한국인 성인성 치주염 환자에서의 구강 스피로헤타의 분포

김혜현* · 최봉규 · 최성호 · 채중규 · 김종관 · 조규성

연세대학교 치과대학 치주과학교실
연세대학교 치과대학 구강생물학교실*

I. 서론

치주염은 구강 세균에 의한 감염성 질환으로 치은의 염증, 치주조직 파괴와 골 흡수로 인한 치아 상실의 주된 원인이 된다. 구강 세균에 관한 거듭된 연구를 통해 치태에 존재하는 세균종 500가지 이상이 밝혀졌는데 그중 특정한 세균만이 다양한 형태의 치주염과 관계되며 치주염의 형태에 따라 관여하는 세균이 다르다고 보고되었다[1-6]. 치주염과 관계가 있다고 생각되는 세균으로는 *Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus, Prevotella intermedia, Peptostreptococcus micros, Fusobacterium nucleatum, Campylobacter rectus, Capnocytophaga, Eikenella corrodens, Eubacterium* species 그리고 Spirochetes등을 들 수 있다[7]. 그간 세균에 관한 연구는 배양법[8-10], 면역학적 방법[11-13] 등을 이용하여 행해졌는데 이들 방법은 종종 어렵거나, 비경제적이고 민감도가 낮으며 간혹 불가능하기도해서 특히 스피로헤타 같은 세균은 몇몇 종을 제외하고는 치주염과 관련된 연구가 극히 미미한 실정이다[14, 15]. 구강 스피로헤타의 분포는 치주염의 형태에 따라 다르며 유년성 치주염과의 연관성은 서로 상반되는 보고[16-18]가 있지만 급성 괴사성 치은염, 만성 성인성 치주염과의 연관성이 밝혀져 있다[19-25]. 특히 치주염이 진행중인 병소에서 많이 관찰되며[1, 24, 26] 치주염 치료 후 예후를 판단하는 근거로서 *T. denticola*를 이용할 수 있다는 보고[27]도 있다. 그러나 구강 스피로헤타는 현미경으로는 총 치태 세균의 55%까지 차지하지만 살아있는 세균 중에서는 1% 미만으로 관찰되어 배양의 어려움을 나타냈다[10, 22]. 현재까지 분리되어 보고된 구강 스피로헤타 종은 *Treponema denticola, Treponema pectinovorum, Treponema socranskii, Treponema vincentii, Treponema maltophilum*[10], Treponema medium[28], *Treponema amylovorum* [29] 등이 있는데 치주염과 관련된 연구는 주로 *Treponema denticola*[25, 27]에 한정되어있다.

16S ribosomal RNA(rRNA)는 단백질을 합성하는데 관여하는 중요한 분자로 모든 세균 세포에 존재하며 진화적으로도 안정되어 세균을 분류하는데 적합하다[30]. 16S rRNA의 염기서열은 모든 세균에 공통되는 부분과 세균의 종마다 다른 부분으로 구성되어 있어서 공통되는 부위에서는 모든 세균에 적합한 보편 소식자(universal probe)를 그리고 다양한 부위에

서는 각 세균종에 적합한 특이 소식자(specific probe)를 만들 수 있다. 이들은 다세균 생태계에서 세균의 다양성 파악, 배양이 가능하지 않은 세균의 연구, 환경에 따른 세균총의 변화, 세균의 분류 및 역학 조사등에 이용된다[30].

DNA 소식자(DNA probe)와 핵산 증폭(nucleic acid amplification) 기술은 세균연구를 위해 비교적 최근에 도입된 방법이다[11, 14, 23, 26, 31, 32, 36]. 1994년 Choi등[34]은 급속 진행성 치주염 환자의 치주낭으로부터 배양에 관계없이 세균의 다양성을 파악하기위해 구강 스피로헤타의 16S rRNA 유전자 서고(gene library)를 제조했다. 여기서 구강 스피로헤타는 염기서열의 분류기준을 98% 염기 유사도로 할 때 23균종(phylotypes), 92%의 염기 유사도로 할 때 크게 8 군(taxonomic groups)으로 나누어졌으며, 이들은 모두 *Treponema* 속(genus)에 속했고 그들의 대다수가 지금까지 배양할 수 없었던 스피로헤타였다. 이로써 배양이 가능한 스피로헤타의 16S rRNA 염기서열과 더불어 이 새로운 각 구강 스피로헤타 종에 대해 특이한 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 소식자를 이용해 각 스피로헤타와 여러 가지 형태의 치주염과의 연관성을 밝히는 역학조사가 가능해졌다. 백인의 급속 진행성 치주염 환자를 대상으로 한 역학조사에서 아직 분리 배양되지 않은 균종의 분포가 배양된 균종의 분포보다 훨씬 높았다는 사실은[35,36] 치주염과 연관된 구강 스피로헤타에 대한 연구가 아직 시작 단계에 불과함을 시사한다. 따라서 치주염의 병원성 기전에 대해 더 많이 이해하기 위해서는 지금까지 배양되지 않은 구강 스피로헤타의 병원성을 밝힐 필요가 있으며 이에 앞서 치주낭 내에서의 구강 스피로헤타 종의 분포도를 살펴볼 필요가 있다. 치주낭에서의 세균의 존재가 곧바로 병인으로 이어지는 것은 아니지만 현재까지 밝혀진 스피로헤타의 속성 - 즉 단백질 분해효소, 면역 반응을 변형시키고 저해하는 인자, 세포독성인 lipopolysaccharide 유사물질과 peptidoglycan, 세포부착인자, 섬유아세포 기능억제능력, 운동성 [4, 21] 을 보면 가능성이 높다.

또한, 치주염에 영향을 미칠수 있는 요소로 미생물이외에 생각할 수 있는 요소중의 하나가 인종적 차이이다. 인종에 따라 세균에 대한 방어능력이 다를 수 있고[37, 38], 섭취하는 음식물을 포함한 환경적 요인에 따라 상주균이 다를 수도 있다는 것이 역학조사를 포함한 여러 연구에서 보고되었다[39 - 46] . 예를들어 구강위생이 불충분한 아프리카의 흑인들을 조사한 보고에 의하면 그들의 치주낭 치태세균을 암시야현미경으로 관찰했을 때 42.1%가 스피로헤타였고 약 7.7%가 운동성 구균이었는데 치주낭의 깊이나 부착수준등 임상적인 치주염의 증세는 나타나지 않았고 단지 치은염에 머물렀다고 한다[39, 45]. 하지만 다른 연구에 의하면 치주염에 관여하는 미생물들이 인종적인 차이에 관계없이 발견된다는 보고도 있다[47 - 49].

이에 본 연구는 한국인에게 전혀 연구가 되어 있지 않은 성인성 치주염에서의 구강 스피로헤타의 역할을 밝히고자 16S rRNA에 의거한 올리고뉴클레오타이드 소식자를 이용하여 성인성 치주염 환자를 대상으로 구강 스피로헤타의 분포를 조사하여 다소의 지견을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

연세대학교 치과대학 부속병원에 내원한 성인성 치주염환자 29명(29 - 59세, 남13명, 여16명)을 대상으로 한 사람당 6mm 이상의 탐침 깊이(≥6mm)를 보이는 부위 4곳(실험군)과 3mm 이하의 탐침 깊이(≤3mm)를 보이는 건강한 부위 1곳(대조 1군)에서 먼저 치은연상치태를 멸균된 큐렛과 면봉으로 제거한 뒤 멸균된 paper point로 치은연하 치태를 채취했다.

같은 방법으로 건강한 치주조직을 가진 19 - 24세의 연세대학교 치과대학 학생 20명(남13명, 여7명)을 대상으로 한 사람당 5부위로부터 치은연하 치태를 채취했다(대조 2군). 표본 채취 부위는 한 치아당 1부위로 한정하였다.

2. 연구 방법

(1) 표본 채취방법

채취방법은 3개의 paper point를 치은 열구내에 10초간 삽입한 후 즉시 reduced trans - port fluid가 들어 있는 2.5 ml 용기에 넣었다. 용기는 혐기성을 유지하며 되도록 빨리 실험실 과정을 밟았다. 성인성 치주염이외의 다른 질병이 있거나 면역성이 약화된 환자, 그리고 최근 6개월이내에 항생제 치료를 포함한 치주염 치료를 받은 환자는 연구대상에서 제외시켰다.

