

급성 치수염 및 급성 치근단 농양의 치근관으로부터의 세균 분리 및 동정

이연재¹ · 김미광² · 황호길^{1,3} · 국중기^{2,3*}

조선대학교 치과대학 ¹치과보존학교실, ²구강생화학교실, ³구강생물학연구소

ABSTRACT

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF BACTERIA FROM THE ROOT CANAL OF THE TEETH DIAGNOSED AS THE ACUTE PULPITIS AND ACUTE PERIAPICAL ABSCESS

Yeon-Jae Lee¹, Mi-Kwang Kim², Ho-Keel Hwang^{1,3}, Joong-Ki Kook^{2,3*}

¹Department of Conservative Dentistry, ²Department of Oral Biochemistry,

³Oral Biology Research Institute, College of Dentistry, Chosun University

The aim of this study was to identify the bacteria isolated from acute endodontic lesions by cell culture and 16S rDNA sequencing. The necrotic pulpal tissue was collected from 17 infected root canals, which were diagnosed as being either an acute pulpitis or acute periapical abscess. Samples were collected aseptically from the infected pulpal tissue of the infected root canals using a barbed broach and a paper point. The cut barbed broaches and paper points were transferred to an eppendorf tube containing 500 ul of 1 X PBS. The sample solution was briefly mixed and plated onto a BHI-agar plate containing 5% sheep blood. The agar plates were incubated in a 37°C anaerobic chamber for 7 days. The bacteria growing on the agar plate were identified by 16S rRNA coding gene (rDNA) cloning and sequencing at the species level. Among the 71 colonies grown on the agar plates, 56 strains survived and were identified. In dental caries involving the root canals, *Streptococcus* spp. were mainly isolated. *Actinomyces*, *Clostridia*, *Bacteroides* and *Fusobacteria* were isolated in the periapical lesion without dental caries. Interestingly, two new *Actinomyces* spp. (ChDC B639 and ChDC B631) were isolated in this study. These results showed that there was diversity among the species in endodontic lesions. This suggests that an endodontic infection is a mixed infection with a polymicrobial etiology. These results may offer the bacterial strains for pathogenesis studies related to an endodontic infection. [J Kor Acad Cons Dent 30(5):409-422, 2005]

Key words: Acute pulpitis, Acute periapical abscess, Bacteria, 16S rRNA gene

- Received 2005.4.11., revised 2005.5.16., accepted 2005.6.13. -

I. 서 론

* Corresponding author: Joong-Ki Kook

Dept. of Oral Biochemistry, and Oral Biology Research
Institute, College of Dentistry, Chosun University
375 Seo-suk Dong, Dong-Gu, Gwang-ju, 501-759 Korea
Tel: 82-62-230-6877 Fax: 82-62-224-3706
E-mail: jkkook@chosun.ac.kr

치수 및 치근단 질환은 치아우식증, 치주질환과 더불어 구
강 내에서 가장 빈번히 발생하는 세균에 의한 감염성 질환
이며, 그 발병 기간에 따라 급성 치수염과 만성 치수염으로
구별할 수 있고, 그 병소 진행 정도에 따라 치수염, 치근단
질환, 치근단 치주염 등으로 나눌 수 있다. 치아는 치조골을

※ 이 논문은 2004년도 조선대학교 연구보조비(국중기) 지원에 의하여 연구되었음.

포함하는 치주조직으로 둘러 쌓여있는 해부학적 특성 때문에 치수까지 이환된 치아우식증에 의해 타액 및 치면세균막 내에 존재하는 모든 세균들이 치수조직에 침입할 수 있다¹⁾. 일반적으로 면역기능이 저하된 환자들의 경우에 있어서 치수조직의 괴사에 의해 치근단까지 병원성 세균이 침투하여 치근단 질환을 야기시킨다^{2,3)}. 이러한 치수 및 치근단 질환의 병인론을 연구하기 위해서는 이와 관련된 세균들에 대한 연구가 필수적이다. 특정 질환과 그 원인이 되는 세균을 알아내기 위해서는 먼저 역학조사가 선행되어야 한다. 그리고, 이를 바탕으로 가장 연관성이 높은 세균을 알아내고, 그들의 독력인자를 찾는 것이 중요하다.

현재 치수 및 치근단 질환에 관련된 세균 중에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다⁴⁻⁶⁾. 초기 연구들은 전통적인 세균 배양법을 이용한 연구결과들⁷⁾이었으며, 최근의 연구들은 세균배양법에 의해 선행된 연구 결과 병원성 세균이라 알려진 세균에 대한 종-특이 DNA 프로브를 이용한 방법⁸⁾, 세균의 단백질분해 효소의 전기영동 패턴의 비교 연구⁹⁾, 세균 종-특이 프라이머를 이용한 중합효소연쇄반응법¹⁰⁾을 이용한 결과들이다. 이런 연구들의 결과를 살펴보면 *Porphyromonas endodontalis*와 같이 주로 치수 및 치근단 병소에 주로 연관되어 나타나는 세균 종이 구별되어 있기도 하지만, 치주질환과 연관이 많은 *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella nigrescens*, *Bacteroides forsythus*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus* 등이 치수 및 치근단 병소에서도 검출됨을 알 수 있다. 이는 치수와 치주조직이 서로 연결되어 있기 때문에 병소의 교통에 의해 관찰되는 소견이라고 생각된다. 즉, 아직까지 치수 및 치근단 질환의 확인한 원인균의 규명이 이루어지지 않았다.

