

만성 치주염과 급속 파괴성 치주염  
에서의 흑색색소 형성 *Bacteroides*의  
분포도 비교

연세대학교 대학원

치의학과

신 철 우

만성 치주염과 급속 파괴성 치주염  
에서의 흑색색소 형성 *Bacteroides*의  
분포도 비교

연세대학교 대학원

치의학과

신 철 우

만성 치주염과 급속 파괴성 치주염  
에서의 흑색색소 형성 *Bacteroides*의  
분포도 비교

지도 조 규 성 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2003년 12월 일

연세대학교 대학원

치의학과

신 철 우



## 감사의 글

논문을 무사히 마칠 수 있게 도와주신 하나님께 먼저 감사드리며, 논문을 마치기까지 지도편달을 아끼지 않으신 조규성 지도교수님, 김종관 교수님, 채중규 교수님, 문익상 교수님, 최성호 교수님, 최봉규 교수님께 감사드립니다.

또한 이 자리에 오기까지 물신양면으로 도와주신 부모님께 가슴속 깊이 감사의 마음을 대신하고 싶습니다. 언제나 격려를 해주신 장인, 장모님, 나의 삶에 있어서 영원한 동반자인 아내 김의경과 사랑하는 두 아들 준엽이, 민규 그리고 동생 정애에게 이 논문을 드립니다.

마지막으로 논문이 나오기까지 도와주신 치주과 의국원분들과 노현수 선생, 황성준 선생께 감사를 전합니다.

2003년 12월

저자 씀

# 목 차

도표 및 사진부도 목차 .....	iii
국문요약 .....	iv
I. 서론 .....	1
II. 연구대상 및 방법 .....	4
1. 연구대상 .....	4
2. 연구방법 .....	4
1) 치은 연하 치태표본 채취 .....	4
2) DNA 추출 .....	5
3) 중합효소연쇄 반응 .....	5
4) Oligonucleotide 소식자의 표지 .....	6
5) 점상블롯 보합결합과 탐지 .....	6
6) 통계 분석 방법 .....	8
III. 연구결과 .....	9
IV. 총괄 및 고찰 .....	15
V. 결론 .....	20
참고문헌 .....	22
영문요약 .....	27

## 도표 및 사진부도 목차

Table 1. Specific oligonucleotide probes used for dot-blot hybridization .....	8
Table 2. Distribution of black-pigmented <i>Bacteroides</i> in CP and AP detected by 16S rRNA gene analysis .....	11
Table 3. Distribution of black-pigmented <i>Bacteroides</i> in CP detected by 16S rRNA gene analysis .....	12
Table 4. Distribution of black-pigmented <i>Bacteroides</i> in AP detected by 16S rRNA gene analysis .....	13
Table 5. Distribution of black-pigmented <i>Bacteroides</i> in N-CP and N-AP detected by 16S rRNA gene analysis .....	14
Figure 1. Distribution of black-pigmented <i>Bacteroides</i> in CP and AP detected by 16S rRNA gene analysis .....	11
Figure 2. Distribution of black-pigmented <i>Bacteroides</i> in CP detected by 16S rRNA gene analysis .....	12
Figure 3. Distribution of black-pigmented <i>Bacteroides</i> in AP detected by 16S rRNA gene analysis .....	13
Figure 4. Distribution of black-pigmented <i>Bacteroides</i> in N-CP and N-AP detected by 16S rRNA gene analysis .....	14

## 국문 요약

### 만성 치주염과 급속 파괴성 치주염에서의 흑색색소 형성 *Bacteroides*의 분포도 비교

본 연구에서는 만성 치주염 환자와 급속 파괴성 치주염 환자간의 흑색색소 형성 *Bacteroides* (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*)의 세균분포도 차이를 조사하기 위해 만성 치주염 환자 30명의 질환부위(치주낭 깊이  $\geq 6$  mm)와 비질환부위(치주낭 깊이  $\leq 3$  mm)에서 치은연하치태를 채취하여 CP, N-CP군으로, 급속 파괴성 치주염 30명의 질환부위(치주낭 깊이  $\geq 6$  mm)와 비질환부위(치주낭 깊이  $\leq 3$  mm)에서 치은연하치태를 채취하여 AP, N-AP군으로 각각 정하여 16S rRNA 분석법을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *P. gingivalis*가 CP군에서 98.33%, AP군에서 94.17%를 보였으며 *P. intermedia*는 CP군에서 77.50%, AP군에서는 64.17%를 보였고, *P. nigrescens*는 CP군에서 35.00%, AP군에서 29.17%를 각각 나타내었다. *P. intermedia*의 경우에서만 CP군에서 AP군에 비해 통계적인 유의차가 있게 더 높은 세균 분포도를 보였다( $p < 0.05$ ).

2. CP군과 N-CP군에서의 세균분포도는 *P. gingivalis*가 각각 98.33%, 43.33%를 보였으며, *P. intermedia*는 각각 77.50%, 10.00%를, *P. nigrescens*는 각각 35.00%, 3.33%를 나타내었다. 만성 치주염 환자의 경



우 3종류의 세균 모두에서 질환부위가 비질환부위에 비해 통계적인 유의차가 있게 더 높은 세균의 분포도를 보였다( $p < 0.01$ ).

3. AP군과 N-AP군에서의 세균분포도는 *P. gingivalis*는 각각 94.17%, 50.00%를 보였으며, *P. intermedia*는 각각 64.17%, 23.33%를 나타내었고, *P. nigrescens*는 각각 29.17%, 23.33%를 나타내었다.

급속 파괴성 치주염에서는 *P. gingivalis*와 *P. intermedia*의 경우 질환부위가 비질환부위에 비해 통계적인 유의차가 있게 더 높은 세균 분포도를 보였으나( $p < 0.01$ ), *P. nigrescens*의 경우 유의성있는 차이를 보이지 않았다.

4. N-CP와 N-AP군에서의 세균분포도는 *P. gingivalis*는 각각 43.33%, 50.00%를 보였으며, *P. intermedia*는 각각 10.00%, 23.33%를 나타내었고, *P. nigrescens*는 각각 3.33%, 23.33%를 나타내었다

만성 치주염과 급속 파괴성 치주염의 대조군간의 비교에서는 세가지 세균 모두에서 통계적인 유의성있는 차이를 보이지 않았다.

이상의 결과에서 만성 치주염환자와 급속 파괴성 치주염 환자의 흑색색소 형성 *Bacteroides*의 세균분포도 차이를 확인하였으며, *P. intermedia*와 *P. nigrescens*의 급속 파괴성 치주염에 있어서의 역할에 대한 좀 더 세분화된 연구가 필요하리라 사료된다.

---

핵심 단어:만성 치주염, 급속 파괴성 치주염, *Bacteroides*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, 16S rRNA 분석법

만성 치주염과 급속 파괴성 치주염에서의 흑색색소 형성  
*Bacteroides*의 분포도 비교

연세대학교 대학원 치의학과

(지도 조규성 교수)

신철우

## I. 서론

치주질환의 발생기전은 아직 확실하지 않으나 치아 면이나 치은 열구 내의 치태 내에 존재하는 세균이 가장 중요하고 1차 적인 원인으로 작용한다고 알려져 있다<sup>12)</sup>.

치태는 주로 미생물로 구성되며 치태 1gm에는  $2.3 \times 10^{11}$  정도의 세균이 존재하고<sup>30)</sup>, 치태 내에는 300 여종 이상의 세균이 존재한다<sup>15)</sup>. 이들 치태는 위치에 따라 크게 치은연상 치태와 치은연하 치태로 구분된다. 치은연하 치태는 다시 치아와 관련된 치태 부분과 조직과 관련된 치태로 구분될 수 있으며, 때로는 숙주조직 내에 세균이 존재하기도 한다. 치은연상 치태와 치은연하의 치아와 관련된 치태는 치석형성과 치근우식증에 중요한 역할을 하며 조직과 관련된 치은연하 치태는 치주질환의 여러 유형에서 나타나는 연조직 파괴와 관련이 있다.

1900년대 중반에는 연령증가에 따른 숙주반응의 감소 및 숙주의 질환감수성 증가와 함께 시간에 따른 치태축적의 증가로 인해 치주질환이 야기된다고 믿어졌다<sup>11)</sup>. 이러한 생각은 연령과 치태량이 치주질환과 상관관계를 보인 역학적 연구에 의해 뒷받침되어졌다<sup>12,24,25)</sup>.

