

감염근관에서 분리한  
*Porphyromonas endodontalis*와 *Prevotella intermedia*의  
제한효소분석법에 의한 유전자 이질성에 관한 연구

서울대학교 치과대학 치과보존학 교실

신주희 · 김한욱 · 윤수한

Abstract

A Study of Genomic Clonal Types of  
*Porphyromonas endodontalis* and *Prevotella intermedia*  
Isolated from Infected Root Canals  
with Restriction Endonuclease Analysis

Joo-Hee Shin, D.D.S., Han-Wook, D.D.S., Ph.D.,  
Soo-Han Yoon, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

*Department of conservative dentistry, College of Dentistry, Seoul National University*

*Porphyromonas endodontalis* and *Prevotella intermedia* are black-pigmented anaerobic gram negative rods which have been isolated from infected root canals and submucous abscesses of endodontic origin. And they are associated with clinical symptoms such as pain, percussion, and foul odor. It has been reported that there are 3 serotypes according to capsule membrane in *P. endodontalis* and 2 DNA homology groups and 3 serotypes in *P. intermedia*, but there is no data available regarding genetic diversity for the species *P. endodontalis* and *P. intermedia*.

The purpose of this study is to investigate genetic diversities between individual strains of *P. endodontalis* and *P. intermedia* which are indistinguishable by serotyping and biotyping using bacterial DNA restriction endonuclease analysis.

45 teeth with at least one clinical symptoms, with single canal, and with pulp necrosis were sampled. For sampling bacteria, access cavity was prepared after disinfecting tooth and its surroundings. Then the paper point was inserted to the apex of the canal, leave

\* 본 연구논문은 서울대학교병원 1996년도 지정진료비에 의하여 이루어졌음.

there for 15 seconds, and finally it was placed into PRAS Ringer's solution and PBS solution. *P. endodontalis* and *P. intermedia* were identified by biochemical test and IIF after subculturing black and brown colonies which were produced after 7 days of incubation on BAP in anaerobic chamber. *P. endodontalis* and *P. intermedia* strains were grown in BHI broth and whole genomic DNA was extracted by phenol-chloroform extraction technique and digested by restriction endonuclease, *Eco* RI and *Pst* I. The resulting DNA fragments were separated by agarose gel electrophoresis, stained with EtBr and photographed under UV light.

The results were as follows :

1. In both *P. endodontalis* and *P. intermedia*, different serotypes could be found within a root canal of same patient.
2. There were obvious genetic heterogeneity within a patient and within a serotype in both *P. endodontalis* and *P. intermedia*.
3. *P. endodontalis* serotype c, isolated from different patients, exhibited limited genotypic diversity.

**Key words :** *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, Restriction Endonuclease Analysis, Serotype, Genetic diversity.

## I. 서 론

치수 및 치근단 질환의 발병과 진행에 있어서 미생물의 역할은 점차 중요시 되어 왔으며<sup>1,2,3)</sup>, 특히 혐기성 세균의 배양기술이 발달함에 따라 혐기성 세균의 근관감염에서의 비중이 증대되고 있다<sup>4,5,6)</sup>.

혐기성 세균 중 특히 Black-pigmented *Bacteroides*로 알려졌던 anaerobic rod는 구강내에서 치은염, 치주염, 근관내 감염 및 치성농양과 관련이 있으며<sup>7)</sup>, 감염근관에서는 *B. intermedius* (Oguntebi et al. 1982)와 *B. endodontalis* (Van Winkelhoff et al. 1985)가 많이 검출되는 것으로 나타났고<sup>7,8,9)</sup>, 이들은 급성동통, 타진반응, 삼출액 등의 증상과 깊은 관련이 있는 것으로 밝혀졌다.<sup>8)</sup>

Black-pigmented *Bacteroides* bacteria는 그 램음성의 혐기성 간균<sup>9)</sup>으로 혈액한천배지에서 검정색 또는 갈색의 균집을 형성한다. 이들 미생물에 대해서는 1921년 Oliver와 Wherry에 의해 *Bacterium melaninogenicum*으로 처음 정

의된 후 1939년 Roy와 Kelly에 의해 *Bacteroides melaninogenicus*로 변했으며 그 후 이 균종을 생화학적 특징 및 당 발효의 정도에 따라 3가지 subspecies로 나누게 되어 *B. melaninogenicus* subsp. *melaninogenicus*, *B. melaninogenicus* subsp. *intermedius*, *B. melaninogenicus* subsp. *asaccharolyticus*로 분류되었다. 이중에서 *B. melaninogenicus* subsp. *asaccharolyticus*의 두 strain인 *B. gingivalis*와 *B. asaccharolyticus*를 연구하던 중에 DNA homology와 enzyme test에서 다른 성질을 지닌 균을 발견하여 *Bacteroides endodontalis*라 명명하게 되었다<sup>9,10)</sup>. 최근에 이 3가지 asaccharolytic black pigmented anaerobic rod를 *Porphyromonas*로 명명하였으며<sup>11)</sup>, 이들 중 구강내 감염에서 주로 나타나는 것은 *Porphyromonas gingivalis*와 *Porphyromonas endodontalis*이다. 또한 *B. melaninogenicus* subsp. *intermedius* 등의 saccharolytic black-pigmented *Bacteroides*와 non-pigmented bacteria는 Prevot가 *Prevotella*라 명명하였다. 이들 혐기성 세균 중 *Porphyromonas endodontalis*와 *Prevotella intermedia*는 감염근관과<sup>12)</sup> 치근단 병소에서

검출되었으며<sup>13,14,15,16</sup> 타진반응이나 악취 등의 임상증상과 연관되어 나타났다<sup>17</sup>

*P. endodontalis*는 혈청학적 연구결과 capsule membrane의 차이로 3가지 혈청형이 존재하며<sup>10</sup> membrane에는 3개의 major protein과 다수의 minor protein이 존재한다고 밝혀졌다<sup>11</sup>. 또한 *P. intermedia*는 2개의 DNA homology group<sup>18,19,20</sup>과 3개의 혈청형<sup>21,22,23</sup>이 보고되어 있다. 그러나 두 균주 모두 독성 발현 기전이나 균주간의 유전적 다양성에 관하여 밝혀진 것은 드물다.

최근까지의 구강내 병인균에 대한 생태학적, 역학적 연구는 개개의 균주를 구별하는데 따른 어려움으로 인해 큰 제한을 받아왔다. Whole cell 또는 outer membrane gel electrophoresis pattern, 혈청형 분류(serotyping), 생물형분류(biotyping)로는 각 종의 개개의 균주를 구분하기 어렵다.

그러나 제한효소(restriction endonuclease)를 이용하여 genomic DNA를 소화하여 얻게 되는 restriction profile은 유전적 이질성을 명확히 보여주며, 각기 고유한 restriction profile은 하나의 clonal type을 나타낸다고 알려져 있으며, 이 방법은 횡적(cross-sectional) 및 종적(longitudinal) 역학연구에 민감하고 유용한 수단으로, 각 환자에서의 clonal line의 분포양상, 전이여부, 한 환자내의 균주의 turnover 분석, 잠재적 독성을 가진 균주의 결정에 이용되고 있다<sup>24,25,26,27,28</sup>. 또한 각 균종의 개개 균주에 대해 보다 더 세밀하게 분류하는 것은 그 세균과 관련된 감염의 natural history, 특히 환자에 있어서 세균에 의한 전염(transmission)과 습득(acquisition) 등을 연구하는데 상당히 가치가 있다<sup>24</sup>.

