

*Porphyromonas gingivalis*의 독성, 대사산물 및 유전자이종성과의 관련성

서울대학교 치과대학 치주과학교실

김강주 · 정종평

I. 서 론

치주질환은 그 중요한 원인이 치주낭 내에 존재하는 세균 및 세균의 분비물로, 이들이 치주조직에 작용하고 이에따라 신체방어 기전이 유도됨으로써 초래되는 반응의 결과로 치주질환이 야기되며, 가장 중요하게 생각되는 일차적 원인은 치주낭 내에 존재하여 치주낭을 감염시키는 독성세균 특히 혐기성 세균을 들 수 있다¹⁻²⁾. 성인형 치주염에 *Porphyromonas gingivalis*(*P. gingivalis*), 국소유년형 치주염에 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, 급성 괴사성 패양성 치은염에 *Prevotella intermedia*(*P. intermedia*)와 중형의 나선균이 관련이 있음이 보고되었다³⁻⁸⁾. 또한 임신성 치은염에 *P. intermedia*, 인슐린의존형 당뇨환자 및 내과적인 질환을 가진 환자의 진행된 치주염에 *Capnocytophaga* 균종이 관련됨이 보고되었다⁹⁻¹¹⁾. 기타 *Eubacterium*, *Haemophilus*, *Wolinella*, *Fusobacterium*, *Selenomonas sputigena* 및 *Eikenella corrodens*가 몇몇 파괴적인 치주질환과 관련이 있을 것으로 보고되었다²⁾.

치은연하 치면 세균막에서 발견되는 그람음성의 혐기성 간균인 *P. gingivalis*가 치주질환

의 원인균으로 작용하고¹²⁻²⁰⁾, 실험동물에서도 치주염을 유발함이 보고되었다²¹⁻²⁴⁾. *P. gingivalis*는 치성농양(odontogenic abscess)에서도 자주 존재하고²⁵⁾, 성인형 치주염에서 *P. gingivalis*에 대한 항체가 많아지며²⁾, 치은열구액 내에 항체가 높아, 이 세균에 대한 국소적인 항체가 생산됨을 암시한다^{25,27)}. *Bacteroides*속은 다형핵백혈구에 의한 보체매개성 세균치사나 포식에 저항하고, 콜라겐, 면역소 및 보체를 파괴하는 단백분해효소를 대량 함유한다^{2,28)}. *P. gingivalis*에서 내독소에 의한 골흡수능은 보고되었지만, 낮은 생물학적 활성을 보이고^{2,29)}. 이러한 현상은 heptose, 2-keto-deoxyoctonate 및 hydroxydecanoic acid를 갖지 않는 특이한 구조를 가지고 있는 것과 관련이 있는 것으로 보고되었다²⁾. *P. gingivalis*의 배양 상청액은 배양한 신장세포에 독성을 보이는데, 낙산염이 하나의 독성요소로 고려되었으며³⁰⁾, 다형핵백혈구의 화학주성 억제능을 가지고 있어 질환의 표식자로 보고되었고^{31,32)}, *P. gingivalis*의 배양 여과액은 연골세포의 기질생성을 억제한다고 보고되었다³³⁾.

Mayrand와 Holt³⁴⁾가 *P. gingivalis*의 독성요소에 관한 보고에서 상피세포에 대한 부착을 매개하는 섬모(pili), 탐식작용을 방해하는 협

이 연구는 1992년도 서울대학교 병원 지정연구비의 지원에 의한 결과임

막(capsule)과 interleukin 1, prostaglandin E 및 tumor necrosis factor의 생산을 유발하여 면역학적 기전을 통한 치주조직 파괴에 중요한 역할을 하는 내독소가 세균독성에 중요한 역할을 하고, 이러한 간접적인 기전이외에 교원질 분해효소 및 단백질분해효소 등의 효소와 낙산, 프로파온산, 암모니아 및 휘발성 황 복합물 등의 적은 분자량의 독성요소 매개에 의한 직접적인 조직파괴를 매개하는 것으로 보고하였고, 탐식작용 방해 및 보체와 면역소(immunoglobulins)을 분해시켜 속주방어 기전을 방해할 수 있음을 보고하였다. 그러나 *P. gingivalis*가 독성균과 비독성균 간에 단백질 분해효소의 수준의 차이가 존재하지 않고, 혈청형에 따라 조직독성에 차이를 보이며 색소소실등의 유무에 따라 동일한 혈청 내에서도 세균의 대사산물 및 세균독성에 상이함을 보이며, 분리균주에 따른 유전자이종성이 존재한다는 등 상이하거나 다양한 독성성분이 보고되었다^{35~37)}.

최근에 세한효소를 이용한 유전자이종성에 관한 연구에서 동일한 종에서도 유전자의 다양성이 존재하며 *mutans streptococci*의 절이가 나타나고, 동일한 구강 내에서도 다른 유전자형을 갖는 종이 존재함이 보고되었다^{38~40)}.

그러나 대부분의 연구가 항원이종성과 유전자이종성에 관한 종 차원의 연구이고, 동일 혈청형내의 시험판내 세균독성과 그 기전 및 유전자이종성과의 관련성에 관한 종합적인 연구는 매우 부족한 편이다.

본 연구는 6mm이상인 치주낭을 갖고있는 치주염 환자에서 분리한 black-pigmented *Bacteroides* 중 *P. gingivalis*를 생활형 및 혈청형을 분류하여 생체 내에서 세균독성을 나타내는 균주를 찾아내고, 세균 초음파추출물 및 내독소의 치은조심유세포 및 치주인대유래세포에 미치는 세균독성을 확인하여 세균의 독성을 나타내는 부위를 검출한다. 또한, 표준균주 및 한국인 분리균주의 대사산물을 분석하여 대사산과 세균의 생체내 및 시험판내 독성과의 연관성을 규명하고, 독성과 관련이 있는 유기산을 치은조심유세포에 떨어뜨려 직접적인 세균

독성을 확인하며, 이러한 세균독성이 plasmid 및 염색체 데옥시리보핵산과의 관련성을 규명하고자 plasmid의 존재 및 염색체 데옥시리보핵산의 restriction fragment length polymorphism(RFLP)을 통하여 *P. gingivalis*가 치주염의 원인균으로써 생체내외에서의 세균독성과 그 독성기전을 규명하여 장차 세균독성과 관련이 있는 유전자 검색의 기초를 마련하고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 생체내 세균독성

1) 연구대상 : 서울대학병원 치주과에 내원한 다섯명의 급속진행형치주염 환자를 대상으로 하였다.

