한국인 성인성 치주염 환자에서 16S rRNA 분석을 이용한 치은연하치태 세균 분포도 조사

박성희 · 김소영* · 최성호 · 채중규 · 김종관 · 조규성

연세대학교 치과대학 치주과학교실
*연세대학교 치과대학 구강생물학교실

I. 서론

치주질환은 치태와 치은열구에 존재하는 다세균감염으로 치은의 염증, 치주조직의 파괴와 골흡수가 일어나 전 세계적으로 가장 흔한 발치의 원인이며, 국민보건에 큰 문제가 되고 있다. 치주질환에 대한 이해는 복잡한 미생물의 생태계로 인하여 어려운 점이 있어 그에 대한 상당량의 연구가 현재까지 진행되고 있다.

1970년 이전에는 치태 전체 세균종에 의한 유해물질의 증가가 치주질환을 일으킨다는 비특이성 치태가설이 지배적이었으나 1975년 Loesche에 의해 몇몇 특정 원인균만이 치주질환의 진행에 관여한다는 특이성 치태가설이 대두되었다[1]. 약 500여종 이상의 세균종이 구강내에 존재하며 이 중 15 - 20여종의 세균종이 여러 가지 형태의 치주질환의 진행에 특이하게 관여하는 것으로 알려져 있다[2].

1977년 Socransky는 치주질환이 존재하는 경우의 주된 원인균을 확인하는 방법을 다음과 같이 제안하였다[3]. 첫 번째, 치주병소에 원인균이 존재하여야 하고, 건강한 개체에서 보다 더 많은 수의 세균이 존재해야 한다. 두 번째, 원인균에 감염된 개체의 체액, 타액, 치은 열구액에서 높은 농도의 항체가 발견되어야하고 병원성균에 대한 세포매개 면역반응이 나타나야 한다. 세 번째, 원인균이 in vivo상에서 임상병리조직소견과 연관지어 질 수 있는 독성물질을 생산할 수 있어야 한다. 네 번째, 원인균을 실험동물에 투여하였을 때 자연적으로 발병하는 치주질환과 비슷한 양상을 보여야 한다. 다섯 번째, 병소에서 원인균을 제거 하였을 때 임상적으로 병소가 향상되는 결과를 보여야 한다.

치주질환 환자의 치은연하 치태에 존재하는 다양한 종류의 세균 가운데 소수의 세균종만이 건강한 상태에서 치주질환 상태로 전이하는데 관련이 있으며 이들 균종 중 그람 음성, 혐기성 세균종의 비율이 증가할 경우 질환발생의 심각도가 증가한다고 볼 수 있다[4]. 이러한 종류의 세균종으로는 *Treponema, Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphy - romonas gingivalis, Fusobacterium, Bacteroides forsythus, Prevotella intermedia, Peptostreptococcus micros* 등을 들 수 있으며 이들 균종과 치주질환 사이의 연관성에 대한 많은 연구가 있어왔다[5 - 9]. 이러한 연구들은 지역적, 인종적으로 다른 동, 서양에서 대부분 진행되어 있으며 인종, 유전자, 음식문화등에 따라 치주병원성 세균에 차이가 있을 가능성이 있다.

신속하고 정확한 세균동정방법이 특이한 몇몇 세균종과 치주질환 사이의 연관성을 밝히는데 유용하게 사용될 수 있다. 최근에 16S rRNA 유전자의 polymerase chain reaction(PCR) 및 PCR산물의 dot-blot hybridization은 치은연하 치태내 세균 표본에서 민감하고 특이성있는 세균동정방법으로 소개되고 있다[10]. 수 많은 증폭부위중에서 16S rRNA 유전자가 PCR을 위한 가장 적절한 부위로 평가되고 있는데 그 이유는 16S rRNA 유전자는 모든 세균에 존재하며 모든 세균에서 같은 염기서열을 나타내는 보존부위와 종마다 특이한 염기서열을 보이는 특이부위로 구성되어 있기 때문이다. 이러한 16S rRNA 유전자의 PCR 및 PCR산물의 dot-blot hybridization을 통한 세균동정방법은 특히 배양이 불가능하거나 배양법으로 쉽게 구별되지 않는 세균의 동정에 유용하게 사용될 수 있다[10,11].

이에 본 연구에서는 치주질환의 원인균으로 여겨지고 있는 다음의 7종류의 세균 즉, *Treponema, A. actinomycetemcomitans, P. gingivalis, Fusobacte-rium, B. forsythus, P. intermedia, P. micros* 의 성인성 치주염 환자에서의 분포도를 알아보기 위해 16S rRNA 분석방법을 사용하여 29명의 성인성 치주염 환자와 20명의 건강한 치주조직을 가지는 학생들을 대상으로 구분하여 각각의 분포도를 알아보고 비교하여 다소의 지견을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 연구대상 및 연구방법

1. 연구대상

Y대학교 치과대학 부속병원 치주과에 내원한 만성 성인성 치주염으로 진단된 29-59세의 환자 29명(남:여=13:16)의 질환부위(치주낭 깊이≥6mm)를 실험군, 비질환부위(치주낭 깊이≤3mm)를 대조2군으로, 건강한 치주조직을 가진 19-24세의 학생 20명(남:여=13:7)을 대조1군으로 하였다.