그러나 치태와 치석이 존재하고 치은염증이 심한 개인의 경우 파괴성 치주염이 없는 경우가 관찰되었다. 더욱이 치주염환자는 부위별 특이성을 가지고 있었다. 어떤 부위는 영향을 받지 않은 반면 근접한 부위는 질환에 심히 이환되어 있었다. 숙주반응은 동일함으로 치태의 병원성이 같다는 개념은 이러한 소견을 설명할 수 없었다. 임상적 상태가 다른 부위에서 치태의 병원성이 다르다는 개념 하에 치주 질환의 특이 병원균에 대한 새로운 연구가 시작되었고<sup>11,28,30)</sup>, 비특이성 치태론에서 특이성 치태론으로 개념이 변화되기 시작하였다. 특이성 치태론에 의하면 특정 치태만이 병원성이 있으며 이병원성은 특정 세균의 존재 또는 증가에 의한 것이다<sup>14)</sup>. 이 이론에 의하면 숙주조직의 파괴를 매개하는 물질을 내는 특정세균이 존재하는 치태에 의해 치주질환이 야기될 수 있음을 예견 할 수 있다.

다수의 치은연하 치태 세균중 소수의 세균종만이 건강한 상태에서 치주질환 상태로 전이하는데 관련이 있으며 이들 균종 중 그람음성 혐기성 세균종의 비율이 증가할 경우 질환발생의 심각도가 증가한다고 볼 수있다<sup>31)</sup>. 이러한 세균종으로는 *Treponema*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium*, *Tannerella forsythensis*, *Prevotella intermedia*, *Micromonas micros*등을 들 수 있으며, 이들 균종과 치주질환 사이의 연관성에 관한 많은 연구가 진행되어왔다<sup>6,7,17,35,42,43,44,45,46,47)</sup>. 이들 세균중 흑색색소형성 *Bacteroides*는 치주질환의 염증도, 치주낭의 깊이, 부착상실의 정도와 비례하여 치주낭에서 빈발하게 나타나는 그람음성 절대 혐기성 세균이다. 이들 균주들은 만성 치주염(Chronic periodontitis:CP), 급속파괴성 치주염(Aggressive periodontitis:AP) 등에 주된 원인균으로 연구되고 있다. 흑색색소형성 *Bacteroides*중 구강내에 나타나는 종류로는 *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *Prevotella melaninogenicus*, *Prevotella loeschii*, *Prevotella denticola*, *Porphyromonas levii* 등을 들 수 있으나 치주질환과 직접적으로 관련있는 세균은 *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P.*

*melaninogenicus*등이다<sup>18,22)</sup>. 동일한 표현형을 갖는 *P. intermedia*종은 *P. intermedia*와 *P. nigrescens*의 두 종류로 분리되었다<sup>27)</sup>.

치아지지조직을 침범하는 질환에는 여러 형태가 있다. 치주 질환을 분류하는 여러 방식 중에서 Page 와 Schröder<sup>20)</sup>는 사춘기 전 치주염, 유년 성 치주염, 급속 진행성 치주염, 성인성 치주염으로 분류하였다. 그러나 기존의 성인성 치주염 및 조기이환 치주염의 분류상의 여러 제한점 및 문제점이 제기되었다. 이에 1999년 치주질환의 분류에 대한 변화가 있어서 기존의 성인성 치주염과 조기이환 치주염 대신 만성 치주염과 급속 파괴성 치주염으로 바뀌었다<sup>1)</sup>.

치주병원성 세균동정방법으로는 현미경 관찰법, 배양법, 면역학적 분석법, 효소 이용법, DNA probe 이용법 등이 있으며, 신속하고 정확한 세균동정방법이 특이한 몇몇 세균균주와 치주질환사이의 연관성을 밝히는데 유용하게 사용될 수 있다. 치은연하 치태세균 표본에서 민감하고 특이성이 있는 세균동정방법으로 소개된 polymerase chain reaction(PCR)은 특히 배양이 불가능하거나 배양법으로 쉽게 구별되지 않는 세균의 동정에 유용하게 사용될 수 있다<sup>29)</sup>. 16S rRNA 유전자의 PCR 및 PCR 산물의 점상 블롯 보합결합 및 탐지법은 높은 정도의 유전적, 형태적 유사성을 보이는 세균들을 확인하는 유용한 방법이다<sup>2,5)</sup>.

PCR의 증폭부위중에서 16S rRNA 유전자가 가장 적절한 부위로 평가되는데 이는 16S rRNA 유전자는 모든 세균에 존재하며, 모든 세균에서 같은 염기서열을 나타내는 보존부위와 종마다 특이한 염기서열을 보이는 특이부위로 구성되기 때문이다<sup>26)</sup>.

이에 본 연구에서는 16S rRNA 분석법을 사용하여 흑색색소 형성 *Bacteroides* 세균 중 *P. gingivalis*, *P. intermedia* 및 *P. nigrescens*의 만성 치주염과 급속 파괴성 치주염에서의 세균분포도를 비교하고자 한다.

## II. 연구대상 및 연구방법

### 1. 연구대상

연세대학교 치과대학 부속병원 치주과에 내원한 환자중 만성 치주염으로 진단된 환자 30명(29-49세, 남 14명, 여 16명)과 급속 파괴성 치주염으로 진단된 환자 30명(19-35세, 남 16명, 여 14명)을 대상으로 하였으며, 치주염이외의 다른 질병이 있거나 면역력이 약화된 환자, 그리고 최근 6개월 이내에 항생제 치료를 포함한 치주염치료를 받은 환자는 연구대상에서 제외하였다.

선택된 급속 파괴성 치주염의 임상적 특징으로는 사춘기와 20세 사이에 발병하며, 제 1 대구치와 전치, 혹은 전 치아에 걸쳐 병소가 이환되는 양상을 보였다. 또한 이전에 유년성 치주염에 이환되었던 경험이 있는 경우도 있었으며, 심하고 빠른 치조골 결손을 보였다. 치태의 침착 정도는 다양하였다.

### 2. 연구방법

#### 1) 치은연하 치태 표본 채취

만성 치주염과 급속 파괴성 치주염 환자 각 30명으로부터 환자당 5개의 치아를 선정하였다. 치주낭 깊이( $\geq 6$  mm)가 가장 깊은 치아 4개를 실험군으로, 치주염을 나타내지 않은 치아 1개(치주낭 깊이 $\leq 3$  mm)를 대조군으로 하여, 실험군인 4개 치아는 각 치아에서 치주낭이 가장 깊은 부위( $\geq 6$  mm)에 paper point를 10초

간 삽입하여 치은연하 치태를 채취하였다. 이때 치은연상 치태를 완전히 제거한 후 paper point를 3회 삽입하였다. 치태를 채취한 paper point를 1 ml의 reduced transport fluid(RTF)에 부유하였다. 대조군인 1개 치아(치주낭 깊이 ≤ 3 mm)에서도 위와 동일한 방법으로 치은연하 치태 채취를 시행하였다.

## 2) DNA 추출

치태세균을 위상차 현미경하에서 검사한 후 균질화 시켰다. 치태세균의 DNA를 추출하기 위해 먼저 치태세균의 시료에서 200  $\mu$ l를 취하여 원심분리(Jouan, MR 1812, 12500rpm)를 시행하여 균 침전물을 얻은 후 다시 PBS(phosphate buffered saline)로 세척하였다. 이후, 200  $\mu$ l lysis buffer(500mM Tris-HCl, pH 9.0, 20 mM EDTA, 10mM NaCl, 1% SDS), 2  $\mu$ l proteinase K(20 mg/ml)를 첨가하여 37°C에서 1시간 방치하였다. 같은 양의 phenol, chloroform을 순차적으로 적용하여 DNA를 추출한 후 상층의 액만을 사용하였다. 여기에 3M sodium acetate 20  $\mu$ l와 ethanol(absolute) 400  $\mu$ l를 첨가하여 -20 °C에서 2시간이상 방치하여 DNA를 침전시켰다. 이 침전물을 70% ethanol로 세척한 후 Speedvac(Automatic Environmental Speedvac<sup>®</sup> System AES1010, Savant)에서 5분간 건조시켰다. 이렇게 얻은 DNA를 11  $\mu$ l의 dH<sub>2</sub>O에 녹였다.