전통적인 세균배양법이나 DNA 프로브법, 종-특이 프라이머를 이용하는 방법들로는 치수 및 치근단 질환 병소에 존재하는 모든 세균 종을 알아내기가 어렵다. 즉, 모든 세균을 배양할 수 있는 기술이 아직 개발되어 있지 않고, DNA 프로브법이나 중합효소연쇄반응법은 짧은 시간에 특정 세균의 존재 유무를 알아낼 수 있는 장점¹¹⁾은 있으나, 특정 세균 종을 대상으로 하기 때문에 이 또한 모든 병소내 모든 세균 종을 동정할 수 없는 단점이 있다. 이러한 세균배양법과 중합효소연쇄반응법의 단점을 보완할 수 있고, 그 결과를 가장 신뢰할 수 있는 방법이 16S 라이보솜 RNA 유전자(rDNA) 클로닝 및 핵산염기서열결정법이다^{12,13)}. 세균의 16S rDNA 염기 서열은 유사한 종간에 상동성이 높아 세균의 계통분류학적 측면에서 많이 이용되고 있다. 특히, 16S 라이보솜 RNA는 그 크기가 약 1,500 bp로 구성되어 있어 비교적 작기 때문에 핵산염기서열을 분석하기가 용이한 편이고, 지금까지 알려진 대부분의 세균 종에 대한 핵산염기

서열이 밝혀져 있으며, 이들의 상동성 여부를 검색할 수 있는 프로그램도 개발되어 공개되어 있다. 하지만, 이러한 16S rDNA 클로닝 및 핵산염기서열결정법도 세균을 얻을 수 없다는 단점이 있다. 그러므로, 특정 세균의 숙주세포에 대한 병인론을 연구한다거나, 세균의 특정 내독소 또는 외독소 등의 독력인자를 얻어 이들의 숙주 세포에 대한 독성 기전을 연구할 수는 없다.

그러므로, 본 연구에서는 치아우식증 및 치주질환에 이환 여부와 치근단 병소의 존재 유무에 따라 급성 치수염(acute pulpitis) 또는 급성 치근단 농양(acute periapical abscess)이라고 진단된 치아의 치수강을 개방하고, 치근관 내용물을 채취하여, 혐기성 상태에서 세균을 배양하고, 이들을 16S rDNA 클로닝 및 핵산염기서열결정법으로 종 수준에서 동정하여 병인론 연구를 위한 기초 자료를 얻고자 하였다.

Ⅱ. 연구재료 및 방법

1. 샘플 채취 및 세균배양

조선대학교 부속 치과병원에 근관치료를 위해 내원한 환자 중 항생제를 복용하거나 근관치료를 받던 사람을 제외한 17명의 환자에서, 치아우식증 유무, 동통, 부종, 누공의 유무, 치근단 방사선 투과상의 존재 유무, 생활력 유무 및 치주질환의 유무를 확인하였다. 샘플링을 할 치아들을 rubber dam으로 격리하고, 치관부를 3% 과산화수소, 5% iodine으로 1분간 소독하고, 5% Sodium thiosulfate로 치면의 iodine을 불활성화시킨 다음 근관을 개방하고, barbed broach 또는 paper point를 이용하여 근관 내 내용물을 채취하여 1 ml의 1X PBS에 담아 혐기성세균배양실로 바로 옮겼다. 채취한 샘플들은 1,000배 희석한 다음 3% Tryptic soy broth, 0.5% Yeast extract, 0.05% Cysteine HCl, 1.5% Bacto-agar, 0.5 μ g/ml hemin, 및 2 μ g/ml vitamin K₁이 함유된 고형배지에 도말하여 85% N₂, 5% H₂, 10% CO₂의 혼합가스가 공급되는 37°C anaerobic chamber (Model Bactron I, Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, OR, USA)에서 2 - 7일 동안 배양하였다. 이 때 자라나는 세균 군락의 모양, 색깔, 크기 등을 고려하여 서로 다른 것을 각각 채취하여 Tryptic soy broth 액체 배지에 배양하여 다음 실험에 사용하였다.

2. 세균 지놈 DNA의 추출

세균 배양액 1.5 ml를 10,000 × g의 원심력을 이용하여 수확하고, 이를 G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit(iNtRON Co., Seoul, Korea)를 이용하여 세균 지놈

DNA를 추출하였다. 즉, 세균을 수확한 다음 50 μ l의 Pre-incubation solution과 3 μ l의 lysozyme solution을 넣고 잘 혼합한 다음 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 여기에 250 μ l의 G-buffer solution을 넣고 잘 혼합한 다음 65°C에서 15분간 반응시키고, 250 μ l의 Binding solution을 넣고 잘 혼합한 다음 vortexing하였다. 이러한 cell lysates를 G-spin™ column에 넣고 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. Column에 500 μ l의 washing buffer A를 넣고 다시 1분간 원심분리하였다. 여기에 500 μ l의 washing buffer B를 넣고 다시 1분간 원심분리하고, G-spin™ column을 새로운 eppendorf tube에 넣고 100 μ l의 elution buffer를 넣고 1분간 실온에 방치한 다음 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다.