2. 연구방법

(1) 실험군 설정 및 치태표본 채취

건강한 치주조직을 가진 19-24세의 학생 20명으로부터 5개 치아에서 각 치아당 3부위씩 paper point를 치주낭내 10초간 삽입하여 치태를 채취하여 대조1군으로 하고, 성인성 치주염 환자 29명으로부터 치주낭깊이(≥6mm)가 가장 깊은 4개 치아와 치주염을 나타내지 않는 1개 치아에서 같은 방법으로 치태를 채취하여 각각 실험군과 대조2군으로 하여 reduced transport fluid(RTF)에 부유하였다.

(2) 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction)

채취된 표본을 위상차 현미경하에서 검사한 뒤 균질화 시켰다. 이중 100㎕를 원심분리시켜 침전물을 얻고 나머지는 냉동보관하였다. 침전물을 lysis buffer(500mM Tris-HCl, pH9.0, 20mM EDTA, 10mM NaCl)로 lysis한 후 치태세균의 16S rRNA 유전인자의 universal primer를 이용해 PCR로 증폭시켰다. 즉, 세균의 DNA를 포함하는 1㎕의 표본부유물, 30 pmol eubacterial universal primers {TPU1(5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3': corresponding position of 8 to 27 in E. coli 16S rRNA), RTU3(5'-GWA TTA CCG CGG CKG CTG-3': corresponding position of 519 to 536 in E. coli 16S rRNA)}, Perkin Elmer Cetus시약(buffer, dNTP, Taq polymerase)등의 100㎕반응 혼합물내에서 16S rDNA의 일부(약 530bp)를 PCR로 증폭했다. PCR은 95℃에서 1분간 변성화, 56℃에서 1분간 annealing, 72℃에서 연장화과정을 30회 반복하였다. agarose gel electrophoresis과정을 통해 PCR여부를 확인

하였다.

(3) Oligonucleotide 소식자의 표지

각각 세균에 대한 특이한 소식자의 염기서열은 Table 1에 정리되어 있다. 소식자는 digoxigenin (DIG) oligonucleotide 3'-end labeling kit (Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하여 DIG-ddUTP로 표지되었다. 즉, 20㎕ (X㎕ 100pmol oligonucleotide, 4㎕ $CoCl_2$, 1㎕ DIG-ddUTP, 1㎕ terminal transferase)의 반응용액을 37℃에서 15분간 방치한 후 얼음에 놓고 2㎕의 stop solution(mixture of 1㎕ glycogen+200㎕ 0.2mM EDTA)을 첨가하였다. oligonucleotide를 2.5㎕ 4M LiCl과 75㎕

Table 1. Specific oligonucleotide probes used for dot-blot hybridization

Bacteria	Sequence(5'-3') of probes	Hybridization temperature(℃)	Accession No.[a)]
Treponema	CGACTTGCATGBTTAARAC	53	[b)]
A.actinomycetem-comitans	ATGCCAAATTGACGTTAAAT	48	M75035, M75036 M75037, M75039
P. gingivalis	TACTCGTATCGCCCGTTATTC	57	X73964, L16492
Fusobacterium	AAGCACTTTACATTCCGAAAAAC	55	[C)]
B. forsythus	CGTATCTCATTTTATTCCCCTGTA	61	X73962, L16495
P. intermedia	CGTGCCCCGCTTTACTCCCCA	62	L16468, X73965
P. micros	AGCCCTTCTTACACCGATAAATCT	62	U60326, D14143

a) Sequence of the probes match those of the strains, with the accession number deposited in data bases
b) The sequence of the probe detecting oral Treponema was derived from all the cultivatable treponeme strains and yet uncultivatable Treponema-phylotypes
c) The sequence of a genus Fusobacterium-specific probe matches that of F. russii, F. varium, F. ulcerans, F. necrophorum, F. gonidiaformans, F. simiae, F. periodonticum, F. nucleatum, F. alocis, F. necrogenes, F.

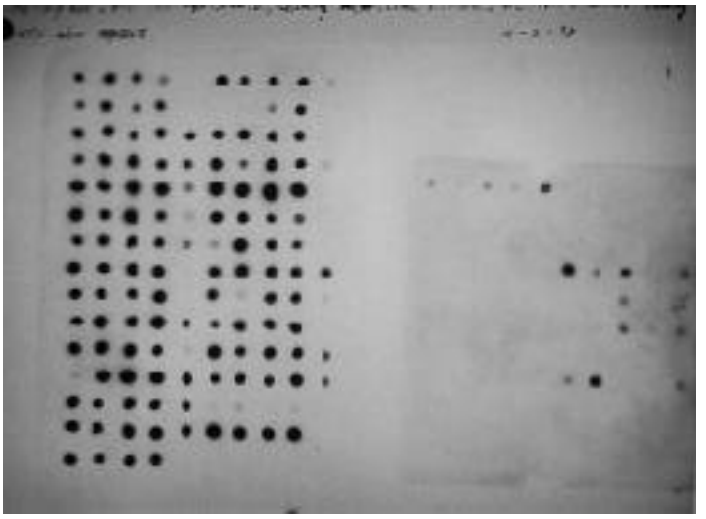

Figure 1. Dot-blot hybridization of P. gingivalis (left : Experimental, Control 2, right : Control 1)

prechilled ethanol로 침전시키기 위해 잘 섞은 후 -20℃에서 하룻밤 두었다. oligonucleotide를 4℃에서 12000g으로 원심분리하여 알콜을 제거한 후, 침전물을 500μℓ 70% ethanol로 세척하고 건조시켰다. oligonucleotide 침전물을 20μℓ dH_2O에 다시 녹였다.