제한효소분석법(Restriction Endonuclease Analysis, REA)은 단순하고도 빠르며 민감도와 재현성이 비교적 높은 방법으로, 상품화되어 있는 제한효소를 이용하는 장점을 가지며<sup>29</sup>, 미생물의 다양한 분류와 동정이 가능한 것으로 밝혀졌다<sup>30,31,32,33</sup>. 제한효소는 이중나선구조인 DNA의 특정 염기 서열을 인지하여 자를 수 있는데 여기에서 나온 DNA fragment는 전기

영동에 의해 분리된 후 EtBr(Ethidium Bromide)로 염색하면 UV로 관찰할 수 있게 된다. 균종의 유전적 이질성과 동질성은 전기영동된 pattern 상에서 얻어진 DNA fragment의 크기와 수, 밝기 등을 비교함으로써 평가할 수 있다. 이러한 DNA fragment pattern은 각각의 균주를 특징지을 수 있는 특정 fingerprint를 형성하는 것이다.

지금까지의 REA를 이용한 연구를 보면, 1991년 Han<sup>29</sup> 등이 각 개인에서 분리한 *A. actinomycescomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* 균종의 모든 균주가 각기 다른 DNA 소화 양상을 보임으로써 동일종에서도 유전자의 다양성이 존재함을 보고하였다. 1993년 Van Steenberg<sup>34</sup> 등과 Menard, Mouton<sup>34</sup> 등도 REA를 통해 심한 치주질환을 앓는 부부에서 *P. gingivalis* 균주의 수평적 전이를 밝힌 바 있다. 또한 1995년 Zhang<sup>35</sup> 등도 동일 치주낭이 다양한 유전자형(genotype)의 *P. gingivalis*에 의해 감염될 수 있음을 밝혔다. 이외에도 DNA의 제한효소 분석은 많은 세균 균종에 대한 유용한 분류 방법으로 알려져 있다<sup>31,36,38</sup>.

그러나 아직까지 감염근관과 치근단 병소의 주요 원인균으로 보고되어 있는 *P. endodontalis*와 *P. intermedia*의 유전적 이질성에 대한 유용한 기록은 없는 실정이다. 이에 저자는 근관 감염이 있는 환자로부터 분리해 낸 *P. endodontalis*와 *P. intermedia*의 혈청형(serotype)을 밝히고 DNA 제한효소분석(REA)을 이용하여 균주간의 유전자 이종성 및 동일 혈청형 내에서의 유전자 이종성에 대해 연구한 결과 다소의 지견을 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

1995년 3월 16일부터 1996년 2월 29일 사이에 서울대학교병원 치과진료부에 내원한 환자 41명 중 임상증상이 있고 단근관을 가지며 치수가 괴사된 치아 45개를 실험재료로 사용하였다. 이전에 근관치료를 받았던 치아는 제외하였으며 치수괴사 여부는 치수천공으로 확인될 수 있

었다.

임상증상의 유무는 급성동통, 국소적 종창, 악취, 누공형성, 촉진시 과민반응, 방사선 사진상의 투과성, 삼출액의 존재, 타진시 과민반응 등으로 분류하였다.

## 2. 세균의 채취

Rubber dam으로 치아를 분리한 후 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 2분간 대상치아와 그 주위를 세척하였다. 소독된 고속 회전 bur로 상아질 하방 1-2 mm까지 와동형성후 치아와 그 주위를 다시 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 10-15초간 세척한 뒤 2% iodine tincture로 소독 후 마지막으로 생리 식염수로 씻어내었다. 그 후 소독된 저속회전 bur로 근관 와동을 형성한 후 멸균된 paper point를 근관 내의 치근단 부위라고 추정되는 부위까지 넣어 약 15초간 방치하였다가 PRAS Ringer 용액과 PBS 용액에 넣었다. 이를 anaerobic gas pack (BBL® Gas Pak Pouch TM, Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, U.S.A.)에 넣어 즉시 실험실의 혐기성 배양기로 옮겼다.

## 3. 혐기성 배양 및 생화학적 검사

Anaerobic pack에 넣어져 옮겨진 PRAS Ringer 용액을 80% N<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>가 든 37°C 혐기성 배양기(Coy anaerobic chamber MI., U.S.A.) 내로 옮겨 2분간 vortex mixer로 진탕한 후 단계적으로 10배씩 희석하여 천배와 만배로 희석된 시료를 100μl씩 취하여 혈액한천배지에 접종하였다. 이들을 7일간 배양한 후 갈색 또는 흑색을 띠는 집락을 임의로 골라 2회에 걸쳐 순수분리하였다. 순수분리된 세균 집락은 BHI(Brain Heart Infusion, Hemin과 Vitamin K 포함) broth에 3일간 배양한 후 다시 PY(Peptide-Yeast) broth에서 3일간 배양시켜 생화학 검사를 시행하여 동정하였다. 생화학 검사로는 glucose, sucrose, cellbiose, lactose 등의 당분해 검사 및 esculine hydrolysis와 indole 검사 등을 시행하였고 BANA(benzoyl-DL-arginine-naphthylamide) test와 hemagglutination 및 간접면역형광법을 통해 *P. endodontalis*와 *P. intermedia*를 분리하였고 분리된

균주는 stock하여 LN<sub>2</sub>에 보관하였다.

## 4. 간접면역형광법

근관에서 채취한 paper point가 들어있는 200 μl의 인산완충용액(PBS, Phosphated-buffered saline : pH 7.2)을 vortex mixer에서 진탕한 후 slide glass에 20μl씩 세군데에 나누어 떨어뜨린 후 공기중에서 건조시켜 열처리로 고정하고 -20°C에서 보관하였다.

실험에 사용한 *P. endodontalis*의 항 혈청은 ATCC 35406(serotype O<sub>1</sub>K<sub>1</sub>)을 가토에 면역감작시켜 생산한 특이 항 혈청이며, 이전의 연구<sup>39)</sup>에 의해 *P. endodontalis*와 가장 가까운 *P. gingivalis*의 여러 serotype들과도 반응하지 않고 오직 *P. endodontalis*에만 반응하는 것으로 밝혀진 polyclonal antisera이다. *P. intermedia*의 표준균주에 대한 혈청형 a(ATCC 25611), b(NCTC 9336), c(SUNYab G8-9K-3)로부터 보다 순수한 개개의 특이 항체를 얻기 위해 다음과 같은 방법을 실시하였다. 항 ATCC 25611 혈청 5ml에 500mg (wet weight)의 NCTC 9336 whole bacterial cell과 G8-9K-3 whole bacterial cell을 넣어 37°C 온수 shaker에 1시간 둔 후 꺼내어 4°C에서 12시간 둔 다음 16,000xg로 원심분리시켜 상층 혈청을 얻어냈다. 같은 방법으로 항 NCTC 9336 혈청에는 ATCC 25611, G8-9K-3 whole bacterial cell을, 항 G8-9K-3 혈청에는 ATCC 25611, NCTC 9336 의 whole bacterial cell을 흡착원심분리시켜 각기 상층 혈청을 얻어냈다.

