

한국인 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* 균주의 특이 독성 clone형과 혈청형 및 백혈구독성과의 관계

구 영

서울대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서 론

치주질환은 세균에 의한 감염의 결과이며 몇몇 질환의 형태는 특이적인 미생물과 관련되어있다고 알려졌다^{1,2,3}. 따라서 치주질환의 원인규명과 치료에 있어서 원인균의 관계, 질환의 전이 그리고 숙주의 반응등을 이해하는 것이 중요하다. 이 중 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*)는 국소유년성치주염(LJP)³뿐만 아니라 급속진행형 치주염^{3,4}, 난치성 치주염⁵ 및 성인성 치주염⁶의 중요한 원인요소로 생각되어지는 그람 음성의 비운동성 간균으로 spore를 만들지 않는 통기성 세균이다.

*A. actinomycetemcomitans*는 치주조직 파괴에 중요한 역할을 담당하는 독성요소들을 갖고 있는데 그 중 가장 포괄적인 요소로 leukotoxin이 있다⁷. 건강한 개체에서는 7%만이 leukotoxin-producing strain이 보이는 반면 질환에 이환된 개체에서는 43-75%가 보인다고 보고되고 있다⁸. 이러한 독성요소의 차이는 혈청형과 연관되어있다고 알려졌다⁹. Zambon등⁹은 구강내 *A. actinomycetemcomitans* 균주를 혈청학적으로 a, b, c 3개의 혈청형으로 분류하였고 Saarela등¹⁰에 의해 미결정형의 임상적 혈청형 d와 e가 첨가되어 분류되었다. 건강한 개체에서는 혈청형 a와 b가 유사한 빈도로 나타나지만 LJP의 경우는 혈청형 b가 증가된 비율로 나타나서 치주조직에 더 파괴적이라고

하였다. 반면 Song등¹¹은 한국인 LJP환자에서는 혈청형 c가 빈번하게 나타난다고 하였으며 Chung등¹²은 혈청형 a, b, c가 같은 분포를 나타내고 혈청형간의 독성정도의 차이는 없었다고하였다. 또한 Zambon등⁹은 하나이상의 혈청형을 가진 사람은 없었다고 한 반면 Chung등¹²은 JP환자 12명중 3명에서 2가지 서로 다른 혈청형이 발견되었다고 보고하고 있다.

*A. actinomycetemcomitans*가 만들어내는 독성인자중 하나인 leukotoxin은 막으로 둘러 싸인 RTX(repeat-in toxin)균에 속하는 세포독성인자로서^{13,14,15} 사람의 다핵백혈구와 단핵백혈구에 특이한 독성을 보인다^{16,17}. Leukotoxin의 발현은 4개의 유전자로 이루어진 유전자 operon에 의해 encode되는데 *ltxA*라 불리는 구조 유전자는 toxin을 encode하고 *ltxB*, *ltxC*, *ltxD*는 toxin의 이동과 활성화를 담당한다^{13,18}. *A. actinomycetemcomitans* 균주들 사이에서도 백혈구독성인자의 발현의 정도가 상당히 차이가 있으나^{17,19,20} 모든 균주는 완전한 독성인자 유전자 operon을 가지고 있다. 유전자 분석을 통해 이러한 백혈구 독성인자의 생산은 전사 단계에서 조절됨을 알 수 있었고 독성이 매우 강한 균주에서는 second *ltx* promoter가 있고 *ltx* promoter부근에 530bp의 결손이 있음이 밝혀졌다¹⁹. 이는 또 이 promoter부위에서 *HindIII* restriction site polymorphism을 보이는 것에서도 확인할 수 있었다^{18,19,21}.

그러나 아직까지 *A. actinomycetemcomitans*

균주의 백혈구 세포독성의 양과 질의 차이가 치주질환과 연관성이 있는지의 여부는 밝혀져 있지 않다.

본 연구에서는 한국인에서 분리한 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* 균주의 혈청형 및 백혈구 독성 균주 분포를 분석하고 특이하게 높은 leukotoxicity가 보이는 균주(JP2-like gene)가 존재하는지의 여부를 알아보려고 한다.