(4) Dot-blot hybridization & detection

95℃에서 5분간 변성 시킨후 PCR생성물 2μℓ씩을 nylon membrane(Hybond N, Amersham)에 dot-blot시키고 3분간 254nm에 UV-cross linking하여 DNA를 고정부착하였다. 그후 nylon membrane을 hybridization tube에 넣고 hybridization solution내에서 30분동안 각각의 소식자에 맞는 온도로 pre-hybridization 시켰다. 여기에 50 pmol labled oligonucleotide 소식자를 5μℓ 넣어 1시간동안 hybridization하고 washing buffer로 15분간 두 번 세척하였다. hybridized probe는 DIG-luminescent detection kit를 사용하여 alka-

Table 2. Distribution of subgingival bacteria detected by 16S rRNA analysis

Bacteria	Distribution(%)			
	Control 1	Control 2	Experimental	p
Treponema	12.5	24.1	75.4	〈0.05
A. actinomycetemcomitans	0.5	19.0	44.4	〈0.05
P. gingivalis	10.5	43.1	94.0	〈0.05
Fusobacterium sp.	33.0	48.3	81.0	〈0.05
B. forsythus	9.5	17.2	65.9	〈0.05
P. intermedia	1.0	12.1	26.3	〈0.05
P. micros	5.0	19.0	48.7	〈0.05

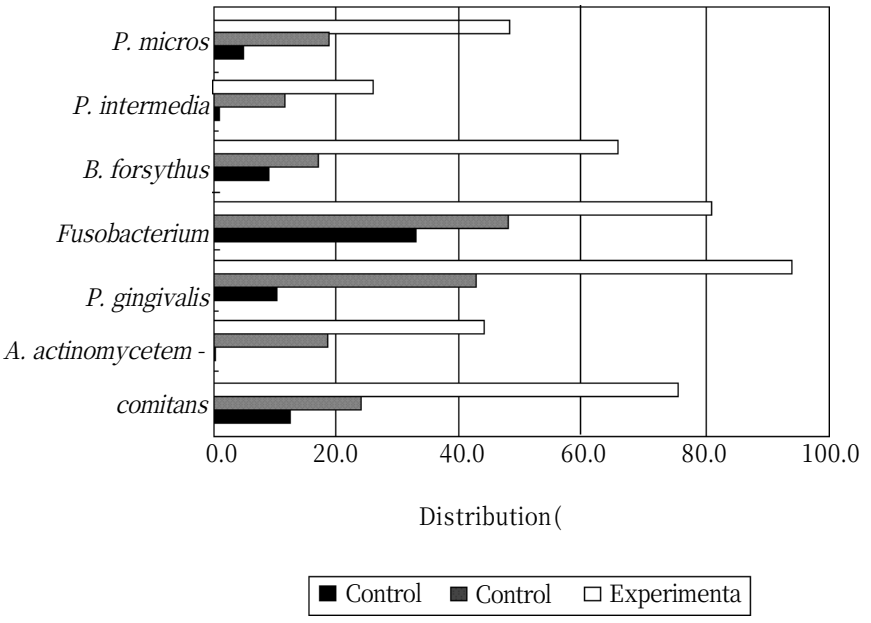

Figure 2. Distribution of subgingival bacteria detected by 16S rRNA analysis

line phosphatase와 chemiluminescence에 결합된 anti-digoxigenin으로 탐지해냈다. 즉, membrane을 washing buffer로 15분간 두 번 세척한후 20ml detection buffer에서 2-5분간 평형을 맞추었다. 그후 membrane을 1-2ml CSPD solution에서 5분간 방치하였다. 여분의 액을 떨구고 membrane을 Whatman 3MM paper상에서 물기를 제거하되 완전 탈수상태가 되지 않도록 하였다. membrane을 37℃에서 5-15분간 방치한 후 실온에서 membrane을 X-ray에 노출시켰다(Figure 1).

여러군들 가운데서 실험군의 각 세균종의 유의성있는 차이를 알아내기 위해 one-way ANOVA test를 시행하였고 각각 군들사이의 차이는 Tukey's studentized range test를 시행하였으며 모든 실험에서 $p<0.05$를 유의한 수준으로 평가하였다.