(2) 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)

채취된 표본을 위상차 현미경하에서 검사하여(x 1,000) 구강 스피로헤타의 유무를 관찰 기록한 후 균질화(homogenization) 시켰다. 이중 100㎕를 원심분리(13,000g)시켜 침전물(pellet) 을 얻고 나머지는 냉동보관했다. 침전물을 용해완충액(lysis buffer[*1.])로 용해한 후 세균의 16S rRNA 유전인자(16S rDNA) 의 universal primer를 사용하여 PCR을 시행했다. 즉 세균의 DNA를 포함하는 1㎕의 표본부유물, 30 pmol eubacterial universal primers {TPU1(5' - AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG - 3': *E. coli* 의 16S rRNA 유전인자의 8 - 27에 상응하는 위치), RTU3(5' - GWA TTA CCG CGG CKG CTG - 3': *E. coli* 의 16S rRNA 유전인자의 519 - 536에 상응하는 위치)}, Perkin Elmer Cetus 시약[*2.]등을 사용하여 100 ㎕ 반응혼합물을 만들어 세균의 16S rDNA의 일부(약 530 염기서열)를 PCR로 증폭했다. PCR은 95℃에서 5분간 초기 변성화시킨 후 열회로(thermal cycler, Perkin - Elmer Cetus model 480)내에서 95℃에서 1분간 변성반응(denaturation), 56℃에서 1분간 결합반응(annealing), 72℃에서 연장반응(exten - sion) 과정을 30회 반복했다. Agarose gel electrophoresis 과정을 통해 PCR의 성공 여부를 확인하여 폴라로이드로 사진을 촬영하였다.

Table 1. The sequences of the probes

Probes	Sequences
TVIN	5' - ATTGAGACTATTCGGTATTACCTGC - 3'
TDEN	5' - CATGACTACCGTCATAAAGAAGC - 3'
TMAL	5' - CTATTGTGCTTATTCATCAGGC - 3'
TSOC	5' - CATTGCTGCCCTGCCGCTCGAGTTG - 3'
TPEC	5' - CTCCAACTTATATGACCTTATCCG - 3'
TRE I	5' - ACGCAAGCTCATCCTCAAG - 3'
TRE II	5' - GCTCTTTTCCTCATTTACCTTTAT - 3'
TRE III	5' - CCCCATCTTAAAGGTAGATCCAC - 3'
TRE IV	5' - CGGTCACATTCGGTATTACCTACT - 3'
TRE V	5' - CCTTTATTCCGTGAGACCTTATC - 3'
TRE VI	5' - GTGGGCGCGTCGTCCACGCGTTAC - 3'
TRE VII	5' - CCCATCCGAGAGGTACGTCATCCA - 3'

배양이 가능한 구강 스피로헤타 종	소식자(species - specfic probe)
Treponema vincentii(ATCC 35580)	TVIN
Treponema denticola(ATCC 33521)	TDEN
Treponema maltophilum(ATCC 51939)	TMAL
Treponema socranskii subsp. socranskii(ATCC 35536)	TSOC
Treponema socranskii subsp. buccale(ATCC 35534)	TSOC
Treponema pectinovorum(ATCC 33768)	TPEC
아직 배양이 되지않은 구강 스피로헤타	소식자(group - specific probe)
group I recombinant clones	TRE I
NZM3D292	
NZM3D464	
NZM3112	
NZM3142	
NZM3147	
NZM3166	
group II recombinant clones	TRE II
NZM3106	
NZM3158	
group III recombinant clones	TRE III
NZM3143	
NZM3D298	
NZM3D527	
group IV recombinant clones	TRE IV
NZM3122	
NZM3D505	
NZM3125	
group V recombinant clones	TRE V
NZM3124	
NZM3155	
group VI recombinant clones	TRE VI
NZM3104	
group VII recombinant clones	TRE VII
NZM3D384	

*1. 용해완충액
500 mM Tris - HCl
20 mM EDTA
10 mM NaCl
1% SDS
pH 9.0

*2. Perkin Elmer Cetus 시약
0.5 μℓ *Taq* polymerase(5units/μl)
10 μℓ 10 x PCR 완충액(Mg^{2+} 없는것)

6 μℓ 25 mM $MgCl_2$
8 μℓ dNTP 혼합물(각각 2.5 mM 씩)
1 μg 이하의 template

(3) 올리고뉴클레오타이드 소식자 (Oligonucleotide Probes)

특이 소식자로서 지금까지 배양이 가능한 구강 스피로헤타 종의 소식자와 아직 배양이 되지않은 구강 스피로헤타 군의 소식자를 아래와 같이 제조하여 사용하였다[34,36](Table 1).

각 군에서 사용한 recombinant clones은 서로 염기서열이 다르며 배양이 되지않은 구강 스피로헤타 중에서는 각 군을 대표할 수 있는 것으로 점상블롯보합결합에서 양성 대조로 사용하였다.

*T. vincentii, T. denticola, T. maltophilum*은 각기 구강 스피로헤타 phylogenetic tree[34]에서 I, II, IV군에 속하며 TVIN, TDEN, TMAL은 각기 *T. vincentii, T. denticola, T. maltophilum*을 제외한 나머지 각군에 속한 *Treponema*는 탐지할 수 없도록 소식자를 제조하였다.

위의 구강 스피로헤타 이외에도 치주염의 병인균이라고 추정되는 아래의 균주를 대조 균주로 사용했다.

Actinobacillus actinomycetemcomitans MCCM 02638
Capnocytophaga gingivalis MCCM 00858
Capnocytophaga ochracea MCCM 00238
Eubacterium lentum ATCC 25559^T
Fusobacterium nucleatum ATCC 25586^T
Porphyromonas gingivalis ATCC 33277
Prevotella intermedia MCCM 00407

각 소식자의 특이도(specificity)는 참조한 균주의 PCR 생성물로 확인되었다.

위의 염기서열로 제작된 소식자를 DIG oligonucleotide 3'-end labeling kit(Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하여 digoxigenin(DIG)-ddUTP 로 표지했다. 즉 20μ의 반응 혼합물[*3.]이 담긴 시험관을 37℃에서 15분간 방치한 후 얼음에 놓아 2μℓ의 반응 정지액(stop solution)[*4.]을 첨가했다. 올리고뉴클레오타이드를 2.5μℓ의 4M LiCl과 75μℓ의 미리 냉각시켜둔 에탄올로 침전시켜 잘 섞은 후 -20℃에서 하룻밤 두었다. 4℃에서 12000g로 원심분리하여 알콜성분은 따뤄내고 침전물을 500μℓ 70% 에탄올로 세척한 후 건조시켰다. 침전물을 20μℓ dH_2O에 다시 녹였다.

[*3.]반응혼합물
10 μℓ 100 pmol oligonucleotide
1 μℓ DIG-ddUTP
1 μℓ terminal transferase
4 μℓ $CoCl_2$
4 μℓ 5 x TT 완충액(terminal transferase buffer)

[*4.]반응정지액
1 μℓ glycogen
200 μℓ 0.2 mM EDTA

4) 점상블롯 보합결합 (Dot-blot Hybridization)

95℃에서 5분간 변성반응시킨 후 각 PCR 생성물 2μℓ를 nylon membrane(Hybond N, Amersham) 에 점상블롯시키고 3분간 254nm에 UV-cross linking 하여 DNA를 고정 부착했다(Ultraviolet crosslinker, UVP, Inc, Upland CA). 원본 16S rRNA 유전자 서고로부터 유래된 recombinant clones과 배양 가능한 스피로헤타, 또 다른 7 가지 치주 병원성 세균들의 DNA를 PCR 하고 점상블롯보합결합을 시행하여 대조 균주로 삼았다. Nylon membrane을 보합결합관(hybridization tube)에 넣고 보합결합용액(hybridization solution)[*5.]내에서 30분동안 소식자에 맞는 온도로 보합결합 전과정(prehybridization)을 시켰다. 여기에 50 pmol의 표지된 올리고뉴클레오타이드 소식