이와 같은 방법으로 얻어진 *P. intermedia* 특이 항 ATCC 25611 혈청, 특이 항 NCTC 9336 혈청, 특이 항 G8-9K-3혈청과 *P. endodontalis*(ATCC 35406) 항 혈청을 인산완충용액에 4% bovine serum albumin을 넣은 용액으로 checker-board 역가 측정 요법으로 1 : 160으로 희석한 후 환자에게서 채취한 sample위에 20 μl씩 떨어뜨린 후 30분 동안 37°C moisture chamber에서 반응시켜 인산완충용액으로 세척하고 Fluorescein isothiocyanate(Isomer I.B.B.L. Microbiology systems. Cockeysville, Md., U.S.A.)-conjugate된 goat anti-rabbit IgG(Meleg Laboratories. Inc. Springfield. Va. U.S.A.)를 1

: 30으로 희석시켜 20 $\mu$ l씩 slide glass상에 떨어뜨려 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 뒤 인산완충 용액으로 1시간동안 세척한 후 90% glycerol로 고정하여 형광 현미경 하에서 관찰하였다. 사용된 현미경은 Olympus fluorescence Microscope BH2-RFL(Olympus Optical Co. LTD. Tokyo, Japan)이며 Exiter filter는 UG-1, Dichroic mirror는 L-435, light source는 HBO 200수은등이다.

형광 염색에 의한 판정 등급은 다음과 같은 기준에 의해 0부터 4 $^{+}$ 까지 나누어서 3 $^{+}$ 에서 4 $^{+}$ 를 양성반응으로 결정하였다.

- 0 : no fluorescence
- 1 $^{+}$  : bare fluorescence with single cells not distinguishable
- 2 $^{+}$  : faint fluorescence with single cells visible, no definition of cell shape
- 3 $^{+}$  : moderate fluorescence with good cell envelope definition and a dark cell center
- 4 $^{+}$  : brilliant fluorescence with good cell envelope definition and a dark cell center

### 5. Whole-genome DNA의 추출

Frozen stock한 각각의 균주를 배양하여 단일 colony를 얻은 후, 이를 80% N<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>가 든 37 $^{\circ}$ C 혐기성 배양기에서 10ml BHI broth(Hemin과 Vitamin K 포함)에 넣고 균주가 포화될 때 까지 3일간 배양한 후 여기에서 1ml를 따서 100ml의 BHI broth에 inoculation시킨 후 같은 시간동안 large culture한 후 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 원심분리하여 세균 pellet을 얻은 후 guanidine용액을 넣어 pellet과 잘 섞고 phenol/chloroform/isoamyl alcohol(25:24:1)을 넣어 두 용액을 잘 섞은 후 실온에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻고 chloroform/isoamyl alcohol(24:1)을 넣어 다시 잘 섞은 다음 실온에서 10분간 원심분리한다. 여기서 얻어진 상층액에 0.6 배의 isopropyl alcohol을 넣어 DNA를 추출하였다. 100% ethanol과 70% ethanol의 차례로 염을 제거하고 건조시킨 후 TE buffer(1mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0)에 넣어 4 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

### 6. DNA 농도 측정

추출한 DNA는 UV-Spectrophotometer(BECKMAN, U.S.A.)를 사용하여 260nm에서 그 농도를 측정하였다.

### 7. 제한효소로 DNA의 소화

분리한 *P. endodontalis*와 *P. intermedia*의 DNA를 각각 *Eco* RI 및 *Pst* I으로 37 $^{\circ}$ C에서 2시간동안 소화시켰다. 전기영동은 horizontal gel apparatus(Hoefer, California, U.S.A.)를 이용하여 agarose를 TAE 완충액에 용해시켜 0.7% 용액으로 만들어 사용하였으며, size marker로는 bacteriophage의 lambda DNA를 *Eco* RI 과 *Hind* III로 소화한 절편(Boehringer Mannheim, 558552, Germany)을 사용하였다. 전기영동은 TAE buffer용액에서 30V로 18시간 동안 시행하였으며, 전기영동 후 증류수에 0.5  $\mu$ g/ml의 ethidium bromide(EtBr)를 넣어 30분간 염색 후 증류수로 탈색시키고 UV transilluminator(LKB.Uppsala, Sweden.)에서 polaroid 667 film을 polaroid camera(SL-5 GD-Photographic System, Seoul, Korea)에 장착하여 촬영하였다.

## III. 실험결과

### 1. 혈청형 연구

본 연구에서의 검출법에 따라 *P. endodontalis*와 *P. intermedia*로 밝혀진 균주의 혈청형과 각 경우에 있어서 환자의 임상증상은 표 1과 표 2에 나타나 있다. 6명의 환자 중 3명에서 *P. endodontalis*와 *P. intermedia*가 함께 검출되었다. *P. endodontalis*만이 검출된 환자는 2명이었고, *P. intermedia*만이 검출된 환자는 1명이었다. 두 균종이 모두 검출된 경우 모든 환자에서 근관내 악취나 치근단 병소의 임상증상이 나타났다. 그 외의 임상증상과도 전반적으로 양성 관계를 나타내었다.

*P. endodontalis*의 경우 혈청형 c 이외의 것은 NT(Non-typeable)로 구분하였다.

*P. endodontalis*와 *P. intermedia* 모두, 동일 환자의 한 개의 근관에서도 여러 종류의 혈청

Table 1. Strains, serotype, and clinical symptoms of *P. endodontalis*

Patient No.	Colony No.	Serotype	Clinical				Symptoms			
			Pain	Local Swelling	Foul Odor	Sinus Tract	Apical Sensitivity to Palpation	Periapical Radiolucency	Exudate	Tenderness to Percussion
P <sub>1</sub>	1	NT								
	2	NT								
	3	NT	+	+	+	-	+	+	±	+
	4	NT								
	5	c								
P <sub>2</sub>	6	c	-	+	+	+	+	+	+	±
P <sub>3</sub>	7	NT	+	+	+	-	+	+	+	+
	8	NT								
P <sub>4</sub>	9	NT	-	-	+	+	-	+	+	-
P <sub>5</sub>	10	c	+	+	+	+	+	+	-	-

Table 2. Strains, serotype, and clinical symptoms of *P. intermedia*

Patient No.	Colony No.	Serotype	Clinical				Symptoms			
			Pain	Local Swelling	Foul Odor	Sinus Tract	Apical Sensitivity to Palpation	Periapical Radiolucency	Exudate	Tenderness to Percussion
P <sub>5</sub>	1	b								
	2	b	+	+	+	+	+	+	-	-
	3	b								
	4	a								
P <sub>3</sub>	5	a	+	+	+	-	+	+	+	+
	6	a								
P <sub>4</sub>	7	c								
	8	b								
	9	a	-	-	+	+	-	+	+	-
	10	a								
	11	a								
P <sub>6</sub>	12	NT								
P <sub>6</sub>	13	b	-	-	+	-	-	+	-	-

NT : Non-typeable

P : Patient

Table 3. Genomic clonal types of *P. endodontalis* strains

Patient No.	Lane No.	<i>Eco</i> RI fingerprint	<i>Pst</i> I fingerprint
P <sub>1</sub>	lane 1	A	NC
	lane 2	A	NC
	lane 3	A-1	NC
	lane 4	B	NC
	lane 5	C	α
P <sub>2</sub>	lane 6	C-1	α-1
P <sub>3</sub>	lane 7	NT	NT
	lane 8	D	β
P <sub>4</sub>	lane 9	E	γ
P <sub>5</sub>	lane 10	C	α-2

