

한국인 급성진행성 및 성인성 치주염의 원인균인 *Bacteroides gingivalis*에 대한 미생물 및 면역학적 연구

서울대학교 치과대학 및 치학연구소¹ · 전남대학교 치과대학²

정종평¹ · 이종훈¹ · 정현주²

— Abstract —

Microbiological and Immunological Investigation on the *Bacteroides gingivalis* in Rapidly Progressive and Adult Periodontitis in Korean

Chong-Pyoung Chung¹, Jong-Heun Lee¹, and Hyun-Ju Chung²

College of Dentistry, Seoul National University¹ and Dental Research Institute

College of Dentistry, Chun Nam National University²

For the investigation of microbiological and immunological specificity of *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides gingivalis* were isolated, enumerated and characterized from 13 Korean rapidly progressive periodontitis and 7 healthy control by anaerobic culture technique. The total proportion of black-pigmented *Bacteroides* from Korean R.P.P. patients and healthy control were 8.78% and 0.92%, respectively, among total isolated black-pigmented *Bacteroides*.

In antibiotic susceptibility test, *Bacteroides gingivalis* isolated from R.P.P. patients were sensitive to Ampicillin and Tetracycline, and resistant to Gentamicin and Erythromycin in disc diffusion method.

In antibiotic broth dilution method, the minimum inhibitory concentration(MIC) to *Bacteroides gingivalis* was 2 unit/ml of Penicillin and 0.25~1 μ g/ml of Tetracycline, respectively.

The concentration of serum IgG in rapidly progressive periodontitis patients were significantly higher than that of healthy control, and concentration of diluted gingival crevicular IgG has not any significant differences between two groups.

Serum and gingival crevicular IgG antibody to *Bacteroides gingivalis* were significantly higher titer in rapidly progressive periodontitis patients to compare with healthy control. The lipopolysaccharide profiles of 2 Korean *B. gingivalis* in silver stained sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis were similar to type strains of *B. gingivalis* and typical LPS band were appeared around the 24-Kd molecular weight.

Immunodiffusion test and immunoelectrophoresis of the L.P.S. extracted from 2 Korean *B. gingivalis* and 2 kinds of type strains of *B. gingivalis* showed that *B. gingivalis* Korean-1 was reacted identically to *B. gingivalis* ATCC 33277.

In trypsin and α -glucosidase activity test of 2 Korean *B. gingivalis*, both of them revealed positive trypsin and negative α -glucosidase activity, respectively.

These investigation suggested that *B. gingivalis* is important pathogenic plaque bacteria for the pathogenesis of periodontitis and further study is needed to purify and characterize of the species-specific antigens of this organisms to develop monoclonal antibody and potential diagnostic reagents.

Key Words: *Bacteroides gingivalis*-rapidly progressive periodontitis-Microbiology-Immunology.

* 본 논문은 1986년도 한국과학재단연구비에 의하여 이루어졌음.

치주질환중에서 20~30세에서 급성으로 광범위한 치주염증과 치조골 파괴와 더불어 치아상실을 가져오는 급성진행성 치주염과²⁰⁾ 40세 이후에 만성적으로 치주조직 파괴와 치아상실을 가져오는 성인성 치주염에 대한 미생물 및 면역학적인 최근의 연구결과 구강내 존재하는 세균중 black-pigmented *Bacteroides*가 가장 이질환과 밀접한 관계를 나타내고 있음이 밝혀졌다^{10, 20, 22, 28, 31, 41}.

black-pigmented *Bacteroides* 중 가장 생물학적 특성이 강한 균주로서 *Bacteroides gingivalis*는 비운동성, 비아세포성 Gram음성의 편형기성 세균이며, 혈액배지상에서 암적색 균집락을 보이는 것이 특징이다. 또한 당류를 발효시키지 않으며, 정상인의 치은열구내에서 보다는 급성진행성 및 성인성 치주염환자의 치주낭내에서 높은 발현빈도를 보이고 있다^{2, 30, 32, 36, 41}. 동물실험 결과 이 균주에 감염시 조직의 파괴가 급성진행성으로 일어나며, 궤양 및 괴저를 일으키며, phlegmonous abscess를 야기시키고^{30, 34}, 비장세포를 활성화시켜 파골세포의 골흡수 능력을 촉진시키며³⁵, phenylacetic 산을 분비하고³⁶, trypsin 효소를 분비하여 단백질 분해능력을 발휘하며, α -glucosidase의 능력을 보이지 않고 있다³⁰. 또한 동세균은 강력한 collagenase을 분비하여 collagen, azocoll 및 casein 등을 파괴하고³⁰ protease를 분비하여 IgA 및 IgG를 파괴한다¹⁰. 또한 superoxide dismutase를 분비하므로써 다형핵 백혈구의 살균효과를 무력화 시키며³⁰ 이 세균의 lipopolysaccharide는 mitogenicity가 있고, polyclonal B cell activation에 관여하며, Interleukin 1의 생산을 촉진하여 골흡수에 관여하는 것으로 알려지고 있다³⁷. 이러한 특성이 있는 *B. gingivalis*는 급성진행성 및 성인성 치주염 환자의 혈청내에서 유의성 있게 높은 항체역가를 나타내고 있으며^{2, 5, 6, 22}, 실험적인 연구를 통하여 타균주들과는 항원교차반응을 가지지 않음이 나타났³⁸. 또한 이러한 독성세균을 치주낭내 치태내에서 조기에 발견하여 동정하며, 선택적 약물요법을 통하여 제거하는데 대한 연구가 한편으로 진행되고 있다.

본 연구는 한국인 급성진행성 및 성인성치주염으로 진단된 환자의 치주낭내에서의 *B. gingivalis*균주의 발현빈도, 급성진행성 치주염 환자의 혈청 및 치은열구내 동균주의 특이항체역가, 동균주의 각종 항생제 감수성, 그리고 trypsin 유사효소분비 유무 검사 및 두종류의 자기 다른 *B. gingivalis*아균주와

한국인에서 분리된 *B. gingivalis*의 항원성 비교분석을 전기영동, 면역확산법 및 면역 전기영동법을 통하여 관찰하며, 이 균주의 치태내에서 조기 동정법에 대한 개발에 그 목적을 두었다.