## 3) 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction)

치태세균의 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위해 추출된 DNA 1  $\mu$ l, 30 pmol eubacterial universal primers[TPU1(5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3': *E. coli*의 16s rRNA 8번째부터 27번째 까지의 염기위치와 상응하는 위치), RTU3(5'-GWA TTA CCG CGG CKG CTG-3': *E. coli*의 16S rRNA 519번째부터 536번째까지의 염기위치와 상응하는 위치)], Perkin Elmer cetus 시약 (x10 buffer, 20 uM dNTP, 2.5U Taq polymerase, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>)등의 100 $\mu$ l 반응 혼

합물 내에서 16S rRNA 유전자의 일부(약 530bp)를 PCR로 증폭하였다. PCR은 95 °C 에서 1분간 변성화과정(denaturation)을, 56°C에서 1분간 결합반응(annealing)과정을, 72 °C black-pigmented *Bacteroides*에서 연장화(extension)과정을 30회 반복하였다. Ethidium bromide가 포함된 agarose gel electrophoresis과정을 통해 PCR 생성물을 확인하였다.

#### 4) Oligonucleotide 소식자의 표지

각각 세균에 대한 특이한 소식자의 염기서열은 Table 1에 정리되어 있다.

소식자는 digoxigenin(DIG) oligonucleotide 3'-end labeling kit(Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하여 DIG-ddUTP로 표지하였다. 즉, 100 pmol oligonucleotide, 4  $\mu$ l CoCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ l DIG-ddUTP, 1 $\mu$ l terminal transferase가 들어있는 총 20  $\mu$ l 반응 혼합물을 37°C에서 15분간 방치한 후 얼음에 놓고 2  $\mu$ l의 stop solution(1  $\mu$ l glycerin과 200 $\mu$ l 0.2mM EDTA의 혼합물)을 첨가하였다. oligonucleotide를 2.5  $\mu$ l 4M LiCl과 75  $\mu$ l 미리 냉각된 ethanol으로 잘 섞은 후 -20°C에서 방치하였다. 표지된 oligonucleotide를 4 °C에서 12,000 g으로 원심분리하여 알콜을 제거한후 침전물을 500  $\mu$ l의 70 % 에탄올로 세척하고 건조시켰다. 이후 20  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O에 녹였다.

#### 5) 점상블롯 보합결합 및 탐지(Dot-blot hybridization & detection)

치태세균중 흑색색소형성 *Bacteroides*(*P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*)를 탐지하기위해 PCR 생성물을 사용하였다. PCR 생성물은 95 °C에서 5분간 변성 시킨 후 2  $\mu$ l를 취하여 nylon membrane에 점상블롯(dot-blot)을 시행하였다. 이후 DNA와 PCR 생성물을 nylon membrane에 부착 고정시키기 위해 적외선(254 nm)으로 3분간 조사하였다(Ultraviolet crosslinker, UVP, Inc,

Upland CA).

Nylon membrane상에서의 치은연하 치태세균의 16S rRNA 유전자가 성공적으로 점상 블롯된 것을 eubacterial universal primer TPU2(5'-CCA RAC TCC TAC GGG AGG CA-3': *E.coli* 16S rRNA의 334번째부터 353까지의 염기위치와 상응하는 위치.)로 보합결합시킴으로써 확인하였다. 이후 nylon membrane을 보합결합관(hybridization tube)에 넣고 hybridization solution(5x SSC: sodium chloride와 sodium citrate를 섞은 용액에 NaOH를 넣어 pH8.0을 맞춘 것으로 통상 20X를 사용하는데 여기서는 4배 희석한 것을 사용했음, 1%blocking reagent, 0.1% N-lauroylsarkosine, 0.02% SDS)에서 30분간 각 소식자에 맞는 온도로 pre-hybridization시켰다. 이후 표지된 oligonucleotide 소식자(50 pmol)를 넣고 1시간동안 보합결합(hybridization)하고 세척용액(washing buffer1: 5xSSC: sodium chloride, sodium citrate, NaOH, pH 8.0, 0.1% SDS: sodium dodecyl sulfate)으로 15분간 두 번 세척하였다. 결합된 소식자는 DIG-luminescent detection kit(Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하여 alkaline phosphatase가 결합된 anti-digoxigenin으로 반응시킨 후 chemiluminescence(CSPD)로 탐지해내었다. 즉, membrane을 세척완충액(washing buffer 2: 0.1% maleic acid, 0.15 M NaCl, 0.3% Tween 20, pH7.5)에서 1-5분간 세척하고, 100ml blocking 용액( 1% blocking reagent, 0.1% maleic acid, 0.15 M NaCl, pH 7.5)에서 30분간 방치한 후 20ml의 항체용액(antibody solution : 완충액에서 1:10000으로 희석하여 75mU/ml로 만든 anti-DIG-AP 중합체)에서 30분간 방치하였다. 그후 membrane을 1-2 ml CSPD(Disodium3-{4-methoxyspiro[1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chlro)tricyclo<3.3.1.13,>>decan]-4-yl} phenyl phosphate, Boehringer Mannheim, Germany}}를 탐지용액에서 1:100으로 희석한 것 )용액에서 5분간 방치한 후 뒤 membrane을 Whatman 3MM paper상에서 물기를 제거하되 완전 탈수상태가 되지 않도록 하였다. membrane을 37 °C에서 5-15분간 방치한 후 실온에서 membrane을 X-ray에 노출시켜 감광된 것을, 사용한 소식자로 탐지해 낼 수 있는 세균이 존재하는 것으로 간주하여 결과를 처리하였다. 각 소식자는 매회 한가지씩만 사용하였으며 사용한 소식자는 소식자 제거용액( stripping solution:0.2 M NaOH, 0.1% SDS )을 사용하여 37°C에서



15분간 2회 세척하고 2xSSC를 사용하여 제거한 뒤 다음 소식자를 사용하여 보합 결합을 진행하였다.

## 6) 통계 분석 방법

여러 군들 가운데서 각 세균종의 유의성있는 차이를 알아내기 위해 Chi-square 검정과 Fisher's exact test를 시행하였고, 집단 내에서의 질환부위와 비 질환부위 간의 비교에는  $p < 0.01$ , 두 집단 간의 비교에서는  $p < 0.05$ 를 유의한 수준으로 평가하였다.

Table 1. Specific oligonucleotide probes used for dot-blot hybridization

Bacteria	Sequence(5'-3') of probes	hybridization temperature(°C)
<i>P. gingivalis</i>	TACTCGTATCGCCCGTTATTC	63
<i>P. intermedia</i>	GGTCCTTATTCGAAGGGTAAATGC	60
<i>P. nigrescens</i>	ATGAGGTACATGCAATGGCGCACA	60

### III. 연구결과

만성 치주염(Chronic Periodontitis:CP)으로 진단된 환자와 급속 파괴성 치주염(Aggressive Periodontitis:AP) 환자 각 30명의 300개 치아중 만성 치주염으로 진단된 질환부위(치주낭 깊이 $\geq$ 6 mm)를 CP군(n=120), 비질환부위(치주낭 깊이 $\leq$ 3 mm)를 N-CP군(n=30)으로 분류하였고, 급속 파괴성 치주염으로 진단된 질환부위(치주낭 깊이 $\geq$ 6 mm)를 AP군(n=120), 비질환부위(치주낭 깊이 $\leq$ 3 mm)를 N-AP군(n=30)으로 각각 분류하였다.

흑색색소형성 *Bacteroides*( *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*)의 세균분포도는 *P. gingivalis*가 CP군에서 98.33%, AP군에서 94.17%를 보였으며 *P. intermedia*는 CP군에서 77.50%, AP군에서는 64.17%를 보였고, *P. nigrescens*는 CP군에서 35.00%, AP군에서 29.17%를 각각 나타내었다(Table 2, Figure 1).

CP군과 N-CP군에서의 세균분포도는 *P. gingivalis*가 각각 98.33%, 43.33%를 보였으며, *P. intermedia*는 각각 77.50%, 10.00%를 , *P. nigrescens*는 각각 35.00%, 3.33%를 나타내었다(Table 3, Figure 2).