Table 4. Genomic clonal types of *P. intermedia* strains

Patient No.	Lane No.	<i>Eco</i> RI fingerprint	<i>Pst</i> I fingerprint
P <sub>5</sub>	lane 1	A	NC
	lane 2	A	NC
	lane 3	A-1	NC
	lane 4	B	NC
P <sub>3</sub>	lane 5	C	α
	lane 6	C	α
P <sub>4</sub>	lane 7	D	β
	lane 8	E	γ
	lane 9	F	δ
	lane 10	NT	NT
	lane 11	NT	NC
	lane 12	G	γ-1
P <sub>6</sub>	lane 13	H	ε

NT : Non-typeable

NC : Non-cutting strain

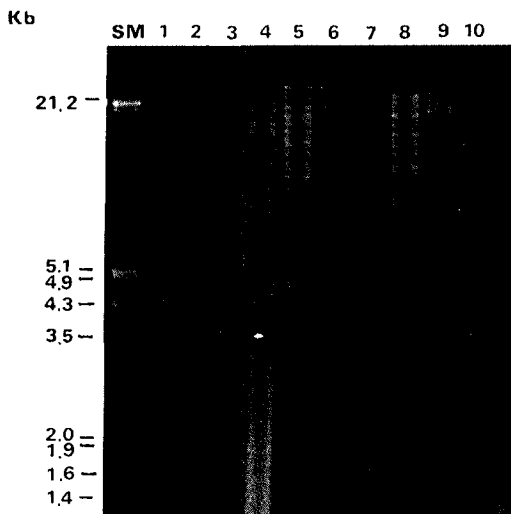


Fig. 1 *Eco* RI restriction endonuclease fingerprinting of *P. endodontalis*.

Lane SM : λDNA size marker, Lane 1 : P<sub>1</sub>-①, Lane 2 : P<sub>1</sub>-②, Lane 3 : P<sub>1</sub>-③, Lane 4 : P<sub>1</sub>-④, Lane 5 : P<sub>1</sub>-⑤, Lane 6 : P<sub>2</sub>-①, Lane 7 : P<sub>3</sub>-①, Lane 8 : P<sub>3</sub>-②, Lane 9 : P<sub>4</sub>-①, Lane 10 : P<sub>5</sub>-①.

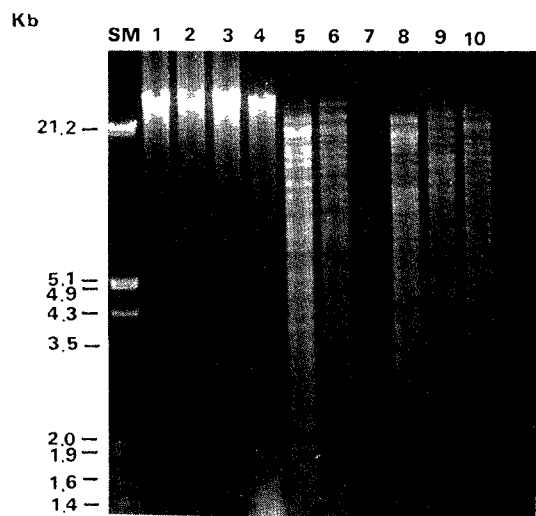


Fig. 2 *Pst* I restriction endonuclease fingerprinting of *P. endodontalis*.

Lane SM : λDNA size marker, Lane 1 : P<sub>1</sub>-①, Lane 2 : P<sub>1</sub>-②, Lane 3 : P<sub>1</sub>-③, Lane 4 : P<sub>1</sub>-④, Lane 5 : P<sub>1</sub>-⑤, Lane 6 : P<sub>2</sub>-①, Lane 7 : P<sub>3</sub>-①, Lane 8 : P<sub>3</sub>-②, Lane 9 : P<sub>4</sub>-①, Lane 10 : P<sub>5</sub>-①.

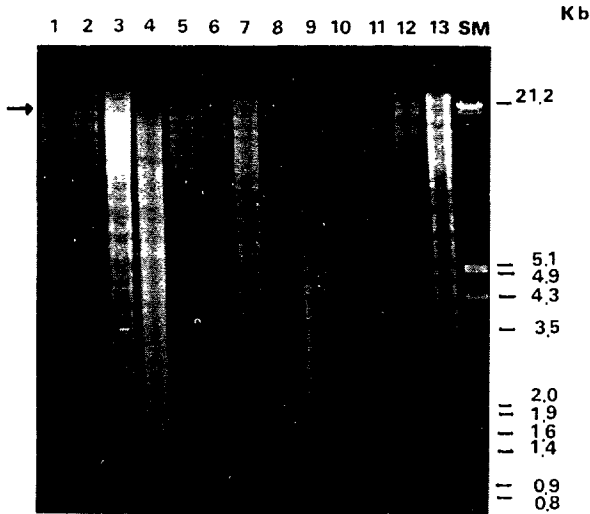


Fig. 3 *Eco* RI restriction endonuclease fingerprinting of *P. intermedia*.

Lane SM :  $\lambda$ DNA size marker, Lane 1 : P<sub>1</sub>-①, Lane 2 : P<sub>1</sub>-②, Lane 3 : P<sub>1</sub>-③, Lane 4 : P<sub>1</sub>-④, Lane 5 : P<sub>2</sub>-①, Lane 6 : P<sub>2</sub>-②, Lane 7 : P<sub>3</sub>-①, Lane 8 : P<sub>3</sub>-②, Lane 9 : P<sub>3</sub>-③, Lane 10 : P<sub>3</sub>-④, Lane 11 : P<sub>3</sub>-⑤, Lane 12 : P<sub>3</sub>-⑥, Lane 13 : P<sub>4</sub>-①.

형을 가진 균주가 다양하게 존재함이 발견되었다.

### 2. *P. endodontalis* 균주간의 유전자 이종성 및 동일 혈청형내의 유전자 이종성

그림 1은 *P. endodontalis*를 *Eco* RI으로 소화한 양상이다. P<sub>1</sub>의 5종류의 균주에서 다양한 DNA 제한효소절편 pattern이 존재함을 발견할 수 있었으나, Lane 1과 Lane 2는 동일한 양상을 나타내기도 하였다. *Eco* RI으로 소화한 *P. endodontalis*는 전체적으로 균주간에 유전자 이종성을 보임이 관찰되었으나, Lane 5와 Lane 6, Lane 10은 서로 다른 환자로부터 분리해 낸 균주이나 혈청형이 동일한 것(serotype c)으로, DNA 제한효소절편 pattern에서 상당한 유사성을 보이고 있다. 그외에는 NT 균주로 동일 혈청형 내의 유전자 이질성의 유무를 밝히기는 어려웠다.

그림 2는 *P. endodontalis*를 *Pst* I으로 소화한 양상을 보여준다. 한 환자로부터(P<sub>1</sub>) 나온 5개의

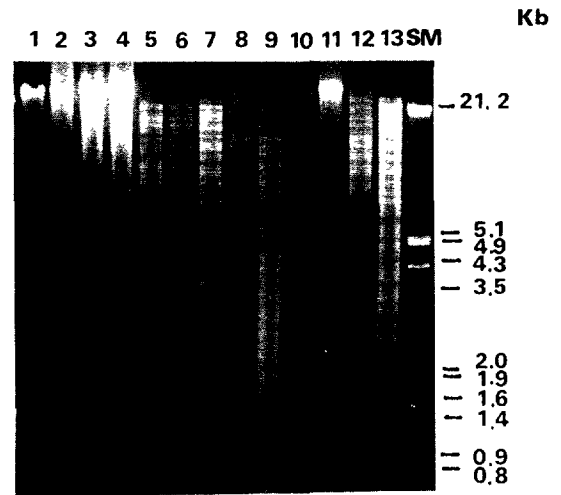


Fig. 4 *Pst* I restriction endonuclease fingerprinting of *P. intermedia*.