실험재료 및 방법

1. Black-pigmented *Bacteroides*의 분리 배양, 동정 및 발현빈도

서울대학교 병원 치과 진료부 치주과에 내원한 30세 내외의 급성진행성 치주염으로 진단된 환자 13명과 동일연령의 치주조직이 건강한 7명을 대상으로 상악 제 1대구치의 치은연하치태를 채취하여 실시하였다. 치은연하치태 채취를 위하여 치은연상 치태는 curette으로 제거하고, Paper point(Johnson Fine Absorbent Points: Johnson and Johnson, East Windsor, N.J., U.S.A) 3개를 동일부위에 삽입한 후 10초간 기다렸다가 곧 pre-reduced Ringer액에 혼합 gas(85% N₂, 10% H₂, 및 5% CO₂ 함유)를 계속 주입하면서 삽입된 paper point를 넣어 2분간 vorter mixer로 진탕한 후 10배 단계 희석시며 놓은 다음 5% 가토혈액을 함유한 혈액한천평판배지(5.0 μ g/ml hemin과 0.5 μ g/ml menadione 첨가)에 각각 접종하여 37°C 혐기성 세균배양기(85% N₂, 10% H₂, 5% CO₂, Coy Lab. Products, Ann Arbor, MI U.S.A.)에서 7일간 배양하였다. 배양후 혐기성 세균총집락수와 black-pigmented *Bacteroides*균집락수를 계수하였다. 혈액한천 평판배지상에서 나타나는 암적색 균집락을 stereo-microscope를 통하여 관찰한 후 20개의 균집락을 취하여 혈액한천 평판배지에 순수분리시켜 1주일간 배양하고 나서 Gram염색과 용혈상태를 관찰하였다. 순수배양된 black-pigmented *Bacteroides*는 pepton-yeast broth에서 3일간 키운 후 생화학적 검사를 실시하였다. 생화학적 검사방법은 Holdeman과 Cato¹⁰의 방법에 따라 glucose, esculin, sucrose, cellobiose, lactose 등의 당분해 검사와 catalase, indole 검사를 실시하였다.

지방산 최종산물 검정을 위하여 Gas Chromatography(Hitachi 263-30, Hitachi Co. Tokyo, Japan)를 이용하였으며, column으로는 TCD를 이용하였고, packing material로는 SP-1000/1% H₂-PO, chromosorb 100/120으로 추가된 것을 사용하였다.

2. *B. gingivalis* 분리균주의 항생제 감수성 검사

(1) Disc 확산법

Disc 확산법은 Ericsson 및 Ryan 방법³⁹에 따라

으며, B.B.L. 회사(B.B.L. Microbiology Systems, Cockeysville, M.D., U.S.A.) 제품의 disc 인 Penicillin G(10 unit), Ampicillin(10 unit), Gentamycin(10 μ g), Tetracycline(30 μ g), Cefoxitin(30 μ g), Erythromycin(15 μ g), Clindamycin(2 μ g) 및 Lincomycin(2 μ g) 등을 4°C 냉장고에 보관하면서 사용하였고, 균주는 급성진행성 치주염 환자에서 순수분리 배양된 *B. gingivalis* 5 균주를 사용하였다. 배지로는 5% 가토혈액을 첨가한 혈액한천평판배지(5.0 μ g/ml hemin과 0.5 μ g/ml menadione)를 pre-reduced시켜 사용하였으며, 선택된 *Bacteroides* 균주들은 Brain Heart Infusion broth에 접종하여 37°C 혐기성 배양기에서 1주일간 배양시킨 후 0.25% dextrose가 첨가된 trypticase soy broth(B.B.L. Microbiology Systems, Cockeysville, M.D. U.S.A.)에 다시 재접종하여 혐기성배양기에서 48시간 배양시켰다. 상기 배양액을 표준탁도액(No. 1 McFarland barium sulfate standard solution)과 동일한 농도로 희석한 후 prereduced된 혈액한천 평판배지에 균액을 균일하게 접종시켰다. 상기 혈액한천 평판배지에 각종의 disc를 밀착시킨후 37°C 혐기성배양기에서 48시간 배양시켜 발육억제대를 측정하였고, 감수성 및 내성 결정은 NCCL(National Committee for clinical Laboratory Standard) 표준수치에 따라 결정하였다.²⁷⁾

(2) Broth 희석법

사용된 항생제 분말은 Penicillin G, Clindamycin, Tetracycline 및 Erythromycin(Sigma Chemical Co. St. Louis, M.O., U.S.A.)이며, 균주로는 급성진행성 치주염환자에서 분리 배양된 *B. gingivalis* 2 균주이다. 상기 균주를 0.25% Dextrose가 첨가된 Trypticase Soy broth에 접종하여 37°C 혐기성 배양기내에서 48시간 증식배양시켜 사용하였다. 각종 항생제는 증류수로 512 μ g/ml 용량이 되도록 각각 희석한 후 Trypticase Soy broth액으로 각 2배씩 희석하여 0.5 μ g/ml까지 희석하여 준비한 다음 48시간 배양균주액을 표준탁도액(No. 1 Mcfarland barium sulfate standard solution)과 동일한 농도로 희석한 후 동량의 항생제 broth와 섞어 접종시켜 37°C 혐기성 배양기에서 48시간동안 배양하였다.

최저발육억제농도(MIC, minimum inhibitory concentration)는 항생제를 포함하지 않은 대조군과 비교하여 혼탁도 유무로 측정하였으며, 최저발육농도로 결정된 용량 전후 4개의 시험관내 용액을 pre-reduced된 혈액한천 배지에 각각 접종시켜 37°C 혐기성 배양기에서 48시간 배양하여 세균성장 유무를 확인한 후 세균이 성장되지 않은 농도를 살균 최저

농도(MBC, minimum bactericidal concentration)로 정하였다.

3. 급성진행성 치주염 환자의 혈청 및 치은열구내 *B. gingivalis* 특이항체 검사

(1) 혈청 및 치은열구액 분리

급성진행성 치주염환자 10명과 정상대조군 10명의 말초혈액을 채취하여 원심분리(2,500 \times g)시켜 사용시까지 -70°C 냉동실에 보관하였다. 치은열구액의 채취를 위하여 치주낭 주위의 타액을 제거한 후 Perio-paper(Harco, Med. elect. Inc. 14 Morgan. California, U.S.A.)을 치은열구내에 넣어 채취하고 Periotron 6000(Harco, Med. Elect. Inc. 14 Morgan. California, U.S.A.)로 채취량을 측정하고 Perio-paper는 0.5%, Tween 20, 0.5% B.S.A. 및 0.02% NaN₃가 든 항체희석용 완충액에 넣어 원심분리시켜 상층액을 얻어 사용시까지 -70°C 냉동실에 보관하였다.

(2) 혈청 및 치은열구액 IgG 측정

혈청과 치은열구액의 IgG 양은 radial immunodiffusion Kit(Nor-partigen, LC-partigen, Hoechst, Diagnostica, W. Germany)를 이용하여 측정하였다.