II. 연구 대상 및 방법

1. 연구 대상 선택 및 임상 측정

서울대학교 치과대학병원 치주과에 내원한 환자중 국소유년성 치주염과 성인성 치주염의 소견을 보이는 6명의 환자에서 모두 13부위를 선정하여 임상소견 및 Michigan O probe를 이용한 치주낭 깊이 측정을 하였다. (Table 1) 이 중 균주번호 1에서 6번 까지는 같은 가족이다. 이들은 본 병원에 내원하기 6개월전부터 항생제 복용 및 치주치료를 받지 않았다.

2. *A. actinomycetemcomitans*의 분리 배양 가. 표본 채취 및 배양

치주낭 주위를 멸균된 건조탈지면으로 표면 치태를 완전히 제거하고 근관치료용 paper point #40 (Johnson Fine Absorbent Point, Johnson & Johnson, East Windsor N.J., U.S.A.) 3개를 동시에 삽입하여 구부러질 때까지 지입한 후 약 10초후 제거하여 2ml의 pre-reduced VMGAIH에 넣어 혐기성 배양상태를 유지 하면서 Vortex mixer로 60초간 진탕한 후 이 액을 10배씩 희석시켜 선택배지에 각 100 μ l씩 분주하였다. 선택배지로는 tryptic soy agar (BBL, microbiology system, Cockeysville Md., U.S.A)에 10% 열처리된 말혈청 및 0.1% yeast extract와 75 μ g/ml bacitracin 과 5 μ g/ml vancomycin(Sigma Chemical Co., St. Louis Mo., U.S.A.)을 혼합하여 사용하였다²³⁾. 선택배지에 옮겨진 희석 균태용액을 10% CO₂ 배양기속에서 72시간 배양하고 순수분리 배양이 이루어질때까지 순수배양을 계속하고 얻어진 집락은 사용할 때까지 -170 $^{\circ}$ C 액체질

Table 1. Clinical features of isolated strains

Strain No.	Name	Sex	Age	Diagnosis	Tooth No.	Site	Pocket Depth	Clinical Features
1	SN I	F	38	Post LJP	21	MP	5mm	Generalized alveolar bone destruction & Mobility of No. 21
2	SN I	F	38	Post LJP	21	MP	5mm	
3	SN II	F	11	LJP	46	MP	5mm	Gingival inflammation
4	SN II	F	11	LJP	46	MP	5mm	〃
5	SN II	F	11	LJP	46	MP	5mm	〃
6	SN II	F	11	LJP	42	DLa	4mm	〃
7	SN III	F	15	GJP	26	MP	9mm	Generalized severe inflammation
8	SN III	F	15	GJP	26	MP	9mm	〃
9	SN III	F	15	GJP	26	MP	9mm	〃
10	SN IV	M	33	PostLJP	26	MB	6mm	Localized severe alveolar bone destruction(No.26)
11	WK I	F	57	AP	46	MB	6mm	Generalized moderate gingival
12	WK I	F	57	AP	16	MB	6mm	inflammation with alveolar bone
13	WK II	M	56	AP	45	MB	6mm	loss

* LJP : localized juvenile periodontitis
GJP : generalized juvenile periodontitis
AP : adult periodontitis

MP : mesio-palatal
MB : mesio-buccal
DLa : disto-labial

소탱크에 저장 보관하였다.

나. 미생물 동정

그람 염색에서 음성의 간균여부를 확인하고 한천에 부착된 둥글고 볼록한 별모양의 내부 구조를 가진 집락형태와 catalase 양성반응으로 첫번째 동정의 기준으로 삼았다. 그 외 생화학적 검사로는 V factor 필요여부, porphyrin 검사, indole 검사, urea분해여부, ornithin decarboxylase 검사, lysine decarboxylase 검사 등을 시행하였다²⁴⁾. 확인된 *A. actinomycetemcomitans* 균을 NIH-thioglycolate broth에 성장시켜 -170°C 액체질소탱크에 보관하였다.