자 5㎕를 넣어 1시간동안 보합결합하고 세척완충액1(washing buffer)*6.로 15분 간 두 번 세척했다. 보합결합된 소식자는 DIG luminescent detection kit(Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하여 alkaline phosphatase에 결합된 anti-digoxigenin과 alkaline phosphatase의 기질로서 chemiluminescence(CSPD)를 사용하여 탐지해냈다. 즉 membrane을 세척완충액2*7.에서 1-5분간 헹구고, 100ml blocking 용액*8.에서 30분간 방치한 후 20ml 의 항체용액(antibody solution)*9.에서 30분간 방치했다. 100ml 세척완충액2*7.로 15분간 두 번 세척하고 20ml 탐지용액(detection buffer)*10. 에서 2-5 분간 방치했다. 그 후 membrane을 1-2 ml CSPD solution*11.에서 5분간 방치한 뒤 membrane을 Whatman 3MM paper 상에서 물기를 제거하되 완전 탈수상태가 되지않도록 했다. Membrane을 37℃에서 5-15 분간 방치한 후 실온에서 X-ray에 노출시켜 감광된 것을 사용한 소식자로 탐지해 낼 수 있는 세균이 존재하는 것으로 간주하여 결과 처리했다. 특이 소식자를 써서 탐색해내기 전에 eubacteria의 보편 소식자를 써서 점상블롯의 온전함을 확인하고 구강 스피로헤타의 보편 소식자로 구강 스피로헤타의 존재 여부를 확인한 다음 구강 스피로헤타의 특이 소식자를 사용했다. 특이 소식자로 탐색해내는 과정중 매 3회마다 1회 eubacterial 보편 소식자 TPU2(5'-CCA RAC TCC TAC GGG AGG CA-3': *E. coli* 16S rRNA 유전인자의 334-353에 상응하는 위치)을 사용한 보합결합으로 점상블롯된 것이 온전한가를 점검했다. 각 소식자는 매회 한 가지씩만 사용하였으며 사용한 소식자는 소식자 제거용액(stripping solution)*12.을 사용하여 37 ℃에서 15분간 2회 세척하고 2 x SSC를 사용하여 제거한 뒤 다음 소식자를 사용하여 보합결합을 진행하였다.

*5.보합결합용액
5 x SSC(sodium chloride 과 sodium citrate를 섞은 용액에 NaOH를 넣어 pH 8.0으로 맞춘 것으로 통상 20 x를 사용하는데 여기서는 4배 희석한 것을 사용했음)
1% blocking 용액 (Boehringer Mannheim, Germany)
0.1% N-lauroylsarkosine
0.02% SDS(sodium dodecyl sulfate)

*6.세척완충액1
5 x SSC
0.01% SDS

*7.세척완충액2
0.1% maleic acid
0.15M NaCl
0.3% Tween 20
pH 7.5

*8.blocking 용액
1% blocking 용액 (Boehringer Mannheim, Germany)
0.1% maleic acid
0.15M NaCl
pH 7.5

*9.항체용액
완충액에서 1:10000으로 희석하여 75 mU/ml로 만든 anti-DIG-AP 중합체

*10.탐지용액
0.1 M Tris-HCl
0.1 M NaCl
pH 9.5

*11.CSPD용액
CSPD(Disodium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2'-

Table 2. Oral spirochetes in Korean adult periodontitis according to the detection method(site, %)

	Phase contrast Microscope	Universal Probe	Specific Probe
Experimental(n=116)	91.37	98.27	95.68
Control 1(n=28)	14.28	46.42	35.71
Control 2(n=100)	0	22.0	19.0

Table 3. The distribution of oral spirochetes in Korean adult periodontitis according to subject(%)

	Experimental(n=29)	Control 1(n=28)	Control 2(n=20)
T. vincentii	16(55.17)	0	0
T. denticola	8(27.58)	0	3(15.0)
T. maltophilum	23(79.31)	1(3.57)	4(20.0)
T. socranskii	27(93.10)	5(17.85)	9(45.0)
T. pectinovorum	0	0	0
TRE I	24(82.75)	2(7.14)	7(35.0)
TRE II	27(93.10)	5(17.85)	5(20.0)
TRE III	13(44.82)	2(7.14)	3(15.0)
TRE IV	28(96.55)	7(25.0)	8(40.0)
TRE V	2(6.89)	0	2(10.0)
TRE VI	3(10.34)	0	0
TRE VII	0	0	0

(5' - chloro) tricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decan} - 4 - yl)phenyl phosphate, Boehringer Mannheim, Germany)를 탐지용액에서 1:100으로 희석한 것

*[12].소식자 제거용액
0.2 M NaOH
0.1 % SDS

Ⅲ. 연구성적

성인성 치주염 환자의 표본 중에서 대조 1군으로 채택된 29개의 표본 중 1개가 손상되어 총 116부위의 실험군(총 29명)과 128부위의 대조군(치주질환자 28명과 치주조직이 건강한 자 20명)의 실험결과를 얻었다.

위상차 현미경으로는 총 29명의 성인성 치주염 환자 중 29명(116부위 중 106부위, 91.37%), 대조 1군에서는 총 28명 중 4명(28부위 중 4 부위, 14.28%) 에서 구강 스피로헤타가 관찰되었으며, 대조 2군에서는 보이지 않았다.

Eubacteria의 보편 소식자를 썼을 때 모든 표본에서 보합결합이 온전함을 확인할 수 있었으며, DNA를 함유하지 않는 모든 음성군(negative control)에서는 보합결합이 탐지되지않아 표본의 오염이 일어나지 않았음을 확인할 수 있었다. 소식자는 1 회에 1 개씩만 사용했으며 교차 보합결합(cross hybridization) 은 관찰되지 않았다. 구강 스피로헤타의 보편 소식자를 쓴 경우는 29명의 실험군 중 29명(116부위 중 114부위, 98.27%), 대조 1군에서는 28명 중 13명(46.42%), 대조 2군에서는 20명 중 9명(100부위 중 22부위, 22%)에서 구강 스피로

Table 4. The distribution of oral spirochetes in Korean adult periodontitis according to site(%)

	Experimental(n=116)	Control 1(n=28)	Control 2(n=100)
T. vincentii	42(36.20)	0	0
T. denticola	16(13.79)	0	4(4.0)
T. maltophilum	58(50.0)	1(3.57)	7(7.0)
T. socranskii	95(81.89)	5(17.85)	7(17.0)
T. pectinovorum	0	0	0
TRE I	66(56.89)	2(7.14)	15(15.0)
TRE II	90(77.58)	5(17.85)	6(6.0)
TRE III	30(25.86)	2(7.14)	3(3.0)
TRE IV	99(85.34)	7(25.0)	19(19.0)
TRE V	3(2.58)	0	2(2.0)
TRE VI	6(5.17)	0	0
TRE VII	0	0	0

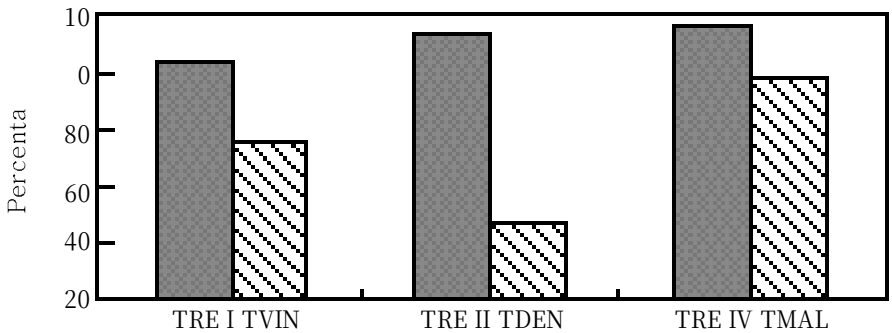

Fig 1. The presence of cultivable versus uncultured oral spirochetes according to subject in Korean adult periodontits patients revealed by group - specific probes(probes TRE I, TRE II and TRE IV) and species - specific probes(probes TVIN, TDEN and TMAL)

헤타가 존재하는 것으로 관찰되었다. 특이 소식자를 쓴 경우는 실험군, 대조 1군, 대조 2군에서 각기 95.68%(111부위), 35.71%(10부위), 19%(19부위)의 구강 스피로헤타가 존재하는 것으로 관찰되었다(Table 2).