(3) 혈청 및 치은열구액 특이항체 역가 측정

Enzyme-linked immunosorbent assay법을 Engvall과 Perlmann²⁸⁾의 방법 따라 실시하였다. 사용된 *B. gingivalis* Korean-1 균주는 BHI broth로 37°C 혐기성 배양기에서 72시간 배양후 인산완충액(pH 7.2)로 3번 세척하고 0.5% buffered formalin saline으로 16시간 고정한 후 다시 세척한 후 사용시까지 -70°C에서 보관하였다. 준비된 *B. gingivalis* Korean 1 균주는 0.02% NaN₃가 든 0.1M Na₂CO₃ 완충용액으로 620nm의 spectrophotometer에서 optical density 0.3이 되게 희석하여 flat bottom polystyrene microtiter plate(Dynatech Lab. Inc U.S.A.)의 각 well에 200 μ l씩 세균액을 분주한 후 원심분리하여 인산완충 세척완충액(PBS-0.05% Tween 20)으로 세척한 후 2%(W/V) BSA 100 μ l를 각 well에 넣어 4°C에서 24시간 보관하였다. 보관된 microtiter plate를 인산완충 세척액(PBS-0.05% Tween 20)으로 세척하였다. 채취된 혈청 및 치은열구액은 항체희석 인산완충액(0.05% Tween 20, 0.5% BSA, 0.02% NaN₃-PBS)으로 2배 희석한 후 세균이 부착된 각 well에 200 μ l씩 분주하고 37°C water bath에서 2시간 반응시키고, 세척인산완충액으로 세척하였다. 적정농도로 희석된 alkaline phosphated-conjugated anti-human IgG(Orion Diagnostica, Helsinki, Finland) 200 μ l를 반응한 각

well에 넣고 다시 37°C water bath에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척된 각 well은 기질완충액(0.5 M Na₂CO₃ buffer -10⁻³M MgCl₂ buffer)에 적정 농도로 용해시킨 P-nitro phenyl phosphate Type 104(Sigma Chemical Co. St. Louis, M.O., U.S.A.) 200 μ l를 각 well속에 넣고 37°C water bath에서 1시간 반응시키고 반응을 정지시키기 위하여 1N NaOH 50 μ l를 사용하였다. 반응이 끝난 각 well은 400nm absorbance ELISA colometer로 비색 정도를 측정하였으며 conjugate, antibody 및 substrate가 제거된 각 well을 대조군으로 하여 측정하였다. 측정된 각 대상의 항체역가는 O.D. 400nm = A+B(log 10 희석농도) 공식에 의한 회귀 방정식을 이용하여 ELISA unit(Eu)로 환원하여 IgG의 역가치를 구하였다.

4. 표준균주 및 한국인 *B. gingivalis*의 lipopolysaccharide의 특성에 관한 연구

(1) 표준균주 및 한국인 *B. gingivalis*의 lipopolysaccharide의 추출

B. gingivalis ATCC 33277, *B. gingivalis* 381 (Denmark, Aarhus 치과대학 Dr. Kilian 및 미국 뉴욕주립대학교 Buffalo 치과대학 Dr. Genco로 부터 기증받음) 및 한국인 *B. gingivalis* 2균주를 hemin 5 μ g/ml 및 menadione 0.5 μ g/ml이 첨가된 brain heart infusion(B.B.L. Microbiology Systems, Cockeysville, M.D., U.S.A.)에 접종하여 37°C 혐기성 배양기(85% N₂, 10% H₂, 5% CO₂, Coy. Lab. products, Ann Arbor, M.I. U.S.A.)에 48~72시간 배양시킨후 성장정지기의 세균배양액을 각각 500ml씩 취하여 원심분리(16,000 \times g, 20min)시켜 균집합층을 취한 후 인산완충용액(PBS pH 7.2)으로 3회 세척하였다. *B. gingivalis*의 lipopolysaccharide 추출은 Westphal과 Jann³⁷⁾의 방법에 따라 세균용액을 세척하여 균집합층을 만든후 50mg/ml되게 순수 증류수로 희석한 후 동량의 90% phenol(Vol/Vol)와 섞어 68°C Water bath에 15분간 반응시킨다. 이 용액을 10분간 냉각시킨후 원심분리(10,000 \times g, 30min)시켜 액화층만을 제거하여 모으며, 이 과정을 반복하므로써 액화층을 얻은 후 흐르는 물에 약 96시간 투석한 후 동결 건조시켰다. 얻은 동결 건조된 분말을 증류수에 희석시켜 원심분리(100,000 \times g, 3h)시켜 gellatinous한 하층액을 얻어 사용하였다.

(2) SDS-gel electrophoresis

Laemmli SDS-gel electrophoresis system¹⁸⁾을 사용하였다. Maizel의 방식인 Vertical slab-gel ap-

paratus(Manhatan, Co. Seoul, Korea)를 이용하였으며, *B. gingivalis* LPS(150 μ g each)를 10mM Tris-HCl 완충액(pH 6.8)(2.5% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol)에 섞은 후 100°C water bath에서 5분간 가열하였다. 전기영동은 35mA의 전류를 이용하였고, 전기영동 완충액으로는 0.1% SDS이든 Tris-glycine(pH 8.3) 완충액을 사용하였다. 가열된 LPS 10 μ l는 6mm넓이의 sample well(12% separating gel, 5% stacking gel)에 주입하여 4~5시간 실시한 후 sample marker가 slab의 최종선에 가까울 때 정지시켰다. Low molecular weight marker(Sigma Chem. Co. St. Louis, M.O., U.S.A.)를 사용하였고, 염색은 sensitive silver staining방법¹⁹⁾과 Coomassie brilliant blue 염색법을 실시하였다.

(3) Immunoelectrophoresis and Immunodiffusion

한국인 *B. gingivalis*의 L.P.S.에 대한 특성을 조사하기 위하여 동 L.P.S. 추출물을 표준균주 *B. gingivalis* ATCC 33277 및 381과 면역확산법 및 면역전기영동법으로 반응시키며, 대조군으로 *B. gingivalis* ATCC 33277 및 381의 L.P.S.를 사용하므로써 한국인 *B. gingivalis*의 L.P.S.가 두 표준균주 중 어느 것과 유사한가를 밝히고자 하는데 있다.

면역전기영동법은 Ouchterlony와 Nilsson²⁰⁾의 방법에 따라 1% agarose(10 μ g/ml) slide glass(0.33M veronal buffer, pH 8.e)에 L.P.S.를 넣은 구멍을 뚫은후 20 μ l의 L.P.S.(15mg/ml dry weight)를 각 구멍에 주입하고, Immunoelectrophoresis Kit(Manhatan, Co. Seoul, Korea)에 놓고, 6V/cm 전기장으로 80분간 전기영동을 시켰다. 전기영동후 slide glass 중앙부에 1mm 넓이로 agar를 제거하고 *B. gingivalis* 381 항혈청을 각각 다른 slide glass에 주입하고 37°C 배양기에서 24시간 반응시킨후 반응단백질을 0.3M NaCl 용액으로 고정하고 이를 37°C에서 서서히 건조시켰다. 건조된 agar 표본은 0.1% Coomassie brilliant blue(Sigma Chemical Co. St. Louis, M.O., U.S.A.)에 1시간 염색한 후 10% acetic acid로 탈색하여 관찰하였다. 면역확산법을 위하여 1% agarose gel 2ml를 취하여 slide glass에 굳힌 후 구멍을 뚫고, *B. gingivalis*(Socransky) 381, *B. gingivalis* ATCC 33277, *B. gingivalis* Korean-1, *B. gingivalis* Korean-2의 L.P.S.(15mg/ml)를 주입하고 중앙부는 *B. gingivalis*(Socransky) 381 항혈청을 주입하여 37°C에서 24시간 반응시킨 다음 0.3 M NaCl 및 0.51M NaCl로 고정하고 건조시켜, Coomassie brilliant blue(Sigma Chemical Co. St. Louis, M.O.U.S.A.)로 염색하여 관찰하였다.