3. 중합효소연쇄반응을 이용한 16S rDNA의 증폭

16S rDNA를 증폭할 수 있는 universal PCR primer(27F: 5'-AGA GTT TGA TC[A/C] TGG CTC AG-3', 1492R: 5'-TAC GG[C/T] TAC CTT GTT ACG ACT T-3'), AccuPower® Premix (Bioneer Corp., Daejeon, Korea)와 PTC-200 (MJ Research Inc., Watertown, MA, USA) PCR machine을 이용하여 16S rDNA를 증폭하였다. 이때 PCR의 조건은 다음과 같이 시행하였다. 20 μ l의 PCR 혼합용액이 되도록, 20 pmoles씩의 forward 및 reverse primers와 100 pg의 세균 genomic DNA를 넣고 94°C에서 2분간 초기 denaturation을 실시한 다음 94°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension하는 과정을 30회 반복하여 증폭한 다음 마지막으로 72°C에서 10분간 extension하였다. 최종 반응물을 2 μ l씩 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 그 증폭 여부를 확인하였다.

앞에서 증폭한 16S rDNA를 pGEM-T easy vector (Pormega Corp., Madison, WI, USA)를 이용하여 클로닝하였다.

4. 플라스미드 DNA 추출

E. coli DH5 α 에 transformation시킨 각각의 재조합된 플라스미드 DNA는 통상의 alkaline lysis법으로 Accu-Prep™ Plasmid Extraction Kit (Bioneer Corp.)를 이용하여 제조회사의 지시대로 추출하였다. 이를 간략히 설명하면, 세균배양액 1 ml를 30초간 원심분리 (12,000 \times g)하고, 얻어진 세균 덩어리를 250 μ l의 Resuspension buffer를 가하여 잘 현탁한 후, 250 μ l Lysis buffer를 첨가하여 천천히 잘 혼합한 다음, 350 μ l의 Neutralization buffer를 첨가한 즉시 잘 섞은 후에 얼음에 5분간 방치하였다. 이

것을 10분간 원심분리 (12,000 \times g)하여 상청액을 binding column tube에 옮기고, 1분간 원심분리 (12,000 \times g)하였다. 여과액은 버리고, binding column tube에 80% 에탄올을 700 μ l 넣은 후 1분간 원심분리 (12,000 \times g)하였다. binding column tube에 남아있을 여분의 에탄올을 제거하기 위해 여과액을 버리고, 다시 30초간 원심분리 (12,000 \times g) 하였다. Binding column을 새로운 eppendorf tube로 옮기고, 여기에 100 μ l의 Elution buffer를 넣고 1분간 기다린 다음 다시 1분간 원심분리 (12,000 \times g)하여 여과액을 -70°C에서 보관하여 핵산염기서열 결정에 사용하였다.

6. 핵산염기서열 결정 및 핵산염기서열의 상동성 검색

핵산염기서열 결정은 바이오니아사에 의뢰하여 결정하였다. 이때 사용되는 프라이머는 ChDC-GEM-F (5'-TTC CCA GTC ACG ACG TTG TAA AA-3'), Seq-F1 (5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'), Seq-R2 (5'-GAC TAC CAG GGT ATC TAA TCC-3'), Seq-F16 (5'-TAG ATA CCC YGG TAG TCC-3') 및 ChDC-GEM-R (5'-GTG TGG AAT TGT GAG CGG ATA AC-3')를 이용하였으며, 그 결과는 SeqMan 프로그램 (Version 5.00; DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA)을 이용하여 분석하였다.

위에서 결정된 핵산염기서열을 GenBank의 데이터 베이스를 이용하여 상동성을 검색하고, 그 결과 98% 이상 상동성을 보이는 세균과 같은 종이라고 판정하였다.

III. 연구결과

본 연구의 연구 대상인 17명 각각의 환자에서 치수 및 치근단 질환 병소에 이환된 치아의 임상 증상은 Table 1과 같았다. 치아우식증에 이환되고 치근단 병소가 없는 치아가 7개, 치근단 병소가 있는 경우가 4개 치아였으며, 치아우식증에 이환되지 않으면서 치근단 병소가 없는 경우가 3개, 치근단 병소가 있는 경우가 3개였다. 본 연구 대상 치아는 모두 동통이 수반되었으며, sinus tract은 보이지 않았다.