이 경우 환자별로 보면 큰 차이가 나서 구강 스피로헤타가 특이 소식자로는 관찰되지않고 보편 소식자로만 관찰되는 환자에서부터 군(group) 특이 소식자로는 5 가지, 종(species) 특이 소식자로는 4 가지의 구강 스피로헤타가 관찰되는 환자까지 있었다. 한 환자에게서 6 가지 이상의 군이 모두 보이는 경우와 5 가지의 종이 모두 보이는 경우는 없었다.

T. pectinovorum 의 소식자를 사용한 실험결과는 실험군과 대조 1, 2군에서 모두 음성으로만 나타났다. 성인성 치주염 환자(실험군) 29명중 27명에게서 *T. socranskii*가 발견되었으 며 (93.1%), *T. maltophilum*(23명, 79.31%), *T. vincentii*(16명, 55.17%), *T. denticola*(8명, 27.58%) 순의 분포도를 보였다. 부위별로 나타난 수치도 *T. socranskii*(95부위, 81.89%), *T. maltophilum*(58부위, 50.00%), *T. vincentii*(42 부위, 36.20%), *T. denticola*(16 부위, 13.79%)였다(Table 3,

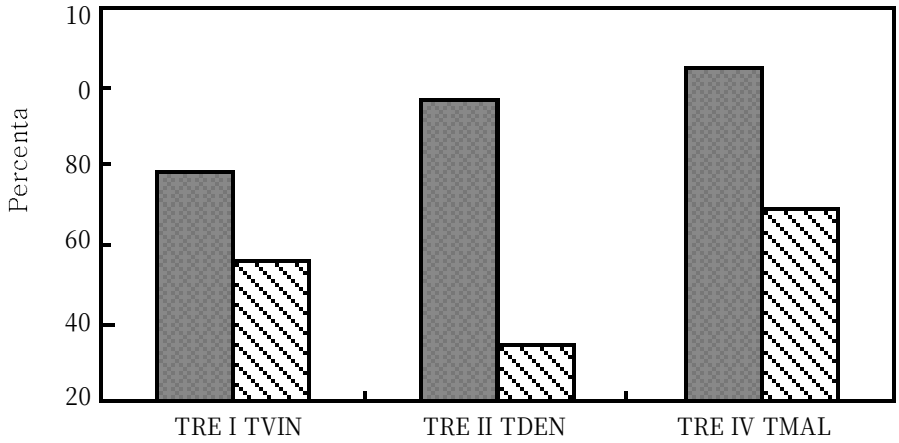

Fig 2. The presence of cultivable versus uncultured oral spirochetes according to site in Korean adult periodontitis patients revealed by group - specific probes(probes TRE I, TRE II and TRE IV) and species - specific probes(probes TVIN, TDEN and TMAL)

4). 특이 소식자를 사용한 모든 경우에서 실험군의 수치가 대조군의 수치보다 월등히 높았다.

I군에 속하는 *T. vincentii*, II군에 속하는 *T. denticola,* IV군에 속하는 *T. maltophilum*이 각기 각 군에서 차지하는 정도를 비교한 도표를 보면 군별로 집계된 수치와 종별로 집계된 수치와는 큰 차이가 있다(Fig. 1, 2). 즉 현재까지 분리 배양이 되지는 않았지만 phylogenetic tree[34]에서 I, II, IV군에 속하는 구강 스피로헤타가 많이 존재함을 알 수 있다. *T. socranskii, T. pectinovorum* 은 I - VII군 중 어느 군에도 속하지 않는데 *T. socranskii*는 종 특이 소식자 중 가장 높은 분포를 보였으며, *T. pectinovorum*은 어떤 표본에서도 관찰되지 않았다.

치주조직이 건강한 자를 대상(대조 1 군과 대조 2군)으로 한 결과에서는 *T. vincentii*가 하나도 발견되지 않았음에도 TRE I 군에 속하는 스피로헤타는 대조 1군에서 7.14%(28명중 2명), 대조 2군에서 7.0%(20명중 7명)가 발견되었다. 이를 부위별로 살펴보면 대조 1군에서 7.14%(28부위중 2곳), 대조 2군에서 15.0%(100부위중 15곳) 였다.

성인성 치주염 환자에서 구강스피로헤타의 군별 분포도를 보면 TRE IV군이 96.55%(29명중 28명)로 가장 높은 백분율을 보이며 TRE II(27명, 93.1%), TRE I(24명, 82.75%), TRE III(13명, 44.82%), TRE VI(3명 10.34%), TRE V(2명,6.89%), TRE VII(0명) 순이었다. 이를 부위별로 보아도 TRE IV(85.34%), TRE II(77.58%), TRE I(56.89%), TRE III(25.86%), TRE VI(5.17%), TRE V(2.58%), TRE VII(0%)로 같은 순위이다. 대조 1군에서는 *T. vincentii, T. denticola, T. pectinovorum,* TRE I 및 TRE V, TRE VI, TRE VII에 속하는 세균이 관찰되지 않았고, 대조 2군에서는 *T. vincentii, T. pectinovorum*, TRE VI, TRE VII 에 속하는 세균이 관찰되지 않았다. *T. pectinovorum* 과 TRE VII 군에 속하는 구강 스피로헤타는 실험군과 대조군을 포함한 어디에서도 관찰되지 않았다.

Ⅳ. 고찰 및 총괄

다른 모든 복합 감염성 질환에서와 마찬가지로 치주염의 발병인자를 찾기란 쉽지 않다

[7,50,51]. 과거에는 치주염이 생겼을 때 수적으로 증가된 세균 연구를 위해 현미경과 배양법을 많이 이용했다. 현미경 관찰은 손쉬운 방법이지만 세균을 분류할 수 없다는 단점을 지녔고 배양법은 진정한 병인균으로서의 세균 증가와 질병 발생에 따라 이차적으로 증식하는 세균을 구분할 수 없다는 단점을 지녔다[7, 30, 36, 51]. 구강 스피로헤타는 치주염 환자에 따라 분포도의 커다란 차이를 보이며 동일한 환자내에서도 병소에 따라 10 - 50%의 분포 차이를 보이는 세균으로[52] 배양 조건에 따라 총 배양 가능한 세균중 최대 복원력이 평균 1%에 불과하다[10, 22].

세균 연구를 위해 비교적 최근에 등장한 DNA 소식자 분석법을 배양법과 비교한 한 연구에 의하면 DNA 소식자 분석법은 배양법에 의해 양성으로 나타나는 기준을 세포수 10^3 이상으로 볼때 91 - 100% 효과적으로 탐지하는 방법이며 배양법에 의해 음성으로 나타난 경우에도 종종 병원균을 확인시켜 줄 수 있는 방법이다[9]. 또한 치주염의 세균 진단을 위한 방법들을 비교 보고한 한 연구[8]에서는 단계희석배양법(serial dilution culture), 현미경 관찰, DNA 소식자법, 면역학적방법(효소법 및 형광법)등을 사용하여 치주염 부위에서 채취한 치태내의 세균 4가지를 탐지한 결과를 비교했는데 4가지 세균의 분포도는 세균종과 탐지법에 따라 다르게 나타났으며 배양법이 제일 낮은 수치를 기록했다. 또한 PCR 없이 보합결합만 사용한 DNA 소식자법의 결과는 *T. denticola* 의 경우 현미경을 사용해서 나온 결과와 유사했다. 이번 연구에서 위상차 현미경으로 관찰된 백분율은 모든 표본에서 소식자를 쓴 경우보다 낮았으며 특히 세균의 존재수가 적다고 생각되는 대조군에서 그 차이가 두드러졌다. 두 연구 결과의 차이는 PCR의 사용 여부와 탐지해 낸 구강 스피로헤타의 가지 수 차이에 기인하는 것으로 생각된다.