5. *B. gingivalis* 균주의 조기동정을 위한 trypticin 및 α -glucosidase activity 검사법

(1) Trypsin activity test

*B. gingivalis*는 N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide(BANA)를 가수분해하므로 이에 대한 검사법으로 BANA(Sigma Chemical Co., St. Louis, M.O., U.S.A.) stock액(44mg의 BANA를 1ml dimethyl sulfoxide(DMSO))에 섞은 후 다시 Sorensen 완충용액으로 1:100 희석시켜, BANA 용액이 0.67mM 되게 하였다. 이 용액을 작은 plastic tube에 100 μ l 되게 분주한 후 각 tube에 혈액한천 평판 배지상의 균집락을 분리하여 넣은 후 37°C CO₂ incubator에 18시간 배양하였다. 배양후 한방울의 sodium dodecyl sulfate 용액(10g of SDS in 100ml of 2.0M Tris-hydrochloride 용액 pH 7.5)을 넣고 다시 한방울의 Fast blue B.B salt(Sigma Chemical Co. St. Louis, M.O., U.S.A.) 용액을 떨어뜨려 반응을 시켰다. 이때 양성반응을 5분 이내에 red orange 색깔이 나타나는 것으로 하였다.

(2) α -glucosidase activity test

*B. gingivalis*는 P-nitrophenyl- α -glucoside (PNPG)를 가수분해하지 못하므로 이에 대한 검사법으

로 PNPG(Sigma Chemical Co. St. Louis, M.O., U.S.A.) 30mg을 1ml DMSO에 용해시킨 후 0.1M Sorensen 인산용액(pH 6.0)으로 10배 희석시켜 이 용액 100 μ l를 분주한 후 각 tube에 혈액한천 평판 배지상의 균집락을 분리하여 넣은 후 37°C CO₂ incubator에서 18시간 배양하여 노란색으로 변하는 균을 양성반응균으로 판정하였다.

성 적

1) *Bacteroides gingivalis*의 발현빈도

급성진행성 치주염 환자 13명에서 분리된 균주중 호기성 세균은 분리균주중 12.5%를 차지하며, 혐기성세균은 87.5%를 차지하고 있다. 이 혐기성세균중 black-pigmented *Bacteroides*는 33.2%를 차지하고 있으며, 이들 균주중 *B. gingivalis*는 8.7%, *B. intermedius*는 10.69%, *B. melaninogenicus*는 4.58% *B. loeschii*는 2.67%로 나타나며, 기타 black-pigmented *Bacteroides*가 6.48%를 차지하고 있다. 그러나 정상대조군의 경우 호기성세균은 전체의 56.9%를 차지하며, 혐기성 세균은 53.1%를 차지하고 있다. 이중 black-pigmented *Bacteroides*는 5.5%로서 *B. gingivalis*가 0.92%, *B. intermedius*

Table 1-1. Levels of black-pigmented *Bacteroides* in the subgingival plaque of rapidly progressive periodontitis and healthy controls

Status	R.P.P. (N=13)* (%)	H.C. (N=7)* (%)
A) Aerobic bacteria	1.511 ± 0.98 × 10 ⁶ (12.5)	3.61 ± 5.31 × 10 ⁶ (56.9)
B) Anaerobic bacteria	1.06 ± 0.86 × 10 ⁷ (8.5)	2.73 ± 1.90 × 10 ⁶ (43.1)
1) Other anaerobic bacteria	6.57 ± 5.57 × 10 ⁶ (54.3)	2.38 ± 0.77 × 10 ⁶ (37.6)
2) black-pigmented <i>Bacteroides</i>	4.02 ± 4.28 × 10 ⁶ (33.2)	3.50 ± 1.85 × 10 ⁶ (5.5)
a) <i>B. gingivalis</i>	8.78 (23/87)*	0.92 (3/18)*
b) <i>B. intermedius</i>	10.69 (28/87)*	0.61 (2/18)
c) <i>B. melaninogenicus</i>	4.58 (12/87)*	1.83 (6/18)
d) <i>B. loeschii</i>	2.67 (7/87)*	1.53 (5/18)
e) Other black-pigmented <i>Bacteroides</i>	6.48 (17/87)*	0.61 (2/18)

*Mean ± S.D.

Table 1-2. The distribution of black-pigmented *Bacteroides* in different disease status in rapidly progressive periodontitis

Bacteria	Severe form (N=7)	Moderate form (N=6)	Normal (N=6)
<i>B. gingivalis</i>	13	2	3
<i>B. intermedius</i>	8	2	2
<i>B. melaninogenicus</i>	2	4	6
Other black-pigmented <i>Bacteroides</i>	4	5	7
Total	27	13	18

가 0.61%, *B. melaninogenicus*가 1.83%, *B. loeschii*가 1.53%, 그리고 기타 black-pigmented *Bacteroides*가 0.61%를 보이고 있다(Table 1-1).

상기 13명의 환자중 염증도 및 치주낭 깊이에 따른 심도별로 구분하여 조사한 결과 심도환자의 경우 *B. gingivalis*가 13균주로서 전체 black-pigmented *Bacteroides*의 약 50%를 차지하고 있으며, 중등도 및 정상군에서는 약 15%로서 질환의 심도에 따른 *B. gingivalis*의 관여도를 나타내고 있다(Table 1-2).

2) *Bacteroides gingivalis*의 항생제 감수성

분리검정된 *B. gingivalis* 5균주에 대한 한천평판회색법에 의한 항생제 감수성 결과 8종류의 항생제 disc 중 Tetracycline, Ampicillin에 감수성을 보이며, Penicillin 및 Cefoxitin에는 중등도의 감수성을 보이고 있다(Table 2-1).

Broth dilution법을 이용하여 분리된 2종류의 *B. gingivalis*균주에 대한 최저발육억제농도 결과는 *B. gingivalis*는 Tetracycline 0.25~1 μ g/ml 농도에서

Table 2-1. Antibiotic susceptibility test with disc diffusion method

Bacteria strains	Antibiotics								
		P	AM	GM	TE	CF	E	CC	L
<i>B. gingivalis</i>	1	I	R	R	S	I	R	R	I
	2	I	S	S	S	I	R	R	I
	3	I	I	R	R	R	R	R	I
	4	S	S	R	S	S	R	R	I
	5	I	S	R	S	I	R	I	I

NCCLS: (National Committee for Clinical Laboratory Standards)

P: penicillin(10units), AM: ampicillin(10 μ g), GM: gentamycin(10 μ g), TE: tetracycline(30 μ g),

CF: cefoxitin(30 μ g), E: erythromycin(15 μ g), CC: clindamycin(2 μ g), L: lincomycin(2 μ g).