AP군과 N-AP군에서의 세균분포도는 *P. gingivalis*는 각각 94.17%, 50.00%를 보였으며, *P. intermedia*는 각각 64.17%, 23.33%를 나타내었고, *P. nigrescens*는 각각 29.17%, 23.33%를 나타내었다(Table 4, Figure 3).

N-CP군과 N-AP군에서의 세균분포도는 *P. gingivalis*는 각각 43.33%, 50.00%를 보였으며, *P. intermedia*는 각각 10.00%, 23.33%를 나타내었고, *P. nigrescens*는 각각 3.33%, 23.33%를 나타내었다(Table 5, Figure 4).

3종류의 세균 모두에서 비질환부위보다 질환부위에서 더 높은 세균 분포도를 보였다. CP와 N-CP간의 비교에서는 세가지 세균종 모두에서 질환부위가 더 높은

세균 분포도를 나타내었다( $p < 0.01$ ). AP와 N-AP 간의 비교에서는 *P. gingivalis*와 *P. intermedia*에서 유의성 있는 차이를 보였으나, *P. nigrescens*에서는 질환부위가 비질환부위에 비해 다소 높은 세균분포도를 보였으나, 유의성 있는 차이를 보이지는 않았다. CP와 AP간의 비교에서는 세균중 유일하게 *P. intermedia*만이 유의성 있는 차이를 보였다( $p < 0.05$ ). N-CP와 N-AP간의 비교에서는 세가지 세균모두에서 유의성 있는 차이를 보이지 않았다.

Table 2. Distribution of black-pigmented *Bacteroides* in CP and AP detected by 16S rRNA gene analysis

<i>Bacteria</i>	Distribution (%)			
	CP (n=120)		AP(n=120)	
	n	%	n	%
<i>P. gingivalis</i>	118	98.33	113	94.17
* <i>P. intermedia</i>	93	77.50	77	64.17
<i>P. nigrescens</i>	42	35.00	35	29.17

\* Statistically significant difference,  $p < 0.05$

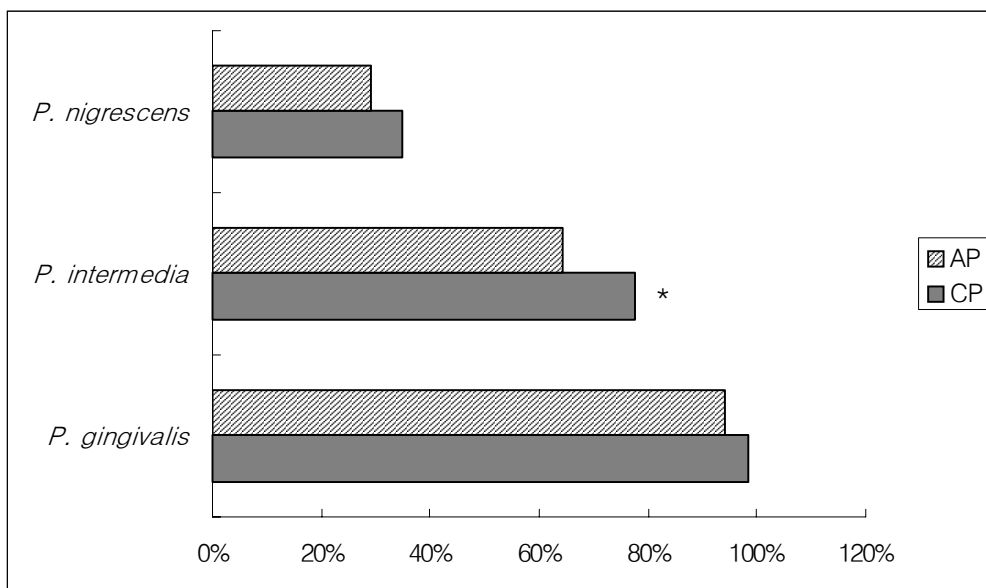


Figure 1. Distribution of black-pigmented *Bacteroides* in CP and AP detected by 16S rRNA gene analysis

\* Statistically significant difference,  $p < 0.05$

Table 3. Distribution of black-pigmented *Bacteroides* in CP detected by 16S rRNA gene analysis

<i>Bacteria</i>	Distribution (%)			
	CP (n=120)		control(N-CP) (n=30)	
	n	%	n	%
* <i>P. gingivalis</i>	118	98.33	13	43.33
* <i>P. intermedia</i>	93	77.50	3	10.00
* <i>P. nigrescens</i>	42	35.00	1	3.33

\* Statistically significant difference,  $p < 0.01$

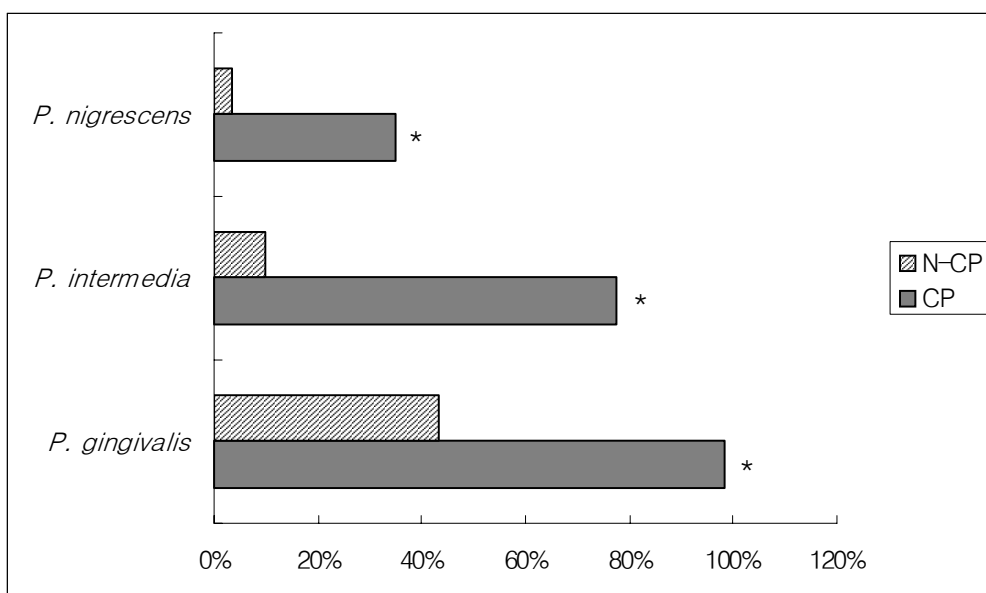


Figure 2. Distribution of black-pigmented *Bacteroides* in CP detected by 16S rRNA gene analysis(\* Statistically significant difference,  $p < 0.01$ )

Table 4. Distribution of black-pigmented *Bacteroides* in AP detected by 16S rRNA gene analysis

<i>Bacteria</i>	Distribution (%)			
	AP (n=120)		control(N-AP) (n=30)	
	n	%	n	%
* <i>P. gingivalis</i>	113	94.17	15	50.00
* <i>P. intermedia</i>	77	64.17	7	23.33
<i>P. nigrescens</i>	35	29.17	7	23.33