각각의 병소를 1,000배 희석한 후 혈액한천배지에서 혐기성 조건에서 세균 배양한 결과 모두 71 종류의 세균 군락이 자라났으며, 그 중 계대 배양을 통해서 적응하여 자라난 것이 56 균주였으며, 나머지 15 균주는 소실되었다 (Table 2). 이들 56 균주의 16S rRNA 유전자를 클로닝하여 핵산염기서열을 결정한 결과 Table 3과 같았다. 연쇄상구균 속에 속하는 균주들 중에는 16S rRNA 유전자 핵산염기서열로는 중 수준에서 동정할 수 없는 경우가 14 균주가 있었다 (Table 4). 또한, 10 균주의 *Actinomyces* 속, 3 균주의

Table 1. Clinical features of the patients

Patients' No.	Teeth (#)	Caries	Pain	Swelling	Sinus track	Apical Lesion	Vitality	Periodontitis
85	45	○	○	×	×	×	○	×
93 / 94	26	○	○	×	×	×	○	×
99	26	○	○	×	×	×	○	×
102	36	○	○	×	×	×	○	×
103	24	○	○	×	×	×	○	×
104	26	○	○	×	×	×	○	×
107	45	○	○	×	×	×	○	×
81	47	×	○	×	×	×	○	×
89	31	×	○	×	×	×	○	○
90	36	×	○	×	×	×	○	○
95	36	○	○	×	×	○	×	×
97	37	○	○	×	×	○	×	×
105	16	○	○	×	×	○	×	×
115	13	○	○	○	×	○	×	×
82	23	×	○	○	×	○	×	×
84	31	×	○	×	×	○	×	×
106	31	×	○	×	×	○	×	×

Table 2. Bacteria isolated from each of patient

Patients' No.	Identified colonies		Non-identified colonies (Number)	Total
	Number	Strains		
85	2	ChDC B639, ChDC B640	1	3
93 / 94	5	ChDC B668, ChDC B669, ChDC B670, ChDC B671, ChDC B672	0	5
99	2	ChDC B678, ChDC B679	0	2
102	2	ChDC B680, ChDC B681	0	2
103	2	ChDC B682, ChDC B683	0	2
104	5	ChDC B647, ChDC B648, ChDC B649, ChDC B650, ChDC B651	0	5
107	4	ChDC B684, ChDC B685, ChDC B686, ChDC B687	0	4
81	5	ChDC B631, ChDC B632, ChDC B633, ChDC B634, ChDC B635	1	6
89	3	ChDC B643, ChDC B644, ChDC B645	3	6
90	1	ChDC B646	3	4
95	3	ChDC B674, ChDC B676, ChDC B677	1	4
97	1	ChDC B709	1	2
105	6	ChDC B652, ChDC B653, ChDC B654, ChDC B655, ChDC B656, ChDC B657	0	6
115	12	ChDC B695, ChDC B696, ChDC B697, ChDC B698, ChDC B699, ChDC B700, ChDC B701, ChDC B702, ChDC B703, ChDC B704, ChDC B705, ChDC B706	0	12
82	1	ChDC B636	0	1
84	1	ChDC B638	5	6
106	1	ChDC B658	0	1
Total	56		15	71

ChDC: Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University

Propionibacterium 속, 2 균주의 *Lactobacillus* 속 및 1 균주씩의 *Staphylococcus* 속, *Clostridium* 속, *Eubacterium* 속 그리고 *Methylobacterium* 속에 속하는 균주들도 중-수준에서의 동정이 되지 않았다 (Table 4). *Actinomyces* sp. ChDC B639 및 *Actinomyces* sp. ChDC B631 균주는 현재 GenBank 데이터 베이스의 자

료를 기준으로 볼 때 본 연구에서 처음으로 배양된 세균 중 이다 (Table 3).

치아우식증에 의한 치근관감염 병소와 치아우식증이 아닌 다른 원인에 의한 치근관감염 병소에서 검출되는 세균은 서로 다른 양상을 보였다 (Table 4 & 5). 즉, 치아우식증에 의한 치아의 치근관 감염 병소에서 연쇄상구균들이 72.7%