Table 2-2. Minimal inhibitory concentration(MIC) and minimal bactericidal concentration(MBC) of various antibiotics to *B. gingivalis*.: broth dilution method(μ g/ml)

Bacterial strains	Antiotis	Penicillin		Clindamycin		Tetracycline		Erythromycin	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>B. gingivalis</i>	A	2	128	16	128	1	32	8	64
<i>B. gingivalis</i>	B	2	128	8	128	0.25	32	8	64
<i>B. intermedius</i>	A	2	128	16	128	0.5	8	8	128
<i>B. melaninogenicus</i>	A	4	128	16	128	1	32	8	64
<i>B. melaninogenicus</i>	B	4	64	16	128	0.5	32	16	128

: Antibiotic contents per disc: Penicillin G(10 μ), Gentamycin(10 μ g), Cefoxitin(30 μ g), Erythromycin(10 μ g)

: Susceptibility to the drug is defined as either absence of turbidity less than 50% of that of the growth control.

Table 3-1. Concentration of serum IgG

Group	n	Mean \pm S.D.(mg/dl)	Significance
Healthy	10	1,334.4 \pm 221.2	
R.P.P.	10	1,598.5 \pm 282.1	P<0.05

Table 3-2. Concentration of diluted gingival crevicular fluid* IgG

Group	n	Mean \pm S.D.(mg/dl)	Significance
Healthy	10	4.27 \pm 1.06	
R.P.P.	10	4.38 \pm 1.14	N.S.

*GCF of Periotron score 100 was diluted in 100 μ l Ab buffer soln.

Penicillin 2 units/ml 농도에서 Erythromycin 및 Clindamycin은 8~16 μ g/ml에서 최저발육억제를 보이고 있으며, 최저살균농도는 Tetracycline 32 μ g/ml에 대하여 Penicillin 128 units/ml로 나타나고 있다(Table 2-2).

3) *Bacteroides gingivalis*의 혈청 및 치은열구 내 IgG 특이항체 역가

급성진행성 치주염 환자의 혈청 및 치은열구액의 *B. gingivalis*균주에 대한 특이항체 존재에 대한 연구에서 급성진행성 치주염환자는 혈청 IgG의 양(1,598.5 \pm 282.1mg/dl)는 정상대조군(1,334.4 \pm

Table 3-3. Antibody titers* of serum and gingival crevicular fluid IgG to *Bacteroides gingivalis* Korean-1

Group	n	Serum(mean± S.D.)	G.C.F.(mean± S.D.)
Healthy	10	92.38± 40.37	96.41± 87.39
R.P.P.	10	185.59± 108.63	184.08± 124.4
Significance**		P<0.05	P<0.05

*Values are expressed as EU to a serum and a gingival crevicular fluid references.

**T test

Fig. 1-1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of L.P.S. preparation from *B. gingivalis*. The gel was stained with Coomassie blue stain.

Lane 1. Molecular weight markers
 Lane 2. Molecular weight markers
 Lane 3. P.W-LPS from *B. gingivalis* 381
 Lane 4. P.W-LPS from *B. gingivalis* ATCC 33277
 Lane 5. P.W-LPS from *B. gingivalis* Korean-1
 Lane 6. P.W-LPS from *B. gingivalis* Korean-2

221.2mg/dl)에 비하여 유의성 있는 증가를 보이고 있다(Table 3-1).

또한 치은열구액 IgG의 양은 급성진행성 치주염 환자의 경우 4.38 ± 1.14 mg/dl로서 정상대조군의 4.27 ± 1.06 mg/dl과는 차이가 없었다(Table 3-2).

B. gingivalis Korean-1균주의 혈청내 IgG 특이 항체 역가치는 급성진행성 치주염환자(185.59 ± 108.63 Eu-G)가 정상대조군(92.38 ± 40.37 Eu-G)에 서보다 유의성 있는 증가를 보였고, 치은열구액내 IgG 특이항체 역가치는 급성진행성 치주염 환자

Fig. 1-2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of L.P.S. preparation from *B. gingivalis*. The gel was stained with sensitive silver stain.

Lane 1. Molecular weight markers
 Lane 2. P.W-LPS from *B. gingivalis* 381
 Lane 3. P.W-LPS from *B. gingivalis* ATCC 33277
 Lane 4. P.W-LPS from *B. gingivalis* Korean-1
 Lane 5. P.W-LPS from *B. gingivalis* Blank
 Lane 6. P.W-LPS from *B. gingivalis* Korean-2

(184.08 ± 124.48 Eu-G)가 정상대조군(94.46 ± 87.89 Eu-G)에 비해 유의성 있는 증가를 보였다(Table 3-3).

4) 한국인 *Bacteroides gingivalis*의 lipopolysaccharide 특성

전기영동법을 이용하여 한국인 *B. gingivalis*의 L.P.S.에 대한 분석을 한후 Coomassie blue에 염색한 결과 L.P.S. band가 나타나지 않고 있으며, sensitive silver stain결과 24 Kilodaltons 부근에서 *B. gin-*

gingivalis socransky 381, *B. gingivalis* ATCC 33277, *B. gingivalis* Korean-1, *B. gingivalis* Korean-2 모두가 band를 나타내고 있었다(Fig. 1-1, 1-2).

면역확산법을 이용하여 한국인 *B. gingivalis* 두 균주에 대한 표준균주와의 특성비교 결과 *B. gingivalis* Socransky 381 L.P.S. 및 *B. gingivalis* Korean-1 L.P.S.는 *B. gingivalis* Socransky 381 항혈청에 대하여 단일 침전선을 보이며, *B. gingivalis* ATCC 33277 및 *B. gingivalis* Korean-2 균주는 *B. gingivalis* socransky 381 항혈청에 대하여 복합 침전선을 보이며, 각각 다른 반응선을 보이고 있다(Fig. 2-1, 2-2).

또한 면역전기영동법을 이용한 상기 4균주의 lipopolysaccharide의 특성을 비교 분석한 결과 면역확산법에서 보이는 결과보다 더 선명한 반응양상이 나타나며, *B. gingivalis* Korean-1 L.P.S.는 *B. gingivalis* Socransky 381 L.P.S.와 *B. gingivalis* Korean-2 L.P.S.는 *B. gingivalis* ATCC 33277 L.P.S.와 유사한 L.P.S. 항원을 가지고 있음을 나타내고 있다(Fig. 3-1, 2).

5) *B. gingivalis* 균주의 조기동정을 위한 trypsin 및 α -glucosidase activity 검사법

순수분리된 *B. gingivalis* Korean-1 및 Korean-2와 *B. gingivalis* Socransky 381 및 *B. gingivalis* ATCC 33277 균집락을 혈액한천 평판배지(5% 가토혈액, 5.0 μ g/ml hemin, 0.5 μ g/ml menadione이 함유됨)에 키운후 이를 이용한 trypsin activity test 및 α -glucosidase activity test 결과 4균주 공히 trypsin activity test에서 red orange 및 orange 빛을 보이는 양성반응을 보였으며, α -glucosidase activity test에서는 4균주 공히 변색을 나타내지 않은 음성반응을 보였다(Table 4).