2) 세균분리 : 검사부위를 cotton rolls로 분리하고, 치은연상 세균막을 cotton pledges로 제거한 후, 세개의 가는 소독된 paper points를 약간의 저당감이 느껴질때까지 치주낭내에 넣었다. 십초동안 망치한 후, 꺼내어 Syed와 Leosche⁴²⁾의 방법에 의하여 glass beads를 함유한 2ml의 소독된 pre-reduced Ringer액에 옮겼다. Vortex mixer로 60초간 섞어서 80% N₂, 10% H₂ 및 10% CO₂를 함유한 37°C 협기성 세균 배양기에서 Ringer액을 이용하여 십배씩 회석하였다. 적합한 회석 시료를 100μl씩 black-pigmented *Bacteroides* 분리를 위해 Loesche⁴²⁾이 사용한 동일한 방법으로 200μl의 Kanamycin을 넣은 선택배지에 옮겨 배양하였다.

3) 세균동정 : black-pigmented *Bacteroides* 균주를 계대하여 균주모양, 그람염색, 협기도 및 생화학 검사로 순수배양을 동정하고, Slots과 Reynolds²⁴⁾의 긴 파장의 자외선을 이용한 fluorescence test와 indole spot test로 *P. gingivalis*를 확인하였다.

4) 간접면역 형광법에 의한 혈청형 분류 : 각 균주를 0.5% formalin으로 고정한 후 인산완충용액(PBS, pH 7.3)으로 씻어내고 흡광도를 비색계(Spectronic 21 U.V.-D®; Bausch & Lomb : Rochester, N.Y., U.S.A)를 이용하여 650nm에서 흡광도 0.15가 되도록 희석하였다. 희석한 각 균주용액을 20 μ l씩 각기 다른 받침유리에 떨어뜨린 후 공기중에서 건조시켜 열처리로 고정하여 -20°C에서 보관하였다. 여기에 항 혈청을 20 μ l씩 떨어뜨린 후 30분간 습실에서 반응시켜 인산완충용액으로 세척하고 단백질 mg당 25 μ g의 fluorescin isothiocyanate®(Isomer I. B.B.L. Microbiology systems, U.S.A.)로 conjugation된 goat antirabbit IgG®(Meloy Laboratories, Inc., Springfield, Va., U.S.A.)로 각각 1:50 및 1:100으로 희석하여 20 μ l를 slide상에 떨어뜨려 37°에서 30분간 반응시킨 후 다시 세척하고 90% glycerol로 고정한 후, 형광 현미경에서 관찰하였다.

2. 시험관내 세균독성

1) 실험균주의 배양 : *P. gingivalis* W50(미국 주립대학 Buffalo 치과대학 Dr.Zambon으로부터 기증 받은 것)과 다섯 균주의 치주낭분리 균주를 5% 가토혈액, 5 μ g/ml의 hemin과 0.5 μ g/ml vitamin K₁이 포함된 한천배지에 접종하여 5-7일간 배양하여 순수분리한 후 균집락을 취하여 이를 5 μ g/ml의 hemin과 0.5 μ g/ml vitamin K₁이 첨가된 Brain Heart Infusion broth(DIFCO, Laboratories, Detroit, Michigan, USA)에 접종하고, 37°C의 혐기성 조건하에서 48-72시간 배양하였다. 균주는 16,000Xg, 4°C에서 15분간 원심분리하여 사용시까지 -20°C에서 보관하였다.

2) 세균의 초음파 파절 : 본 실험에 사용한 균주를 동결건조시켜 증류수에 3mg/ml로 부유시킨 후 냉각시키면서 2분간격으로 30분 동안 Ultrasonic Dismembranometer(Fisher

Scientific Co., Pittsburgh, P.A., U.S.A.)로 초음파 파절시켰다. 세균의 파절을 그램염색 및 위상차현미경으로 확인하였다.

3) 내독소의 추출 : 원침시킨 균체를 0.85% saline으로 2회, 증류수로 1회 세척한 후 냉동건조시켰다. 건조시킨 균체를 Westphal 등⁴⁴⁾(1965)의 증류수 1ml에 20mg이 들어가도록하여 분산시킨 후 동일한 양의 90%(W/W) phenol(Merck)과 혼합한 후 68°C에서 15분간 교반하면서 반응시켰다. 그후 얼음물에 냉각하여 5°C에 3,000Xg로 30분간 원침후 수용액 부분을 채취하고 동일량의 증류수를 가하면서 2회 반복하여 수집된 수용액 부분을 72시간 동안 투석(dialysis) 시킨 후 냉동건조하여 사용하였다.

4) 치은조섬유세포의 대옥시리보핵산 합성에 미치는 영향 : 교정치료를 위하여 내원한 10세 환자의 제일 소구치를 발치하면서 발치와 주위의 치은을 절제하였다. 절제한 치은은 40% fetal bovine serum(FBS, GIBCO Co., U.S.A.)와 20% 항생제(penicillin G, streptomycin, amphotericin B 포함, GIBCO Co., U.S.A.)가 첨가된 α -MEM(α -minimum essential medium, L-glutamine 포함, GIBCO Co., U.S.A.)에서 삼회 세척하였다. 세척된 치은조직을 60mm세포 배양용 Petri dish(Corning Co. U.S.A.)로 옮기고 건조되지 않도록 주의하면서 No.15 scalpel 두개를 이용하여 1mm²로 세절하였다. 세절한 치은조직은 조직의 가장자리가 잘 부착되도록 주의하면서 dish에 잘펴 놓은 후 pipette를 이용하여 각 dish당 2ml의 배양액을 주입하여 37°C, 5% CO₂, 습도 100% 배양기(Shel-Lab, U.S.A.)에서 배양하였다. 배양액으로는 10% FBS 와 1% 항생제를 첨가한 α -MEM을 사용하고 단일 세포층이 형성될 때까지 삼일 간격으로 교환하였다. Petri dish내의 배양액을 제거하고 Hanks' balance salt solutions(HBSS, GIBCO Co. U.S.A.)로 2회 세척한 후 부착된 세포를 분

리하기 위하여 HBSS를 제거하고, 0.25% Trypsin-EDTA(GIBCO Co., U.S.A.)를 dish당 2ml씩 놓고 3분간 bench상에서 방치한 후 Pasteur pipette을 이용해서 dish에 부착된 잔여세포를 기계적으로 분리시키고 원심분리용 시험관으로 옮겨서 1,200rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 원심분리를 이용해서 HBSS로 2회 세척한 후 배양액을 넣고 세포부유액을 만들어 60mm Petri dish에 분주하였다. 5내지 8계대의 치은조심유세포를 25ml flask에서 배양하고, trypsin-EDTA로 분리하여, 96-well round-bottom microtest plates(Nunc®, Denmark)에 옮겨, 24시간후에 배양액을 갈아주고, 2일째 배양액을 제거하고, 인산완충용액으로 세척한 다음, 세척한 치은조심유세포를 세균초음파파절물 및 내독소 0-100 μ g/ml을 가한 배양액에 22시간 배양한 다음, [methyl-³H] thymidine(specific activity, 85Ci/mmol : Amersham life science products)을 1 μ Ci/well 가하고 24시간이 되었을 때 4°C에서 trichloroacetic acid(Sigma)로 고정한후 5% NaOH로 37°C에서 30분동안 녹여 Scintillation counter(Beckman, LS 5000 TA)로 치은조심유세포에 함유된 [methyl-³H] thymidine을 측정하고 데옥시리보핵산 합성에 미치는 영향을 측정하였고 대조군의 DNA 합성정도를 100으로하여 환산 후 분산분석을 시행하였다.