최근에 Papapanou등은 DNA - DNA 보합결합법과 배양법을 사용하여 치태내의 10가지 세균들의 분포를 비교 조사하여 발표했는데 DNA - DNA 보합결합법을 사용한 경우가 대다수의 세균들중에서 훨씬 높은 수치를 기록했다[23] . 따라서 위에서 언급한 보고서에 의한다면 세균을 탐지해내는데 배양법은 까다롭고 힘들 뿐만 아니라 세균에 따라서는 그다지 신뢰도도 높지 않다고 볼 수 있다. 또 DNA 소식자법과 ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay)법을 비교한 한 보고서에서는 위의 두 방법의 민감도와 특이도는 세균에 따라 다르며 DNA 소식자법은 ELISA법보다 10^3 배 낮은 수준에서도 세균을 탐지해낼 수 있고(10^3 대 10^6) 특히 *T. denticola* 의 경우는 ELISA 법보다 DNA 소식자법에 의해 훨씬 높은 빈도로 탐지될 수 있었다고 했다[11]. DNA 소식자법은 빠른 속도로 개발, 수정되어 탐지 민감도 측면에서 종래의 방사선이 표지된 full - length 소식자를 10^4개의 세포수로 볼 때 핵산증폭법을 쓴다면 10 - 100 개의 세포수에서도 탐지할 수 있을 정도가 되었다[14].

DNA 소식자 사용시 whole genomic DNA 소식자를 쓰는 방법은 낮은 특이도가 문제이고 cloned DNA 소식자법은 민감도가 낮은데 비해 본 실험에서 세균을 탐지해내기위해 사용한 중합효소연쇄반응과 점상블롯보합결합은 소식자의 민감도와 특이도를 높이는 방법으로 교차반응이 적어 유전학적, 형태학적으로 유사한 세균들을 분리해내는데 매우 유용하다 [20]. DNA 소식자를 사용하여 구강내의 치태 세균들의 분포를 보고한 최근의 연구서 중에는 방법은 조금씩 달라도 증폭을 이용해서 민감도와 특이도를 높인 것이 있다[20,31].

세균탐색을 위해 핵산 보합결합법을 썼을 때의 보고분자(reporter molecule) 로 과거에는 방사능동위원소 ^{32}P, ^{35}S, ^{125}I 등을 쓴 후 자동방사능기록기나 beta counter로 알아냈는데 이 방법은 방사능 동위원소의 반감기에 의거한 제한된 보존기간, 방사능 원소 취급에 따를 수 있는 재해와 그와 관련된 복잡한 규제 및 처리문

제등의 단점이 있다. 따라서 최근에는 biotin, digoxigenin, horseradish perioxidase (HRP) 등으로 표지를 써서 효소법, 비효소법등으로 핵산에 직접 붙이는 방법을 많이 이용한다. 그 다음에 나타난 결과를 발색법을 쓰거나 HRP - catalyzed light 생성여부로 알아내는데 현재 상품화되어 나와있는 도구가 여럿이다[14, 32]. 이번 연구에서 사용된 chemiluminescence는 가장 최근에 나온 비방사능 보고법으로 보합결합 완료후 특정 기질에 노출되면 빛을 발하는 화학물질로 이번 연구에서는 DIG luminescent detection kit(Boehringer Mannheim, Germany)를 이용했다.

본 연구에서는 배양과 관계없이 구강 스피로헤타를 분리해내기 위해 중합효소연쇄반응을 이용하여 16S rRNA에 의거한 올리고뉴클레오타이드 소식자를 사용했는데 이것은 한국인 성인성 치주염 환자의 치은연하 치태내의 구강 스피로헤타의 분포를 살펴본 최초의 연구로 현재까지 배양이 되지않은 구강 스피로헤타 7군(Group I - VII 7군)과 배양이 되는 구강 스피로헤타 중에서 *T. denticola, T. pectinovorum, T. maltophilum, T. socranskii, T. vincentii* 5종으로 나누어 조사했다. 전체적인 구강 스피로헤타의 분포는 건강한 부위와 성인성 치주염이 있는 부위에서 큰 차이를 보이며 그 어느 구강 스피로헤타도 건강한 부위에서의 수치가 치주염에 이환된 부위 수치보다 높게 나타나지 않았다.

Riviere등[4,25]은 monoclonal 항체를 이용한 면역형광법으로 *Treponema pallidum* 과 유사한 항체반응을 갖으며 조직 침투력을 보이지만 그 당시 분리 배양이 되지못했던 구강 스피로헤타를 관찰하여 Pathogen - Related Oral Spirochetes(PROS)라 명명했다. 그 후 Choi 등[34,35]은 PROS가 단일 *Treponema*종이 아니고 그들의 phylogenetic tree에서 I군에 속하는 구강 스피로헤타의 heterogenous한 집단이며 그 중에서는 *T. vincentii*가 현재 배양되는 유일한 구강 스피로헤타종이라고 보고했다. 이번 연구 결과에서도 *T. vincentii* 가 건강한 부위에서는 하나도 검출되지 않았음은 성인성 치주염과의 연관 관계의 가능성을 시사하여 *T. vincentii* 의 치주염과 관련된 병원성에 대한 연구가 필요하다고 생각된다.

각 군별로 집계된 수치가 종별로 집계된 수치와 큰 차이를 보이는 것은 급속 진행성 치주염 환자의 연구 결과[34, 36] 에서와 같이 지금까지 분리 배양된 구강 스피로헤타보다 배양이 되지 않은 스피로헤타의 종류가 훨씬 많다는 것을 보여 주었으며 TRE III, VI, VII 는 현재 분리된 종이 없는 스피로헤타의 집단이다. 이번 연구에서는 소식자로 이용하지는 않았지만 현재 배양 가능하다고 보고된 *T. amylovorum*[29]은 Choi 등[34] 에 의하면 phylotype 19에 속하는 것으로 V군에 속한다고 볼 수 있으며 *T. medium*[28]은 *Treponema* 균주를 크게 두 군으로 분류했을 때 *T. phagedenis, T. denticola, S. zuelzera, T. pallidum* 등이 속하는 군에 넣을 수 있다고 했다. *T. medium*은 16S rRNA 염기서열 유사도로써 비교했을 때 *T. phagedenis*와 88.1%로 가장 유사했지만 Choi등의 phylogenetic tree[34]에서 어디에 속하는지 현재로서는 알 수 없다.

TRE VII 군에서는 구강 스피로헤타의 검출이 되지않았는데 이는 실재로 존재하지 않거나 혹은 빈도수가 매우 낮아 탐지하기 힘든 것으로 추정 가능하다. *T. pectinovorum*의 결과가 모두 음성으로 나온 것은 예상 밖으로 펙틴을 필요로 하는 작은 크기의 이 구강 스피로헤타가[22] 한국인 치주염 환자에게서 매우 낮은 분포를 보이는 것인지 아니면 실험상의 오류에 따른 결과인지는 판단할 수 없다. 최근의 유럽인 급속 진행성 치주염 환자를 대상으로 한 연구[36]와 이번 연구와 직접적인 대조는 무리일지 몰라도 전체적인 결과를 볼 때 두 집단의 구강 스피로헤타의 분포는 차이가 있었다. 즉 종 특이 소식자를 사용했을 때 이번 연구에서는

TVIN 이 TDEN 보다 약 2배 높게 관찰되었지만(55.17% vs 27.58%), Moter등[36]의 보고에서는 TDEN 이 TVIN 보다 약 3배 높은 결과(62.3% vs 20.8%)를 보였다. 또 군 특이 소식자를 사용했을 때는 이번 연구에서는 TRE IV가 가장 높게 관찰되었고(96.55%) 그다음이 TRE II, TRE I, TRE III, TRE VI, TRE V 순이었지만, Moter등[36]의 보고에서는 TRE IV와 TRE I이 100%로 나왔고 그 다음이 TRE II, TRE III, TRE VII, TRE V, TRE VI 순으로 한국인 성인성 치주염 환자에서는 볼 수 없었던 VII 군에 속하는 구강 스피로헤타가 유럽인 급성 진행성 치주염 환자에서는 5 번째로 높게(39.6%) 관찰되었다. 이것이 치주염의 유형에 따른 차이인지, 혹은 인종적 차이인지, 아니면 단순히 표본수가 적어서 나온 차이인지는 알 수 없지만 흥미로운 것은 유럽의 급속 진행성 치주염 환자에게서도 이번 연구에서와 마찬가지로 *T. pectinovorum*이 발견되지 않았다는 것이다. 성인성 치주염 부위에서 4부위(2명의 환자), 대조 1군에서 3부위(3명의 환자), 대조 2군에서 3부위(1명)에서는 구강 스피로헤타의 보편 소식자로는 양성이었지만 *Treponema*에 특이한 소식자로는 모두 음성으로 결과가 나왔다. 위와 같은 사실은 현재 만들어진 특이 소식자로는 탐지해 낼 수가 없는 구강 스피로헤타가 존재함을 시사하며 이번에 사용한 12개의 특이 소식자로 탐지해 낼 수 없었던 구강 스피로헤타중에는 *T. medium*이 포함될 가능성도 배제할 수 없다.