고 찰

혐기성 세균 특히 black-pigmented *Bacteroides*가 급성진행성 치주염의 병인으로서의 중요한 위치를 차지함은 많은 연구를 통하여 밝혀졌다. 특히 *B. gingivalis*는 동균주의 특이독성 및 질환진행시의

Fig. 2. Immunodiffusion reactions between L.P.S. preparations and antisera against whole cells of *B. gingivalis* 381.

L.P.S.: a) *B. gingivalis* 381, b) *B. gingivalis* 33277
Trough: Anti-*B. gingivalis* 381 antisera.

Fig. 2-2. Immunodiffusion reactions between L.P.S. preparations and antisera against whole cells of *B. gingivalis* 381.

L.P.S.: a) *B. gingivalis* Korean-1, d) *B. gingivalis* Korean-2
Trough: Anti-*B. gingivalis* 381 antisera.

Fig. 3-1. Immunelectrophoretic reactions of the *B. gingivalis* L.P.S.(15mg/ml PBS). 20 μ l each of *B. gingivalis* 381 L.P.S(a) and *B. gingivalis* 33277(b) was electrophoresed at 6V/cm for 80min and reacted with 80 μ l of rabbit antiserum to *B. gingivalis* 381.
Trough: Anti-*B. gingivalis* 381 antisera.

Fig. 3-2. Immunelectrophoretic reactions of the *B. gingivalis* L.P.S.(15mg/ml PBS). 20 μ l each of *B. gingivalis* Korean-1 L.P.S.(a) and *B. gingivalis* Korean-2 L.P.S.(b) was electrophoresed at 6V/cm for 80min and reacted with 80 μ l of rabbit antiserum to *B. gingivalis* 381.
Trough: Anti-*B. gingivalis* 381 antisera.

Table 4. Trypsin and α -glucosidase activity of 4 strains of *Bacteroides gingivalis*

Strain	Test	Trypsin activity test(BANA by hydrolysis)	α -glucosidase test
<i>B. gingivalis</i> Socransky 381		+	-
<i>B. gingivalis</i> ATCC 33277		+	-
<i>B. gingivalis</i> Korean-1		+	-
<i>B. gingivalis</i> Korean-2		+	-

높은 발현빈도로 인하여 중요한 병원균으로 알려지고 있는 바 본 연구를 통하여 한국인 급성진행성 치주염환자의 경우는 *B. gingivalis*의 발현빈도가 건강대조군에 비하여 현저히 높게 나타나며, 특히 심도가 있는 급성진행성 치주염의 경우 더욱 뚜렷한 차이로 증가함을 보이는 바 이는 Slots²⁰⁾, Tanner²¹⁾, White²²⁾ 및 Ohta²³⁾의 결과와 동일하므로 동양인의 경우도 동균주가 질환의 진행에 중요한 위치를 차지함을 알 수 있다. 그러나 발현빈도에서는 Tanner²¹⁾ 등의 결과보다는 낮은 비율인 바 이는 인공간의 차이 혹은 분리과정의 기술적 차이에 기인

하지 않다가 생각된다. 분리된 *B. gingivalis*의 항생제 감수성 결과는 Penicillin, Ampicillin, Tetracycline에 대하여 특이하게 예민한 결과를 보이는 바 이는 Ciancio⁸⁾, Genco⁹⁾ 및 Sutter¹¹⁾ 등의 연구결과와 동일한 양상을 보인다. 그러나 Genco⁹⁾ 등이 연구에서 *B. gingivalis*가 Clindamycin에도 예민한 감수성을 보인다는 결과와는 약간 상치되는 바 이에 대한 연구로서 보다 정밀한 항생제 감수성 검사법이 요구된다.

또한 broth 희석법을 통한 동균주의 최저 발육역제 농도에 대한 연구결과는 Sutter¹¹⁾ 등의 결과보다

높은 농도로 나타나는 바 이는 사용된 항생제 감수성 평가방법의 차이거나 예민도가 뒤떨어졌기 때문이라고 보나 원칙적으로는 동일한 결과를 보이고 있다고 본다. 혈청 및 치은열구액의 동균주에 대한 특이항체 존재연구 결과 급성진행성 치주염환자의 혈청에서는 건강대조군에서 보다 현저히 높은 IgG의 양을 보이며¹³, 치은열구액에서는 두군이 비슷한 IgG의 양을 보이고 있다. 이중 치은열구액의 경우는 국소 치주조직 및 전신면역계에서 생성된 IgG가 치은열구내에 나오면서 희석되었으나²⁰, 세균의 각종 효소 특히 Protease에 의해¹⁶ 파괴되거나 혹은 치은열구내 특정세균과의 Immune complex 반응에 의한 기온항체의 소모등으로 구분할 수 있으나²¹ 이에 대한 보다 높은 연구결과가 요구된다. 그러나 정상대조군에 비하여 급성진행성 치주염환자의 혈청내에서 *B. gingivalis*에 대한 특이 항체 IgG의 역가가 높게 나타나는 것은 이 균주에 대한 전신면역계의 동균주에 대한 특이항체 생성과 관련되며, 또한 치은열구액내의 IgG의 양이 정상인과 동일하면서도 동균주에 대한 특이항체 IgG의 역가가 상승하는 이유는 국소 치주조직내에 존재하는 국소면역계가 동균주에 대하여 특이항체를 다량 생산하고 있음을 증명하는 것으로서 Manson²² 등의 연구결과를 뒷받침하며, Ebersole¹⁵ 등의 결과와 일치한다고 본다.

SDS-polyacryamide gel 전기영동법을 이용한 2 종류의 한국인 *B. gingivalis*와 *B. gingivalis* Socransky 381, 및 *B. gingivalis* ATCC 33277의 lipopolysaccharide의 분석결과 Coomassie 염색법으로는 공히 나타나지 않았으며, Sensitive silver 염색법^{14, 23}에서만이 24Kd 분자량 부근에서 4 종류의 *B. gingivalis* L.P.S.가 나타났다. 따라서 이들의 L.P.S.는 동일 성분으로 구성되어 있는 동일 분자량의 물질임이 증명되었다.

그러나 Koga¹⁷ 등의 연구결과 phenol-water 추출법에서 L.P.S.가 나타나지 않았다는 결과는 염색방법의 불찰인 것으로 생각된다. 면역확산법을 이용한 2 종류의 한국인 *B. gingivalis*의 2종류 표준 *B. gingivalis*와의 비교결과 *B. gingivalis* Korean-1은 *B. gingivalis* Socransky 381과 동일한 침전선을 형성하며, *B. gingivalis* Korean-2는 *B. gingivalis* ATCC 33277과 동일한 침전선을 형성하고 있었다. 이에 대한 보다 세밀한 항원특성을 분석코져 면역전기영동법을 이용한 결과 *B. gingivalis* Korean-1은 *B. gingivalis* Socransky 381에 *B. gingivalis* Korean-2는 *B. gingivalis* ATCC 33277과 유사한 침전선을 보이고 있는 바 이와 같은 결과는 Mi-

yoshi¹¹ 및 Simanson²⁰ 등이 *B. gingivalis*에 대한 단일 clone 항체 생산결과 동일 균주내에서는 다른 혈청형을 가지고 있다는 보고 및 Gmur¹² 등의 *B. intermedius*에 대한 단일 clone 항체 생산결과와 서로 다른 혈청형의 존재를 밝힌 것과 비교하여 동일 균주의 L.P.S.내에서도 약간의 다른 항원성을 가지는 성분이 존재함을 의미한다.