Ⅲ. 연구결과

* 16S rRNA 분석법에 의한 세균종의 분포도 조사

대조1군(비질환개체의 비질환부위, n=100), 대조2군(질환개체의 비질환부위, n=28), 실험군(질환개체의 질환부위, n=116) 각각에서의 7종류 세균의 분포도는 다음과 같다. 먼저 *Treponema*는 대조1군, 대조2군, 실험군에서 12.5%, 24.1%, 75.4%를 보였으며 *A. actinomycetemcomitans*는 0.5%, 19.0%, 44.4%, *P. gingivalis*는 10.5%, 43.1%, 94.0%, *Fusobacterium*은 33.0%, 48.3%, 81.0%, *B. forsythus*는 9.5%, 17.2%, 65.9%, *P. intermedia*는 1.0%, 12.1%, 26.3%, *P. micros*은 5.0%, 19.0%, 48.7%를 각각 나타냈다(Table 2, Figure 2). 7종류의 세균 모두 대조2군, 대조1군에서보다 실험군에서 통계적인 유의차가 있게 더 높은 세균의 분포도를 보였다($p<0.05$). 또한 *Treponema, B. forsythus, P. intermedia*에서는 실험군과 대조2군, 실험군과 대조1군 사이에서는 유의성있는 차이를 보이지만, 대조1군과 대조2군 사이에서는 유의성있는 차이를 보이지 않았다. 그러나, *A. actinomycetemcomitans, P. gingivalis, Fusobacterium, P. micros*에서는 실험군과 대조2군, 실험군과 대조1군, 대조1군과 대조2군 사이에서 유의성있는 차이를 나타냈다($p<0.05$).

Ⅳ. 총괄 및 고찰

본 연구에서는 16S rRNA 유전자의 PCR 및 PCR산물의 dot-blot hybridization을 이용하여 성인성 치주염 환자군과 건강한 치주조직을 가진 학생군에서 7종류의 치주병원성 세균의 분포도에 대하여 알아보았다. 이번 실험에서 사용한 16S rRNA분석방법 외에 치주병원성 세균동정 방법으로는 현미경 관찰법, 배양법, 면역학적 분석법, 효소이용법, DNA probes 이용법등을 들 수 있다.

현미경 관찰법은 위상차 현미경이나 암시야 현미경이 주로 이용되며, 세균의 형태에 의하여 세균을 확인하는 가장 간단한 방법이다. 수 많은 연구에 의하면, 질환을 보이는 병소에서는 많은 수의 운동성 세균이 증가함을 보이는 동시에 구균형태의 세균은 감소함을 보인다고 한다[12]. 그러나, 이러한 방법으로 확인된 세균이 질환의 진행에 영향을 준다고 단정적으로 결론지을 수는 없으며, 몇몇 세균들은 현미경 관찰을 통해서는 구분될 수 없고, 표본제작 과정 중에서 야기되는 가성 결과등의 단점이 존재한다[13-15].

배양법은 치태표본의 세균구성을 알아보는 가장 기본이 되는 방법으로 구성성분 각각의 확인을 가능하게하고, in vitro상에서 항세균물질에 대한 민감성을 평가할 수 있지만 배양된 균

종 각각의 전체 세균총에 대한 초기 기여도를 나타내지 못하고, 시간과 경비가 많이 소요되며, 배양과정 중에 몇몇 중요한 세균의 성장은 실패할 수 있는 제한점이 존재한다[16 - 20].

면역학적 분석방법은 latex agglutination, flow cytometry, enzyme - linked - immuno sorbent - assay(ELISA), 면역형광 현미경 관찰법등이 포함된다[21]. 이러한 방법은 항원 - 항체 반응에 그 기초를 두고 있다. 비교적 정확한 결과를 얻을 수 있고 신속한 정성적 분석이 가능한 장점이 있지만, 정량적으로 분석할 경우 시간과 경비가 많이 소요되며 아직까지 널리 사용되지 않는 특이한 항체를 필요로 하고, 원하지 않는 세균종과의 교차반응 때문에 가성양성반응이 나타날 수 있는 제한점이 따른다[22 - 29].

효소이용법은 세균성 효소의 정량적, 정성적인 변화를 평가 하는 것으로써, 치주병원성 세균을 확인하는 방법으로 최근에 많이 사용되고 있다. 몇 가지 종류는 kit화(예. BANA test) 되어있어 비교적 간단하고 신속하게 세균을 확인할 수 있지만, 특정한 세균의 동정에 한정되어 있으며, 질환의 활성도를 나타내기에는 어려운 점이 존재한다[13, 30 - 34].

DNA probes이용법은 세균 DNA의 특이한 염기서열을 이용하여 이를 probe로 제작, 세균동정을 하는 방법으로 10^3 /ml microbes 까지 확인이 가능한 민감한 방법이라 할 수 있다. 이처럼 민감하고 특이성이 있는 장점이 있지만 probe에 부착시킨 label이 변성되거나, probe의 self hybridization, probe의 비특이적인 결합, 다른 종류 세균과의 교차반응등이 단점으로 지적된다[35 - 37].

최근에 16S rRNA 유전자의 polymerase chain reaction(PCR)은 치은연하 치태내 세균 표본에서 민감하고 특이성있는 세균동정방법으로 소개되고 있다[10]. 수 많은 증폭부위중에서 16S rRNA 유전자가 PCR을 위한 가장 적절한 부위로 평가되고 있는데 그 이유는 16S rRNA 유전자는 모든 세균에 존재하며, 모든 세균에서 같은 염기서열을 나타내는 보존부위와 종마다 특이한 부위로 구성되어있기 때문이다[38]. 이러한 16S rRNA 유전자의 PCR 및 PCR 산물의 dot - blot hybridization을 통한 세균동정방법은 특히 배양이 불가능하거나 배양법으로 쉽게 구별되지 않은 세균의 동정에 유용하게 사용될 수 있다[10, 11].