\* Statistically significant difference,  $p < 0.01$

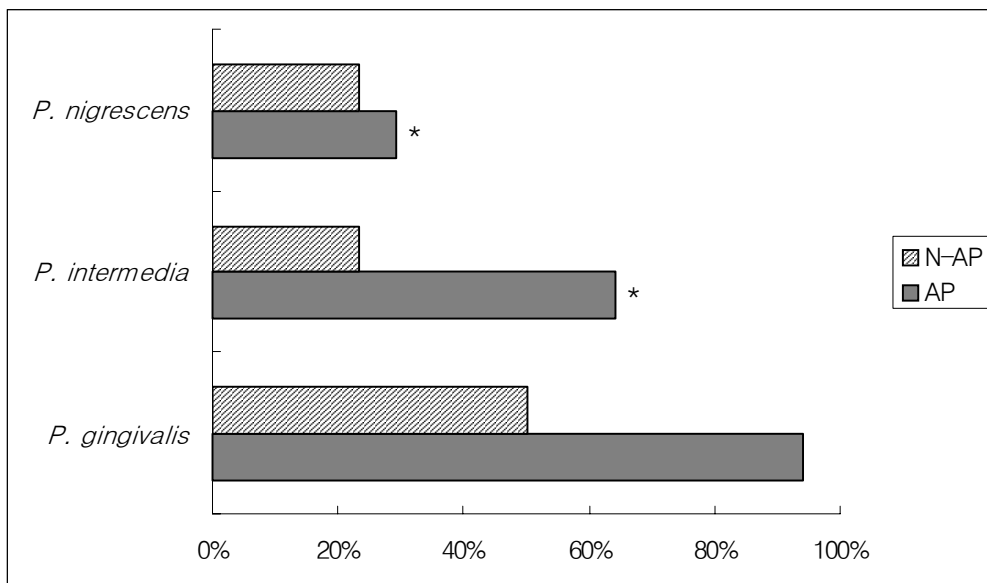


Figure 3. Distribution of black-pigmented *Bacteroides* in AP detected by 16S rRNA gene analysis(\* Statistically significant difference,  $p < 0.01$ )

Table 5. Distribution of black-pigmented *Bacteroides* in N-CP and N-AP detected by 16S rRNA gene analysis

<i>Bacteria</i>	Distribution (%)			
	N-CP (n=30)		N-AP(n=30)	
	n	%	n	%
<i>P. gingivalis</i>	13	43.33	15	50.00
<i>P. intermedia</i>	3	10.00	7	23.33
<i>P. nigrescens</i>	1	3.33	7	23.33

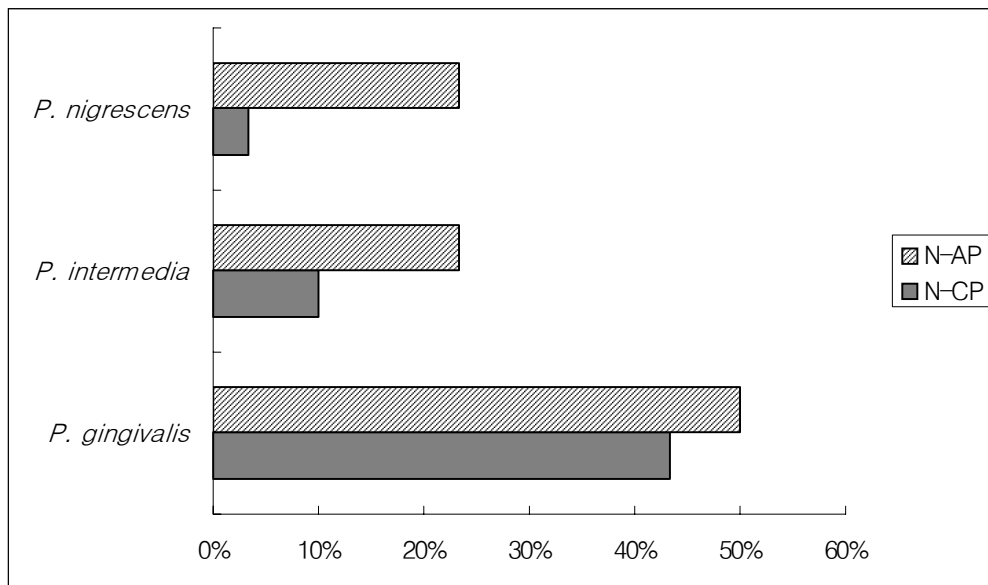


Figure 4. Distribution of black-pigmented *Bacteroides* in N-CP and N-AP detected by 16S rRNA gene analysis

## IV. 총괄 및 고찰

본 연구에서는 만성 치주염과 급속 파괴성 치주염에서의 흑색색소 형성 *Bacteroides* 분포도를 비교하고자 16S rRNA 유전자의 PCR 및 PCR 산물의 dot-blot hybridization 방법을 사용하여 알아보았다. 본 연구의 대상이 된 흑색색소 형성 *Bacteroides*는 혈액 한천 배지 상에서 갈색 또는 검은 군집을 이루며<sup>19)</sup> 처음에는 단일종인 *Bacterium melaninogenicum*으로 그룹되었다<sup>4)</sup>. 1970년대 후반에는 비 당분해성인 세균종과 중증도의 탄수화물 발효성을 갖는 세균 혹은 높은 당 분해성을 지닌 세균을 포함한다는 것을 알게되었다. 이전까지 흑색 색소 형성 *Bacteroides*는 genus *Bacteroides*내에서 분류되었으나 Shah와 Collins는 다음과 같은 3가지 genera로 나눌 것을 제안하였다; 1) saccharolytic, non-pigmenting species로 구성된 *Bacteroides* ( e.g. *B. fragilis* ), 2) assaccharolytic, black-pigmenting species로 구성된 *Porphyromonas* ( e.g. *P. gingivalis* ), 3) saccharolytic, black-pigmenting로 구성되는 *Prevotella* ( e.g. *P. intermedia* ). 모든 *Porphyromonas* species와 6종류의 *Prevotella* species는 protoporphyrin 및 protoheme으로 이루어지는 갈색 혹은 흑색 pigment를 만들어낸다<sup>39)</sup>.

Tanner<sup>34)</sup>등은 치은열구내 감수성 연구에서 여러종류의 흑색 색소 형성 *Bacteroides*가 관여한다고 보고하였다. 흑색 색소 형성 *Bacteroides*중 구강내에 나타나는 종류로는 *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. melaninogenicus*, *P. loeschii*, *P. levii*등이 있으며, 이중 치주질환과 직접적으로 많은 관련이 있는 세균은 *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. melaninogenicus* 등이다<sup>18)</sup>. 이들 흑색 색소 형성 *Bacteroides*의 lipopolysaccharide는 다형핵 백혈구의 화학주성에 관여하는 보체를 활성화시키는 작용을 하나 협막은 이러한 보체활성 작용을 안하며 다형핵 백혈구의 탐식작용을 저해하는 역할을 한다. 또한, superoxide dismutase를 분비함으로써 다형핵 백혈구가 균 탐식시 만들어내는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 superoxide anion을 파괴시킴으로



서 이런 산소의존형 세포내 살균력을 무력화시킨다. 또한 이들 흑색 색소 형성 *Bacteroides*는 IgG 및 IgA를 파괴시키는 protease를 분비한다. 또한 이 균의 lipopolysaccharide는 골흡수에 관여하며 세포체의 phospholipaseA를 생산함으로써 이것이 prostaglandin 전단계 물질을 만드는데 도움을 주게된다. 또한 강한 acid 및 alkaline phosphatase를 분비하여 골흡수에 관여한다<sup>28)</sup>.

*P. gingivalis*는 그람음성, 혐기성, 비운동성, 비 당분해성의 간균으로 성공적으로 치유된 부위에서는 그 수가 줄어들지만 치료 후에 재발된 부위에서 자주 발견된다<sup>3,9,40)</sup>. *P. gingivalis*는 급속 진행형 및 난치성 치주염에 깊이 관여하는 독성이 강한 세균으로써 이 균을 동물에 접종시키면 침투성, 확산성의 궤양을 발생시키며 자당 비 분해성 세균으로 collagenase, protease를 분비하고 높은 gelatinase활성을 나타낸다. 또한, collagen, azocoll, casein등의 파괴를 동반하며 강한 trypsin 유사 효소활성을 보이며 강한 fibrinolysis를 일으키는 fibrinolysin을 분비한다. 이들 세균은 대사산물로 세포독성 물질인 hydrogen sulfide, ammonia, indole 및 지방산을 만들며 이들이 분비하는 protease는 IgG 및 IgA를 파괴한다. 만성 치주염 및 급속 파괴성 치주염 환자의 혈청 및 타액 내에서 이 균에 대한 높은 항체역가를 나타내고 있으며 정상인이나 다른 치주 질환 환자의 경우 매우 낮은 항체 역가를 나타낸다. 또한 이 세균의 lipopolysaccharide는 단핵의 interleukin-1의 생산을 유도하는 바 이는 파골 세포에 의한 골 흡수에 관여함을 알 수 있으며 치주 질환의 다양한 형태를 보이는 환자의 전신적 혹은 국소적 면역 반응을 유도한다<sup>13)</sup>.

