니켈 농도에 따른 니켈 내성의 유도 단계 없이 직접 접종시에도 같은 내성 효과를 나타낸 결과를 보여 주는 것은, 니켈 내성이 니켈의 농도를 점진적으로 증가시켰을 때 발현된다는 종전에 제시되었던 니켈 내성 확설과 상반되는 점이 특이할 만한 결과였다²⁴⁾.

본 실험에서 니켈 내성을 나타낸 균주인 *Enterococcus faecalis*는 group D streptococci 균으로 2개의 구균 형태나 짧은 chain 형태로 존재하며, 주로 피부, 상기도, 위장관, 비뇨기관 등에서 발견된다. 이 균은 요로 감염, 담관 감염, 패혈증, 심내막염, 창상 감염, 맹장염, 위장관 감염 등의 원인균 중의 하나이다. 특히, 노년층에서 주로 세균성 심내막염의 주 원인균의 하나로서 여러 항생제에 내성을 갖고 있는 것으로 보고되었다²⁶⁾.

특히 구강내에서 enterococci가 차지하는 비율은 정상 성인 구강내의 치은 열구 내에 7.2%로 존재하고 타액 내에 1.3%로 존재한다고 밝혀져 있다. 또 치아 우식증에서 *Enterococcus faecalis*가 소와 열구내에서 발견되었으며, 괴사된 감염 치수로부터 *Enterococcus faecalis*가 흔히 발견되고 있다. 또한 enterococci는 치근단 농양의 원인균 중 1.1%를 차지하지만, 근관 치료할 때 enterococci는 치료에 대한 내성이 큰 것으로 나타나 있고, 정상적인 점막 표면이나 설배면에는 거의 나타나지 않지만 감염되었을 때에는 다수 검출되며, 정상적인 치은연, 구각, 그리고 입술에도 소수 나타나는 것으로 알려져 있다²⁶⁾.

최근의 연구에 의하면 enterococci는 새로운 유해균으로 임상에서 부상되고 있는데, 특히 병원에서 발생되어지고 있는 획득적 감염이 그 좋은 예이다. 특히 *Enterococcus faecalis*와 *Enterococcus faecium*에 의한 감염은 여러 병원 입원 환자에게서 선택적으로 발생하고 있으며 심한 경우 목숨을 잃는 경우도 있다. 또한 패혈증을 일으켜 심각한 상황에 처하는 임상 예가 점차 증가하고 있다. 그 예로 세균성 심내막염 환자나 요로 감염 환자에게서 나타나는 *Enterococcus faecalis* 감염의 경우가 보고되고 있는 실정이다²⁷⁻³¹⁾.

또한 Slovak에서 조사한 임상 예에 의하면 감염에 의한 세균성 심내막염의 경우 상당한 비율(11.7%)로 *Enterococcus faecalis*가 그 주원인균으로 밝혀진 바 있고, 치과 임상 예의 경우 구강외과적 수술 후에 20.5%가 risk factor로 보고되었으며, 25% 이상의 환자가 60세 이상인 것으로 보고되었다³²⁾.

*Enterococcus faecalis*와 전병력 및 고연령과의 상관관계를 구명하는 것도 중요하리라 생각되며, 이러한 예는 최근에 유럽과 일본에서도 몇몇 case study로 제시되어 온 바 있어 흥미로운 사실이다^{32,33)}.

*Enterococcus faecalis*에 의한 병원성 획득성 감염은 치

료가 매우 어려운데 여러 항생제에 대하여 크거나 작게 내성을 보여줌으로 인해 이러한 어려움이 가중되고 있다. Ampicillin이나 vancomycin이 보통 enterococci 감염에 잘 쓰여지고 있으나, 1990년 이후 이 항생제 또한 내성균의 출현으로 유명무실하게 되었으며 그 내성균의 빈도수는 증가 추세에 있는 실정이다. 특히 vancomycin의 내성 균주는 더욱 빠른 속도로 증가하고 있다³⁴⁾.