이번 연구에서 확인된 7종류 세균종으로부터의 16S rRNA가 높은 유사성을 가지지만, PCR을 통해 각각의 확인이 가능한 특이한 부위를 찾아내어 세균을 동정할 수 있었다. 16S rRNA 유전자의 PCR 및 PCR산물의 dot - blot hybridization방법은 높은 정도의 유전적, 형태학적 유사성을 보이는 세균들을 확인하는 방법으로서 가치가 있다. 예를 들어, *A. actino - mycetemcomitans*는 유전학적으로 *H. aphrophilus*와 밀접한 관련이 있는데 이들 두 종류의 세균모두 치은연하에서 발견되며, 군락의 형태도 비슷하다고 알려져 있다. *P. inter - media*와 *P. nucleatum*은 16S rRNA 유전자에서 94%의 유사도와 6.6%의 차이를 보이는데 이들 두 종류의 세균 역시 치주낭내 주된 상주균이며 전통적인 배양법으로는 구별하기 어려운 점이 있다[39]. 그럼에도 불구하고 16S rRNA 분석방법을 통해서는 이러한 부류의 세균을 교차반응 없이 확인해 낼 수 있다.

이번 실험 결과에서 실험군(성인성 치주염 환자군)에서 대조군에서 보다 *Treponema, A.actinomycetemcomitans, P. gingivalis, Fusobacterium, B. forsythus, P. intermedia, P. micros*의 7종류 세균이 우세하게 나타남을 확인할 수 있었다. 특히 본 실험에서는 대조군을 2가지로 구분하였는데 대조1군은 건강한 치주조직을 가진 학생군으로, 대조2군은 성인성 치주염 환자군에서의 비질환 부위로 정의하였다. 이렇게 대조군을 2가지로 구분한 이유는 대조2군에서의 세균의 분포도를 확인함으로써 질환을 가진 개체의 질환부위에서 비질환부위로의 세균

전파여부 및 건강한 개체와의 세균분포도를 비교 분석하기 위함이었다. 비교결과 *Treponema, B. forsythus, P. intermedia*는 대조 1, 2군에서보다 실험군에서 각각 유의성있게 높은 분포도를 보이지만 대조1군과 비교시 대조2군에서는 유의성있게 높은 분포도를 보이지는 않았다. 즉, 질환개체의 비질환부위에서는 위의 세가지 세균이 건강한 치주조직에 비해 더 높은 분포도를 보이지는 않는다는 결론을 얻어낼 수 있었다. 그러나, *A. actinomycetemcomitans, P. gingivalis, Fusobacterium, P. micros*는 대조 1, 2군에서보다 실험군에서 유의성있게 높은 분포도를 보이며, 대조1군과 비교해 볼 때 대조 2군에서 더 높은 분포도를 보였다. 다시말하면, 질환개체의 비질환부위라 하더라도 건강한 치주조직과는 다르게 위의 4종류의 세균들이 더 많이 분포되어 있다고 말할 수 있을 것이다. 위의 결과로 미루어 짐작해 볼 수 있는 점은 4종류의 세균 즉 *A. actinomycetemcomitans, P. gingivalis, Fusobacterium, P. micros*는 질환부위에서 비질환부위로의 전파력이 강하다고 생각해 볼 수 있으며, 이러한 세균들이 존재하더라도 질환의 증상이 나타나는 데에는 추가적인 요인이 필요하다고 할 수 있을 것이다.

이전의 많은 연구결과[40-43]와는 좀 다르게 본 연구결과에서는 실험군에서의 *P. intermedia*의 분포도(26.3%)가 좀 낮게 나타났는데 그 이유로 생각해 볼 수 있는 점은 첫째, whole chromosomal probe를 사용하여 증폭하는 실험과정중에 cross-hybridization이 일어났거나 둘째, 이전까지의 연구결과는 보통 같은 표현형적 특성을 가지는 두 종류의 세균 즉, *P. intermedia*와 *P. nucleatum*을 합쳐서 "*P. intermedia*"라 명명[44]하여 분포도를 확인한 것이었지만 본 연구에서는 *P. intermedia*만의 specific probe를 사용하여 분포도를 확인한 것이기 때문에 이전 연구결과와는 약간 다른 결과가 나왔다고 볼 수도 있을 것이고[45-51] 셋째, 서양인에서보다 한국인에서 *P. intermedia*의 비율이 좀 더 낮게 나타난다고 생각해 볼 수도 있을 것이다. 또 주로 LJP환자에서 많이 발견되는 *A. actinomycetemcomitans* 역시 성인성 치주염 환자군에서의 분포도는 44.4%로 *P. gingivalis, Fusobacterium, Treponema*등과 비교해 볼 때 비교적 낮은 수치를 보이지만, 환자의 연령이 낮을수록, 질환의 진행속도가 빠를수록 치은연하 치태표본에서 *A. actinomycetemcomitans*세균이 많이 관찰됨을 알 수 있었다. 그 외의 세균종 즉, *P. gingivalis, Fusobacterium, B. forsythus, P. micros, Treponema*등은 본 연구에서도 이전의 연구결과와 거의 비슷한 분포도를 보였다[52].