*P. intermedia*는 그람음성으로 짧고 끝이 둥근 혐기성 간균으로 숫자가 급성 괴사성 궤양성 치은염과 일부 치주염에서 특히 증가한다. 이 종에 대한 혈청항체가 일부 난치성 치주염 환자에서 관찰됨이 보고되었다<sup>10)</sup>. 이 세균은 자당 분해성 세균으로서 이 균을 동물에 접종시킬 때 국소적 궤양을 유발하며 약하거나 변화성있는 fibrinolysis를 일으키는 fibrinolysin을 분비하며 중증도의 gelatinase 활성을 보이고 있다. 동일한 표현형을 갖는 *P. intermedia*종은 *P. intermedia*와 *P. nigrescens*의 두 종류로 분리되었다<sup>27)</sup>. 이러한 2종의 타종세균에 의한 자료가 혼합될 수 있어서 초기 연구가 해석되기 어려웠다.

*P. nigrescens*는 1992년 Shah와 Gharbia의 연구<sup>27)</sup>에 의해 *P. intermedia*로부

터 독립 분류되었고, 그람 음성, 혐기성 간균으로 Broth culture상에서 0.3- 0.7 $\mu$ m의 폭에 1- 2  $\mu$ m깊이까지 자란다. 혈액 한천 배지에서 3일간 자란 집락은 0.5- 2 mm의 직경에 원형이고 low convex하며 갈색 또는 흑색을 나타낸다. Pigmentation은 colony의 주변부에서 주로 나타나고 중심부는 크림색 또는 암갈색을 띤다.

이번 실험에 사용된 16S rRNA 분석법은 김 등<sup>45)</sup> 및 박 등<sup>46)</sup>의 연구에서 세균동정방법으로서의 유용성이 강조된 바 있으며, 이외의 세균동정방법으로는 현미경 관찰법, 배양법, 면역학적 분석법, 효소 이용법, DNA probes 이용법 등을 들 수 있다. 16S rRNA 분석방법은 높은 정도의 유전적, 형태적 유사성을 보이는 세균들을 분류 및 분석하는 방법으로서 가치가 있다<sup>23,45,46)</sup>. 본 연구의 대상이 된 두 균주 *P. intermedia*와 *P. nigrescens*는 16S rRNA유전자에서 94%의 유사도와 6.6%의 차이를 보이는데<sup>22)</sup> 전통적인 다른 세균동정방법으로는 이들을 구별하기 어려운 점이 있다. 16S rRNA 분석방법을 통해서는 교차반응없이 두 균종을 구별할 수 있었다<sup>23,29)</sup>.

Conrads<sup>5)</sup>등에 의하면 건강한 상태의 치주표지인자(marker)로서의 *P. nigrescens*를 언급하였으며, 본 실험에서는 급속파괴성 치주염의 대조군에서 실험군과 통계학적으로 유의성없는 차이를 보여 Conrads의 의견과 다소 일치하는 결과를 보였지만, 만성 치주염에서는 이와는 상반된 결과를 보였다.

치주 질환의 분류는 여러 측면에서 분류될 수 있으며, 보는 관점에 따라서 다르게 분류된다. 여러 가지 분류법이 있지만 치주질환을 그 발병연령, 치주낭내 세균의 종류와 분포 상태, 백혈구의 기능, 혈청내 항체, 임상 및 방사선 사진 소견, 그 진행과정과 병력을 근거로 Page와 Schröder<sup>20)</sup>는 치주염을 사춘기전 치주염, 유년성 치주염, 급속진행형 치주염과 성인성 치주염으로 분류하였다. 유년성 치주염은 다시 국소적 유년성 치주염과 전신적 유년성 치주염으로 구분되고 있다. 이상의 분류방식에서 발병나이를 기준으로 한 분류법의 한계점 및 문제점이 제기되어 1999년 새로운 치주질환의 분류법이 제시되었다<sup>1,38)</sup>. 기존의 성인성 치주염대신 만성 치주염으로, 조기 이환 치주염대신 급속 파괴성 치주염(Aggressive periodontitis)으로 대체되었다<sup>1)</sup>. 만성 치주염과 급속 파괴성 치주염에서 각각 국소

적 형태와 전반적 형태로 구분되어진다.

실험결과에서 흑색색소형성 *Bacteroides*(*P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*)의 세균분포도를 비교해 본 결과는 *P. gingivalis*가 CP군에서 98.33%, AP군에서 94.17%를 보였으며 *P. intermedia*는 CP군에서 77.50%, AP군에서는 64.17%를 보였고, *P. nigrescens*는 CP군에서 35.00%, AP군에서 29.17%를 각각 나타내었다. 세균종중 *P. intermedia*에서만 만성 치주염과 급속 파괴성 치주염간의 세균 분포도상의 통계학적 유의성 있는 차이를 보였다( $p < 0.05$ ). 이는 이전 2000년 이 등의 연구<sup>47)</sup>의 결과와는 다소 다른 결과를 보이는 것으로, 이등<sup>47)</sup>의 연구에서는 급속 파괴성 치주염과 만성치주염의 7가지 세균(*Treponema*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *Fusobacterium*, *Bacteroides forsythus*, *P. intermedia*, *Peptostreptococcus micros*)의 비교에서 세균 분포간의 차이를 확인하지 못하였다. 본 연구에서도 *P. gingivalis*와 *P. nigrescens*의 경우는 유의성 있는 차이를 보이지 않았다. 본 연구에서 *P. intermedia*의 비교 결과가 다소 상이한 결과가 나온 이유로 생각해 볼 수 있는 점은 첫째, 증폭하는 실험 과정중 cross-hybridization이 일어났거나 둘째, 집단 선정의 차이점을 들 수 있다.

질환부위와 비질환부위간의 비교에서 CP군과 N-CP군에서의 세균분포도는 *P. gingivalis*가 각각 98.33%, 43.33%를 보였으며, *P. intermedia*는 각각 77.50%, 10.00%를 , *P. nigrescens*는 각각 35.00%, 3.33%를 나타내었다. AP군과 N-AP군에서의 세균분포도는 *P. gingivalis*는 각각 94.17%, 50.00%를 보였으며, *P. intermedia*는 각각 64.17%, 23.33%를 나타내었고, *P. nigrescens*는 각각 29.17%, 23.33%를 나타내었다. 만성 치주염과 급속 파괴성 치주염 모두에서 질환부위가 비질환 부위에 비해 높은 세균분포도를 보였으며( $p < 0.01$ ), 이중 AP군의 *P. nigrescens*의 경우 질환부위와 비질환부위 간의 세균 분포도 차이가 적었으며, 유의성 있는 차이를 보이지 못했다( $p < 0.01$ ). 이는 실험도중 다른 세균간의 교차반응의 가능성 및 실제 *P. nigrescens*가 AP군의 비질환부위(N-AP)에 상대적으로 많이 존재하여 나타난 결과로 추정된다. 반면 만성 치주염의 질환부위와 비질환부위의 분포도비교에서 *P. nigrescens*의 분포도 결과가 분명하게 차이를 보였다. 과

거 *P. intermedia* 와 구분이 어려웠던 *P. nigrescens*는 본 실험 결과 만성 치주염에서는 비질환부위에서 낮은 분포도를 보이며, 반면 급속 파괴성 치주염에서는 질환부위여부와 관계없이 상대적으로 높은 분포도를 보였다.