이러한 항생제 내성 효과는 종종 세균이 지니고 있는 extra-chromosomal genetic element인 plasmid에 깊게 관여하고 있다. Plasmid의 유전자 전이에 관여하는 conjugation(접합) plasmid pPD1에 대한 연구가 *Enterococcus faecalis*에서 유전학적, 생화학적 측면에서 연구되어지고 있는데, 특이하게도 이 plasmid group은 pheromone에 민감하게 반응하여 전이가 일어나는 것이 밝혀졌다³⁵⁻³⁷⁾.

그리고 *Enterococcus faecalis*의 chromosome은 transposon과 같은 mobile element를 지니고 있다. 이러한 element는 최근 Tn5385라는 multi-resistant chromosomal element(다발성 내성 유전자)인 erythromycin, gentamicin, streptomycin, tetracycline, minocycline, penicillin 등에 내성을 갖는 유전자를 chromosome내에 함유하여, 이 유전자가 유전자 전이를 통하여 다른 유사 균주에 자유롭게 이동하는 것이 실제로 가능할 수 있게 되었음을 시사했다³⁸⁻⁴¹⁾.

그와 유사하게 *Staphylococcus* β -lactamase plasmid가 *Enterococcus faecalis* 균주에 유전자 전이를 통하여 삽입된 경우도 최근에 밝혀진 바 있다⁴²⁾. 대체적으로 항생제 내성 인자가 plasmid에 있을 경우 다른 유전적 특성(예를 들어 증균속 내성)도 함께 유전자 전이로 전달될 수 있음을 볼 때, 니켈 내성 인자의 이동도 또한 항생제 내성과 함께 다른 균주에 자유롭게 이동될 수 있음을 시사하는 바가 크다.

본 연구에서도 *Enterococcus faecalis*는 다양한 항생제 내성을 가지고 있음을 확인하였다. 일반적으로 널리 사용되고 있는 항생제인 clindamycin, kanamycin, chloramphenicol, streptomycin, lincomycin에 대하여 내성이 있었고, 치주 치료와 함께 많이 사용되는 tetracycline에는 다행히도 감수성을 보였다. 이 결과로 미루어 보아 니켈-크롬 보철물을 장착한 환자에게 항생제 투여시에는 보다 각별한 주의가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 이러한 니켈에 내성을 갖는 균주의 니켈 내성 기전이 어디서 유래하는지에 대한 의문을 가지고 *Enterococcus faecalis*로부터 chromosomal DNA와 plasmid DNA를 각각 분리하였으며, 이 DNA를 기존에 알고 있던 니켈 내성 균주인 *Klebsiella*의 plasmid에서 분리한 4.3 Kb의 DNA 절편에 DNA hybridization으로 검사해 본 결과 그 유사성이 없음이 밝혀졌다. 이는 유전자의 G-C 배열의 상이성에 기인할 수도 있으나, 다른 기전의 니켈 내성 유전자일 가능성도 배제하기 어렵고, 또 세포막 투과성이나 chromosome에서 생산된 다른 단백질이 니켈 내성 기전에 관여할 수도 있을 것으로 사료되어 앞으로 이에 대한 연구가 더 이루어져야 할 것으로 생각된다.

최근 연구에 의하면 *Enterococcus faecalis* 균주에서 cold shock이나 heat shock을 가했을 때의 내성에 대한 단백질 변화에 관한 기전이 연구되고 있고, 또한 alkaline stress나 acid에 내성 반응 및 다른 영양 물질 결여 등에 의한 이 균주의 독성 변이가 연구되고 있다⁴³⁻⁴⁸⁾.

니켈에 내성을 나타내는 다른 균주인 *Klebsiella*에 대한 니켈 내성 기전은 오랫동안 연구되어져 왔고, *Klebsiella oxytoca*에서의 니켈 내성은 약 4.3 Kb *Hind* III DNA 절편에서 기인한 것으로 보고된 바 있고²⁵⁾, 본 연구 결과에서도 *Klebsiella*가 니켈 내성균으로 동정되어짐을 볼 때 *Klebsiella*의 니켈 내성은 구강 환경에서도 연구되어야 할 것으로 생각된다.