또한 사람별로 집계된 분포도가 부위별로 집계된 분포도보다 높게 나와 특정 세균이 한 사람내에서도 다르게 군락을 이룰 수 있을 수 있다는 것을 보인다. 성인성 치주염 환자의 건강한 부위와 건강한 자의 표본으로부터 나온 결과는 Haffajee등[2]의 결과와 상이하다. 즉 Haffajee등[2]에서는 성인성 치주염 환자의 건강한 부위에서 건강한 자보다 많은 *T. denticola*가 검출되어 임상적인 증상이 나타나기 전에 세균의 증식이 있거나, 환자의 질병부위에서 건강한 부위로의 세균의 " spill - over "가 있음을 암시했지만 이번 결과에서는 성인성 치주염 환자의 건강한 부위에서 *T. denticola*가 검출되지 않았다. 이것이 표본수의 부족에 의한 것인지 아니면 인종에 따른 차이인지는 현재로서는 알 수 없다. 또한 보편 소식자를 썼을 때의 결과는 부위별로 봤을 때 실험군, 대조 1군, 대조 2군에서 각기 98.27%, 46.42%, 22.0% 로 나타나고, 특이 소식자의 결과는 각기 95.68%, 35.71%, 19.0% 로 나와 대조 1군에서의 백분율이 대조 2군에서보다 높다. 하지만 군별, 종별로 본 결과는 대조 2군의 결과 수치가 대조 1군의 결과보다 높은 것이 4곳(부위별로 봤을 때)에서 눈에 띄는 것이 흥미롭다. 이것은 대조 2군의 표본채취 부위가 임상적으로는 인식되지 못했지만 진정한 의미의 건강한 부위가 아닐 수도 있음을 시사하여 앞으로의 예후와도 관련지어 생각할 수도 있다. 실재 Simonson등[27]은 *T. denticola*를 *P. gingivalis*와 더불어 치주염 치료후의 예후를 판단할 수 있는 표지로 사용할 수 있다고 보고한 바 있다. 따라서 대조 1군과 대조 2군을 향후 관찰하여 비교해 보는 것도 흥미로울 것이다. 또 한 가지 가능한 것은 표본수의 차이에서 따른 결과로 보는 것이다. 즉 같은 대조군이면서 대조 1군은 각 사람당 1부위, 대조 2군은 각 사람당 5부위씩을 포함했다. 이는 사람별로 본 백분율이 부위별로 본 백분율보다 높았다는 사실로도 가능성이 있다.

" Checkerboard " DNA - DNA 보합결합방법을 쓴 한 연구[22]에서는 세균수에 따른 어느 정도의 정량측정을 보고했지만 증폭법을 썼을 때 세균 수에 따라 동일한 비율로 증폭되지 않음을 감안하여 이번 연구에서는 표지반응의 강도에 따른 분류는 하지 않았다.

V. 결론

한국인 성인성 치주염 환자의 구강 스피로헤타의 분포를 알아보기위해 현재 배양될 수 있

는 구강 스피로헤타와 배양이 되지않은 구강 스피로헤타의 16S rRNA에 의거한 올리고뉴클레오타이드 소식자를 사용한 중합효소연쇄반응과 점상블롯보합결합법을 이용하여 성인성 치주염 환자로부터 실험군 116 부위(탐침 깊이 ≥6mm)와 대조 1군 28 부위(탐침 깊이≤ 3mm), 건강한 치주 조직을 갖은 학생으로부터 대조 2군 100 부위의 결과를 얻었다.

1. 위상차 현미경으로 본 결과는 실험군, 대조 1군에서 각기 91.37%, 14.28%의 구강 스피로헤타가 관찰되었으며 대조 2군에서는 관찰되지 않았다.
2. 보편 소식자를 사용한 경우는 실험군, 대조 1군, 대조 2군에서 각기 98.27%, 46.42%, 22.0% 의 구강 스피로헤타가 관찰되었다.
3. 특이 소식자를 사용한 경우는 실험군, 대조 1군, 대조 2군에서 각기 95.68%, 35.71%, 19.0% 의 구강 스피로헤타가 관찰되었다.
4. 종 특이 소식자를 사용한 경우는 *T. socranskii*가 가장 많이 관찰되었으며(81.89%), 그 다음이 *T. mal - tophilum(*50.0%), *T. vincentii(*36.20%), *T. denticola(*13.79%) 순이었고, 군 특이 소식자를 사용한 경우는 TRE IV(85.34%), TRE II(77.58%), TRE I(56.89%), TRE III(25.86%), TRE VI(5.17%), TRE V(2.58%) 순이었다.
5. T. vincentii는 치주염에 이환된 부위에서만 관찰되었고 건강한 부위에서는 관찰되지 않았다.
6. *T. pectinovorum* 과 VII군에 속하는 구강 스피로헤타는 어느 표본에서도 관찰되지 않았다.

이상의 결과에서 16S rRNA에 의거한 올리고뉴클레오타이드 소식자로 구강 스피로헤타의 한국인 성인성 치주염과의 연관성과 분리되지 않은 구강 스피로헤타를 확인하였으며, 인종 및 치주염의 형태에 따른 구강 스피로헤타의 분포 차이, *T. vincentii* 의 병원성 연구, 치료 전후의 구강 스피로헤타의 분포 변화등의 보다 세분화된 연구가 필요하다고 생각된다.

Ⅵ. 참고문헌

1. Albandar, J.M., Brown, L.J., Loe, H.: Putative periodontal pathogens in sub - gingival plaque of young adults with and without early - onset periodontitis, J.Periodontol., 68:973 - 981, 1997
2. Haffajee, A.D., Cugini, M.A., Tanner, A., Pollack, R.P., Smith, C., Kent Jr., R.L., Socransky, S.S.: Subgingival microbiota in healthy, well - maintained elder and periodontitis subjects, J.Clin.Periodontol., 25:346 - 353, 1998
3. Moore, W.E.C., Moore, L.V.H.: The bacteria of periodontal diseases, peri - odontology 2000, 5:66 - 77, 1994
4. Riviere ,G.R., Weisz, K.S., Adams,D.F., Thomas, D.D.: Pathogen - related oral spirochetes from dental plaque are invasive, Infection and Immunity, 59:3377 - 3380, 1991
5. Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Cugini, M.A., Smith, C., Kent Jr., R.L. : Microbial complexes in subgingival plaque, J.Clin.Periodontol., 25:134 - 144, 1998
6. Socransky, S.S., Haffajee, A.D.: Evidence of bacterial etiology: a his - torical perspective, Periodontology 2000, 5:7 - 25, 1994
7. Haffajee, A.D., Socransky, S.S.: Microbial etiological agents of