5) 치주인대유래세포의 데옥시리보핵산 합성에 미치는 영향: 교정목적으로 밭치한 치아의 치주인대에서 배양한 치주인대유래세포를 25ml flask에서 배양하고, trypsin-EDTA로 떼어내, 96-well round-bottom microtest plates(Nunc®, Denmark)에 옮겨, 24시간 후에 배양액을 갈아주고, 2일째 배양액을 제거하고, 인산완충용액으로 세척한 다음, 세척한 치주인대유래세포를 세균 초음파파절물 및 내독소 0-100 μ g/ml을 가한 배양액에 22시간 배양한 다음, [methyl-³H] thymidine을 1 μ Ci/well가하고, 24시간이 되었을 때 4°C에서

trichloroacetic acid로 고정한후, 5% NaOH로 37°C에서 30분동안 녹여 Scintillation counter(Beckman, LS 5000 TA)로 치주인대유래세포에 함유된 [methyl-³H] thymidine을 측정하여 대조군의 데옥시리보핵산 합성정도를 100으로하여 환산 후 분산분석을 시행하였다.

6) 세포독성 및 세포활성에 미치는 영향: Carmichael⁽⁴⁵⁾ 및 Mossman⁽⁴⁶⁾의 방법에 의한 MTT(methyl thiazol-2-yl-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide)용액(Sigma Co., St. Louis, U.S.A., 1mg/ml)검정법을 적용하였는데, 5내지 8회 계대배양한 치은조심유세포 및 치주인대유래세포를 0.25% Trypsin-EDTA 용액으로 처리한 후 원심분리하여 배양액으로 세포부유액을 만들었다. 표준 혈구계산 방법을 이용하여 2.5×10^4 cells/well이 되도록 96-well round-bottom microtest plates(Nunc®, Denmark)에 옮겨 10% fetal bovine serum(FBS)가 포함된 1ml 배양액에서 배양하였다. 24시간 후에 배양액을 교환하고 다시 24시간 배양후 배양액을 제거하여 HBSS로 세척하였다. 세균 초음파파절물 및 내독소 0-100 μ g/ml과 0-100 μ g/ml, 5-60mM의 n-Butyric acid(Sigma Co., St. Louis, U.S.A.)를 가한 배양액에 22시간 배양한 후 세포모양을 관찰하여 세포독성을 평가하였고, 생리식염수에 용해한 MTT용액 50 μ l을 각 well에 넣고 4시간동안 배양한 후 MTT용액을 버리고, Dimethyl sulfoxide(DMSO)를 50 μ l씩 첨가하여 formazon 결정을 용해시킨다. Plate를 잘 흔든 후 ELISA analyser(Toyo Instruments, Inc., Model ETY-96)로 630nm를 기준으로 577nm에서 흡광도를 측정했다. 배설험마다 실험용액이 들어있지 않은 배양액을 대조군으로 설정하여 모든 실험결과는 아래와 같이 대조군의 백분율로 산출하였다.

세포활성도(%) = 실험 well의 흡광도/대조 well의 흡광도 $\times 100$

3. 세균 대사산물 분석

Gordon 등⁴⁷⁾ 및 Johansen 등⁴⁸⁾의 방법을 변형하여 High performance liquid chromatography(HPLC)를 시행하였다. 세균배양액을 취하여 대사산을 ether로 추출하고, 0.1N NaOH로 재추출하여 사용하였다. 세균이 들어있지 않은 배양액도 같은 방법으로 배양분석하였다. HPLC System은 visible absorbance detector(Water's 484), System controller (Water's 602), integrator(Water's 745B) 및 유기산 분석용 Aminex HPX-87H column (No. 125-0140, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA)으로 구성되었다. 이동상은 3%의 acetonitrile이 포함된 0.008N의 황산을 이동상으로 사용하였으며 관류량은 0.3ml/min으로 측정하여 nm파장에서 측정하였다. 대사산은 표준용액의 잔류시간을 비교하여 구별하였다.

4. Plasmid 분리

Plasmid 분리는 Kado와 Liu⁴⁹⁾의 방법을 변형하여 사용하였다. Trypticase soy broth 5 ml에 실험균주를 식균하여 37°C에서 배양한 후, 1.2ml을 취하여 12,000rpm에서 2분간 원침시켰다. 상청액을 버리고 TE(10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0) 완충액 200μl를 넣어 세균침사를 부유시키고, lysis용액(3% SDS, 50mM Tris, pH 12.6) 400μl를 가하여 잘 혼합하여 세포를 파쇄한다. 55°C에 항온수조에서 45분간 반응시킨 후 얼음에서 5분간 냉각시킨 후 phenol-chloroform(1 : 1 v/v)용액을 800μl 넣고 혼합시킨 후 15분간 원침시켰다. 상층액을 gel-loading buffer와 잘 혼합하여 전기영동에 사용하였다. 전기영동은 horizontal gel apparatus를 이용하여 0.7% agarose 을 Tris-acetate 완충액(0.04M Tris-acetate, 0.001M EDTA, pH 8.0)에 용해시켜 사용하였으며, 시료를 첨가하여 상온에서 80Volts로 3시간 전기영동하고 size marker로는 lambda DNA를 Hind III로 소화한 조각(Bethesda Res. Lab., Gaithburg, MD, U.S.A.)를 사용하였다. 전기영동후

Res. Lab., Gaithburg, MD, USA)를 사용하였다. 전기영동후 Tris-acetate 완충액에 0.5μg/ml의 ethidium bromide에서 30분간 염색후 증류수로 탈색시키고, UV trans-illuminator에서 665 polaroid film으로 촬영하였다.

5. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)을 이용한 유전자이종성

염색체 데옥시리보핵산의 준비 : Wilson⁵⁰⁾의 방법을 변형하여 액체배지에 포화시까지 배양한 *P.gingivalis*의 배양액 1.5ml를 소형원심분리기로 2분간 원침하여 세균체를 얻고 여기에 Tris-EDTA(TE) 완충액(10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) 567μl, 10%SDS (sodium dodecyl sulfate) 30μl 및 proteinase K(20mg/ml) 3μl를 첨가하고 잘 섞어서 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 여기에 5M NaCl 100μl를 첨가하여 잘 섞은 후 CTAB/NaCl용액(10% hexadecyltrimethyl ammonium bromide) 80μl을 첨가하고 잘 섞은 후 65°C에서 10분간 배양하였다. 이를 동량의 chloroform/isoamyl alcohol(24 : 1)과 phenol/chloroform/isoamyl alcohol(25 : 24 : 1)로 순서대로 추출하였다. 상층의 DNA 수용액을 취하여 새튜브에 옮기고 0.6용량의 이소프로판올을 첨가하여 염색체 데옥시리보핵산을 침전시킨 후 70% 에탄올로 침전된 데옥시리보핵산을 셧고 냉동건조하였다. 건조된 데옥시리보핵산을 TE 완충액 100μl에 용해하여 4°C에 보관하였다. 분리한 염색체 데옥시리보핵산 3.0μg를 꺼내어 30units의 *Pst* I을 가하여 37°C에서 여섯시간 소화하였다. 전기영동은 horizontal gel apparatus(16.0×15.0×0.5cm)를 이용하여 0.7% agarose을 Tris-acetate완충액(0.04M Tris-acetate, 0.001M EDTA, pH 8.0)에 용해시켜 사용하였으며, 시료를 첨가하여 상온에서 40Volts로 17시간 전기영동하고 size marker로는 lambda DNA를 Hind III로 소화한 조각(Bethesda Res. Lab., Gaithburg, MD, U.S.A.)를 사용하였다. 전기영동후

Tris-acetate 완충액에 0.5 μ g/ml의 ethidium bromide에서 30분간 염색후 중류수로 탈색시키고 UV trans-illuminator에서 665polaroid film으로 촬영하고, densitometry(AIS system, Seoul, Korea)로 분석하였다.

IV. 실험결과

1. 생체내 세균독성

다섯 명의 급속진행형 치주염 환자의 6mm 이상의 치주낭 부위에서 분리된 다섯 균주에 특이항 *P.gingivalis* 381, 특이항 *P.gingivalis* W50 및 특이항 *P.gingivalis* A7A1-28을 가한 후 형광 현미경으로 관찰한 결과 다섯 균주 모두 특이항 *P.gingivalis* W50에 검은 세포 중심부와 세포의 외피가 뚜렷한 중등도의 형광을 보이거나, 검은 세포 중심부와 세포의 외피가 뚜렷한 빛나는 형광을 보였다(Table 1).

2. 시험관내 세균독성

1) 세균파절물이 치은조심유세포의 데옥시리보핵산합성에 미치는 영향: 치주낭내에서 분리한 균주의 네 균주는 대조군 및 동일한 혈청 형의 표준 균주의 세포활성보다 낮았다(Table 2).

2) 세균파절물과 내독소가 치주인대유래세포의 데옥시리보핵산합성 및 세포활성에 미치는 영향: 표준균주 및 분리균주의 세균파절물을 50 μ g/ml의 농도로 첨가하여 배양한 치주인대유래세포에서는 세포독성의 차이를 보였으나 내독소를 첨가한 경우에는 차이가 없었다

Table 1. Prevalence of *P. gingivalis* serotype isolated from five patients with rapidly progressing periodontitis

Patient	strain	serotype
1	K1	b
2	K2	b
3	K3	b
4	K4	b
5	K5	b

Table 2. Cell activity of gingival fibroblast by *P. gingivalis* sonicates

strain	%change
Control	100.00±40.39
<i>P. gingivalis</i> W50(b)	102.21±15.94
<i>P. gingivalis</i> K1(b)	49.66±47.82
<i>P. gingivalis</i> K2(b)	28.79±20.90*
<i>P. gingivalis</i> K3(b)	20.64±6.14*
<i>P. gingivalis</i> K4(b)	15.53±2.64*
<i>P. gingivalis</i> K5(b)	15.62±0.97*

* P<0.05, significantly different from control

Table 3. Cytotoxicity of *P.gingivalis* sonicates and its lipopolysaccharides in cells derived from periodontal ligamen

strain	Sonicates (50 μ g/ml)	Lipopolysaccharides (50 μ g/ml)
Control	-	-
<i>P. gingivalis</i> W50(b)	+++	++
<i>P. gingivalis</i> K1(b)	++	+
<i>P. gingivalis</i> K2(b)	+++	+
<i>P. gingivalis</i> K3(b)	+	+
<i>P. gingivalis</i> K4(b)	+	+
<i>P. gingivalis</i> K5(b)	++	+

Cytotoxicity - : Control culture

+ : Cells were altered slightly.

++ : Globular form cells were detected.

+++ : Over 50% of the cells became globular

++++ : All cells became globular.

Table 4. DNA synthesis of *P. gingivalis* lipopolysaccharides in cells derived from periodontal ligament

strain	% change	
	50 μ g/ml	100 μ g/ml
Control	100.0 ± 23.9	100.0 ± 23.9
<i>P. gingivalis</i> W50(b)	187.7 ± 22.2	193.2 ± 13.0
<i>P. gingivalis</i> K1(b)	273.4 ± 35.7*	133.5 ± 69.5
<i>P. gingivalis</i> K2(b)	110.4 ± 64.7	171.7 ± 31.8
<i>P. gingivalis</i> K3(b)	193.4 ± 115.7	42.8 ± 0.7
<i>P. gingivalis</i> K4(b)	70.4 ± 18.3	68.4 ± 30.0
<i>P. gingivalis</i> K5(b)	64.7 ± 23.1	51.4 ± 8.5

* $P < 0.05$, significantly different from control, *P. gingivalis* K2(b), *P. gingivalis* K4(b) and *P. gingivalis* K5(b)

(Table 3). 치주인대유래세포의 데옥시리보핵산합성에 미치는 정도는 내독소의 경우 50 μ g/ml의 농도에서 치주낭내 분리균주중 한 균주가 치주낭내 분리 균주 및 대조군 사이에 치주인대유래세포 데옥시리보핵산합성의 정도의

Table 5. Cell activity of *P. gingivalis* sonicates in cells derived from periodontal ligament

strain	%change
Control	100.00 ± 6.04
<i>P. gingivalis</i> W50(b)	81.55 ± 41.01
<i>P. gingivalis</i> K1(b)	65.37 ± 41.53
<i>P. gingivalis</i> K2(b)	101.82 ± 14.40
<i>P. gingivalis</i> K3(b)	63.09 ± 10.03
<i>P. gingivalis</i> K4(b)	104.64 ± 1.93
<i>P. gingivalis</i> K5(b)	65.64 ± 51.43

차이가 높았으나, 100 μ g/ml의 농도에서는 차이가 없었다(Table 4). 또한, 50 μ g/ml의 농도에서 침습성 균주(invasive strain)인 표준균주 *P. gingivalis* W50의 세균파절물에 의한 치주인대유래세포의 세포활성은 대조군과 차이가 없었으나, 세균파절물에 의한 데옥시리보핵산합성억제가 내독소에 비하여 심하였다(Table 5-6).