이러한 결과는 Okuda²⁴ 등이 밝혔듯이 자기 다른 균주의 L.P.S.는 자기 특이항원을 가지므로서 면역확산법을 이용한 타균주와의 혈청학적 항원검정에는 도움이 되나 동일 균주내에서의 자기 다른 L.P.S.의 특이항원성을 위하여는 보다 예민한 면역 전기영동법이나 기타 방법이 이용되는 것이 바람직하다고 본다. *B. gingivalis*의 특성중의 하나인 동균주의 trypsin 유사효소 생산과 이에 따른 BANA hydrolysis 반응은 동균주의 조기분리 감별진단에 도움이 된다는 Laughon¹⁹ 등의 연구결과를 한국인 *B. gingivalis*에 적용한 결과 동일한 양성반응을 보이고 있는 바 이 방법은 동균주의 조기 감별분리 진단에 크게 도움을 주리라 보고 있다. 한국인 *B. gingivalis*의 미생물 및 면역학적 연구를 통하여 서구인에 비하여 발현빈도는 낮으나 질환의 진행과 같은 관련이 있음을 보이며, 항생제 감수성결과는 구미학자의 결과와 유사하며, 동균주의 L.P.S.항원의 비교결석 결과 약간의 다른 항원이 존재함을 알게 되었다. 이들 L.P.S.의 정성분석과 혈청학적 연구결과는 한국인 *B. gingivalis*의 주종 균주의 분석과 동균주의 주요 항원에 대한 단일 clone 항체 생산이 또한 요구되며, 이러한 일련의 연구는 장차 동균주의 조기감별진단과 질환의 진행시 동균주의 선별제거를 위한 일환으로 동세균의 특이항원^{25, 26} 추출과 이에 따른 동항원 단일 clone 항체 생성 및 기타 면역학적 연구가 더욱 요구된다.

결 론

한국인 *B. gingivalis*의 미생물 및 면역학적 특성을 연구하고자 서울대학교병원 치과진료부 치주과에 내원한 환자중 급성진행성 치주염환자 13명을 선택하여 실험대상으로 하였고, 대조군으로 건강인 7명을 선정하여 이용하였다. *B. gingivalis*의 분리, 동정은 혐기성 세균배양법을 이용하였으며 분리된 *B. gingivalis*를 이용하여 항생제 감수성 혈청 및 치은열구내 특이항체 검사 전기영동법을 이용한 동균주들의 L.P.S.의 특성검사 및 면역확산 면역전기영동법을 이용한 표준균주의 특성과의 비교를 실시하였다. 분리된 *B. gingivalis*균주는 급성진행

성치주염 환자에서 분리된 black-pigmented *Bacteroides*의 8.78%를 차지하고 있으며, 대조군의 0.92%에 비해 현저히 높은 수치를 보이고 있다. 항생제 감수성 검사결과 disc 확산법에서는 Ampicillin 및 Tetracycline에 높은 감수성을 보였고, Gentamicin과 Erythromycin에 내성을 보였으며, 항생제 broth 희석법의 경우 최저발육억제농도는 Penicillin에서 2 units/ml이하였고, Tetracycline에 대해 0.25~1 μ g/ml이었다. 급성진행성 치주염 환자의 혈청 IgG의 양은 건강인에 비해 유의성 있게 증가하였고, 혈청 및 치은열구내 *B. gingivalis*에 대한 특이 항체 역가 검사결과 건강인에 비하여 급성진행성 치주염 환자에서 유의성 있는 높은 수치를 나타내고 있다.

한국인에서 분리된 *B. gingivalis* 2균주를 표준 *B. gingivalis* 2균주와 함께 lipopolysaccharide를 추출하여 전기영동법에 의한 특성을 비교 검토한 결과 4균주 공히 분자량 24Kd에서 L.P.S.가 나타나고 있었다. 면역확산법 및 면역전기영동법을 이용한 상기 4균주의 비교 연구결과 *B. gingivalis* Korean-1은 표준균주 *B. gingivalis* Socransky 381과 동일한 반응을 보이며, *B. gingivalis* Korean-2는 *B. gingivalis* ATCC 33277과 동일한 반응을 나타냈다. *B. gingivalis*의 조기동정법의 일환으로서 trypsin 및 α -glucosidase activity test 결과 4균주 공히 trypsin 검사에는 양성으로 α -glucosidase 검사에는 음성반응을 나타냈다. 상기의 연구결과를 토대로 *B. gingivalis*는 급성진행성 치주염의 진행에 중요한 역할을 하였음이 밝혀졌으며, 동균주의 중요항원을 추출하여 이를 이용한 동균주의 진단사약용 단일 clone 항체 개발과 치주질환의 치료개발이 선행되어야 할 연구과제라고 본다.

참 고 문 헌

- 1) Bon-van Noorloos AA, van Steenberg TJM, De Graaff J and Burger EH: *Bacteroides gingivalis* activates mouse spleen cells to produce a factor that stimulates resorptive activity of osteoclasts in vitro. *J. Periodontal Res.* **21**:440-444, 1986.
- 2) Chung CP and Lee YH: The proportion, antibiotic susceptibility and specific antibodies to *Bacteroides gingivalis* isolated from subgingival plaque of Korean rapidly progressive periodontitis. *Korean. J. Immunol.* **7**:65-75, 1985.
- 3) Ciancio, S.G.: Chemotherapeutics in periodontics. *Dent. Clin. Am.* **24**:813-826, 1980.
- 4) Coykendall AL, Kaczmarek FS and Slots, J: Genetic heterogeneity in *Bacteroides asaccharolyticus*(Holdeman and Moore, 1970) Finegold and Barnes 1977(approved lists, 1980) and proposed of *Bacteroides gingivalis* sp. nov. and *Bacteroides macaccae*(Slots and Genco) *Comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol.* **25**:297, 300, 1975.
- 5) Ebersole JL, Taubman, MA, Smith DJ and Goodson MJ: Gingival Crevicular fluid antibody to oral microorganisms, I Method of collection and analysis of antibody. *J. Periodontal Res.* **19**:124-132, 1984.
- 6) Ebersole JL, Taubman MA and Smith DJ: Quantitative comparison of serum IgG antibody to periodontal microorganisms. *J. Dent. Res.* **64**:Sp issue. Abstract., 1678, 1985.
- 7) Engvall E and Perlmann P: Enzyme-linked immunosorbent assay ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. *J. Immunol.* **109**:129-135, 1972.
- 8) Ericsson HM and Sherris JC: antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B.* **217**(Suppl.): 1-90, 1971.
- 9) Genco RJ: Antibiotics in the treatment of human periodontal disease. *J. Periodontol.* **52**:545-558, 1981.
- 10) Genco RJ and Slots J: Host responses in periodontal disease. *J. Dent. Res.* **63**(3):441-451, 1984.
- 11) Gordon JM, Walker CB, Murphy JC, Goodson JM and Socransky SS: Tetracycline: levels achievable in gingival organisms-Part I. Concentrations in crevicular fluid after repeated doses. *J. Periodontol.* **52**:609-612, 1981.
- 12) Gmur R and Guggenheim B: Antigenic heterogeneity of *Bacteroides intermedius* as recognized by monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* **42**:459-470, 1983.
- 13) Hitchcock PJ and Brown TM: Morphological heterogeneity among *Salmonella lipopolysaccharide* chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Bacteriol.* **154**:269-277, 1983.
- 14) Holdeman LV, Cato EP and Moore WEC:

- Anaerobe laboratory manual, 4th ed. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blackburg, Va, 1977.
- 15) Kaslick RS, West TL, Singh SM and Chasens AL: Serum immunoglobulins in periodontitis patients. *J. Periodontol.* **51** :343-344, 1980.
 - 16) Kilian, M.: Degradation of immunoglobulins A₁, A₂ and G by suspected principal periodontal pathogens. *Infect. Immune.* **34**:757-765, 1981.
 - 17) Koga T, Nishihara T, Fujiwara T, Nisizawa T, Okahashi N, Noguchi T and Hamada S: Biochemical and immunobiological properties of lipopolysaccharide(LPS) from *Bacteroides gingivalis* and comparison with LPS from *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **47**:638-647, 1985.
 - 18) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature(London)*, **227**:680-685, 1970.
 - 19) Laughon DE, Syed SA and Loesche WJ: Rapid identification of *Bacteroides gingivalis*. *J. Clin. Microbiol.* **15** :345-346, 1982.
 - 20) Mason JD, Thompson JJ and Yukna RA: Local immunoglobulin synthesis in juvenile periodontitis: Initial findings. *J. Dent. Res.* **63** : 1211-1213, 1984.
 - 21) Miyoshi T, Hangzawa S, Hirose K, Saitoh K, Amano S, Ohmori Y and Kitano S: Humoral antibody response against *Bacteroides gingivalis*-specific antigen recognized by monoclonal antibody in adult periodontal patients *Infect. Immun.* **53** :366-371, 1986.
 - 22) Mouton C, Hammond P, Slots J and Genco RJ: Serum antibodies to oral *Bacteroides asaccharolyticus*(*Bacteroides gingivalis*): Relationship to age and periodontal disease. *Infect. Immunol.* **31** :182-192, 1981.
 - 23) Ohta Y, Sato T and Takazoe I: Microbiological study on the periodontal lesion in advanced periodontitis patients. Changes in the regional flora and clinical features caused by short term treatment with clindamycin. *Bull. Tokyo. Dent. Coll.* **84** :1209-1223, 1984.
 - 24) Okuda K, Ohta K, Kato T, Takazoe I and Slots J: Antigenic characteristics and serological identification of 10 black-pigmented *Bacteroides* species. *J. Clin. Microbiol.* **24** :89-95, 1986.
 - 25) Ouchterlony O and Nilsson LA: Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: Immunochemistry. *Weir DM.(ed) Black well Scientific publications.* **19** :2:19-40, 1978.
 - 26) Page RC, Altman LC, Ebersole JL, Vandenberg GE, Dahlberg WH, Williams BL and Osterberg SK: Rapidly progressive periodontitis: A distinct clinical condition. *J. Periodontol.* **52** : 197-209, 1983.
 - 27) Ryan KI, Schoenknecht FD and Kirby WM: Disc sensitivity testing. Hospital practice February. 91-100, 1970.
 - 28) Schenkein HA and Genco RJ: Gingival fluid and serum in periodontal diseases, I. Quantitative study of immunoglobulins, complement components and other proteins. *J. Periodontol.* **48** :772-777, 1977.
 - 29) Simonson LG, Merrell BR, Rouse RF and Shklar IL: Production and characterization of monoclonal antibodies to *Bacteroides gingivalis*. *J. Dent. Res.* **65** :95-97, 1986.
 - 30) Slots J: Importance of black-pigmented *Bacteroides* in human periodontal disease. In: Host-parasite interactions in periodontal disease. Genco RJ and Mergenhagen SE(eds), Washington DC, American Society for Microbiology. pp. 27-45, 1982.
 - 31) Sutter V.L, Jones MJ and Ghoneim AM: Antimicrobial susceptibility of bacteria associated with periodontal disease. *Antimicrob. Agents Chemother.* **23** :483-486, 1983.
 - 32) Tanner ACR, Haffer C, Bratthall CT, Visconti RA and Socransky SS: A study of the bacteria associated with advancing periodontics in man. *J. Clin. Periodontol.* **6** : 273-307, 1979.
 - 33) Tsai CM and Frasch CE: A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **119** : 115-119, 1982.
 - 34) Van Steenberg TJM, Kastelein P, Touw JJA and De Graaff J: Virulence of black-pigmented *Bacteroides* strains from periodontal pockets and other sites in experimentally induced skin lesions in mice. *J. Periodontal Res.* **17** :41-49, 1982.

- 35) Walker CB, Gordon JM, Mcquikin SJ, Niebloom TA and Socransky SS: Tetracycline levels achivable in gingivel crevice fluid and in vitro effect on subgingival organisms. Part II. Susceptibilities of periodontal Bacteria. *J. Periodontol.*, **52** :513-616, 1981.
- 36) Walker CB, Gordon JM and Socransky SS: Antibiotic susceptibility testing of subgingival plaqur samples. *J. Clin. Periodontol.* **10** :422-432, 1983.
- 37) Westphal O and Jann K: *Bacterial lipopolysaccharide* extraction with phenol-water and further application of procedures. *Methods Carbohydr. Chem.* **5** :83-91, 1965.
- 38) White D and Mayrand D: Association of oral *Bacteroides* with gingivitis and adult periodontitis. *J. Periodont. Res.* **16**:259-265, 1981.
- 39) Williams GD and Holt SC: Isolation and characterization of the peptidoglycans from selected Gram-positive and Gram-negative periodontal pathogens. *Can. J. Microbiol.* **31** :154-160, 1985.
- 40) Williams GD and Holt SC: Characteristics of the outer membrane of selected oral *Bacteroides* species. *Can. J. Microbiol.* **31** : 238-250, 1985.
- 41) Zambon JJ, Reynolds H and Slots J: Black-pigmented *Bacteriodes* spp. in the human oral cavity. *Infect. Immun.* **32** :198-203, 1981.