Table 3. Bacteria isolated from necrotized pulpal tissue

Patients' No.	Strains	Genus or species match [*]	Homology(%)
85	<i>Actinomyces</i> sp. ChDC B639	<i>Actinomyces naeslundii</i> [AB062278]	94
	<i>Streptococcus anginosus</i> ChDC B640	<i>Streptococcus anginosus</i> ATCC 33397 [AF104679]	98
	<i>Streptococcus</i> sp. ChDC B668	<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 7073 [AY188352] <i>Streptococcus thermophilus</i> ATCC 19258 [AY188354] <i>Streptococcus vestibularis</i> ATCC 49124 [AY188353]	99 99 99
	<i>Streptococcus</i> sp. ChDC B669	<i>Streptococcus parasanguinis</i> ATCC 15912 [AF003933] <i>Streptococcus</i> genomosp. C1 [AY278629]	98 98
93/94	<i>Streptococcus</i> sp. ChDC B670	<i>Streptococcus parasanguinis</i> ChDC OS49 [AF543299] <i>Streptococcus</i> genomosp. C1 [AY278629]	98 99
	<i>Streptococcus</i> sp. ChDC B671	<i>Streptococcus parasanguinis</i> ATCC 15912 [AF003933] <i>Streptococcus australis</i> ATCC 700641 [AY485604] <i>Streptococcus oralis</i> ATCC 35037 [AY485602]	98 98 98
	<i>Streptococcus</i> sp. ChDC B672	<i>Streptococcus salivarius</i> strain ATCC 7073 [AY188352] <i>Streptococcus thermophilus</i> ATCC 19258 [AY188354] <i>Streptococcus vestibularis</i> ATCC 49124 [AY188353]	99 99 99
	<i>Streptococcus</i> sp. ChDC B678	<i>Streptococcus mitis</i> ATCC 49456 [AF003929] <i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 33400 [AF003930] <i>Streptococcus pseudopneumoniae</i> ATCC BAA-960 [AY612844]	99 99 99
	<i>Streptococcus</i> sp. ChDC B679	<i>Streptococcus gordonii</i> ATCC 10558 [AF003931]	99
	<i>Streptococcus</i> sp. ChDC B680	<i>Streptococcus mitis</i> strain 209 [AJ295853] <i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 33400 [AF003930]	99 99
	<i>Streptococcus</i> sp. ChDC B681	<i>Streptococcus mitis</i> strain Sm91 [AY518677] <i>Streptococcus oralis</i> ATCC 35037 [AY485602] <i>Streptococcus pneumoniae</i> R6 [AE008552]	99 99 99
	<i>Lactobacillus</i> sp. ChDC B682	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain WCFS1 [AL935258] [AL935263] <i>Lactobacillus plantarum</i> Chikuso-1 [AB104855]	99 99 99
103	<i>Lactobacillus</i> sp. ChDC B683	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> isolate Akira1 [AY369076] <i>Lactobacillus</i> sp. <i>rennanqilfy14</i> [AY363372] <i>Lactobacillus casei</i> ATCC334 [D86517]	99 99 99

ChDC; Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University

(Continued on next page)

Table 3. Bacteria isolated from necrotized pulpal tissue

(Continued in previous page)

Patients' No.	Strains	Genus or species match [*]	Homology(%)
104	<i>Propionibacterium</i> sp. ChDC B647	<i>Propionibacterium</i> sp. oral strain FMA5 [AF287756]	98
	<i>Streptococcus</i> sp. ChDC B648	<i>Streptococcus</i> sp. oral strain T4-E3 [AF385526]	99
	<i>Streptococcus</i> sp. ChDC B648	<i>Streptococcus oralis</i> ATCC 35037 [AF003932]	98
	<i>Actinomyces</i> sp. ChDC B649	<i>Actinomyces</i> sp. oral clone EP005 [AY008314]	98
	<i>Actinomyces</i> sp. ChDC B650	<i>Actinomyces naeslundii</i> strain CCUG 34285 [AJ234050]	98
	<i>Actinomyces</i> sp. ChDC B650	<i>Actinomyces</i> sp. ChDC B197 [AF543275]	99
	<i>Actinomyces</i> sp. ChDC B650	<i>Actinomyces naeslundii</i> strain CCUG 34285 [AJ234050]	99
	<i>Actinomyces georgiae</i> ChDC B651	<i>Actinomyces georgiae</i> 6843 DSM [X80413]	98
107	<i>Streptococcus anginosus</i> ChDC B684	<i>Streptococcus anginosus</i> strain 1093 [AF145244]	99
	<i>Streptococcus mitis</i> ChDC B685	<i>Streptococcus mitis</i> ATCC 15914 [AY281076]	99
	<i>Streptococcus</i> sp. ChDC B686	<i>Streptococcus</i> genomosp. C3 [AY278631]	99
	<i>Streptococcus</i> sp. ChDC B686	<i>Streptococcus</i> sp. oral clone P4PA_13 P3 [AY207062]	99
	<i>Streptococcus</i> sp. ChDC B686	<i>Streptococcus mitis</i> ATCC 49456 [AF003929]	99
	<i>Streptococcus cristatus</i> ChDC B687	<i>Streptococcus cristatus</i> ATCC 51100 [AY188347]	99
81	<i>Actinomyces</i> sp. ChDC B631	<i>Actinomyces</i> sp. oral clone IP073 [AY349365]	99
	<i>Actinomyces</i> sp. ChDC B631	<i>Actinomyces oricola</i> CCUG 46090T [AJ507295]	94
	<i>Actinomyces israelii</i> ChDC B632	<i>Actinomyces israelii</i> strain A1 [AF479270]	98
	<i>Actinomyces</i> sp. ChDC B633	<i>Actinomyces</i> sp. oral strain B27SC [AJ239281]	99
	<i>Actinomyces</i> sp. ChDC B633	<i>Actinomyces georgiae</i> 6843 DSM [X80413]	98
	<i>Actinomyces</i> sp. ChDC B634	<i>Actinomyces viscosus</i> ChDC OS34 [AF543286]	98
	<i>Actinomyces</i> sp. ChDC B634	<i>Actinomyces naeslundii</i> 16S rRNA gene, strain CCUG 33914	98
	<i>Methylobacterium</i> sp. ChDC B635	<i>Methylobacterium</i> sp. BF15 [Z23160]	99
89	<i>Methylobacterium</i> sp. ChDC B635	<i>Methylobacterium fujisawaense</i> DSM 5686 [AJ250801]	99
	<i>Staphylococcus</i> sp. ChDC B643	<i>Staphylococcus warneri</i> ATCC 27836 [L37603]	99
	<i>Staphylococcus</i> sp. ChDC B643	<i>Staphylococcus pasteurii</i> ATCC 51129T [AB009944]	99
	<i>Actinomyces</i> sp. ChDC B644	<i>Actinomyces</i> sp. oral clone EP005 [AY008314]	98
	<i>Actinomyces</i> sp. ChDC B644	<i>Actinomyces naeslundii</i> strain CCUG 34285 [AJ234050]	98
	<i>Actinomyces</i> sp. ChDC B645	<i>Actinomyces</i> sp. ChDC B197 [AF543275]	99
90	<i>Actinomyces</i> sp. ChDC B645	<i>Actinomyces naeslundii</i> strain CCUG 34285 [AJ234050]	99
	<i>Actinomyces</i> sp. ChDC B646	<i>Actinomyces</i> genomosp. C2 [AY278611]	98
90	<i>Actinomyces</i> sp. ChDC B646	<i>Actinomyces odontolyticus</i> strain CCUG 32897 [AJ234043]	98