3. 세균의 대사산물분석

고성능액체크로마토그래피를 이용하여 유기산을 분석한 결과, 혈청형 b형인 치주낭내 분리 균주와 *P. gingivalis* W50에서 모든 균주가 낙산을 생산하고, 동일한 혈청형의 치주낭내 분리균주에서도 낙산을 생산하는 비율이 일

Table 6. DNA synthesis of *P. gingivalis* sonicates and its lipopolysaccharides in cells derived from periodontal ligament

strain	% change	
	Sonicates (50 μ g/ml)	Lipopolysaccharides (50 μ g/ml)
Control	100.0 ± 2.4	100.0 ± 2.4
<i>P. gingivalis</i> W50(b)	37.3 ± 4.4	187.7 ± 22.2*
<i>P. gingivalis</i> K1(b)	44.4 ± 5.0	273.4 ± 35.7
<i>P. gingivalis</i> K2(b)	39.6 ± 3.9	110.4 ± 64.7
<i>P. gingivalis</i> K3(b)	86.5 ± 7.1	193.4 ± 115.7
<i>P. gingivalis</i> K4(b)	54.4 ± 9.7	70.4 ± 18.3
<i>P. gingivalis</i> K5(b)	47.4 ± 14.8	64.7 ± 23.1

* $P < 0.05$, significantly different from control

Table 7. Organic acid produced by *P. gingivalis* (*Pg*)

	Un-inoculated	<i>Pg</i> W50	<i>Pg</i> K1	<i>Pg</i> K2	<i>Pg</i> K3	<i>Pg</i> K4	<i>Pg</i> K5
Fumaric acid	4.1*	-	-	-	-	0.4	1.9
Succinic acid	-	1.3	0.2	-	0.1	0.3	-
Lactic acid	-	4.5	-	0.7	-	3.5	-
Formic acid	3.2	-	0.2	0.8	0.2	0.3	1.2
Acetic acid	4.6	2.3	8.7	10.2	7.6	10.1	9.3
Isobutyric acid	-	-	0.2	0.2	-	-	-
Butyric acid	0.3	6.3	5.4	7.6	4.6	6.2	7.5
Isovaleric acid	0.2	-	-	-	-	-	-

* : Proportion of organic acid produced by each organism to total organic acid

Table 8. Cell activity of gingival fibroblast by butyric acid

Concentration	% change
0 mM butyric acid(BA)	100.0±4.9
5 mM BA	18.3±2.1*
10mM BA	6.1±1.4*
20mM BA	2.1±0.7*
30mM BA	1.9±0.8*
60mM BA	0.0±0.0*

* $P<0.05$ significantly different from control

치하지 않았으며, 젖산을 생산하는 균주와 비생산 균주가 존재하였다(Table 7).

4. 낙산에 의한 치은조섬유세포의 활성에 미치는 영향

낙산이 존재하는 경우 대조군에 비하여 세포활성이 유의하게 떨어졌고, 10mM이상의 경우는 5mM을 가한 경우보다 세포활성이 유의하게 떨어졌다(Table 8).

5. Plasmid의 존재

Hot boiling method로 plasmid의 존재를 확인할 결과 같은 혈청형 내에 뚜렷한 band를 확인할 수 없었다(Fig. 1).

6. 세균 데옥시리보핵산의 유전자이종성

세균 데옥시리보핵산을 *Pst* I으로 소화하여

전기영동 해본 결과 같은 혈청형 내에도 유전자이종성이 존재함을 관찰할 수 있었다(Fig. 2-3).

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of plasmid of *P. gingivalis* W50 standard strain and five *P. gingivalis* Korean isolates by hot boiling method. Clear band was not detected.

lane 1, *P. gingivalis* W50; lane 2, *P. gingivalis* K1;

lane 3, *P. gingivalis* K2; lane 4, *P. gingivalis* K3;

lane 5, *P. gingivalis* K4; lane 6, *P. gingivalis* K5.

R: Lambda phage DNA size markers in kilobases (kb).

(Kb) R K₁ K₂ K₃ K₄ K₅ W50

Fig. 2. Restriction profile of *Pst* I digests in *P. gingivalis* W50 standard strain and five *P. gingivalis* isolates.

K1 : *P. gingivalis* K1.

K2 : *P. gingivalis* K2.

K3 : *P. gingivalis* K3.

K4 : *P. gingivalis* K4.

K5 : *P. gingivalis* K5.

R : Lambda phage DNA size markers in kilobases (Kb).

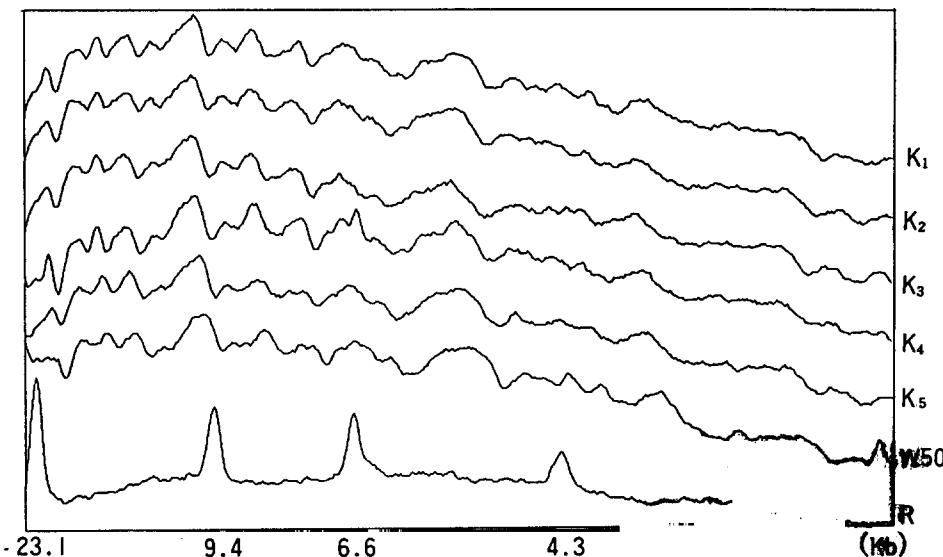


Fig. 3. Densitometric profiles of restriction endonuclease analysis (REA) of *P. gingivalis* serotype b. There were genetic heterogeneities among *P. gingivalis* serotype b.