이상에서 보여준 것과 같이 니켈-크롬 합금 보철물을 장착한 치아의 치은 열구액에서 니켈에 높은 내성을 갖는 균주를 확인하였으며, 매우 높은 농도의 니켈 배지(60mM - 110mM)에서도 그 성장이 저해를 받지 않았다. 균의 동정 결과 채취된 균주는 그람 양성균인 *Enterococcus faecalis*와 그람 음성균인 *Klebsiella pneumoniae*와 *Enterobacter gergoviae*로 밝혀졌으며 각각 여러 항생제에 내성을 지니고 있었다. 그러나 대조군인 자연치아나 금 합금으로 수복한 치아의 치은 열구액에서는 니켈에 내성이 있는 세균이 발견되지 않았다.

본 연구는 니켈 내성에 관한 것으로서 니켈이 함유된 배지에서 세균을 배양하였으며 자연 치아나 금 합금으로 수복한 치은 열구액의 경우에는 니켈 배지 상에서 성장이 가능한 니켈 내성균이 존재하지 않았을

뿐, 치은열구내에 세균이 없음을 의미하는 것은 아니었다.

이 *Enterococcus faecalis*균의 니켈 내성 유무를 떠나서 전신질환에서 가지는 의의를 고려해 볼 때, 전신질환 환자 특히 *Enterococcus faecalis*에 의해 이차적으로 세균성 심내막염이나 요로 감염과 같은 병원성 획득성 감염의 기회가 있는 환자와 같은 경우에, 특히 니켈에 내성이 생긴 *Enterococcus faecalis*가 생존 가능한 구강 환경이 국소나 전신 질환에 미치는 영향에 관하여는 더욱 연구가 필요할 것으로 생각되며, 치과에서 이용되는 여러 다른 합금을 대상으로 한 연구도 필요하리라 생각되고, 니켈의 함유도의 차이에 대한 분석과 이의 임상적 유해 여부에 대한 문제 등도 고려되어야 할 것으로 생각된다. 니켈-크롬 합금 보철물을 사용할 때 환자의 과민 반응, 치과 의사와 치과 기공사의 발암성 등의 생체 적합성을 이유로 니켈의 함유 비율에 대한 조정이 이미 1974년부터 스웨덴에서 있었는데, 치과용 합금으로 쓰이는 재료에서 1% 이상의 니켈이 함유된 금속의 사용을 금하고 있는 실정이다¹⁶⁾. 또한 치과 의사나 치과 기공사에게는 치료실이나 치과 기공실에서 이들 금속을 다룰 때 공기 중에서 니켈을 흡입할 수 있으므로, 마스크를 반드시 착용하고 고속 흡입기를 사용하도록 하며 공기 중 니켈의 농도를 제한 농도 이하로 유지되도록 환기해야 할 필요가 있으며, 미국에서는 니켈의 공기 중 제한 농도를 $15\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 이하로 규제하고 있다^{2,16)}. 이러한 연구들은 주로 치과 의사와 기공사를 위한 것으로서 실제 보철물을 장착하게 되는 환자들에 관한 연구는 미미하였기에 본 연구를 시도하였다.

한편, 기타 치과용 다른 금속들이 구강 및 전신에 미치는 영향에 대한 연구와 이들 금속의 내성 균주 유무 등에 대한 연구도 필요할 것으로 생각된다. 또한 전신 질환과의 관계를 확인하기 위하여 내과 의사 등과 함께 공동 연구도 고려되어야 할 것으로 생각되며, 구강내 니켈 내성 균주와 전신 질환과의 상관 관계는 아직 밝혀진 것이 없으나, 2차 감염의 가능성이 있는 세균이 확인되었으므로 세균성 심장내막염 환자나 전신 감염성 질환이 있는 환자의 경우에는 보철물 제작에 사용할 합금의 선정시 이를 고려하는 것이 좋을 것으로 생각된다.