3. 혈청형 분석

5가지 혈청형의 표준균주인 ATCC 29523 (serotype a), Y4 (serotype b), SUNY aB 67 (serotype c), 그리고 IDH 781 (serotype d), IDH 1705 (serotype e)를 thioglycolate broth에 키워 500ml의 NIH-TG broth에 배양하여 원심분리하고 pellet을 PBS로 3번 washing하였다. pellet을 PBS로 1×10^8 cell/ml의 농도로 희석하여 가토의 정맥에 면역량을 단계적으로 증가시키면서 2일 간격으로 한달동안 면역감작시켰다. 형광현미경으로 역가를 확인한 후 심장 천공법으로 혈액을 채취한 다음 혈청을 분리, 보관하였다. 항혈청을 얻은 후 황산암모니움 침전법과 면역 흡착법에 의하여 교차반응 유무를 판별한 후 각 혈청에 특이성을 갖는 감마글로블린액을 얻었다. 순수분리배양된 *A. actinomycetemcomitans* 균주의 혈청형결정은 간접면역형광법을 이용하여 다음과 같이 하였다. 각각의 균주를 1×10^8 cell/ml의 농도로 PBS에 희석하여 slide glass상에 20 μ l씩 도말, 고정한 후 동량의 각각의 혈청을 떨어뜨려 37°C 가습배양에서 30분간 반응시킨 후 PBS에서 15분간 세척한다. Fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-rabbit IgG (Cappel Lab., USA) 20 μ l를 37°C 가습배양기에서 30분간 반응시키고 PBS에서 1시간 동안 세척하고 90% glycerol 용액으로 고정하였다. 고정된 표본을 형광현미경(Olympus Inc. Co., Japan)으로

관찰하여 혈청형을 결정하였다.

4. *A. actinomycetemcomitans*의 leukotoxicity 분석

250ml의 NIH-thioglycolate broth(NIH-TG)에 환자에서 분리된 *A. actinomycetemcomitans*를 접종하여 37°C에서 3일간 배양한다. 배양된 *A. actinomycetemcomitans*를 8000rpm에서 원심분리한 후 pellet을 PBS(0.68% NaCl, 0.12% Na₂HPO₄, 0.07% KH₂PO₄, pH7.0)로 2번 washing한다. Pellet의 농도가 0.1g/ml가 되도록 DDW로 희석한 후 200W, 20kHz을 조건으로 ultrasonic disruptor(Fisher, USA)에서 2분의 간격을 두면서 얼음에서 1분씩 5번 sonication하고 이것을 4°C, 13000rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 따서 4°C에서 하루동안 PBS에서 투석하고 -20°C에서 보관하였다. 이렇게 얻어진 sonic extract의 단백질 농도는 Lowry method²⁵⁾에 의해 측정하여 사용시까지 -20°C에서 보관하였다.

사람의 정맥에서 피를 채혈하여 40 μ l씩 slide glass에 떨어뜨린후 37°C에서 30분간 incubation한 후 0.5% (w/v) gelatin/normal saline 용액으로 clot과 붙어있는 적혈구를 씻어내어 제거하여 PMN의 monolayer를 얻었다. 40 μ l의 1mg/ml의 농도로 희석된 각 균주의 sonic extract를 PMN monolayer에 노출시킨 후 37°C에서 30분간 incubation한다. Trypan blue (1.6 mg/ml in normal saline)로 10분간 염색한 후 10분간 실온의 moist chamber에 보관한 뒤 광학현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하여 trypan blue에 염색된 세포(죽은 세포)와 염색되지 않은 세포(살아있는세포)의 수를 세어 전체 세포수 중 염색된 세포의 수의 percentage를 구하였다.

5. *A. actinomycetemcomitans*균주에서의 whole-genomic DNA probe 분리 및 Southern blot

한국인에서 순수 분리배양된 *A. actinomycetemcomitans*의 독성 clone형 실험을 위해 DNA추출 및 Southern blot분석을 Denmark의

Aarhus 대학교 미생물학연구소와 공동으로 다음과 같이 시행하였다. 10ml의 NIH-G broth에 *A. actinomycetemcomitans* 균을 배양한 후 원심 분리하여 pellet을 0.5ml의 0.1M NaCl, 0.05M Tris-HCl, 0.05M EDTA(pH8.0), 20 μ l의 Sodium dodesyl sulfate(SDS)으로 현탁한 후 proteinase K(1mg/ml)을 첨가하여 16시간동안 37 $^{\circ}$ C에서 반응시킨다음 phenol/chloroform/isoamyl alcohol(25 : 24 : 1), chloroform/isoamyl alcohol을 순서대로 넣고 추출하였다. 0.6배의 isopropanol을 넣고 DNA를 침전시킨 후 70% EtOH로 씻은후 건조한 후 200 μ l의 TE buffer(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA [pH 7.6])를 넣고 냉장보관하였다. 10U의 *Taq*I(Borehringer Mannheim, Germany)를 넣어 2 μ g의 DNA를 자른 후 1% 아가로즈 젤에서 1V/cm로 18시간동안 전기영동하였다. 젤을 denaturation, neutralization을 한 후 DNA를 nylon membrane(Schleicher & Schuell, Germany)에 옮기고 UV-cross linker(UV-Stratalinker)로 DNA를 membrane에 고정시켰다.