Lane SM :  $\lambda$ DNA size marker, Lane 1 : P<sub>1</sub>-①, Lane 2 : P<sub>1</sub>-②, Lane 3 : P<sub>1</sub>-③, Lane 4 : P<sub>1</sub>-④, Lane 5 : P<sub>2</sub>-①, Lane 6 : P<sub>2</sub>-②, Lane 7 : P<sub>3</sub>-①, Lane 8 : P<sub>3</sub>-②, Lane 9 : P<sub>3</sub>-③, Lane 10 : P<sub>3</sub>-④, Lane 11 : P<sub>3</sub>-⑤, Lane 12 : P<sub>3</sub>-⑥, Lane 13 : P<sub>4</sub>-①.

균주(Lane 1-5)중 Lane 1-4의 DNA는 소화되지 않았고, Lane 5의 DNA만이 소화되었다. *Eco* RI으로 소화한 DNA 제한효소절편 pattern과 마찬가지로 서로 다른 환자로부터 분리해 낸 균주이면서 동일한 혈청형(serotype c)을 보이는 Lane 5와 Lane 6, Lane 10은 유사한 DNA 제한효소절편 pattern을 보였다.

본 연구에 사용된 10개의 strain에 제한효소 *Eco* RI과 *Pst* I을 처리하여 얻어진 유전자형(genotype)이 표 3에 분류되어있다.

### 3. *P. intermedia* 균주간의 유전자 이종성 및 동일 혈청형내의 유전자 이종성

그림 3은 *P. intermedia*를 *Eco* RI으로 소화시킨 DNA 제한효소절편 pattern으로 균주간에 다양한 제한효소절편 pattern을 보이고 있다. Lane 1과 Lane 2, Lane 3은 동일 환자에서 분리한 균주로 혈청형이 b로 동일하며, Lane 1과 Lane 2의 DNA 제한효소절편 pattern은 동일한 것으로 나타났으나, Lane 3은 한 band



(→)에서 차이를 보이고 있다. Lane 9와 Lane 10, Lane 11도 동일 환자에서 분리한 동일 혈청형(serotype a)의 균주이지만 DNA 제한효소절편 pattern은 상이한 것으로 관찰되었다. 즉 동일 환자에서 분리해낸 동일 혈청형 균주 간에서 유전자 이종성이 관찰되었으며, 다른 환자에서 분리해낸 동일 혈청형을 보이는 균주 간에서도 DNA 제한효소절편 pattern에 있어 이종성이 관찰되었다.

그림 4는 *P. intermedia*를 *Pst* I의 제한효소로 처리한 제한효소절편 pattern으로  $P_5$ 의 Lane 1-4 모두에서 소화되지 않은 양상을 보이며,  $P_3$ 의 Lane 5와 Lane 6은 같은 혈청형이면서 동일한 DNA 제한효소절편 pattern을 보이고 있다.  $P_4$ 의 경우 Lane 11 균주의 DNA는 *Pst* I으로 소화되지 않았으며 또 같은 혈청형을 보이는 나머지 균주에서는(Lane 9, Lane 10, Lane 11) 제한효소절편 pattern이 상이함을 관찰할 수 있었다. 또한 다른 환자에서 분리해 낸 동일 혈청형을 보이는 균주 간에서도(Lane 4와 Lane 5, Lane 6. 그리고 Lane 1, Lane 2, Lane 3과 Lane 8, Lane 13) 제한효소절편 pattern의 다양성을 보이고 있음이 관찰되었다.

이상의 13개 strain에 제한효소 *Eco* RI과 *Pst* I을 처리하여 얻어진 유전자형(genotype)이 표 4에 나타나 있다.

#### IV. 총괄 및 고안

치수 및 치근단 질환의 발병과 진행에 있어서 미생물의 역할은 점차 중요시 되어 왔으며<sup>1,2,3</sup>, 혐기성 세균의 배양 기술이 발달함에 따라 혐기성 세균의 비중이 증대되고 있다<sup>4,5,6</sup>. 이들 혐기성 세균중 Black-pigmented *Bacteroides* (BPB), 특히 *B. endodontalis*, *B. intermedius*, *B. gingivalis* 등이 구강내 감염과 관련이 있다고 밝혀진 바 있다<sup>7</sup>. 1985년 Winkelhoff 등은 감염근관 및 치근단 농양에서 조사한 sample의 90% 이상에서 *B. endodontalis*를 분리해 낼 수 있었고, *B. intermedius*는 감염된 치수강으로부터 가장 흔하게 분리되는 BPB라고 하였으며, *B. gingivalis* 역시 치근단 농양과 관련되어 나

타한다고 하였다<sup>9</sup>.

Black-pigmented *Bacteroides*의 발현빈도에 관한 연구를 살펴보면 Haapasalo<sup>14</sup> 등은 임상증상이 있는 경우에는 54%, 임상증상이 없는 경우는 44%의 발현빈도를 보인다고 하였으며, Sundqvist<sup>15</sup>는 급성 환자의 73%에서, Winkelhoff<sup>13</sup> 등은 치근단 농양 환자의 90% 이상에서 발견되었다고 하여, 50%에서 90%까지의 발현 빈도를 보이는 것으로 나타났다. 1992년 Hashioka<sup>17</sup> 등도 자발통과 타진반응 및 근관내 악취 등을 보이는 근관에서 *Porphyromonas*와 *Prevotella*가 특징적으로 많이 나타났다고 보고한 바 있다<sup>18</sup>. 본 연구에서는 45개의 감염 근관 중에서 5근관에서는 *P. endodontalis*가, 4근관에서는 *P. intermedia*가 검출되었고, 두 균종이 함께 검출된 근관은 3개였다. 두 균종이 모두 검출된 경우 모든 환자에서 근관내 악취나 치근단 병소의 임상증상이 나타났다. *P. endodontalis*와 *P. intermedia*는 절대 혐기성 균으로 산소에 민감하며 까다로운 배양조건으로 인하여 분리와 동정이 어려워, 본 연구에서는 임상증상과 이들 세균의 존재에 관한 연관성을 연구할 수는 없었다.

지난 15년 동안 *Bacteroides melaninogenicus*는 여러개의 새로운 species로 나누어지게 되었다. 이러한 분류상의 변화는 더 최신의 생화학적, 화학적 방법의 적용으로 가능했으며, 세균 분류학에서의 이러한 진보는 다양한 감염의 병인론(etiology)에서 각기 균종의 역할을 좀 더 잘 평가할 수 있게 하였다. 즉, asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides*인 *B. asaccharolyticus*와 *B. gingivalis*, *B. endodontalis*는 처음에는 *B. melaninogenicus* subsp. *asaccharolyticus*로 여겨졌으나, 구강내에서 이들 미생물의 임상적 중요성이 인식되면서 광범위한 분류학적 연구가 진행되어 이들 사이의 이질성을 밝히게 되었는데, 이는 SDS(Sodium Dodecyl Sulfate) polypeptide pattern과 DNA-DNA hybridization data를 통한 DNA base composition과 enzyme polymorphism에 관한 연구에 의해서였다<sup>12</sup>. 즉, *B. asaccharolyticus*와 *B. gingivalis*, *B. endodontalis*는 *Bacteroides* 균종의 type species인 *B. fragilis*와는 매우 다른 생화학적, 화학적