V. 결 론

니켈-크롬 합금을 사용한 보철물을 장착한 환자의 치은 열구액에서 채취한 시료에서 니켈에 내성을 갖는 균주를 확인하여, 이 균주를 분리 배양하여 동정하고, 이 균주의 니켈 내성과 성장 곡선 그리고 니켈 농도에 따른 성장능 및 항생제 내성을 확인하였으며, 이 균주의 니켈 내성 기전이 어디서 유래하였는지를 확인하기 위하여 균주로부터 chromosome과 plasmid DNA를 분리하고, 분리된 DNA를 제한 효소로 처리한 후 이를 전기 영동으로 확인하고, DNA hybridization하여 종래에 알려진 니켈 내성 유전자와 동일한 니켈 내성 유전자를 가졌는지 확인하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 니켈-크롬 합금 보철물을 장착한 환자의 치은 열구액에서 채취한 시료에 대한 검사 결과, 니켈에 내성을 가진 균주가 발견되었다.
2. 매우 높은 농도의 니켈 배지(60 mM-110 mM)에서도 니켈 내성 균주는 성장의 저해를 받지 않았다.
3. 동정 결과, 그람 양성균인 *Enterococcus faecalis*와 그람 음성균인 *Klebsiella pneumoniae*와 *Enterobacter gergoviae*로 밝혀졌다.
4. 니켈-크롬 합금 보철물을 장착한 환자의 치은 열구액에서 분리된 니켈 내성 균주는 clindamycin, kanamycin, chloramphenicol, streptomycin, lincomycin에 대하여 내성이 있었고, tetracycline에만 감수성을 보였다.
5. 니켈 내성 요인을 검색한 결과, *Enterococcus faecalis*의 chromosome에는 종래에 알려진 니켈 내성 균주인 *Klebsiella pneumoniae*의 plasmid에 있는 니켈 내성 유전자와 동일하거나 유사한 유전자가 확인되지 않았다.

참 고 문 헌

1. National Institute of Dental Research. : Workshop : Biocompatibility of metals in dentistry. J.Am.Dent.Assoc., 109 : 469-471, 1984.
2. Morris, H.F. : Veterans Administration Cooperative Studies Project No.147. Part