이번 실험을 통해 세균동정방법중 유용한 16S rRNA 분석법을 이용하여 분리하기 힘든 *P. intermedia*와 *P. nigrescens*의 세균분포도를 조사하였으며, 만성 치주염과 급속 파괴성 치주염간의 세균분포도를 비교 확인하였다. 또한 *P. nigrescens*의 분포도상의 특이함을 확인하였다. 만성 치주염과 급속 파괴성 치주염의 세균 분포도 비교시 *P. gingivalis*와 *P. nigrescens*의 경우 세균 분포도의 차이를 보이지 않았으며, 이는 치주 질환 비교시 세균의 차이는 중요한 요인으로 작용하지 못하는 것으로, 치주 질환의 특성상 숙주와 세균간의 상호작용, 숙주의 면역학적 요인, 세균자체의 subtype의 다양성, 이의 균주등 다양한 요인들이 작용할 것으로 추정된다. 반면 두 질환간의 차이를 보인 *P. intermedia*의 경우는 좀더 많은 연구가 필요하리라 생각된다. 또한, 이전의 연구<sup>5)</sup>에서 건강한 치주조직의 표시인자로 언급된 *P. nigrescens*의 역할에 대한 연구가 요망되며, 본 연구에서는 만성 치주염과 비교하여 급속 파괴성 치주염에서 *P. nigrescens*의 상이한 분포도 차이를 확인하였다. 급속 파괴성 치주염의 분류와 관련되어 실제 임상적 진단이 중심이 된 분류의 한계점이 인식되며, 이에 대한 좀더 명확한 진단 및 분류법이 요망된다고 할 수 있다. 이는 급속 파괴성 치주염의 경우 만성 치주염과는 다른 질환의 진행을 보여 좀 더 빠른 처치가 요망되기 때문이다. 세균동정방법이 급속 파괴성 치주염의 좀 더 빠른 진단의 한 방법으로 제안될 수 있을 것이다.

본 연구결과를 바탕으로 좀 더 다양한 세균에서의 만성 치주염과 급속 파괴성 치주염의 세균 분포도 비교에 대한 연구와 *P. nigrescens*의 치주질환에서의 역할에 대한 고찰이 필요하리라 사료된다. 또한 국가간이나 인종간의 세균분포도 비교 연구가 이루어진다면 한국인과 다른 인종간의 치주질환을 비교 연구하는데 도움이 되리라 사료된다.

## V. 결론

만성 치주염과 급속 파괴성 치주염에서의 흑색색소 형성 *Bacteroides* 세균( *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*) 의 분포도를 비교하고자 16S rRNA 유전자의 PCR 및 PCR 산물의 dot-blot hybridization 방법을 사용하였다. 만성 치주염으로 진단된 환자 30명과 급속 파괴성 치주염으로 진단된 30명에서 각각 질환부위 (치주낭 깊이  $\geq 6$  mm) 4개 치아, 비질환부위 (치주낭 깊이  $\leq 3$  mm) 1개 치아를 선택하여 만성 치주염 질환부위를 CP군(n=120)으로, 만성 치주염 비질환부위를 N-CP군(n=30)으로, 급속 파괴성 치주염 질환부위를 AP군(n=120)으로, 급속 파괴성 치주염 비질환부위를 N-AP군(n=30)으로 분류하여 3가지 세균의 분포도를 알아본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. CP군, AP군에서 세균들의 분포도를 살펴보면 *P. gingivalis*는 각각 98.33%, 94.17%를 보였으며, *P. intermedia*는 77.50%, 64.17%, *P. nigrescens*는 35.00%, 29.17%를 각각 나타내었다.

세 종류 세균들 모두에서 CP군이 AP군에 비해 더 높은 세균분포도를 나타내었으나, *P. intermedia*의 경우에서만 통계적 유의성있는 차이를 보였다( $p < 0.05$ ).

2. CP군과 N-CP군에서 세균분포도를 살펴보면 *P. gingivalis*는 각각 98.33%, 43.33%를 보였으며, *P. intermedia*는 77.50%, 10.00%, *P. nigrescens*는 35.00%, 3.33%를 각각 나타내었다.

세 종류 세균들 모두에서 질환부위가 비질환부위에 비해 더 높은 세균분포도를 보였으며, 통계적 유의성있는 차이를 보였다( $p < 0.01$ ).

3. AP군과 N-AP군에서 세균분포도를 살펴보면 *P. gingivalis*는 각각 94.17%, 50.00%를 보였으며, *P. intermedia*는 64.17%, 23.33%, *P. nigrescens*는 29.17%, 23.33%를 각각 나타내었다. 세 종류의 세균들 모두에서 질환부위가 비질환부위에 비해 더 높은 세균 분포도를 보였으나, *P. gingivalis*와 *P. intermedia*의 경우에서만 통계적 유의성있는 차이는 보였다( $p < 0.01$ ).

4. N-CP군과 N-AP군에서 세균분포도를 살펴보면 *P. gingivalis*는 각각 43.33%, 50.00%를 보였으며, *P. intermedia*는 10.00%, 23.33%, *P. nigrescens*는 3.33%, 23.33%를 각각 나타내었다. N-CP군에 비해 N-AP군의 세균분포도가 높았으나 통계적 유의성있는 차이를 보이지는 않았다.

이상의 결과에서 볼 때 만성 치주염과 급속 파괴성 치주염에서 흑색색소 형성 세균들 간의 세균분포도 차이는 없는 것으로 사료되며, 통계적 유의성 있는 차이를 보인 *P. intermedia*와 급속 파괴성 치주염간의 좀 더 많은 연구가 요망되리라 사료된다.

또한 급속 파괴성 치주염의 비 질환부위에서 비교적 많은 분포도를 보인 *P. nigrescens*의 역할에 대한 이후의 연구가 진행되어야 할 것이다.

## 참 고 문 헌

1. Armitage GC: Development of a classification system for periodontal disease and conditions. *Ann Periodontol* 4:1-6,1999.
2. Ashimoto, A., Chen, C., Baker, I., Slot, J.: Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions, *Oral Microbiol Immunol.* 11 : 266-273, 1996.
3. Bragd L, Dahlen G, Wikstrom M, Slots J: The capability of *Actinobacillus actinomycetecomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* to indicate progressive periodontitis; a retrospective study. *J Clin Periodontol* 14 : 95, 1987.
4. Burdon KL: *Bacterium melaninogenicum* from normal and pathologic tissues. *J Infect Dis* 42 : 161, 1982.
5. Conrads, G., Mutters, R., Fischer, J., Brauner, A., Lutticken, R., Lampert, F., : PCR and dot-hybridization to monitor the distribution of oral pathogens within plaque samples of periodontally healthy individuals, *J Periodontol* 67 : 994-1003, 1996.
6. Dzink JL., Tanner A.C.R., Haffajee A.D., Socransky S.S. : Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions, *J Clin Periodontol* 12 : 648-659, 1983.
7. Ebersole J.L., Taubman M.A., Smith D.J., Frey D.E.: Human immune responses to oral microorganisms: patterns of systemic antibody levels to *Bacteroides* species, *Infect and Immun* 51 : 507-513, 1986.
8. Gharbia S.E., Haapasalo M., Shah H.N.: Characterization of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates from periodontic and

- endodontic infections. *J Periodontol* 65 : 56-61, 1994.
9. Haffajee AD, Dzink JL, Socransky SS: Effect of modified Widman flap surgery and systemic tetracycline on the subgingival microbiota of periodontal lesions. *J Clin periodontol* 15 : 255, 1988a.
  10. Haffajee A.D., Socransky S.S., Dzink J.L., Taubman M.A., Ebersole J.L.: Clinical, microbiological and immunological features of subjects with refractory periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 15 : 390, 1988b.
  11. Löe H, Theilade E, Jesnsen SB : Experimental gingivitis in man. *J Periodontol* 36 : 177. 1965.
  12. Lovdal, A., Arno, A. and Waerhaug, J. : Incidence of clinical manifestations of periodontal disease in light of oral hygiene and calculus formation. *J Am Dent Assoc* 56 : 21-33, 1958.
  13. Mahanonda R, Seymour GJ, Powell LW, Good MF, Halliday JW: Effect of initial treatment of chronic inflammatory periodontal disease on the frequency of peripheral blood T-lymphocytes specific to periodontopathic bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 6 : 221. 1991.
  14. McBride BC, van der Hoeven JS: Role of interbacterial adherence in colonization of the oral cavities of gnotobiotic rats infected with *Streptococcus mutans* and veilonella alcalescence. *Infect Immun* 33 : 467, 1981.
  15. Moore WC : Microbiology of periodontal disease. *J Periodont Res* 22 : 335. 1987.
  16. Moore W.E.C.: Rapid identification of important periodontal micro-organism by cultivation, *Oral Microbiol Immunol* 1 : 56, 1986.
  17. Moore W.E.C., Moore L.H., Ranney R.R., Simbert R.M., Burneister J.A., Schenkein H.A. : The microflora of periodontal sites showing active destructive progression, *J Clin Periodontol* 18 : 729-739, 1991.
  18. Nakamura. T., Fujimura, s., Okata, N. and Yamazaki, N: Bacteriocin-like