3.1kb의 hybridization probe LtxA-3.1은 JP2 균의 genome DNA를 PCR로 증폭시켜 얻었으며 두번째 사용한 probe delta 530(Δ 530)은

A. actinomycetemcomitans 652의 DNA 절편을 PCR 증폭으로 얻었다. SC2 probe는 λ DASH II에 JP2균주를 클로닝하여 얻었다. 클론된 DNA 절편은 Geneclean(Bio 101)으로 추출하고 probe로 사용된 DNA 절편은 [32 P]dATP로 labelling 시켰다. hybridization은 Sambrook등²⁶⁾의 방법으로 시행하였다.

III. 실험 결과

6명의 환자에서 얻은 13균체의 치태세균을 적정량의 Ringer액에 희석하고 선택배지에 식균한 후 CO₂ 배양기에서 배양한 후 집락의 형태를 현미경 관찰을 통해 균집락 내부에 별모양의 핵이 존재하는지 유무를 판단하였고, 배지에 단단히 부착된 것인지의 여부를 관찰하였다. V factor requirement와 porphyrin 검사 및 3% H₂O₂를 이용한 catalase 검사에서 13개의 균주 모두에서 양성반응이 나왔고 Kovac 지시약을 이용한 indole 검사, ornithin decarboxylase 검사, lysin decarboxylase 검사, urease 검사 그리고 ONPG 검사 모두에서 음성반응이 나타나 선택배지에서 배양된 균주가 모두 *A. actinomycetemcomitans*임을 확인하였다. (표 2)

Table 2. Biochemical test for identification of *A. actinomycetemcomitans*

Strain No.	V-factor require	Porphyrin test	Indole	Ornithin dec.	Lysin dec.	ONPG	Catalase	Urease
1	+	+	-	-	-	-	+	-
2	+	+	-	-	-	-	+	-
3	+	+	-	-	-	-	+	-
4	+	+	-	-	-	-	+	-
5	+	+	-	-	-	-	+	-
6	+	+	-	-	-	-	+	-
7	+	+	-	-	-	-	+	-
8	+	+	-	-	-	-	+	-
9	+	+	-	-	-	-	+	-
10	+	+	-	-	-	-	+	-
11	+	+	-	-	-	-	+	-
12	+	+	-	-	-	-	+	-
13	+	+	-	-	-	-	+	-

Table 3. Serotype distribution, unviable PMN percentage for leukotoxicity and RFLP types for detection of virulent clonal type

Strain No.	Serotype	Leucotoxicity	RFLP type		
			△530	SC2	ltxA-3.1
1	d	0%	h	nh	h
2	b	0%	h	nh	h
3	e	0%	h	nh	h
4	nt	0%	h	nh	h
5	d	33%	h	nh	h
6	d	30%	h	nh	h
7	nt	0%	h	nh	h
8	e	0%	h	nh	h
9	nt	0%	h	nh	h
10	e	8.2%	h	nh	h
11	b	0%	h	nh	h
12	b	0%	h	nh	h
13	e	0%	h	nh	h

* nt : nonserotypeable
 h : hybridization
 nh : nonhybridization

가토에서 5가지 혈청형의 표준균주에 대한 항혈청을 얻은 후 황산암모니움 침전법과 면역흡착법에 특이성을 갖는 감마글로블린액을 간접면역형광법에 의해 분석한 결과 b, d, e 혈청형이 고른 분포를 보였으며, 균주번호 1,2의 좌측 중절치의 근심구개면 그리고 균주번호 3,5의 우측제1대구치의 근심협면에서는 동일인의 같은 부위에서 채취한 균주에서도 서로 다른 혈청형이 나왔다. (표 3)