성질을 가지는 *Porphyromonas*라는 새로운 균종으로 독립하게 된 것이다. *Porphyromonas*의 세 가지 균종은 G+C(Guanine+Cytosine) contents와 전기영동 pattern에서의 malate dehydrogenase의 mobility 정도 및 menadione의 필요성에 따라 구분가능하다<sup>11)</sup>. 이 세균들 중 치근단 질환에서만 특이하게 검출되는 *P. endodontalis*는 capsule membrane의 차이로 세가지 혈청형 즉, O<sub>1</sub>K<sub>1</sub>(HG 370), O<sub>1</sub>K<sub>2</sub>(HG 182), O<sub>1</sub>K<sup>-</sup>(HG 181)으로 나뉜다<sup>10)</sup>. 이들이 서로 각각 다른 pathologic potential을 가지고 있는지는 명확하지 않으나, Winkelhoff<sup>40)</sup> 등에 의하면 *P. endodontalis*의 다른 혈청형은 capsule 구조의 존재에 기인한 병원성(pathogenecity)과 세균독성(virulence)의 차이와 관련이 있을 것이라고 하였다.

*Bacteroides melaninogenicus* subsp. *intermedius*로 처음에 분류되었다가 *Prevotella intermedia*로 분류된 균종의 이질성에 관한 연구가 최근에 진행되어 1992년 Shah와 Gharbia<sup>41)</sup>에 의해 *P. intermedia*가 2개의 genetic group으로 나뉘어 밝혀졌다. 하나는 *P. intermedia*의 type strain(strain ATCC 25611<sup>T</sup>)을 포함하는 균주이고 나머지 균주는 DNA hybridization 특징과 peptidase, lipase activity 그리고 multilocus enzyme electrophoretic profile의 명백한 차이로 strain ATCC 25611<sup>T</sup>과는 다른 새로운 균주로 이를 *P. nigrescens*로 분류하였다. 그 후 이들은 *P. intermedia*와 *P. nigrescens*를 명확히 구분할 수 있는 malate와 glutamate dehydrogenase(MDH, GDH) electrophoretic mobility의 차이에 근거를 둔 확인법에 따라 정상 부위와 치주질환 이환 부위, 치근단 농양에서 분리해낸 73개의 strain에 대해 시행한 결과<sup>42)</sup>, 대부분의 치주 병소에서는(70%) *P. intermedia*가, 대부분의 치근단 농양에서는(73%) *P. nigrescens*가, 또한 정상부위에서는(94%) *P. nigrescens*가 검출됨을 밝혔다. 즉, *P. intermedia*와 *P. nigrescens*는 서로 다른 site specificity와 surface property를 가지므로 구강 감염의 병인론에서의 그들의 역할을 평가하기 위해서는 두 균종의 정확한 확인과 동정이 필요하다고 보

여진다. 본 연구에서는 *P. nigrescens*에 관한 고려가 배제되었으나, 1994년 Shah<sup>42)</sup> 등의 실험 및 1991년 Moor 등의 실험결과로 미루어 볼 때 본 실험에서 생화학적 검사 결과 *P. intermedia*로 밝혀진 균주들 중 대부분이 *P. nigrescens*라 사료된다.

본 연구에서 이용한 제한효소분석(Restriction endonuclease analysis)은 세균 각 균주간의 유전적 이질성과 동질성을 밝히는 데 있어 유용한 분류 방법이다. 전통적으로 시행된 방법인 혈청형 분류나 세포 단백질의 polyacrylamide gel electrophoresis, cellular fatty acid analysis나, LPS subtyping 등은 균주를 몇 개의 group으로만 구별해 낼 수 밖에 없기 때문에<sup>43)</sup> 역학적 연구로는 한계가 있다. 그러나 제한효소분석에 의해 두 strain이 하나의 endonuclease에 대해 polymorphism을 보이면 이는 유전적으로 다른 즉, 다른 clonal type을 갖는 것으로 인정할 수 있으며, 두 strain의 DNA fragment pattern이 여러 endonuclease에 의해 동일하면 두 strain은 유전적으로 구별할 수 없는 동일한 clonal type을 갖는 것으로 여겨질 수 있는 것이다. 이와 같은 육안적 해석을 단순화시키기 위해서 enzyme에 의해 생겨나는 band는 30개 미만인 것이 이상적이다. DNA fragment는 특히 band가 밀집되어 분포할 때 해석이 어려워지기 때문에 laser densitometry를 사용하여 복잡한 DNA fragment pattern의 분석을 다양화시키기도 하였다<sup>43)</sup>. 그러나 Collins와 Ross<sup>43)</sup>에 의해 밝혀졌듯이 적절한 enzyme를 선택하면 strain간의 유전자 유사성과 이질성은 육안 관찰에 의해서도 명확히 구분될 수 있다.

본 실험의 결과 *P. endodontalis*와 *P. intermedia* 모두 *Eco* RI에서는 적절히 소화되어 agarose gel에서의 전기영동 후 fingerprint pattern을 형성하였으나, *Pst* I은 소화시키지 못한 균주가 있었고, 소화 여부는 동일 근관으로부터 나온 균주 사이에서도 차이를 보이기도 했다. *Pst* I으로 소화되지 않은 이유는 일부 균주가 *Pst* I endonuclease를 가져서 이 효소가 작용할 DNA sequence에 methylation 등의 변화가 일어나 cutting site를 인지하지 못했기 때문으로 보여

진다. 따라서 *Eco* RI이 본 연구의 목적에 알맞은 제한효소로 생각되어진다.

본 연구의 목적은 감염근관과 치근단 병소의 주요 원인균으로 보고된 *P. endodontalis*와 *P. intermedia*를 근관 감염이 있는 환자에서 분리해 낸 후 각 균주의 혈청형을 밝히고 유전자 이질성을 제한효소분석을 통해 알아보려고 했던 것으로, *P. endodontalis*와 *P. intermedia* 모두에서 하나의 감염근관에서도 다양한 혈청형이 존재하고 각 균주는 동일 혈청형일지라도 유전적으로 상이함이 관찰되었다. 그러나 특이하게도 서로 다른 환자의 근관으로부터 분리해 낸 *P. endodontalis*의 serotype c 균주에 *Eco* RI과 *Pst* I을 처리한 제한효소 절편 pattern이 모두 동일하거나 상당히 유사한 양상을 보였다. 제한효소분석을 통한 균주의 유전자형의 다양성에 대한 결과는 실험에 따라 차이를 보이고 있는데, Rudney<sup>27)</sup> 등은 oral viridans *Streptococci*를 제한효소분석한 후, 이로부터 얻는 정보는 너무나 strain-specific하여 균종의 확인에는 적합하지 않다고 하였다. 이와는 반대로 제한효소 절편 pattern상의 제한된 다양성이 몇몇 연구가들에 의해 보고되었는데, *Legionella pneumophila*<sup>44)</sup> 균종은 보고된 모든 혈청형에서 얻은 균주간에 유사한 restriction endonuclease profile을 가짐이 보고되었고, Zamboni<sup>45)</sup> 등도 전혀 별개의 source로부터 온 DNA가 제한효소절편 pattern에서는 거의 다양성을 보이지 않음을 보고하였다. 이들 연구 결과가 엇갈리는 이유들 중 첫 번째로 생각할 수 있는 것은, 제한효소 절편의 수가 많아 profile의 작은 차이는 REA에 의해 쉽게 인지되지 못하기 때문으로 보여진다. 균주간의 REA상에서의 이러한 작은 차이는 extensive REA 방법을 이용하여도 인지가 어려운데, 한 예로 conventional REA를 통해서도 *Corynebacterium diphtheria*<sup>46)</sup>의 경우 비독성 균주(nontoxic strain)로부터 독성 균주(toxic strain)를 구별해 낼 수 없다. 둘째로, Rudney<sup>27)</sup> 등의 연구보고에서 실험 sample로 이용한 *Streptococci*는 건강한 숙주에서는 병원성이 없는 것이며 다른 세균들도 공생적 관계의 균주인 경우로 이러한 경우 균주의 유전자형은 상당히