ChDC; Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University

(Continued on next page)

Table 3. Bacteria isolated from necrotized pulpal tissue (Continued in previous page)

Patients' No.	Strains	Genus or species match [*]	Homology(%)
95	<i>Streptococcus</i> sp.	<i>Streptococcus mitis</i> strain Sm91 [AY518677]	99
	ChDC B674	<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6 [AE008552]	98
	<i>Streptococcus</i> sp.	<i>Streptococcus mitis</i> ATCC 49456 [AF003929]	98
	ChDC B676	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 33400 [AF003930]	98
	<i>Streptococcus</i> sp.	<i>Streptococcus</i> genomosp. C3 [AY278631]	99
	ChDC B677	<i>Streptococcus mitis</i> ATCC 49456 [AF003929]	99
97	<i>Clostridium</i> sp.	<i>Clostridium sporogenes</i> rrn gene ATCC3584 [X68189]	99
	ChDC B709	<i>Clostridium botulinum</i> NCTC7273 type B rrn gene [X68186]	99
105	<i>Propionibacterium</i> sp.	<i>Propionibacterium propionicus</i> DSM 43307 [AJ003058]	99
	ChDC B652	<i>Propionibacterium avidum</i> DSM 4901 [AJ003055]	99
	<i>Propionibacterium</i> sp.	<i>Propionibacterium propionicus</i> DSM 43307 [AJ003058]	99
	ChDC B653	<i>Propionibacterium avidum</i> DSM 4901 [AJ003055]	99
	<i>Finegoldia magna</i>	<i>Finegoldia magna</i> ATCC 29328 rrnC operon [AB109771]	98
	ChDC B654		
	<i>Propionibacterium propionicus</i>	<i>Propionibacterium propionicus</i> DSM 43307 [AJ003058]	99
	ChDC B655		
	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i> ATCC 25260 [L16490]	98
	ChDC B656		
115	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i> ATCC 25260 [L16490]	98
	ChDC B657		
	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus anginosus</i> strain 367 [AF145239]	99
	ChDC B695		
	<i>Prevotella denticola</i>	<i>Prevotella denticola</i> ATCC 35308 [AY323524]	98
	ChDC B696		
	<i>Prevotella buccae</i>	<i>Prevotella buccae</i> ATCC 33690 [L16478]	98
	ChDC B697		
	<i>Prevotella denticola</i>	<i>Prevotella denticola</i> ATCC 35308 [AY323524]	98
	ChDC B698		
	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus anginosus</i> strain ATCC33397 [AF104678]	99
	ChDC B699		
	<i>Shuttleworthia satelles</i>	<i>Eubacterium</i> sp. oral clone EH006 [AF385570]	99
	ChDC B700	<i>Shuttleworthia satelles</i> VPI D143K-13 [AF399956]	99
	<i>Bifidobacterium dentium</i>	<i>Bifidobacterium dentium</i> ATCC27534 [D86183]	98
	ChDC B701		
	<i>Prevotella denticola</i>	<i>Prevotella denticola</i> ATCC 35308 [AY323524]	98
	ChDC B702		
	<i>Atopobium parvulum</i>	<i>Atopobium parvulum</i> ATCC22793 [AF292372]	99
	ChDC B703		

ChDC: Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University

(Continued on next page)

Table 3. Bacteria isolated from necrotized pulpal tissue

(Continued in previous page)