destructive periodontal disease, Periodontology 2000, 5:78 - 111, 1994
8. Loesche, W.J., Lopatin, D.E., Stoll, J., van Poperin, N., Hujoel, P.P. : Comparison of various detection methods for periodontopathic bacteria: Can culture be considered the primary reference standard? J.Clin.Microbiol., 30:418 - 426, 1992
9. Savitt, E.D., Strzempko, M.N., Vaccaro, K.K., Peros, W.J., French, C.K. : Comparison of cultural methods and DNA probe analysis for the detection of *Actinobacillus actinomycetem - comi - tans, Bacteroides gingivalis,* and *Bacteroides intermedius* in subgingival plaque samples, J.Periodontol. 59:431 - 438, 1988
10. Wyss, C., Choi, B.K., Schupbach, P., Guggenheim, B., Gobel, U.B. : *Treponema maltophilum* sp. nov., a small oral spirochete isolated from human periodontal lesions, Int.J.Syst.Bacteriol., 46:745 - 752, 1996
11. Melvin, W.L., Assad, D.A., Miller, G.A., Gher, M.E., Simonson, L., York, A.K.: Comparison of DNA probe and ELISA microbial analysis methods and their association with adult periodonti - tis, J.Periodontol., 65:576 - 582, 1994
12. Wolff LF, Anderson L, Sandberg GP, Reither L, Binsfeld CA, Corinaldesi G, Shelburne CE: Bacterial concentra - tion fluorescence immunoassay(BCFIA) for the detec - tion of periodontopathogens in plaque. J.Periodontol. 63:1093 - 1101, 1992
13. Zappa, U., Reinking - Zappa, M., Graf, H., Gmur, R., Savitt, E.: Comparison of selological and DNA probe analyses for detection of sus - pected periodontal pathogens in sub - gingival plaque samples, Archs.oral Biol., 35.suppl.161s - 164s, 1990
14. Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C., Yolken, R.H. : Manual of clinical microbiology 1995 6th ed. Americal Society for Microbiology
15. Wyss, C.: Growth of *Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, T. pectinovorum, T. socran - skii,* and *T. vincentii* in a chemically defined medium, J.Clin.Microbiol., 30:2225 - 2229, 1992
16. Loesche, W.J., Syed, S.A., Schmidt, E., Morrison, E.C.: Bacterial profiles of subgingival plaques in peri - odontitis, J.Periodontol., 56:447 - 456, 1985
17. Newman, M.G., Socransky, S.S.: Predominant cultivable microbiota in periodontitis, J.Periodont.Res., 12:120 - 128, 1977
18. Slots, J.: The predominant cul - tivable organisms in juvenile peri - odontitis, Scand. J.Dent.Res. 84:1 - 10, 1976
19. Armitage,G.C., Dickinson,W.R., Jenderseck, R.S., Levine,S.M.,Chambers,D.W. : Relationship between the percentage of subgingival spirochetes and the severity of periodontal disease, J.Periodontol., 53:550 - 556, 1982
20. Ashimoto, A., Chen, C., Bakker, I., Slots, J.: Polymerase chain reaction

detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions, Oral.Microbiol. Immunol., 11:266 - 273, 1996

21. Choi, B.K., Gobel, U.B.: Identification of new oral spirochete in a subgingival plaque sample by 16s rRNA sequence analysis, Experientia 50:790, 1994
22. Loesche, W.J.: The role of spirochetes in periodontal disease, Adv.Dent.Res., 2(2):275 - 283, 1988
23. Papapanou, P.N., Madianos, P.N., Sandros, J.: "Checkerboard" versus culture: A comparison between two methods for identification of subgingival microbiota, Eur.J.Oral.Sci., 105:389 - 396, 1997
24. Riviere, G.R., DeRouen, T.A.: Association of oral spirochetes from periodontally healthy sites with development of gingivitis, J.Periodontol., 69:496 - 501, 1998
25. Riviere, G.R., Elliot, K.S., Adams, D.F., Simomson, L.G., Forgas, L.B., Nilius,A.M., Lukehart, S.A.: Relative proportions of pathogen - related oral spirochetes(PROS) and *Treponema denticola* in supragingival and subgingival plaque from patients with periodontitis, J.Periodontol.,63:131 - 136, 1992
26. Papapanou, P.N., Baelum, V., Luan, W - M., Madianos, P.N., Chen, X., Fejerskov, O., Dahlen, G.: Subgingival microbiota in adult Chinese: Prevalence and relation to periodontal disease progression, J.Periodontol.,66:651 - 666, 1997
27. Simonson, L.G., Robinson, P.J., Pranger, R.J., Cohen, M.E., Morton, H.E. : *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* as prognostic markers following periodontal treatment, J.Periodontol., 63:270 - 273, 1992
28. Umemoto, T., Nakazawa, F., Hoshino, E., Okada, K., Fukunaga, M.,Namikawa, I.: *Treponema medium* sp. nov., isolated from human subgingival dental plaque, Int.J.Syst.Bacteriol., 47: 67 - 72, 1997
29. Wyss, C., Choi, B.K., Schupbach, P., Guggenheim, B., Gobel, U.B. : *Treponema amylovorum* sp. nov., a

saccharolytic spirochete of medium size isolated from an advanced human peridontal lesion, Int.J.Syst .Bacteriol., 47:842 - 845, 1997

30. Woese, C.R.: Bacterial evolution, Microbiol.Rev. 51:221 - 271, 1987
31. Conrads, G., Mutters, R., Fischer, J., Brauner, A., Lutticken, R., Lampert, F. : PCR reaction and dot - blot hybridization to monitor the distribution of oral pathogens within plaque samples of periodontally healthy individuals, J.Periodontol., 67:994 - 1003, 1996
32. Conrads, G., Brauner, A.: Non - radioactively labelled DNA probes for the detection of periodontopathogenic *Prevotella* and *Porphyromonas* species, FEMS Immunology and Medical Microbiology, 6;115 - 120, 1993
33. Tanner, A.C.R., Maiden, M.F.J., Zambon, J.J., Thoren, G.S., Kent Jr., R.L.: Rapid chair - side DNA probe assay of *Bacteroides forsythus* and *Porphyromonas gingivalis*, J.Periodont.Res., 33:105 - 117, 1998
34. Choi, B.K., Paster, B.J., Dewhirst, F.E., Gobel, U.B.: Diversity of cultivable and uncultivable oral spirochetes from a patient with severe destructive periodontitis, Infection and Immunity, 62:1889 - 1895, 1994
35. Choi, B.K., Wyss, C., Gobel, U.B.: Phylogenetic analysis of pathogen - related oral spirochetes, J.Clin.Microbiol., 34:1922 - 1925, 1996
36. Moter, A., Hoenig, C., Choi, B.K., Riep, B., Gobel, U.B.: Molecular epidemiology of oral *Treponemes* associated with periodontal disease, J. Clin.Microbiol., 36:1399 - 1403, 1998
37. Gunsolley, J.C., Tew, J.G., Burmeister, J.A., Schenkein, H.A.: Effects of race and periodontal status on antibody reactive with *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain Y4, J.Periodont.Res., 23:303 - 307, 1988
38. Schenkein, H.A., Rest, A.M., Gunsolley, J.C.: Influence of race and periodontal clini - cal status on neutrophil chemotctic responses, J.Periodont. Res.,26:272 - 275, 1991
39. Africa, C.W., Parker, J.R., Reddy, J.: Bacteriological studies of subgingival plaque in a periodontitis - resistant population. Darkfield microscopic study, J.Periodont.Res., 20:106 - 112, 1985
40. Beck, J.D., Koch, G.G., Zambon, J.J., Genco, R.J., Tudor, G.E..: Evaluation of oral bacteria as risk indicators for periodontitis in older adults, J.Periodontol., 63:93 - 99, 1992
41. Beck, J.D., Koch, G.G., Rozier, R.G., Tudor, G.E.: Prevalence and risk indicators for periodontal attachment loss in a population of older community - dwelling blacks and whites, J.Periodontol., 61:521 - 528, 1990
42. Cao, C.F., Aeppli, D.M., Liljemark, W.F., Blomquist, C.G., Bandt, C.L., Wolff,L.F.: Comparison of plaque microflora between Chinese and Caucasian population groups, J.Clin.Periodontol., 17:115 - 118, 1990
43. Genco, R.J.: Current view of risk factors for periodontal diseases, J.Periodontol., 67:1041 - 1049, 1996