다핵백혈구를 이용한 Leukotoxicity 검사에서는 균주번호 5와 6에서 각각 33%와 30%가 나왔으며 이들은 모두 혈청형 d를 갖고 있었다. 또 10번째 균주에도 8.2%의 leukotoxicity를 보였는데 혈청형은 e로 나타났다. 혈청형 b에서는 leukotoxicity는 보이지 않았다. (표 3)

특이하게 높은 백혈구독성인자를 가진 JP2 strain의 존재여부를 확인하기 위해 3가지 probe를 사용한 결과 JP2 strain만이 hybride 되는 SC2 probe에는 실험균주 모두 hybridization되지 않았고 652 strain에서 얻은 △530

probe에는 모두 hybridization 되었다. 또한 JP2 strain에서 얻은 ltxA-3.1 probe에도 모든 균주가 hybridization 되었다. (표 3, 그림 1)

IV. 총괄 및 고안

많은 종류의 *Actinobacillus*종이 동물에서 발견되지만 사람에서는 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*만이 항상 발견된다. 이 세균은 구강내 치주낭 뿐만 아니라 endocarditis, brain abscess, osteomyelitis, subcutaneous abscess와 같은 감염성 질환과도 관련되어 있다²⁷⁾. *A. actinomycetemcomitans*의 작용기전은 정확히 알려져있지는 않으나 이 세균에서 생산된 leukotoxin같은 독성 물질이 사람의 다핵백혈구나 단핵백혈구 뿐만 아니라 상피세포, endothelial cell, 섬유세포, 적혈구, 혈소판등을 파괴하며 또한 숙주로부터의 용해작용에 강하게 저항한다¹⁷⁾. Leukotoxin의 세포용해과정은 세포독소가 대상 세포면에 부착, 곧이어 cation-

Fig. 1. Southern blots showing genomic DNAs digested with the enzyme *Taq*I and hybridized with the probe Δ 530. Lanes : 1, SN I (d) ; 2, SN I (b) ; 3, SN II (e) ; 4, SN II (nt) ; 5, SN II (d) ; 6, SN II (d) ; 7, SN III (nt) ; 8, SN III (e) ; 9, SN III (nt) ; 10, SN IV (e) ; 11, WK I (b) ; 12, WK I (b) ; 13, WK I (e) ; 14, JP2(b) * () : serotype, nt : nonserotypeable

selective pore를 형성하여 결국에는 삼투용해 (osmotic lysis)를 일으켜 대상 세포를 무력화 시킨다. 이런 기전은 다른 그람 음성세균들이 백혈구나 적혈구를 용해시킬때도 마찬가지로의 현상이 일어난다^{26, 27)}.

A. actinomycetemcomitans leukotoxin의 독성정도는 매우 다양하게 나타나며 그들의 독성의 차이와 혈청형과의 연관성, 그리고 다른 균주에 비해 10-20배 높은 독성을 보이는 JP2 like 균주가 한국인에서 분리된 *A. actinomycetemcomitans* 균에서 발견되는지를 알아보고자 본 실험을 실시하였다.

*A. actinomycetemcomitans*는 *Haemophilus*

aphrophilus 및 *Haemophilus paraphrophilus*와 공통항원을 갖고 있어 V factor의 필요여부와 catalase 양성반응으로 이들 균주와 감별하였다²⁴⁾.

5종류의 표준 항혈청으로 혈청형을 분석한 결과 b, d, e 혈청형이 거의 고르게 나타났다. 균주번호 1, 2와 3, 4, 5, 6은 각각 동일인임에도 불구하고 다른 혈청형 2개가 나타난 것은 Zambon등⁹⁾이 주장한 하나 이상의 혈청형을 가진 환자는 없다는 것과는 상이하며 Chung등¹²⁾의 결과와 같다.

즉, 동일한 구강내 또는 동일한 치주낭에서 다른 2가지 혈청형이 함께 분리되었다는 결과를

확인해 주었다. 이 균의 감염경로를 밝히기 위해서는 치료전후의 혈청형의 분포를 비교하는 연구가 필요하다고 생각된다.