Patients' No.	Strains	Genus or species match [*]	Homology(%)
115	<i>Prevotella denticola</i> ChDC B704	<i>Prevotella denticola</i> ATCC 35308 [AY323524]	98
	<i>Fusobacterium nucleatum</i> ChDC B705	<i>Fusobacterium nucleatum</i> ChDC OS50 [AF543300]	99
	<i>Eubacterium</i> sp. ChDC B706	<i>Eubacterium</i> sp. oral strain A35MT [AF287761] <i>Eubacterium infirmum</i> W 1471 [U13039]	99 99
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ChDC B636	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> WatG. [AB117953]	99
82	<i>Propionibacterium acnes</i> ChDC B638	<i>Propionibacterium acnes</i> isolate: #6119 [AB108479]	99
106	<i>Actinomyces</i> sp. ChDC B658	<i>Actinomyces</i> genomosp. C2 [AY278611] <i>Actinomyces odontolyticus</i> 16S rRNA gene, strain CCUG 32834 [AJ234042]	98 98

ChDC: Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University

*: GenBank accession number

(8/11)로 가장 많은 빈도로 검출되었다 (Table 4 & 5). 반면에 치아우식증이 없는 치아의 치근관 감염 병소에서는 *Actinomyces* 속의 균주들이 66.7%로 가장 높은 빈도로 검출되었다 (Table 4 & 5).

치근단 병소가 있는 경우의 치근관 감염 병소에는 대체로 혐기성 세균인 *Clostridia* 아문, *Bacteroides* 문, *Fusobacteria* 문의 균주들이 검출되었지만, 치근단 병소가 없는 치아에서는 검출되지 않았다 (Table 4 & 6). 반면에 치근단 병소가 없는 치근관 병소에서는 연쇄상구균 (60%)과 *Actinomyces* 속 (50%)의 균주들이 높은 빈도로 검출되었다 (Table 4 & 6).

IV. 총괄 및 고안

본 연구 결과 세균배양법에 의해서는 치근관 감염 병소에서는 1-8개의 세균 종만 검출되었다 (Table 3 & 4). Sundqvist⁽¹⁴⁾와 Le Goff 등⁽¹⁵⁾은 치근관 감염 병소에서 세균 배양법으로 *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Bacteroides* 및 *Lactobacillus* 속에 속하는 균주들이 한 병소에서 2-8 종류씩만 배양되었다고 보고하였다. 이는 본 연구 결과와 매우 유사한 것으로, 세균배양법으로는 모든 세균의 배양이 어렵기 때문인 것으로 생각된다. 또한, 치근관

병소 샘플을 1,000배 정도 희석하여 혈액천천배지에 도말하기 때문에 적은 수로 존재하는 세균 종의 배양 기회가 소실되는 것도 하나의 원인이라 생각된다. 그리고, 이때 자라는 모든 세균들 모두 동정해야 하지만, 군락의 모양, 색깔, 크기 등의 형태학적인 특징으로 대표 집락을 선정하여 동정하였기 때문에 실험 과정에서 소실한 균주들이 존재하는 것도 하나의 원인이라 할 수 있다.

이러한 단점을 보완하기 위해 최근에는 치근관 감염 병소에서 16S rRNA 유전자 library를 제작하여 세균 종을 동정하는 방법이 시도되었다^(12,13). Yoo 등⁽¹³⁾은 본 연구에서 사용한 115번 환자의 치근관 감염 병소에서 16S rRNA 유전자 library 제작에 의한 세균 종 동정의 결과 21 종의 세균이 검출되었다고 보고한 반면, 본 연구에서는 8 종의 세균이 검출되었다. 이들 8 종의 세균 중 *Prevotella buccae*와 *Atopobium parvulum*은 Yoo 등⁽¹³⁾의 연구에서는 검출이 되지 않은 반면, 나머지 6 종의 세균은 검출이 되었다. 하지만, 105번 환자의 치근관 감염 병소를 대상으로 한 실험에서는 Yoo 등⁽¹³⁾의 연구결과 11 종의 세균이 검출되었지만, 본 연구에서 검출된 4 종의 세균과 동시에 검출된 종은 없었다. 이러한 상반된 두 결과는 16S rRNA 유전자 library 제작법이 세균배양법 보다 많은 세균 종을 검출할 수 있는 방법이지만, 모든 세균 종을 검출하기에는 한계가 있다는 것을 의미한다고 할 수 있다. 이러한 경향은 Munson 등⁽¹²⁾

Table 4. Summary of the isolated clones derived from endodontic lesions

Patient No. Phylum / subphylum Genus or species	85	93 / 94	99	102	103	104	107	81	89	90	95	97	105	115	82	84	106	Total n = %	
Firmicutes / Bacilli																			
<i>Streptococcus</i> sp.		5	2	2		1	1				3							14	25.0
<i>Streptococcus mitis</i>							1											1	1.8
<i>Streptococcus anginosus</i>	1							1						2				4	7.1
<i>Streptococcus cristatus</i>							1											1	1.8
<i>Lactobacillus</i> sp.					2													2	3.6
<i>Staphylococcus</i> sp.									1									1	1.8
Firmicutes / Clostridia																			
<i>Shuttleworthia satelle</i>														1				1	1.8
<i>Finegoldia magna</i>													1					1	1.8
<i>Clostridium</i> sp.												1						1	1.8
<i>Eubacterium</i> sp.														1				1	1.8
<i>Proteobacteria</i>																			
<i>Methylobacterium</i> sp.								1										1	1.8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>															1			1	1.8
Bacteroidetes																			
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>													2					2	3.6
<i>Prevotella denticola</i>														4				4	7.1
<i>Prevotella buccae</i>														1				1	1.8
Fusobacteria																			
<i>Fusobacterium nucleatum</i>														1				1	1.8
Actinobacteria																			
<i>Actinomyces</i> sp.	1					2		3	2	1							1	10	17.9
<i>Actinomyces georgia</i>						1												1	1.8
<i>Actinomyces israelii</i>								1										1	1.8
<i>Atopobium parvulum</i>														1				1	1.8
<i>Bifidobacterium dentium</i>														1				1	1.8
<i>Propionibacterium</i> sp.						1							2					3	5.4
<i>Propionibacterium propionicus</i>													1					1	1.8
<i>Propionibacterium acnes</i>																1		1	1.8
Total	2	5	2	2	2	5	4	5	3	1	3	1	6	12	1	1	1	56	100