다양한 것으로 보고되었다<sup>47)</sup>. 그러나 병의 발생 이후에 분리된 병원성 균주의 경우 전기 영동시 상당히 제한된 pattern만을 보이는 것으로 나타났다. 즉, 구강내에서 세균들이 감염성 질환에 의해 selective pressure를 받았거나, 다양한 세균들중의 편중된 sample일 수 있다는 것이다. 두 경우 모두에서 세균은 숙주내로 쉽게 전염되는 세균 독성 요소(virulence factor)를 지닐 수 있다<sup>48)</sup>. 이 경우 배양을 통해 분리해 낸 세균들은 유사한 fingerprint pattern을 가지는 균주를 많이 포함하게 된다. 이와 유사한 결과는 labeled DNA probe를 이용한 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)연구에서도 보고되었는데, Mazurek<sup>49)</sup> 등은 *M. tuberculosis*의 DNA fingerprint pattern이 동일하거나 아주 작은 부분만이 상이함을 보인 바 있다. 이상으로 미루어 볼 때 상당히 다양한 제한효소절편 pattern을 보인 *P. intermedia*보다는 전기영동에서 제한된 pattern을 보인 *P. endodontalis*가 더 직접적인 근관감염과 치근단 질환의 원인균으로 여겨지며, 서로 다른 환자로부터 얻어진 *P. endodontalis*의 serotype c를 보이는 Lane 5와 Lane 6, Lane 10의 균주는 pathogenic strain일 가능성이 크다고 보여진다. 하지만 어떤 특정 clonal type이 virulence와 관련이 있는지를 알 수 있으려면, 좀 더 많은 균주에 대한 분석이 필요하고 더 많은 종류의 endonuclease에 의한 분석결과가 요구되어진다.

DNA 제한효소분석은 검사자의 판독 능력에 의존하지만 역학조사에 유용하게 이용될 수 있다. 또한 균주간의 유전자의 이질성을 연구하기에 충분한 방법으로 여겨지고 있다. 그러나 제한효소 분석은 agarose gel에 수 많은 band가 나타나 chromosome에서의 미세한 유전적 차이를 결정하기는 힘든 등의 문제가 있지만 이는 DNA probe를 이용한 hybridization 방법에 의해 극복될 수 있을 것이다. 이러한 방법들을 이용하면 근관감염과 치근단 질환의 병원성인 *P. endodontalis*와 *P. intermedia*에 대한 병원성(pathogenicity)과 관련한 유전자 추적 및 DNA probe의 개발이 가능할 것이다. 계속적으로 이러한 연구방법에 의해 세균의 colonization 및

virulence factor에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다.

## V. 결 론

본 연구에서는 감염근관과 치근단 병소의 주요 원인균으로 보고되어 있는 *Porphyromonas endodontalis*와 *Prevotella intermedia*를 근관 감염이 있는 환자의 근관에서 분리해 낸 후 생화학검사를 통해 확인하고, 각각의 혈청형을 간접 면역형광법을 이용하여 밝히고, 각 균주간 유전자 이종성 및 동일 혈청형 내의 유전자 이종성을 알아보고자 각 균주의 DNA를 *Eco* RI 및 *Pst* I의 endonuclease로 소화한 후 그 제한 효소절편 pattern을 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. *Porphyromonas endodontalis*와 *Prevotella intermedia* 모두에서, 동일 환자의 한 개의 근관에서도 여러 종류의 혈청형을 가지는 균주가 다양하게 존재함을 발견할 수 있었다.
2. *Porphyromonas endodontalis*와 *Prevotella intermedia* 모두에서, 한 개인에서도 유전적으로 상이한 균주들이 존재함을 관찰할 수 있었고, 동일 혈청형에서도 유전적으로 다양한 균주들이 존재함을 확인할 수 있었다.
3. *Porphyromonas endodontalis*의 혈청형 c에서는 다른 환자로부터 분리해 낸 균주인 경우에서도 제한효소절편 pattern에서 상당한 유사성이 관찰되었다.

## 참 고 문 헌

1. Kakehashi S., Stanley H. R., Fitzgerald R. J. : The effects of surgical exposure of dental pulp in germ-free and conventional laboratory lab. Oral Surg. 20 : 340-349, 1965.
2. Zavistoski J., Van Winkelhoff A. J., Van Steenberg T. J., Dzink J., Onderdonk A. : Quantitative bacteriology of endodontic infection. Oral Surg. 49 : 171-174, 1980.
3. Fukushima H., Yamamoto K., Hirohara K., Sagawa H., Leung K-P. : Localization and identification of root canal bacteria in clinically asymptomatic periapical pathosis. J. Endodon. 16 : 534-538, 1990
4. Griffe M. B., Patterson S. S., Miller C. H., Kafrawy A. H., Newton C. W. : The relationship of *Bacteroides melaninogenicus* to symptoms associated with pulpal necrosis. Oral Surg. 50 : 457-461, 1980.
5. Attebery H. R., Kimura J. T., Carroll G. W. : An acute anaerobic infection following endodontic treatment. J. Endodon. 6 : 793-795, 1980.
6. Kannagara D. W., Thadepalli H., McQuirter J. L. : Bacteriology and treatment of dental infections. Oral Surg. 50 : 103-109, 1980.
7. Van Winkelhoff A. J., Van Steenberg T. J., De Graaff J. : The role of black-pigmented *Bacteroides* in human oral infection. J. Clin. Periodontol. 15 : 145-155, 1988.
8. Yoshida M., Fukushima H., Yamamoto K., Ogawa K., Toda T., Sagawa H. : Correlation between clinical symptom and microorganisms from root canal of teeth with periapical pathosis. J. Endodon. 13 : 24-28, 1987.
9. Matusow R. J., Goodall L. B. : Anaerobic isolates in primary pulpal-alveolar cellulitis cases : endodontic resolutions and drug therapy consideration. J. Endodon. 9 : 535-543, 1983.
10. Van Steenberg T. J., Van Winkelhoff A. J., Mayrand D., Grenier D., De Graaff J. : *Bacteroides endodontalis* sp. nov, and Asaccharolytic Black-pigmented *Bacteroides* species from infected dental root canals. Int. J. of Syst. Bacteriol. 34 : 118-120, 1984.
11. Shah H. N., Collins M. D. : Proposal for

- reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a new Genus *Porphyromonas*. Int. J. of Syst. Bacteriol. 38 : 128–131, 1988.
12. Baumgartner C., Falkler W. A. : Bacteria in the apical 5mm of infected root canals. J. Endodon. 17 : 380–383, 1991.
  13. Van Winkelhoff A. J., Carlee A. W., De Graaff J. : *Bacteroides endodontalis* and other Black-pigmented *Bacteroides* species in odontogenic abscesses. Infect. Immun. 49 : 494–497, 1985.
  14. Haapasalo M., Ranta H., Randa K., Shah H. N. : Black-pigmented *Bacteroides* spp. in human apical periodontitis. Infect. Immun. 53 : 149–153, 1986.
  15. Sundqvist G., Johansson E., Sjögren U. : Prevalence of black-pigmented *Bacteroides* species in root canal infections. J. Endodon. 15 : 13–19, 1989.
  16. Sundqvist G. : Associations between microbial species in dental root canal infections. Oral Microbiol. Immunol. 7 : 257–262, 1992.
  17. Hashioka K., Yamasaki M., Nakane A., Horiba N., Nakamura H. : The relationship between clinical symptoms and anaerobic bacteria from infected root canals. J. Endodon. 18 : 558–561, 1992.
  18. Johnson J. L., Holdema L. V. : *Bacteroides intermedius* comb. nov. and description of *B. corporis* sp. nov. and *B. levii* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 33 : 15–25, 1983.
  19. Moncla B. J., Strockbine L. : Use of whole cell DNA probes for the identification of *B. intermedius* isolates in a dot blot assay. J. Dent. Res. 10 : 1267–1270, 1988.
  20. Strzempko M. N., Simon C. K. : A Cross-reactivity study of whole genomic DNA probe for *Haemophilus actinomycetemcomitans*, *B. intermedius*, and *B. gingivalis*. J. Dent. Res. 66(10) : 1543–1546, 1987.
  21. Nakazawa F., Zambon J. J., Reynolds H. S., Genco R. J. : Serological studies of oral *B. intermedius*. Infect. Immun. 56 : 1647–1651, 1988.
  22. Choi N. J., Chung C. P., Son S. H. : The virulence and antigenic heterogeneity of *B. intermedius*. Kor. Acad. Periodontol. 19 : 60–74, 1989.
  23. Gmur R., Guggenheim B. : Antigenic heterogeneity of *B. intermedius* as recognized by monoclonal antibodies. Infect. Immun. 42 : 459–470, 1983.
  24. Caufield P. W., Walker T. M. : Genetic diversity within *S. mutans* evident from chromosomal DNA restriction fragment polymorphism. J. Clin. Microbiol. 27 : 274, 1989.
  25. Kulkarni G. V., Chan K. H., Sandham H. J. : An investigation into the use of restriction endonuclease analysis for the study of transmission of *S. mutans*. J. Dent. Res. 68(7) : 1155, 1989.
  26. Bjorvatn B., Lund V., Kristiansen B. E., Korsnes L.K., Spanne O., Linguist B. : Application of restriction endonuclease fingerprinting of chromosomal DNA of *Neisseria meningitidis*. J. Clin. Microbiol. 19 : 763, 1984.
  27. Rudney J. D., Neuvar E. K., Soberay A. H. : Restriction endonuclease fragment polymorphisms of Oral Viridans *Streptococci*. Compared by conventional and field-inversion gel electrophoresis. J. Dent. Res. 71(5) : 1182.
  28. Wilson M. A., Rimler R. B., Hoffman L. J. : Comparison of DNA fingerprints and somatic serotypes of sero B and *E. pasteurilla multocida* isolates. J. Clin. Microbiol. 30 : 1518, 1992.
  29. Naiming Han, Charles I. Hoover, James R. Winkler. : Identification of genomic

- clonal types of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by restriction endonuclease analysis. J. Clin. Microbiol. 29 : 1574-1578, 1991.
30. Gissmann L., Pfister H., Zur Hausen. : Human papilloma virus (HPV) : characterization of four different isolates. Virology 76 : 569-580, 1977.
  31. Marshall R. B., Wilton B. E., Robinson A. J. : Identification of *Leptospira serovars* by restriction endonuclease analysis. J. Med. Microbiol. 14 : 163-166, 1981.
  32. Regnery R. L., Tzianabos T., Esposito J. J., McDade J. E. : Strain differentiation of epidemic typhus rickettsiae by DNA restriction endonuclease analysis. Curr. Microbiol. 8 : 355-358, 1983.
  33. Scherer S., Stevens D. A. : Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. J. Clin. Microbiol. 25 : 675-679, 1987.
  34. Van Steenberg T. J., Petit M. D., Scholte L. H., Van der Velden J., de Graaff J. : Transmission of *P. gingivalis* between spouses. J. Clin. Periodontol. 10 : (5) : 340-435, 1993.
  35. Zhang Y. J., Yasui S., Yoshimura F., Ishikawa I. : Multiple restriction fragment length polymorphism genotypes of *Porphyromonas gingivalis* in single periodontal pocket. Oral Microbiol. Immunol. 10 : 125-128, 1995.
  36. Langenberg W., Rauws E. A. J., Wikjojokusuma A., Tijtgat G. N. J., Zanen H. C. : Identification of *Campylobacter pylorides* isolates by restriction endonuclease DNA analysis. J. Clin. Microbiol. 24 : 414-417, 1986.
  37. Marshall R. B., Wilton B. E., Robinson A. J. : Identification of *Leptospira serovars* by restriction endonuclease analysis. J. Med. Microb. 14 : 163-166, 1981.
  38. Van Ketel R. J., Ter Schegget J., Zanen H. C. : Molecular epidemiology of *Legionella pneumophila* subgroup 1. J. Clin. Microbiol. 20 : 362-364, 1984.
  39. 김재희, 윤수환 : 치근단 병소가 있는 환자에서 *P. endodontalis* 항원에 대한 혈청 특이 항체의 면역 반응 연구. 대한 치과 보존 학회지 19 : 485-498, 1994.
  40. Van Winkelhoff A. J., Kippuw N., De Graaff J. : Serological characterization of black-pigmented *Bacteroides endodontalis*. Infect. Immun. 51 : 972-974, 1986.
  41. 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. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 42 : 542-546, 1992.
  42. Gharbia S. E., Haapasalo M., Shah H. N. : Characterization of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates from periodontic and endodontic infection. J. Periodontol. 65 : 56-61, 1994.
  43. Van Steenberg T. J., Van der Velden U., Abbas F., De Graaff J. : Microflora and Bacterial DNA restriction enzyme analysis in young adults with periodontitis. J. Periodontol. 62 : 235-241, 1991.
  44. Van Ketel R. J. : Similar DNA restriction endonuclease profiles in strains of *Legionella pneumonia* from different serogroups. J. Clin. Microbiol. 26 : 1838, 1988.
  45. Zambon J. J., Sunday G. J., Smutko J. S. : Molecular genetic analysis of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* epidemiology. J. Periodontol. 61 : 75, 1990. Pappenheimer AM., Murphy IR. : Studies on the molecular epidemiology of diphtheria. Lancet. ii : 923, 1983.
  46. Pappenheimer A. M., Murphy I. R. : Studies on the molecular epidemiology of diphtheria. Lancet. ii : 923, 1983.

47. Caugant D. A. et al : Clonal diversity of *Neisseria meningitidis* from a population of asymptomatic carriers. *Infect. Immun.* 56 : 2060, 1988.
48. Musser J. M., Kroll J. S., Moxon E. R., Selander R. K. : Clonal population structure of encapsulated *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* 56 : 1837, 1988.
49. Mazurek G. H., Cave M. D., Eisenach K. D., Wallas R. J. : Chromosomal DNA fingerprint patterns produced with IS 6110 as strain-specific markers for epidemiologic study of *Tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 29 : 2030, 1991.