Leukotoxicity는 *A. actinomycetemcomitans*의 특이한 독성작용이다. Tsai등³⁰⁾은 이미 존재하고 있던 PMN의 기능저하가 *A. actinomycetemcomitans*와 같은 세균의 감염을 받기 쉽고 PMN의 기능은 많은 수의 crevicular PMN과 조직내 거대세포들을 파괴하는 leukotoxic factor에 의해 무력화되어 이러한 상황의 결과 *A. actinomycetemcomitans*의 증식은 독소에 저항하는 항체가 만들어질때까지 계속된다고 하였다. PMN monolayer에 sonic extract를 붙여 trypan blue 염색으로 조사한 백혈구독성검사에서는 균주번호 5와 6에서 각각 33%와 30%의 toxicity를 보였으며 이들은 모두 혈청형 d에 속하였다. 균주번호 10의 혈청형 e에서는 이보다 약한 8.2%가 나왔다. 실험한 균주중 23%에서 독성이 나타났으며 동일한 병소에서도 독성균과 비독성균이 함께 관찰되었는데 이는 Chung등¹²⁾의 결과와 같다. 그러나 혈청형 b가 다른 것에 비해 높은 독성을 갖는다는 일반적인 견해와는 달리 본 실험균주의 혈청형 b는 nonleukotoxic하였는데 이는 분리균주수의 제한때문에 어떠한 결론을 내리기는 한계가 있다고 하겠다. 또한 백혈구 독성 정도와 임상 소견간에는 연관성이 없는 것으로 보아 치주염은 다분히 opportunistic infection으로 여겨진다.

A. actinomycetemcomitans leukotoxin의 분자생물학은 이미 널리 알려져있다. 이것은 RTX(repeat in toxin) 균에 속하며 여기에는 *Pasteurella haemolytica* leukotoxin, *Bordetella pertussis* cyclolysin 그리고 *Actinobacillus pleuropneumoniae* haemolysin등이 있다.

A. actinomycetemcomitans leukotoxin에 대한 유전자 분석을 통하여 한국인에서 분리된 *A. actinomycetemcomitans*에 특이하게 높은 독성을 갖는 균주의 존재를 확인하기 위해, 분리된 모든 균주를 Aarhus대학 미생물 연구소(Denmark)와 공동으로 이미 만들어진 세 종류의 DNA probe (Δ 530, LtxA-3.1, SC2)를 이용한 JP2

유전인자의 존재여부를 알아보았다. 유전자의 polymorphism의 정도를 확인하기 위해 제한효소 *TagI*를 사용하였다. 그림 1에서와 같이 분리된 모든 *A. actinomycetemcomitans*의 구조 유전자(*ltxA*)는 매우 homogenous하였다. Southern blot을 Δ 530으로 명명된 530-bp절편과 hybridization시켰다. 이 Δ 530 probe는 가장 독성이 약하다고 알려진 652 균주의 *ltx* promoter에서 얻었으며 JP2균주에는 이러한 530-bp가 없다고 알려졌다. 검사에 사용된 모든 균주의 DNA가 530-bp의 DNA 절편과 hybridization되었다. 또 JP2 균주의 DNA절편을 λ -DASH II에 cloning하여 만든 SC2 probe에는 실험한 모든 균주가 hybridization 되지않았다. 즉 실험균주에는 강한 독소를 생산하는 JP2균의 promoter부위에서 보이는 530-bp의 결손(deletion)이 없었으며, SC2에 모두 반응하지않은 것으로 보아 JP2-like gene을 가진 strain이 없다는 것을 알 수 있었다. 미국의 유년성치주염 환자의 *A. actinomycetemcomitans*균에서 발견된 JP2균은 아직까지 유럽에서도 발견되지 않았고 한국인에서 처음 시행한 본 연구에서도 존재하지 않았다.

향후 상당한 기간동안과 지역적으로 다양한 곳에서 더 많은 *A. actinomycetemcomitans*균을 분리하여 이미 만들어진 probe를 이용하여 leukotoxin 발현 gene의 polymorphism을 자세히 규명하고 임상소견과의 상관관계를 파악하는 일이 필요하다 하겠다.

V. 결 론

한국인 치주염에서 분리된 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*균주의 특이 독성 clone형과 혈청형 및 백혈구독성과의 상관관계를 보고자 6명의 LJP 및 AP환자의 치주염에서 혐기성 방법으로 치대세균을 채취하여 선택배지를 이용하여 균주를 분리, 배양하였다. 혈청형 분포분석 및 백혈구독성 정도, 그리고 Southern blot을 통해 얻어진 DNA 절편에 Δ 530, LtxA-3.1, SC2 probe를 이용하여 DNA 절편을 hybridization 시킨 결과 다음과 같은 결과를 얻었

다.