- IV : Biocompatibility of base metal alloys. *J. Prosthet. Dent.*, 58 : 1-5, 1987.
3. Bergman, B., Bergman, M. and S remark, R. : Tissue accumulation of nickel released due to electrochemical corrosion of non-precious dental casting alloys. *J. Oral Rehabil.*, 7 : 325-330, 1980.
 4. Van Loon, L.A.J., Van Elsas, P.W., Van Joost, T.H. and Davidson, C.L. : Contact stomatitis and dermatitis to nickel and palladium. *Contact Dermat.*, 11 : 294-297, 1984.
 5. Marcusson, J.A. : Contact allergies to nickel sulfate, gold sodium thiosulfate and palladium chloride in patients claiming side-effects from dental alloy components. *Contact Dermat.*, 34 : 320-323, 1996.
 6. Magnusson, B., Bergman, M., Bergman, B. and S remark, R. : Nickel allergy and nickel-containing dental alloys. *Scand. J. Dent. Res.*, 90 : 163-167, 1982.
 7. Moulon, C., Vollmer, J. and Weltzien, H.U. : Characterization of processing requirements and metal cross-reactivities in T Cell clones from patients with allergic contact dermatitis to nickel. *Eur. J. Immunol.*, 25 : 3308-3315, 1995.
 8. Kanerva, L., Sipiläinen-Malm, T., Tulla, Estlander, T., Zitting, A., Jolanki, R. and Tarvainen, K. : Nickel release from metals, and a case of allergic contact dermatitis from stainless steel. *Contact dermat.*, 31 : 299-303, 1994.
 9. Basketter, D.A., Briatico-Vangosa, G., Kaestner, W., Lally, C. and Bontinck, W.J. : Nickel, cobalt and chromium in consumer products : a role in allergic contact dermatitis? *Contact Dermat.*, 28 : 15-25, 1993.
 10. Silvennoinen-Kassinen, S., Ikaheimo, I., Karvonen, J., Kauppinen, M. and Kallioinen, M. : Mononuclear cell subsets in the nickel-allergic reaction in vitro and in vivo. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 89 : 794-800, 1992.
 11. Vilaplana, J., Romaguera, C., Grimalt, F. and Cornellana, F. : New trends in the use of metals in jewellery. *Contact Dermat.*, 25 : 145-148, 1991.
 12. Camner, P., Casarett-Bruce, M., Curstedt, T., Jarstrand, C., Wiernik, A., Johansson, A., Lundborg, M. and Robertson, B. : Toxicology of Nickel. *Lsrc. Sci. Publ.*, 53 : 267-276, 1984.
 13. Hamano H. : Fundamental studies on biological effects of dental metals- nickel dissolution, toxicity and distribution in cultured cells. *Kokubyo Gakkai Zasshi*, 59 : 456-478, 1992.
 14. Aberer, W., Holub, H., Strohal, R. and Slavicek, V. : Palladium in dental alloys- the dermatologists' responsibility to warn?. *Contact dermat.*, 28 : 163-165, 1993.
 15. Dunnick, J.K., Elwell, M.R., Radovsky, A.E., Benson, J.M., Hahn, F.F., Nikula, K.J., Barr, E.B. and Hobbs, C.H. : Comparative carcinogenic effects of nickel subsulfide, nickel oxide, or nickel sulfate hexahydrate chronic exposures in the lung. *Cancer res.*, 55 : 5251-5256, 1995.
 16. Pierce, L.H. and D., and Goodkind, R.J. : A status report of possible risks of base metal alloys and their components. *J. Prosthet. Dent.*, 62 : 234-238, 1989.
 17. Mergeay, M., Nies, D., Schlegel, H.G., Gerits, J., Charles, P. and Van Gijsegem, F. : *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J. Bacteriol.*, 162 : 328-34, 1985.
 18. Collard, J.M., Provoost, A., Taghavi, S. and Mergeay, M. : A New type of *Alcaligenes eutrophus* CH 34 Zinc Resistance generated by mutations affecting regulation of the *cnr* cobalt-nickel resistance System. *J. Bacteriol.*, 175 : 779-784, 1993.
 19. Mergeay, M. : Towards an understanding of the genetics of bacterial metal resistance. *Tibtech.*, 9 : 17-24, 1991.