44. Grossi, S.G., Genco, R.J., Machtei, E.E., Ho, A.W., Koch, G., Dunford, R.,Zambon, J.J., Hausmann, E.: Assessment of risk for periodontal disease. II.Risk indicators for alveolar bone loss, J.Periodontol., 66:23 - 29, 1995
45. Reddy, J., Africa, C.W., Parker, J.R.: Darkfield microscopy of subgingival plaque of an urban black population with poor oral hygiene, J.Clin.Periodontol., 13:578 - 582, 1986
46. Schenkein, H.A., Burmeister, J.A., Koertge, T.E., Brooks, C.N., Best, A.M., Moore, L..V.H., Moore, W.E.C.: The influence of race and gender on periodontal microflora, J.Periodontol., 64:292 - 296, 1993
47. Ali, R.W., Johannessen, A.C., Dahlen, G., Socransky, S.S., Skaug, N. : Comparison of the subgingival microbiota of periodontally healthy and diseased adults in Northern Cameroon, J.Clin.Periodontol., 24:830 - 835, 1997
48. Ali, R.W., Martin, L., Hafajee, A.D., Socransky, S.S.: Detection of identical ribotypes of *Porphyromonas gingivalis* in patients residing in the United States, Sudan, Romania and Norway, Oral.Microbiol. Immunol., 12:106 - 111, 1997
49. Ali, R.W., Velcescu, C., Jivanescu. M - C., Lofthus, B., Skaug, N.: Prevalence of 6 putative periodontal pathogens in subgingival plaque samples from Romanian adult peri - odontitis patients, J.Clin.Periodontol., 23:133 - 139, 1996
50. Christersson, L.A., Zambon, J.J., Genco, R.J.: Dental bacterial plaque, Nature and role in periodontal disease, J.Clin.Periodontol., 18:441 - 446, 1991
51. Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Smith, G.L.F., Dzink, J.L.: Difficulties encountered in the search for the etiologic agents of destructive periodontal disease, J.Clin.Periodontol., 14:588 - 593, 1987
52. Evian, C.J., Rosenberg, E.S., Listgarten, M.A.: Bacterial variability within diseased periodontal sites, J.Periodontol., 53:595 - 598, 1982

국문요약

한국인 성인성 치주염 환자에서의 구강 스피로헤타의 분포

본 연구에서는 한국인 성인성 치주염의 관련 세균 중에서 구강 스피로헤타의 분포를 조사하기 위하여 배양하지 않고도 구강 스피로헤타를 분리할 수 있는 16S rRNA에 의거한 올리고뉴클레오타이드 소식자를 사용하였다.

성인성 치주염 환자 29명을 대상으로 한 사람당 6mm 이상의 탐침 깊이를 보이는 부위 4곳(실험군)과 3mm 이하의 탐침 깊이를 보이는 건강한 부위 1곳(대조 1군), 건강한 치주조직을 가진 학생 20명을 대상으로 한 사람당 5부위로부터 치은연하 치태를 채취한 뒤(대조 2군) 중합효소연쇄반응과 점상블롯보합결합법을 시행하였다. 소식자로는 구강 스피로헤타의 보편 소식자 및 현재 배양이 되는 구강 스피로헤타중에서 *T. denticola, T. pectinovorum, T. socranskii, T. vincentii, T. maltophilum*에 대한 종 특이 소식자 TDEN, TPEC, TSOC, TVIN, TMAL과 현재 배양이 되지않은 구강 스피로헤타중에서 I - VII군에 대한 군 특이 소식자 TRE I - TRE VII을 이용하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 위상차 현미경으로 본 결과는 실험군, 대조 1군에서 각기 91.37%, 14.28%의 구강 스피로헤타가 관찰되었으며 대조 2 군에서는 관찰되지 않았다.
2. 보편 소식자를 사용한 경우는 실험군, 대조 1군, 대조 2군에서 각기 98.27%, 46.42%, 22.0%의 구강 스피로헤타가 관찰되었다.
3. 특이 소식자를 사용한 경우는 실험군, 대조 1군, 대조 2군에서 각기 95.68%, 35.71%, 19.0%의 구강 스피로헤타가 관찰되었다.
4. 종 특이 소식자를 사용한 경우는 *T. socranskii*가 가장 많이 관찰되었으며(81.89%), 그 다음이 *T. maltophilum*(50.0%), *T. vincentii*(36.20%), *T. denticola*(13.79%)순이었고, 군 특이 소식자를 사용한 경우는 TRE IV(85.34%), TRE II(77.58%), TRE I(56.89%), TRE III(25.86%), TRE VI(5.17%), TRE V(2.58%) 순이었다.
5. *T. vincentii*는 치주염에 이환된 부위에서만 관찰되었고, 건강한 부위에서는 관찰되지 않았다.
6. *T. pectinovorum*과 VII군에 속하는 구강 스피로헤타는 어느 표본에서도 관찰되지 않았다.

이상의 결과에서 16S rRNA에 의거한 올리고뉴클레오타이드 소식자로 구강 스피로헤타의 성인성 치주염과의 연관성과 분리되지 않은 구강 스피로헤타를 확인하였으며, 인종 및 치주염의 형태에 따른 구강 스피로헤타의 분포 차이, *T. vincentii*의 병원성, 치료 전후의 구강 스피로헤타의 분포 변화등의 보다 세분화된 연구가 필요하다고 생각된다.

핵심되는 말: 성인성 치주염, 구강 스피로헤타, 16S rRNA, 올리고뉴클레오타이드 소식자, 중합효소연쇄반응, 점상블롯보합결합법, 보편 소식자, 특이 소식자

- Abstract -

The Prevalence of Oral Spirochetes in Korean Adult Periodontitis

Hay Hyun Kim, Bong - Kiu Choi*, Seong Ho Choi, Jung Kiu Chai, Chong Kwan Kim, Kyoo Sung Cho
Department of Periodontology, Dental College, Yonsei University
*Department of Oral biology, Dental College, Yonsei University

In the present study, oligonucleotide probes based on 16S rRNA were taken to investigate the diversity of oral spirochetes without culture method. This is the first study that revealed oral spirochetes of both presently cultivable and uncultured oral spirochetes in Korean adult periodontitis patients.

Subgingival plaque samples were taken from diseased sites(probing depth ≥6 mm, experimental group, n=116) and healthy sites(probing depth≤3mm, control 1 group, n=28) in 29 patients with adult periodontitis, and from 20 periodontally healthy subjects(probing depth≤3mm, control 2 group, n=100). Following being examined under phase - contrast microscope, all samples were submitted to dot - blot hybridization after polymerase chain reacton with eubacterial primers. 5 species - specific probes(TVIN, TDEN, TMAL, TSOC, and TPEC) and 7 group - specific probes(TRE I, TRE II, TRE III, TRE IV, TRE V, TRE VI, and TRE VII) were used one by one for the identification of both cultivable and so far uncultivable oral spirochetes. All probes were labeled with digoxigenin(DIG) - ddUTP and detected by chemiluminines - cence.

The following results were obtained.

1. Under phase - contrast microscope, 91.37% and 14.28% of oral spirochetes were observed in the experimental and control 1 groups, respectively. None of oral spirochetes were observed in control 2 group.
2. With universal probe, 98.27%, 46.42%, and 22.0% of oral spirochetes were observed in experimental, control 1, and control 2 groups, respectively.
3. With specific probe, 95.68%, 35.71%, and 19.0% of oral spirochetes were observed in experimental, control 1, and control 2 groups, respectively.
4. With species - specific probes, *T. socranskii* were recovered in a high per - centage of sites(81.89%) examined, followed by *T. maltophilum*(50.0%), *T. vincentii*(36.20%), *T. denticola*(13.79%), respectively. With group - specific probes, TRE IV was recovered in a high percentage of sites(85.34%) examined, followed by TRE II(77.58%), TRE I(56.89%), TRE III(25.86%), TRE VI(5.17%), and TRE V(2.58%), respec - tively.
5. *T. vincentii* were only observed in the diseased sites, not in the healthy sites.
6. Neither *T. pectinovorum* nor group VII oral spirochetes were observed in any sites.

The findings warrant further investga - tions of the recovered spirochetes to eluci - date the possible associations of oral spiro - chetal prevalence in race and types of peri - odontitis, pathogenesis of *T. vincentii* and the possible distributional change of oral spirochetes before and after treatments.

Kew words: oral spirochetes, adult peri - odontitis, oligonucleotide probe, 16S rRNA, polymerase chain reaction(PCR), dot - blot hydridization, specific probe, universal probe