이번 실험에서는 성인성 치주염환자에서 단지 16S rRNA분석방법을 통해 세균의 분포도를 확인하여 보았고 다른 세균동정방법을 통한 결과 비교는 해 보지 못하였지만, 이전의 여러 연구결과[53,54,55]를 참조하여 볼 때 배양법이나 DNA probes이용법, 면역학적 분석법등을 이용하여 세균의 분포도를 확인하는 방법보다는 민감하고 특이성 있는 16S rRNA 분석법을 이용하여 세균을 확인하여 보는 것이 좀 더 다양한 세균들, 예를들면 배양이 어려운 *Treponema, B. forsythus*등, 의 분포도를 간단하고 정확하게 알아내는 데 도움이 될 것이라 생각된다. 덧붙여 본 연구에서 처음으로 밝혀진 16S rRNA 분석법에 의한 한국인 성인성 치주염 환자에서의 세균분포도를 바탕으로 하여 국가간의 또는 인종간의 치주병원성 세균분포도 비교연구가 계속되어져야 할 것이라 사료된다.

V. 결론

치주질환의 원인균으로 여겨지고 있는 다음의 7종류의 세균 즉, *Treponema, A. actinomycetem-comitans, P. gingivalis, Fusobacterium, B. forsythus, P. intermedia, P. micros* 의 성인성 치주염 환자에서의 분포

도를 알아보기 위해 16S rRNA 분석방법을 사용하여 29명의 성인성 치주염 환자의 질환부위를 실험군으로, 비질환부위를 대조2군으로 20명의 건강한 치주조직을 가지는 학생들을 대조1군으로 구분하여 각각의 분포도를 알아본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 각각 세균의 대조1군, 대조2군, 실험군에서의 분포도를 살펴보면 *Treponema*는 대조1군, 대조2군, 실험군에서 각각 12.5%, 24.1%, 75.4%를 보였으며 *A. actinomycetemcomitans*는 0.5%, 19.0%, 44.4%, *P. gingivalis*는 10.5%, 43.1%, 94.0%, *Fusobacterium*은 33.0%, 48.3%, 81.0%, *B. forsythus*는 9.5%, 17.2%, 65.9%, *P. intermedia*는 1.0%, 12.1%, 26.3%, *P. micros*은 5.0%, 19.0%, 48.7%를 각각 나타냈다. 7종류의 세균 모두 대조2군, 대조1군에서 보다 실험군에서 통계적인 유의차가 있게 더 높은 세균의 분포도를 보였다($p<0.05$).
2. *Treponema, B. forsythus, P. intermedia*의 분포는 대조1군과 대조2군 사이에서는 유의성있는 차이를 보이지 않았다. 그러나, *A. actinomycetem-comitans, P. gingivalis, Fusobacterium, P. micros*에서는 대조1군과 대조2군 사이에서 유의성있는 차이를 나타냈다($p<0.05$).

이상의 결과에서 볼 때 한국인 대상으로 처음 시행되어진 16S rRNA 분석방법이 치주질환자에서 치주질환 원인균들의 분포도를 밝혀내는데 유용하게 사용될 수 있다고 생각된다.

Ⅵ. 참고문헌

1. Loesche W.J. : Chemotherapy of dental plaque infections, Oral. Sci. Rew., 9:65 - 68, 1975.
2. Moore W.E.C., and Moore L.V.H. : The bacteria of periodontal diseases, Periodontol. 2000., 5:66 - 77, 1994.
3. Socransky S. : Microbiology of periodontal disease - present status and future considerations, J. Periodontol., 48:497 - 504, 1977
4. Socransky S.S. and Haffajee A.D. : The bacterial etiology of destructive periodontal disease - current concepts, J. Periodontol., 63:322 - 331, 1992.
5. Kornman K.S. and Loeshe W. : The subgingival microbial flora during pregnancy, J. Periodont. Res., 15:111 - 122, 1980.
6. Moore W.E.C., Moore L.H., Ranney R.R., Smibert R.M., Burmeister J.A. and Schenkein H.A. : The microflora of periodontal sites showing active destructive progression, J. Clin. Periodontol., 18:729 - 739, 1991.
7. Tanner A.C.R., Socransky S.S. and Goodson J. : Microbiota of periodontal pockets losing crestal alveolar bone, J. Periodont. Res., 19:279 - 291, 1984.
8. Wolff L.F., Liljemark W.F., Bloomquist C.G., Pihlstrom B.L., Schaffer E.M. and Bandt C.L. : The distribution of *A. actinomycetemcomitans* in human plaque, J. Periodont. Res., 20:237 - 250, 1985.
9. Wolff L.F., Liljemark W.F., Pihlstrom B.L., Schaffer E.M, Aeppli D.M. and Bandt C.L. : Dark-pigmented Bacteroides species in subgingival plaque of adult patients on a rigorous recall program, J. Periodont. Res., 23:170 - 174, 1988.
10. Slots J., Ashimoto A., Flynn M.J., Li G. and Chen C. : Detection of putative periodontal pathogens in subgin -