1. 분리된 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*의 혈청형은 b, d, e가 고른분포를 보였고, 2명의 환자에 서는 동일한 부위에서 서로 다른 혈청형이 함께 분리되었다.
2. 백혈구 독성검사에서는 실험대상 균주의 23%에서 독성이 나타났으며 독성의 정도는 혈청형 및 임상소견과 연관성이 없었다.
3. 특이독성을 보이는 JP2-like gene을 가진 균주는 발견되지 않았다.

참고 문헌

1. Socransky, S. : Relationship of bacteria to etiology of periodontal disease. J. Dent. Res., 49 : 203-222, 1970.
2. Socransky, S. : Microbiology of periodontal disease : Present status and future consideration. J. Periodontol, 48 : 497-504, 1977.
3. Slots, J. and Genco, R.J. : Black pigmented and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease : Virulence factor in colonization, survival and tissue destruction. J. Dent. Res., 63 : 412-421, 1984..
4. Koga, K., Nishihara, Y. & Amino, K. : Chemical and biological properties of cell surface components of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* : Periodontal disease. pathogen and host immune response : 177, 1991.
5. Slots, J. : Bacterial specificity in adult periodontitis : A summary of recent work. J. Clin. Periodontol., 13 : 912-917, 1986.
6. Tanner, A. C., Haffer, C. & Bratthall, G. T. : A study of bacteria associated with advancing periodontitis in man. J. Clin. Periodontol., 6 : 278-307, 1979.
7. Zambon, J. J. : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. J. Clin. Periodontol., 12 : 1-20, 1985.
8. Zambon, J. J., Christersson, L.A. & 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.
9. Zambon, J. J., Slots, J. & Genco, R. J. : Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. Infect. & Immun., 41 : 19-27, 1983.
10. Saarela, M., Asikainen, S. : Frequency and stability of mono-or poly-infection by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a,b,c,d,e Oral Microbiol. Immunol., 7 : 277-279, 1992.
11. Song, E. J., Son, S. & Chung, C-P. : Serology and ultrastructure of *A.a* SNUDC strains isolated from LJP. J. Kor. Acad. of Periodontol., 14 : 87-97, 1984.
12. Chung, H. J., Chung, C-P. & Son, S. : *A.a* serotypes and leukotoxicity in Korean LJP. J. Periodontol., 60 : 506-511, 1989.
13. Kraig, E., T. Dailey, and D. Kolodrubetz. : Nucleotide sequence of leukotoxin gene from *A.a* : Homology to the alpha-hemolysin/leukotoxin gene family. Infect. & Immun., 58 : 920-929, 1990.
14. Lally, E. T., I. R. Kieba, D.R. Demuth, J. Rosenbloom, E.E. Golub, N.S. Taichman, and C.W. Gibson. : Identification and expression of the *A.a* leukotoxin gene. Biochem, Biophys. Res. Commun. 159 : 256-262, 1989.
15. Welch, R.A. : Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria. Mol. Microbiol. 5 : 521-528, 1991.
16. Taichman, N.S., R.T. Dean, and C.J. Sanderson. : Biochemical and morphological characterization of the killing of human monocytes by a leukotoxin derived from *A.a*. Infect. & Immun. 28 : 258-268,