20. Schmidt, T. and Schlegel, H.G. : Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the ncc locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31A. J. Bacteriol., 176 : 7045-54, 1994.
21. Silver, S. and Misra, T.K. : Plasmid-mediated heavy metal resistances. Ann. Rev. Microbiol., 42 : 717-43, 1988.
22. Silver, S. : Plasmid-determined metal resistance mechanisms : range and overview. Plasmid, 27 : 1-3, 1992.
23. Nies, D.H. : Resistance to Cadmium, Cobalt, Zinc, and Nickel in Microbes. Plasmid, 27 : 17-28, 1992.
24. Stoppel, R.D., Meyer, M. and Schlegel, H.G. : The nickel resistance determinant cloned from the enterobacterium *Klebsiella oxytoca* : conjugational transfer, expression, regulation and DNA homologies to various nickel-resistant bacteria. Biometals, 8 : 70-9, 1995.
25. McLean, J.W. : The science and art of dental ceramics. Vol 1. Bridge design and laboratory procedure in dental ceramics. Quintessence Pub., Chicago, 1984.
26. Slot, J. and Taubman, M.A. : Contemporary oral microbiology and immunology. Mosby-Year Book, Inc., 267-510, 1992.
27. Morrison, D., Woodford, N. and Cookson B. : Enterococci as emerging pathogens of humans. J. Appl. Microbiol. Symposium Supplement, 83 : 89s-99s, 1997.
28. Noskin, G.A., Peterson, L.R. and Warren, J.R. : *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* bacteremia : acquisition and outcome. Clin. Infect. Dis., 20 : 296-301, 1995.
29. Suppola, J.P., Kuikka, A., Vaara, M. and Valtonen, V.V. : Comparison of risk factors and outcome in patients with *Enterococcus faecalis* vs *Enterococcus faecium* bacteremia. Scand. J. Infect. Dis., 30 : 153-157, 1998.
30. Pasquarella, C., Morrison, D., Savino, A. and Cookson, B.D. : Dynamics of *Enterococcus faecalis* colonization of bone marrow transplant patients. Adv. Exp. Med. Biol., 418 : 275-9, 1997.
31. Bottone, E.J., Patel, L., Patel, P. and Robin, T. : Mucoid encapsulated *Enterococcus faecalis* : an emerging morphotype isolated from patients with urinary tract infections. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 31 : 429-430, 1998.
32. Hricak, V., Kovacic, J., Marx, P., et al. : Etiology and Risk factors of 180 cases of native valve endocarditis. Report from a 5-year national prospective survey in Slovak Republic. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 31 : 431-435, 1998.
33. Kitamura, T., Shibata, M., Isaka, N. and Nakano, T. : An elderly patient with infectious endocarditis complicated with congestive heart failure due to mitral and tricuspid regurgitation. J. Cardiol., 29 : 131-135, 1997.
34. Carias, L.L., Rudin, S.D., Donskey, C.J. and Rice, L.B. : Genetic linkage and cotransfer of a novel, vanB-containing transposon (Tn5382) and a low-affinity penicillin-binding protein 5 gene in a clinical vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolate. J. Bacteriol., 180 : 4426-34, 1998.
35. Shiojima, M., Tomita, H., Tanimoto, K., Fujimoto, S. and Ike, Y. : High-level plasmid-mediated gentamicin resistance and pheromone response of plasmids present in clinical isolates of *Enterococcus faecalis*. Antimicrob. Agents. Chemother., 41 : 702-705, 1997.
36. Tomita, H., Fujimoto, S., Tanimoto, K. and Ike, Y. : Cloning and genetic and sequence analyses of the bacteriocin 21 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis*. Pheromone-responsive conjugative plasmid pPD1. J. Bacteriol., 179 : 7843-7855, 1997.
37. Hedberg, P.J., Leonard, B.A.B., Ruhfel, R.E. and Dunny, G.M. : Identification and characterization of the genes of *Enterococcus faecalis* plasmid pCF10 involved in replication and in

- negative control of pheromone-inducible conjugation. *Plasmid*, 35 : 45-57, 1996.
38. Dunny,G., Funk,C. and Adsit,J. : Direct stimulation of the transfer of antibiotic resistance by sex pheromones in *Streptococcus faecalis*. *Plasmid*, 6 : 270-278, 1981.
 39. Jaworski,D.D., Flannagan,S.E. and Clewell, D.B. : Short communication : Analyses of *traA*, *int-Tn*, and *xis-Tn* mutations in the conjugative transposon *Tn916* in *Enterococcus faecalis*. *Plasmid*, 36 : 201-208, 1996.
 40. Manganelli,R., Ricci,S. and Pozzi,G. : The joint of *Tn916* circular intermediates is a homoduplex in *Enterococcus faecalis*. *Plasmid*, 38 : 71-78, 1997.
 41. Clermont,D., de Cespedes,G., Delbos,F. and Horaud,T. : Genetic analysis *Enterococcus faecalis* chromosome carrying mobile elements. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 418 : 1023-1027, 1997.
 42. Rice,L.B. and Carias,L.L. : Transfer of *Tn5385*, a composite, multiresistance chromosomal element from *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.*, 180 : 714-721, 1998.
 43. Rice,L.B., Carias,L.L., Marshall,S.H. and Bonafede,M.E. : Sequences found on staphylococcal β -lactamase plasmids integrated into the chromosome of *Enterococcus faecalis* CH116. *Plasmid*, 35 : 81-90, 1996.
 44. Panoff,J.M., Corroler,D., Thammavongs,B. and Boutibonnes,P. : Differentiation between cold shock proteins and cold acclimation proteins in a mesophilic gram-positive bacterium, *Enterococcus faecalis* JH2-2. *J. Bacteriol.*, 179 : 4451-4454, 1997.
 45. Boutibonnes,P., Giard,J.C., Hartke,A., Thammavongs,B. and Auffray,Y. : Characterization of heat shock response in *Enterococcus faecalis*. *Antonie Van Leeuwenh.*, 64 : 47-55, 1993.
 46. Flahaut,S., Hartke,A., Giard,J.C. and Auffray, Y. : Alkaline stress response in *Enterococcus faecalis* : adaptation, cross-protection, and changes in protein synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 : 812-814, 1997.
 47. Svensater,G., Larsson,U.B., Greif,E.C., Cvitkovitch,D.G. and Hamilton,I.R. : Acid tolerance response and survival by oral bacteria. *Oral. Microbiol. Immunol.*, 12 : 266-273, 1997.
 48. Giard,J.C., Hartke,A., Flahaut,S., Boutibonnes,P. and Auffray,Y. : Glucose starvation response in *Enterococcus faecalis* JH2-2 : survival and protein analysis. *Res. Microbiol.*, 148 : 27-35, 1997.