gival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction, Clin. Infect. Dis., 20(suppl2):304 - 307, 1995.
11. Relman D.A. : The identification of uncultured microbial pathogens, J. Infect. Dis., 168:1 - 8, 1993.
12. Greenstein G. and Polson A. : Microscopic monitoring of pathogens associated with periodontal diseases. A review, J. Periodontol., 56:740 - 747, 1985.
13. Dunham S.L., Goodson J.M., Hogan P.E. and Socransky S.S. : Failure of dark - field microbiologic parameters to predict periodontal disease activity at periodontal sites(Abstr. No. 1657), J. Dent. Res., 64:359, 1985.
14. Listgarten M.A., Schifter C.C., Sullivan P. et al. : Failure of a microbial assay to reliably predict disease recurrence in a treated periodontitis population receiving regularly sched - uled prophylaxis, J. Clin. Periodontol., 13:768 - 773, 1986.
15. Omar A.A.,and Newman H.N. : False results associated with dark - ground microscopy of subgingival plaque, J. Clin. Periodontol., 13:814 - 824, 1986.
16. Bragd L., Dahlen G., Wikstrom M. and Slots J. : The capacity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans, Bacteroides gingivalis, and Bacteroides intermedius* to indicate progressive periodontitis - a retrospective study, J. Clin. Periodontol., 14:95 - 99, 1987.
17. Moore W.E.C. : Rapid identification of important periodontal micro - organisms by cultivation, Oral. Microbiol. Immunol., 1:56 - 57, 1986.
18. Moore W.E.C., Ranney R.R. and Holdeman L.V. : Subgingival microflora in periodontal disease - cultural stud - ies, Host - Parasite Interactions in Periodontal Diseases, p13. Washington, DC, American Society of Microbiology, 1982.
19. Slots J. : Bacterial specificity in adult periodontitis. A summary of recent work, J. Clin. Periodontol., 13:912 - 917, 1986.
20. Slots J. : Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation, Oral. Microbiol. Immunol., 1:48 - 55, 1986.
21. Zambon J.J., Bochacki V. and Genco R.J. : Immunological assays for putative periodontal pathogens, Oral. Microbiol. Immunol., 1:39 - 44, 1986.
22. Chung C.P., Nisengard R.K., Slots J. and Genco R.J. : Bacterial IgG and IgM antibody titers in acute necrotizing ulcerative gingivitis, J. Periodontol., 54:557 - 562, 1983.
23. Ebersole J.L., Taubman M.A. and Smith D.J. : Local antibody responses in periodontal diseases, J. Periodontol.(suppl.), 51 - 55, 1985.
24. Genco R.J., Zambon J.J. and Christersson L.A. : Use and interpre - tation of microbiologic assays in peri - odontal diseases, Oral. Microbiol. Immunol., 1:73 - 79, 1986.
25. Genco R.J., Zambon J.J. and Murray P.A. : Serum and gingival fluid antibodies as adjuncts in the diagnosis of *Actinobacillus actinomycetemcomi* -

tans associated periodontal diseases, J. Periodontol.(suppl.), 41, 1985.

26. Slots J., Hafstrom C., Rosling B. and Dahlen G. : *Actinobacillus actino - mycetemcomitans* and Bacteroides gingivalis in sub gingival smears by the indirect fluorescent - antibody tech - nique, J. Periodont. Res., 20: 613 - 620, 1985.
27. Taubman M.A., Ebersole J.L. and Smith D.J. : Association between sys - temic and local antibody and peri - odontal diseases. R. J. Genco and S. E. Mergenhagen(eds), Host - Parasite Interactions in Periodontal Diseases, p283. Washington, DC, American Society of Microbiology, 1982.
28. Tew J.G., Smibert R.M., Scott E.A. et al. : Serum antibodies in young adult humans with periodontitis associated treponemes, J. Periodont. Res., 20:580 - 590, 1985.
29. Zambon J.J., Reynolds H.S., Chen P. and Genco R.J. : Rapid identification of periodontal pathogens in subgingival dental plaque - comparison of indirect immuno - fluorescence microscopy with bacterial culture for detection of Bacteroides gingivalis, J. Periodontol., 32(suppl.), 1985.
30. Loesche W.L. : The identification of bacteria associated with periodontal disease and dental caries by enzymatic methods, Oral. Microbiol. Immunol., 1:65 - 70, 1986.
31. Nakamura M. and Slots J. : Salivary enzymes. Origin and relation - ship to periodontal diseases, J. Periodont. Res., 18:559 - 569, 1983.
32. Syed S., Gusberti F.A., Loesche W.J. and Lang N.P. : Diagnostic poten - tial of chromogenic substrates for rapid detection of bacterial enzymatic activity in health and disease associ - ated periodontal plaques, J. Periodont. Res., 19:618 - 621, 1984.
33. Tanner A.C.R. : The identification of bacteria associated with periodontal disease and dental caries by enzymatic methods, Oral. Microbiol. immunol., 1:71 - 72, 1986.
34. Zambon J.J., Nakamura M. and Slots J. : Effect of periodontal therapy on salivary enzymatic activity, J. Periodont. Res., 20:652 - 659, 1985.
35. Berry A.J. and Peter J.B. : DNA probes for infectious disease, Diagn. Med., 7:62, 1984.
36. Dickinson D.P. : DNA probe detection of periodontal pathogens, Oral. Microbiol. Immunol., 1:63 - 64, 1986.
37. French C.K., Savitt E.D., Simon S.L. et al. : DNA probe detection of periodontal pathogens, Oral. Microbiol. Immunol., 1:58 - 62, 1986.