- substance(melaninocin) from oral *Bacteroides melaninogenicus*. *Infect Immun* 31 : 28, 1981.
19. Oliver WW, Wherry WB: Notes on some bacterial parasites of the human mucous membranes. *J Infect Dis* 28 : 341, 1921.
  20. Page R. C., Schroeder, H.E.: Periodontitis in man and other animals. Karger. 8, 222. 1982.
  21. Pamela JB, Rondi B, Ulf M.E. Wikesjo: Bacterial sampling by absorbent paper points. an in vitro study. *J Periodonto*. 62 : 142-146, 1991.
  22. Paster B.J., Pewhirst F.E., Fraser G: Phylogeny of *Bacteroides*, *Prevotella*, and *Porphyromonas spp*, and related bacteria, *J Bacteriol* 176 : 725-732, 1994
  23. Relman D.A.: The identification of uncultured microbial pathogens, *J Infect Dis* 168 : 1-8, 1993.
  24. Russel AL : Epidemiology of periodontal disease. *Int Dent J* 17:282, 1967
  25. Schei O, Waehaug J, Lovdal A, Aron A.: Alveolar bone loss as related to oral hygiene and age. *J Periodontol* 30 : 7, 1959.
  26. Schmidt T., Relman D.A. :Phylogenetic identification of uncultured pathogens using ribosomal RNA sequences, *Methods. Enzymol* 235 : 205-222, 1994.
  27. Shah H.N., Gharbia S.E., : Biochemical and chemical studies on strains designated *Prevotella intermedia* and proposal of a new pigmented species, *Prevotella nigrescens* sp. *Int J Systematic Bacteriol* 42 : 542, 1992.
  28. Slots, Genco RJ :Black pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species and *Actinbacillus actinmytecemcomitans* in human periodontal disease;Virulence factor in colonization, survival and tissue destruction. *J Dent Res* 63:412,1984.
  29. Slots J., Ashimoto A., Flynn M.J., Li G., Chen C., : Dectection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA

- amplification with the polymerase chain reaction, *Clin Infect Dis* 20(suppl2) : s304-307, 1995.
30. Socransky SS, Gibbons RJ, Dale AC.: The microbiota of the gingival crevice area of man total microscopic and viable counts of specific microorganism. *Arch. Oral Biol* 8 : 275, 1953.
  31. Socransky S.S., Haffajee A.D. : The bacterial etiology of destructive periodontal diseases- current concepts, *J Periodontol* 63 : 322-331, 1992.
  32. Socransky S.S., Haffajee A.D.: Microbiological risk factors for destructive periodontal diseases. In: Bader JD, ed. Risk assessment in dentistry. Chapel Hill; University of North Carolina Dental Ecology, 79-90, 1990.
  33. Suzuki J.B.: Diagnosis and classification of the periodontal diseases, *Dent. Clin North Am* 1988.
  34. Tanner A, Maiden MEJ., Paster B.J., Dewhirst E.E.: The impact of 16S ribosomal RNA-based phylogeny on the taxonomy of oral bacteria. In : Socransky SS, Haffajee AD, eds. Microbiology and immunology of periodontal diseases. *Periodontol* 2000 5 : 26, 1994.
  35. Tanner A.C.R., Haffer C., Bratthall G.T., Visconti R.A., Socransky S.S. : A study of bacteria associated with advancing periodontitis in man, *J Clin Periodontol* 6 : 278-307, 1979.
  36. Tanner A.C.R., Socransky S.S. and Goodson J. : Microbiota of periodontal pockets losing crestal alveolar bone, *J Periodont Res* 19 : 279-291, 1984
  37. The American Academy of Periodontology : Proceedings of the World Workshop in Clinical periodontics. Chicago I-23/I-31. 1989.
  38. The American Academy of Periodontology: 1999 International Workshop for a classification of Periodontal Diseases and Conditions. 1992.
  39. Van Winkelhoff A.J. : Black-pigmented *Bacteroides* in human oral diseases. Amsterdam: Free University Press. 1986.

40. Van Winkelhoff AJ, van der Velden U, de Graaff J: Microbial succession in recolonizing deep periodontal pockets after a single course of supra- and subgingival debridement. *J Clin Periodontol* 15 : 116, 1988
41. Wolff L.F., Liljemak W.F., Bloomquist C.G., Pihlstrom B.L, Schaffer E.M., and Bandt C.L. : The distribution of *A. actinomycetemcomitans* in human plaque, *J Periodont Res* 20 : 237-250, 1985
42. Wolff L.F., Liljemark W.F., Pihlstrom B.L., Schaffer E.M., Aeppli D.M., Bandt C.L.: Dark-pigmented *Bacteroides* species in subgingival plaque of adult patients on a rigorous recall program, *J Periodont Res* 23 : 170-174, 1988.
43. Zamborn J.J., Haraszthy V.I., Hariharan G., Lally E.T., Demuth D.R. The microbiology of early-onset periodontitis: Association of highly toxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains with localized juvenile periodontitis, *J Periodontol* 67 : 282-290, 1996.
44. 김진홍, 최봉규, 최성호, 조규성, 채중규, 김종관: 급속 진행형 치주염 환자로 부터 배양 분리한 *Porphyromonas gingivalis* 균주의 ribotyping, 대한 치주학회지, 29 : 963-977, 1999.
45. 김혜현, 최봉규, 최성호, 채중규, 김종관, 조규성: 한국인 성인성 치주염 환자에서 구강 스피로헤타의 분포, 대한 치주과 학회지, 28 : 659-675, 1998.
46. 박성희, 김소영, 최성호, 채중규, 김종관, 조규성: 한국인 성인성 치주염 환자에서 16S rRNA 분석을 이용한 치은연하치태 세균 분포도 조사, 대한 치주과 학회지, 28 : 691-701, 1998.
47. 이정옥, 최봉규, 유윤정, 최성호, 조규성, 채중규, 김종관: 한국인 급속 진행성 치주염 환자에서 16S ribosomal RNA 분석을 이용한 치주병원균 분포, *J Periodontol* 74:1329-1335, 2003.

## **ABSTRACT**

Comparison of Black-pigmented *Bacteroides* using 16S rRNA analysis between Chronic periodontitis and Aggressive Periodontitis

**Chul Woo Shin, D.D.S.**

Department of Dental science, Graduate School, Yonsei University

(Directed by Prof. Kyoo Sung Cho, D.D.S.,M.S.D.,PhD.)

The purpose of the research is to compare the distribution of Black-pigmented *Bacteroides* between Chronic Periodontitis and Aggressive Periodontitis.

*P. gingivalis*, *P. intermedia* and *P. nigrescens* were examined in order to evaluate their distribution in patients with Chronic Periodontitis(CP) and Aggressive Periodontitis(AP).

PCR and dot-blot hybridization of 16S rRNA gene were used to compare bacterial distribution of two groups - CP group and AP group, which were divided into two subgroups. Subgingival plaque taken from the diseased sites(pocket depth  $\geq 6$  mm) and healthy sites(pocket depth  $\leq 3$  mm) were grouped into the experimental group and the control group.

The result are as follows ;

1. The distribution of *P. gingivalis* was 98.33% for chronic Periodontitis(CP), 94.17% for Aggressive Periodontitis(AP), the distribution of *P. intermedia* was 77.50% for CP, 64.17% for AP, and the distribution of *P. nigrescens* was 35.00%, 29.17%.

In all 3 types of bacteria, CP group showed higher distribution compared to AP group, but only *P. intermedia* showed statistically significant difference.

2. In the case of CP, every type of bacteria showed higher distribution in the experimental group with statistically significant difference.

3. In the case of AP, every type of bacteria also showed higher distribution in the experimental group, but *P. gingivalis* and *P. intermedia* showed the result with statistically significant difference, and the other did not

4. In 3 all bacteria type, N-AP showed higher distribution than N-CP without statistically significant difference

These results suggest that the comparison of the distribution of *Bacteroides* between Chronic Periodontitis and Aggressive Periodontitis has no statistically significant difference, except *P. intermedia*.

---

Key words: *Bacteroides*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, 16S rRNA, Chronic Periodontitis, Aggressive Periodontitis