- 1980.
17. Baehni, P.C., C.C Tsai, W.P. MaArthur, B. F. Hammond, B.J. Shenker and N.S. Taichman. : Leukotoxin activity in different strains of the bacterium *A.a.* isolated from Juvenile periodontitis in man. Arch. Oral Biol. 26 : 671–676, 1981.
 18. Kolodrubetz, D, T. Dailey, J. Eberzole and E. Kraig. : Cloning and expression of the leukotoxin gene from *A.a.* Infect. & Immun. 57 : 1465–1469, 1989.
 19. Brogan, J. M., E.T. Lally, K. Poulsen, M. Kilian and D.R. Demuth. : Regulation of *A.a.* leukotoxin expression : analysis of the promoter regions of leukotoxic and minimally leukotoxic strain. Infec. & Immun. 62 : 501–508, 1994.
 20. Spitznagel, J., E. Kraig and D. Kolodrubetz. : Regulation of leukotoxin in leukotoxic and nonleukotoxic strains of *A.a.* Infec. & Immun. 59 : 1394–1401, 1991.
 21. DiRienzo J.M. and T.L. Mckay. : Identification and characterization of genetic cluster group of *Aa* isolated from human oral cavity J. Clin. Microbiol. 32 : 75–81, 1994.
 22. Baer, P. N. : The Case for periodontosis as a clinical entity. J. Periodontol.42 : 516, –520, 1971.
 23. Slots, J. : Selective medium for isolation of *A.a.* J. Clin. Microbiol 15 : 606–609, 1982.
 24. Balows, A. : Manual of Clinical Microbiology. 5th ed. American Society for Microbiology 469, 1991.
 25. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., and Randall, R.J. : Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265 –275, 1951.
 26. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. : Molecular cloning : A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
 27. Block, P.J., A.D. Fox, C.Yoran and A. J. Kaltman : *A.a.* endocarditis : Report of a case and review of the literature. Am. J. Med. Sci. 266 : 387–392, 1973.
 28. Benz, R., A. Schmid, W. Wagner, and W. Goebel. : Pore formation by the *escherichia coli* alpha hemolysin : evidence for an association-dissociation equilibrium of the pore-forming aggregates. Infec. & Immun. 57 : 887–895, 1989.
 29. Berthold, P.H., D. Forti, I.R. Kieba,, J. Rosenbloom, N.S., Taichman and E.T. Lally : Electron immunocytochemical localization of *A.a.* leukotoxin. Oral Microbiol Immunol. 7 : 242–7, 1992.
 30. Tsai, C.C., McArthur, W.P., Baehni, P.C., Evian, C., Genco, R.J., Taichman, N.S. : Serum neutralizing activity against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin in juvenile periodontitis. J. Clin. Periodontol. 8 : 338–348, 1981

INTERRELATIONSHIP BETWEEN VIRULENT CLONAL TYPES, SEROTYPES AND LEUKOTOXICITY OF KOREAN STRAINS OF *A. ACTINOMYCETEMCOMITANS*

Ku Young

Dept. of Periodontology, College of Dentistry, Seoul National University

Previous studies have demonstrated that not all *A. actinomycetemcomitans* produced significant level of leukotoxic factor and its leukotoxicity have associated with serotype and genetic variation. Our aim was to investigate on the interrelationship between serotype and leukotoxicity of an *A. actinomycetemcomitans* consisting of 13 clinically well characterized Korean isolates and to evaluate if particular virulent clonal types of *A. actinomycetemcomitans* are associated with periodontal disease.

For this study, 13 strains of *A. actinomycetemcomitans* from 6 patients with periodontal disease were isolated and identified by using a selective medium (tryptic soy agar supplemented with 10% serum, 75µg of bacitracin and 5µg of vancomycin per ml) in 10% CO₂ incubator for 3 days with routine Gram staining, colony morphology and biochemical test. For serotyping, antisera were prepared from reference strains of 5 serotypes. (ATCC 29523, Y4, SUNY aB 67, IDH 781, IDH 1705) and then ammonium sulfate precipitation, immunoabsorption and indirect immunofluorescent procedures were done. For analysis of leukotoxicity, sonic extract of *A. actinomycetemcomitans* exposed to PMN, and trypan blue was stained for counting the cell viability. Finally Southern blot analyses of genomic DNA digested with the restriction enzyme *Tag* I was done and the Southern blots were hybridized with the 530bp fragment, termed delta 530, originating from the *ltx* promoter of strain 652 and deleted from strain JP2. Also *ltxA*-3.1 and SC2 probe from strain JP2 were hybridized with genomic DNA fragments.

Results reveal that strains isolated showed approximately equal proportions of 3 serotypes (b, d, e) and serotype b was not detected. 2 patients harbored 2 different serotypes in the same disease site. The prevalence of leukotoxic strain was 23% and there was no relationship between serotype, leukotoxicity and clinical observations. Especially virulent clonal types of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (JP2 strain) could not found.

Further studies are necessary on the genetic polymorphism of leukotoxin and its relations to clinical status.