38. Schmidt T. and Relman D.A. : Phylogenetic identification of uncultured pathogens using ribosomal RNA sequences, Methods. Enzymol., 235:205 - 222, 1994.
39. Paster B.J., Pewhirst F.E., Olsen I. and Fraser G. : Phylogeny of Bacteroides, Prevotella and Porphyromonas spp. and related bacteria, J. Bacteriol., 176:725 - 732, 1994.
40. Dzink J.L., Socransky S.S., Ebersole J.L. and Frey D.E. : ELISA and conventional techniques for identification of black - pigmented Bacteroides isolated from periodontal pockets, J. Periodont. Res., 18:369 - 374, 1983.
41. Loesche W.J., Syed S.A., Laughon B.E. and Stoll J. : The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis., J. Periodontol., 53:223 - 230, 1982.
42. Moore W.E.C., Holdeman L.V., Cato E.P., Smibert R.M., Burmeister J.A., Palcanis K.G. and Ranney R.R. : Comparative bacteriology of juvenile periodontitis, Inf. Imm., 48:507 - 519, 1985.
43. Tanner A.C.R., Haffer C., Bratthall G.T., Visconti R.A. and Socransky S.S. : A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man, J. Clin. Periodontol., 6:278 - 307, 1979.
44. Shah H.N. and 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.
45. Chung H.J., Chung C.P., Son S.H. and Nisengard R.J. : Actinobacillus actinomycetem - comitans serotypes and leukotoxicity in Korean localized juvenile periodontitis, J. Periodontol., 60:506 - 511, 1989.
46. Mandell R.L. and Socransky S.S. : A selective medium for Actinobacillus actino - mycetem - comitans and the incidence of the organism in juvenile periodontitis, J. Periodontol., 57:94 - 99, 1981.
47. Newman M.G. and Socransky S.S. : Predominant cultivable microbiota in periodon - tosis, J. Periodont. Res., 12:120 - 128, 1977
48. Newman M.G., Socransky S.S., Savitt E.D., Propas D.A. and Crawford A. : Studies of the microbiology of periodontosis, J. Periodontol., 47:373 - 379, 1976.
49. Slots J. : The prominent cultivable organisms in juvenile periodontitis, Scan. J. Dent. Res., 84:1 - 10, 1976.
50. Slots J., Reynold H.S. and Genco R.J. : Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal disease - a cross sectional microbiological investigation, Inf. Imm., 29:1013 - 1020, 1980.
51. Zambon J.J., Christersson L.A. and Slots J. : Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal disease. Prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families, J. Periodontol., 59:23 - 31, 1983.
52. Jan Lindhe : Clinical periodontology and implant dentistry, Munksgaard., 3rd ed., 144 - 160, 1998.

53. Ali R.W., Bakken V., Nilsen R. and Skaug N. : Comparative detection frequency of 6 putative periodontal pathogens in Sudanese and Norwegian adult periodontitis patients, J. Periodontol., 65:1046 - 1052, 1994.
54. Brez W.A., Lopatin D.E. and Loesche W.J. : Benzoyl - arginine naphthylamide(BANA) hydrolysis by Treponema denticola and/or Bacteroides gingivalis in periodontal plaques, Oral. Microbiol. Immunol., 5:275 - 279, 1990.
55. Chen C.K.C., Dunford R.G., Reynold H.S. and Zambon J.J. : Eikenella corrodens in the human oral cavity, J. Periodontol., 60:611 - 616, 1989.

- Abstract -

The detection of subgingival plaque microflora using 16S rRNA analysis in Korean adult periodontitis

Seong Hee Park, So Young Kim*, 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

The 16S rRNA analyzing method is a bacterial identification method that is useful in identifying bacteria which is difficult to do by other means. The following 7 types of bacteria which are Treponema, A. actinomycetemcomitans, P. gingivalis, Fusobacterium, B. forsythus, P. intermedia, P. micros were evaluated in order to study their distribution among patients with adult periodontitis. The 16S rRNA analyzing method was used to compare bacterial distribution among 3 groups. Subgingival plaque acquired from the affected sites(pocket depth ≥6mm)of 29 patients with adult periodontitis were grouped as the experimental group while plaque from the non - affected sites(pocket depth≤ 3mm)were grouped as control 2 and finally plaque acquired from students with healthy periodontal tissues were grouped as control 1.

The results are as follows ;

1. The distribution of Treponema was 12.5% for control 1, 21.4% for control 2 and 75.4% for the experimental group. For A. actinomycetemcomitans the distribution was 0.5%, 19.0%, 44.4% in respect to the order of groups mentioned above. P.gingivalis showed 10.5%, 43.1%, 94.0% distribution, Fusobacterium 33.0%, 48.3%, 81.0% distribution, B. forsythus 9.5%, 17.2%, 65.9% distribution, P. intermedia 1.0%, 12.1%, 26.3% distribution and finally P. micros 5.0%, 19.0%, 48.7% respectively. In all 7 types of bacteria, the experimental group showed higher bacterial distribution compared to the other two groups with statistically significant difference.
2. In the case of Treponema, A. actinomycetemcomitans, P.

gingivalis,Fusobacterium, B. forsythus, P. intermedia, P. micros showed significant difference between control 1 and 2. These results suggest that the 16S rRNA analyzing method which was applied on Koreans for the first time could be utilized and useful in finding potential pathogens of periodontal disease.

Key words : adult periodontitis, 16S rRNA analyzing method, subgingival plaques