W50; *P. gingivalis* W50. K1; *P. gingivalis* K1.

K2; *P. gingivalis* K2. K3; *P. gingivalis* K3.

K4; *P. gingivalis* K4. K5; *P. gingivalis* K5.

R: Lambda phage DNA size markers in kilobases (kb).

IV. 고 찰

치주질환은 치주낭 내에 존재하는 세균 및 세균의 분비물들이 치주조직에 작용하고 이에 따른 신체 방어기전이 유도됨으로써 초래되는 반응의 결과로 야기되는 데, 가장 중요하게 생각

되는 일차적인 원인은 치주낭 내에 존재하여 치주낭을 감염시키는 독성세균, 특히 혐기성 세균을 들 수 있다¹⁻²⁾.

치은연하 치면세균막에서 발견되는 그람음성의 혐기성 간균인 *P. gingivalis*가 치주질환의 원인균으로 작용하고^{12-16,19,26)}, 실험동물에서

치주염을 유발함이 보고되었다²¹⁻²⁴⁾. 우리 연구에서 6mm이상의 치주낭을 갖는 치주염 환자의 병소부위에서 분리한 *P. gingivalis*의 혈청형이 모두 b형인 것은 인종과 식이습관의 차이에 의한 것으로 생각되고³⁶⁾, 특정 혈청형이 주로 분리되는 것은 함 등⁵¹⁾이 보고된 생체내 세균독성이 다른 두 혈청형에 비하여 강하다는 보고와 관련이 있는 것으로 생각되는 데, Okuda와 Takazoe가⁵²⁾ 보고한 치은염 부위에 존재하는 *P. gingivalis*에 대한 혈청형 구분 및 질환진행 여부와 관련된 부위에서 분리한 *P. gingivalis*에 대한 혈청형에 관한 연구가 더 필요한 것으로 생각된다. 시험관에서의 혈청형 간의 독성 차이를 보이는 것은 질환의 양태 및 질환활성과 혈청형의 관련이 있음을 추론할 수 있고, 시험관에서의 세포활성이 내독소 및 세균파절물에 따라 다른 것은 내독소가 세포에 대한 중식효과를 가짐을 알 수 있다. 표준 혈청형 b 세균파절물의 세포독성이 내독소를 가한 것보다 심한 것은 세균 대사산물의 차이 및 유전자이종성과의 관련을 추정할 수 있다 (Table 2-7 및 Fig. 2-3). 치주낭내 분리균주의 내독소가 치주인대유래세포의 세포독성에 미치는 영향이 비슷한 것은 동일한 혈청형에서 추출되었음에 기인하는 것으로 생각되고, 세균파절물에 의한 세포활성이 치은조섬유세포와 치주인대유래세포간에 관련성이 없는 것은 치주인대유래세포가 알칼리성 인산효소 활성등 세포가 가지는 특성이 다르기 때문으로 생각된다(Table 2와 Table 5)⁵³⁾.

제한효소를 이용한 유전자이종성에 관한 연구에서 동일한 종에서도 유전자의 다양성이 존재하고, *mutans streptococci*의 전이가 나타나며, 동일인의 구강 내에서도 다른 유전자형을 갖는 종이 존재함이 보고되었다^{36,39-41)}. 우리 연구에서 동일한 *P. gingivalis* b 혈청형 내에 유전자이종성이 존재하고(Fig. 2-3), 세균 대사산물의 차이를 보이며(Table 7), 세균독성의 차이를 보이는 것과 상호관련이 있음으로 생각된다(Table 1-6). 또한, 이러한 유전자이종성과 개인에 따라 다른 임상증상의 차이를 추론할 수 있으며 질환활성 및 휴지기의 균에

대한 자료가 필요하고, 이러한 질환활성과 관련된 유전자의 추적과 이러한 유전자에 대한 탐식자의 개발이 필요할 것으로 생각된다.

*P. gingivalis*의 배양여과액은 연골세포의 기질생성을 억제한다고 보고되었는데³⁰⁾, 우리 연구에서 동일한 *P. gingivalis* 혈청형 b 내에서도 세균독성의 차이를 보였는데, 독성을 나타내는 부위는 중식효과를 나타내는 내독소에 존재하기 보다는 고성능액체크로마토그래피를 이용한 대사산을 분석한 결과에서 나타나는 낙산 및 젖산의 존재 유무와 관련이 있을 것으로 생각된다(Table 3, Table 4, Table 6 및 Table 7).

혈청형 b형인 치주낭내 분리 균주와 *P. gingivalis* W50에서 모든 균주가 낙산을 생산하고 낙산이 농도에 관계없이 치은조섬유세포에 세포독성을 보았다(Table 8). 이는 호기성 세균이 최종 전자수용체로 산소를 필요로하나 혐기성 세균의 경우 발효반응에서 에너지를 얻고, hemin의 감소등이 색소소실을 유발하여 동일한 b 혈청형 내에서도 세균의 대사산물 및 세균독성의 차이가 존재함과 관련이 있고, 분리균주에 따른 유전자이종성의 존재함과 관련이 있으리라 생각된다³⁶⁻³⁸⁾. 이와 같은 관점에서 유기산이 세균독성 발생의 요소로써 작용함을 추론할 수 있으며, 낙산이 질환의 표식자로서의 가능성이 있음을 암시한다. 이러한 현상은 Tonetti²⁷⁾등이 보고한 낙산의 다형핵백혈구에 대한 화학주성 억제 및 림프구 중식등의 작용과 더불어 치주질환이 국소부위(local site)의 질환활성과 관련이 있을 것으로 추정되는데, 유기산의 생성과 관련된 유전자의 추적이 필요한 것으로 생각되며, 질환진행과 관련이 있는 유기산의 존재에 관한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

생체 및 시험관 내에서 세균독성을 나타내는 균주를 찾아내고 고성능액체크로마토그래피를 이용한 세균산물을 분석하고 세균 대옥시리보핵산의 유전자이종성과의 관련성을 규명하고자

치주염의 질환부위에서 분리된 다섯 균주의 *P. gingivalis*는 혈청형 b 였고, 모든 혈청형 b 는 낙산을 생산하였고, 또한 낙산은 농도에 관계없이 치은조심유세포의 세포활성을 억제하였다. Plasmid의 분리에 의하면 뚜렷한 band의 존재를 관찰할 수 없었으나, 전체 염색체 리보핵산을 *Pst I* 으로 소화하여 유전자이종성을 검사한 결과, 동일한 혈청형 내에서도 유전자이종성을 관찰할 수 있었다.