ABSTRACT

A Study of Ni-resistant bacteria isolated from gingival crevicular fluid on the patients wearing Ni-Cr alloy prosthesis (In terms of molecular biological aspects)

Young-Ah Chae, Yi-Hyung Woo, Boo-Byung Choi, Dae-Gyun Choi, Sung-Bok Lee, Kung-Rock Kwon

*Department of Prosthodontics, Division of Dentistry, Graduate School
Kyung Hee University, Seoul, Korea.*

As a material of metal-ceramic prosthesis, nickel as a form of Ni-Cr alloy has been used for many dental prostheses in many cases. However, several problems in use of the alloy have been revealed (ex : tissue stimulation, skin allergy, hypersensitivity, cytotoxicity and carcinogenicity). Little is known about nickel with respect to the relationship between Ni-prosthesis and gaining of Ni-resistance in oral microorganisms. The present study was undertaken to check whether use of Ni-prosthesis leads to occurrence of Ni-resistant microorganisms. So this study may suggest the possible relationships between the oral microorganisms and nickel-resistance in oral environment.

Bacteria were isolated from the gingival crevicular fluid on the patients wearing Ni-Cr prosthesis. The isolated bacteria were tested for their Ni-resistance in nickel containing media at different concentration from 3mM to 110mM. *E. coli* HB101 was used as control. The Ni-resistant bacteria were isolated and biochemically identified. The Ni-resistant bacteria were tested several biochemical, molecular-biological tests. Performed tests were : measuring the growth curve, antibiotic test, growth ability test in liquid media, isolation of the chromosome and plasmid, digestion of DNA by restriction enzyme, electrophoresis of chromosome and plasmid DNA, identification of Ni-resistant genes by the DNA hybridization.

The results were as follows:

1) The bacteria isolated from gingival crevicular fluid on the patients wearing Ni-Cr alloy prosthesis showed nickel-resistance.

2) The isolated microorganisms grew at nickel containing media of high concentrations (60mM-110mM).

3) Based on the biochemical tests, the isolated microorganisms were identified as *Enterococcus faecalis* (13 cases), *Klebsiella pneumoniae* (1 case) and *Enterobacter gergoviae* (1 case) .

4) *Enterococcus faecalis* expressed not only nickel resistance but also the multi-drug resistance to several antibiotics : chloramphenicol, kanamycin, streptomycin, lincomycin, clindamycin. However, all strain showed the sensitivity against the tetracycline.

5) DNA hybridization result suggest that there is no homology between the previously known gene of nickel resistance in *Klebsiella pneumoniae* and chromosomal DNA of *Enterococcus faecalis*.