이상의 연구결과 *P. gingivalis*균주에 따른 세균독성 및 유기산의 생산비율의 차이가 존재하고, 이러한 차이와 유전자이종성이 관련이 있으리라 생각된다.

REFERENCES

- Hirsch, R.S. and Clark N.G.: Infection and periodontal diseases. Rev Infect Dis. 2(5): 707-715, 1989.
- Slots, J. and Genco, R.J.: Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: Virulence factors in colonization, survival and tissue destruction. J. Dent. Res., 63: 412, 1984.
- 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, D.C., American Society for Microbiology, pp. 27-45, 1982.
- Slots, J. and Rosling, B.G.: Suppression of the periodontopathic microlora in localized juvenile periodontitis by systemic tetracycline. J. Clin Periodontol 10:465-486, 1983.
- Zambon, J.J., Christersson, L.A. and Slots, J.: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: Prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. J Periodontol 54:707-711, 1983.
- Kim, K.J., Kim D.K., Chung C.P. and Son, S.: Longitudinal monitoring for disease progression of localized juvenile periodontitis. J. Periodontol., 63:806-811, 1992.
- Loesche, W.J., Syed, S.A., Laughon, B.G. and Stoll, J.: The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. J. Periodontol., 53:223-230, 1982.
- Chung, C.P., Nisengard, R.J., Slots, J. and Genco, R.J.: Bacterial IgG and IgM antibody titers in acute necrotizing ulcerative gingivitis. J. Periodontol., 54:557-562, 1983.
- Kornman, K.S. and Loesche, W.J.: The subgingival microbial flora during pregnancy. J. Periodont. Res., 15:111-122, 1980.
- Mashimo, P.A., Yamamoto, Y., Slots, J., Park, B.H. and Genco, R.J.: The periodontal microflora of juvenile diabetics: culture, immunofluorescence, and serum antibody studies. J. Periodontol., 54:420-430, 1983.
- Mashimo, P.A., Yamamoto, Y., Nakamura, M. and Slots, J.: Selective recovery of oral *Capnocytophaga* spp. with sheep blood ager containing Bacitracin and Polymixin B. J. Clin. Microbiol., 17:187-191, 1983.
- 정해원, 정종평: 급성 진행형 치주염 환자의 *Bacteroides gingivalis* SNUDC1 균주에 대한 혈청 및 치은 열구액 항체 역가에 관한 면역학적 연구. 대한치주과학회지 1984 : 14(1) : 21.
- 정종평, 이영희, 최주용, 손재운, 손성희, 최상묵, 한수부: 한국인의 급성 진행성 치주염

- 환자 치은연하 균태 *Bacteroides gingivalis* 표주 분리에 관한 연구 (I). 대한치과의사협회지 1984; 22(10): 865.
14. 정종평, 이영희: 한국인 급성 진행성 치주염 환자의 치은 연하 치태내 *Bacteroides gingivalis* 균주의 분포 항생제 감수성 및 특이항체 존재에 관한 연구. 대한면역학회지 1985; 7: 65.
 15. 정종평, 이진용, 이영희, 정해위, 정현주: 형광 현미경법 및 효소결합 면역흡착법을 이용한 *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* 및 *Bacteroides asaccharolyticus*의 형질학적 연구. 대한미생물학회지 1987; 22(2): 117.
 16. 정종평, 이종훈, 정현주: 한국인 급성진행성 및 성인성 치주염의 원인균인 *Bacteroides gingivalis*에 대한 미생물 및 면역학적 연구. 대한미생물학회지 1987; 22(3): 309.
 17. Manti, F., K. Kornman and J. Goldschneider: Effects of an immunomodulating agent on peripheral blood lymphocytes and subgingival microflora in ligature-induced periodontitis. Infect. Immun. 45:172-179, 1984.
 18. Nagahata, T., Kiyoshige, T., Tomono, S., Abe, R., Sasaki, S. and Takazoe, I.: Oral implantation of *Bacteroides asaccharolyticus* and *Eikenella corrodens* in conventional hamsters. Infect. Immun. 36:304-309, 1982.
 19. Slots, J. and Hausmann, E.: Longitudinal study of experimental induced periodontal disease Macaca arctoides: relation between microflora and alveolar bone loss, Infect. Immun., 23:260-269, 1979.
 20. Takazoe, I., Nakamura, T. and Okuda, K.: Colonization of the subgingival area by *Bacteroides gingivalis*. J. Dent. Res., 63: 422, 1984.
 21. Heijl, L., Wennstrom, J., Lindhe, J. and socransky, S.S.: Periodontal disease in gnotobiotic rats. J. Periodontal Res., 15: 405, 1980.
 22. Katahira, H., Okuda, K., Moriguchi, M., Naito, Y., Takazoe, I. and Miake, K.: The effect of immunization on experimental periodontitis induced by inoculation of *Bacteroides gingivalis* in hamsters. Bull Tokyo Dent. Coll., 26:127-136, 1985.
 23. Nair, B.C., Mayberry, W.R., Dziak, R., Chen P.B., Levine, M.J. and Hausmann E.: Biological effects of a purified lipopolysaccharides from *Bacteroides gingivalis*. J. Periodont. Res., 18:40-49, 1983.
 24. Slots, J. and Reynolds, H.S.: Long-wave UV light fluorescence for identification of black-pigmented *Bacteroides* spp. J. Clin. Microbiol 16(6): 1148-1151, 1982.
 25. van Winkelhoff A.J., Carlee, A.W. and de Graaff: *Bacteroides endodontalis* and other black-pigmented *Bacteroides* species in odontogenic abscesses. Infect Immun., 49: 494-497, 1985.
 26. Tew, J.G., Marshall, D.R., Burmeister, J.A. and Renney, R.R.: Relationship between gingival crevicular fluid and serum antibody titers in young adults with generalized and localized periodontitis. Infect. Immun., 49:487-493, 1985.
 27. Tonetti, M., Eftimiadi, C., Damiani, G., Buffa, D., Botta, G.A.: Short chain fatty acids present in periodontal pockets may play a role in human periodontal diseases. J. Periodont. Res., 22:190-191, 1987.
 28. Carlsson J, JF Höfbling and GK Sundqvist: Degradation of albumin, haemopexin, haptoglobin and transferrin, by black-pigmented *Bacteroides* species. J. Med. Microbiol., 18:39-46, 1984.
 29. Millar SJ, EG Goldstein, MJ Levine and

- E. Hausmann: Modulation of bone metabolism by two chemically distinct lipopolysaccharide fractions from *Bacteroides gingivalis*. *Infect. Immun.*, 51:302-306, 1986.
30. Touw JJA, TJM van Steenberg and J de Graaff: Butyrate: a cytotoxin for Vero cells produced by *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides asaccharolyticus*. Antonio van Leeuwenhoek *J. Microbiol. Serol.*, 48: 315, 1982.
31. Botta, G.A., Radin L., Costa A., Schito, Blasi G.: Gas-liquid chromatography of the gingival fluid as an aid in periodontal diagnosis. *J. Periodont. Res.*, 20:450-457, 1985.
32. van Steenberg TJM, den Ouden MD, Touw JJA and de Graaff J.: Cytotoxic activity of *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides asaccharolyticus* *J. Med. Microbiol.*, 15:253-258, 1982.
33. Touw JJA, van Kampen GPJ, van Steenberg TJM, Veldhuijzen JP and de Graaff J.: The effect of culture filtrates of oral strains of black-pigmented *Bacteroides* on the matrix production of chick embryo cartilage cells in vitro. *J. Periodont. Res.*, 17:352-357, 1982.
34. Mayrand D. and Holt S.C.: Biology of asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species. *Microbiol Rew.* 52:134-152, 1988.
35. Greiner, D., Mayrand, D.: Selected characteristics of pathogens and nonpathogenic strains of *Bacteroides gingivalis*. *J. Clin. Microbiol.*, 25:738-740, 1987.
36. Loos B.G., Mayrand, D., Genco, R.J. and Dickinson, D.P.: Genetic heterogeneity of *Porphyromonas* (*Bacteroides*) *gingivalis* by genomic DNA fingerprinting. *J. Dent. Res.*, 69(8): 1488-1493, 1990.
37. Neiders, M.E., Chen, P.B., Suidoo, H., Reynolds, H.S., Zambon, J.J., Shlossman, M., Genco, R.J.: Heterogeneity of virulence among strains of *Bacteroides gingivalis*. *J. Periodont. Res.*, 24:192-198, 1989.
38. Shah, H.N., Sedden, S.V., Gharbia, S.E.: Studies on the virulence properties and metabolism of pleiotropic mutants of *Porphyromonas gingivalis* (*Bacteroides gingivalis*) W50. *Oral Microbiol. Immunol.*, 4: 19-23, 1989.
39. Dudney, J.D., Neuvar, E.K., Soberay, A.H.: Restriction endonuclease fragments polymorphisms of oral viridans streptococci, compared by conventional and field-inversion gel electrophoresis. *J. Dent. Res.*, 71 (5): 1182-1188, 1992.
40. Kulkarni, G.V., Chan, K.H., Sandham, H.J.: An investigation into the use of restriction endonuclease analysis for the study of transmission of mutans streptococci. *J. Dent. Res.*, 68(7): 1155-1161, 1989.
41. Loose, B.G., Van Winkelhoff, A.J., Dunford, R.G., Genco, R.J., de Graaff, J., Dickinson, D.P., Dyer, D.W.: A statistical approach to the etiology of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Dent. Res.*, 71(2): 353-358, 1992.
42. Syed, S.A., Loesche, W.J.: Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Appl. Microbiol.*, 23:638-644, 1972.
43. Loesche, W.J., Hockett, R., Syed S.A.: Evaluation of Kanamycin as an aid in the isolation of *Bacteroides melaninogenicus* from dental plaque. *Arch Oral Biol.*, 16: 813-815, 1971.
44. Westphal, O. and Jann, K.: Bacterial lipopolysaccharide extraction with phenol water and further application of the procedures. *Methods Carbohydr. Chem.*, 5:83, 1965.
45. Carmichael, J., DeGraff, W.G., Gazdar,

- A.F., Minna J.D. and Mitchell, J.B.: Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Research.*, 47: 936-942, 1987.
46. Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Method.*, 65:55-63, 1983.
47. Gordon, O., Guerrant, M.A., Lambert, M.A. and Waynemoss, O.: Analysis of short-chain acids from anaerobic bacteria by high performance liquid chromatography. *J. Clin. Microbiol.*, 16:355, 1982.
48. Johansen, H., Olsen, I., and Kerekes, K.: Differentiation between *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides endodontalis* and *Bacteroides asaccharolyticus* by means of HPLC analysis of non-derivatized free metabolic acids. *Oral Microbiol. Immunol.*, 3: 42-25, 1988.
49. Kado, C.I., and Liu, S.T.: Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 145:1365, 1981.
50. Wilson, K.. Preparation of Genomic DNA from bacteria. In: *Current Protocols in Molecular Biology*, FM Ausubel, R Brend, RE Kingston, DD Moore, JG Seidman, JA Smith and K Strual, Eds., New York, NY: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, pp. 2.4.1-2.4.5.
51. 함명도, 정종평, 손성희 : *Bacteroides forsythus*의 항원 특성 및 조직독성에 관한 연구. 대학치주과학회지 1989 : 19(2) : 46.
52. Okuda, K. and Takazoe, I.: The role of *Bacteroides gingivalis* in periodontal disease. *Adv. Dent. Res.*, 2(2): 260, 1988.
53. Sommerman, M.J., Archer, S.Y., Imm, G.R., Foster, R.A.: A comparative study of human gingival fibroblasts in vitro. *J. Dent. Res.*, 67(1):66-70, 1988.

—Abstract—

RELATIONSHIP BETWEEN VIRULENCE, METABOLIC ACID AND GENETIC HETEROGENEITY OF *PORPHYROMONAS GINGIVALIS*

Kang - Ju Kim, Chong - Pyoung Chung

Department of Periodontology, College of Dentistry, Seoul National University

P. gingivalis has been implicated as a strong pathogen in periodontal disease and known to have three serotypes of *P. gingivalis*. The purpose of this study is to investigate on the relationship between virulence, metabolic acids and genetic heterogeneity of *P. gingivalis*.

P. gingivalis W50 standard strain and five strains of *P. gingivalis* serotype b Korean isolates were used in this study.

For in vitro virulence test, lyophilized whole cell *P. gingivalis* were suspended, and sonicated with ultrasonic dismembranometer. Sonicated samples were applied to cultured cells derived from periodontal ligament, and cell activity was assayed with growth and survival assay.

The metabolic acids were also extracted, and determined by High Performance Liquid Chromatography. *Pst I*-digested bacterial genomic DNA was electrophoresed, and densitometric analysis was performed to study the genetic heterogeneity.

All of the *P. gingivalis* serotype b produced butyric acid.

In cell activity study, butyric acid inhibited the cell activity irrespective of its concentration.

Densitometric analysis showed restriction fragment length polymorphism.

These results suggested that there existed heterogeneity of the metabolic acids and the virulence of *P. gingivalis* and such heterogeneity might be related to genetic heterogeneity.

Key word: *Porphyromonas gingivalis*, serotype, sonic extract, metabolic acid, genetic heterogeneity