Table 5. Comparison of the bacteria isolated from the endodontic infection according to the presence of caries in infected teeth

Patient' No. Phylum / subphylum Genus or species	Caries (O)		Caries (X)		Total	
	Person (n / 11)	%	Person (n / 6)	%	Person (n / 17)	%
Firmicutes / Bacilli						
<i>Streptococcus</i> sp.	6	54.5			6	35.3
<i>Streptococcus mitis</i>	1	9.1			1	5.9
<i>Streptococcus anginosus</i>	3	27.3			3	17.6
<i>Streptococcus cristatus</i>	1	9.1			1	5.9
<i>Lactobacillus</i> sp.	1	9.1			1	5.9
<i>Staphylococcus</i> sp.			1	16.7	1	5.9
Firmicutes / Clostridia						
<i>Shuttleworthia satelle</i>	1	9.1			1	5.9
<i>Finegoldia magna</i>	1	9.1			1	5.9
<i>Clostridium</i> sp.	1	9.1			1	5.9
<i>Eubacterium</i> sp.	1	9.1			1	5.9
<i>Proteobacteria</i>						
<i>Methylobacterium</i> sp.			1	16.7	1	5.9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			1	16.7	1	5.9
Bacteroidetes						
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	1	9.1			1	5.9
<i>Prevotella denticola</i>	1	9.1			1	5.9
<i>Prevotella buccae</i>	1	9.1			1	5.9
Fusobacteria						
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1	9.1			1	5.9
Actinobacteria						
<i>Actinomyces</i> sp.	2	18.2	4	66.7	6	35.3
<i>Actinomyces georgia</i>	1	9.1			1	
<i>Actinomyces israelii</i>			1	16.7	1	5.9
<i>Atopobium parvulum</i>	1	9.1			1	5.9
<i>Bifidobacterium dentium</i>	1	9.1			1	5.9
<i>Propionibacterium</i> sp.	2	18.2			2	11.8
<i>Propionibacterium propionicus</i>	1	9.1			1	5.9
<i>Propionibacterium acnes</i>			1	16.7	1	5.9

Table 6. Comparison of the bacteria isolated from the endodontic infection according to the presence of the apical lesion

Patient No. Phylum / subphylum Genus or species	Apical lesion (O)		Apical lesion (X)		Total	
	Person (n / 7)	%	Person (n / 10)	%	Person (n / 17)	%
Firmicutes / Bacilli						
<i>Streptococcus</i> sp.	1	14.3	5	50.0	6	35.3
<i>Streptococcus mitis</i>			1	10.0	1	5.9
<i>Streptococcus anginosus</i>	1	14.3	2	20.0	3	17.6
<i>Streptococcus cristatus</i>			1	10.0	1	5.9
<i>Lactobacillus</i> sp.			1	10.0	1	5.9
<i>Staphylococcus</i> sp.			1	10.0	1	5.9
Firmicutes / Clostridia						
<i>Shuttleworthia satelle</i>	1	14.3			1	5.9
<i>Finegoldia magna</i>	1	14.3			1	5.9
<i>Clostridium</i> sp.	1	14.3			1	5.9
<i>Eubacterium</i> sp.	1	14.3			1	5.9
Proteobacteria						
<i>Methylobacterium</i> sp.			1	10.0	1	5.9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	14.3			1	5.9
Bacteroidetes						
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	1	14.3			1	5.9
<i>Prevotella denticola</i>	1	14.3			1	5.9
<i>Prevotella buccae</i>	1	14.3			1	5.9
Fusobacteria						
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1	14.3			1	5.9
Actinobacteria						
<i>Actinomyces</i> sp.	1	14.3	5	50.0	6	35.3
<i>Actinomyces georgia</i>			1	10.0	1	
<i>Actinomyces israelii</i>			1	10.0	1	5.9
<i>Atopobium parvulum</i>	1	14.3			1	5.9
<i>Bifidobacterium dentium</i>	1	14.3			1	5.9
<i>Propionibacterium</i> sp.	1	14.3	1	10.0	2	11.8
<i>Propionibacterium propionicus</i>	1	14.3			1	5.9
<i>Propionibacterium acnes</i>	1	14.3			1	5.9

이 5개의 치근관 감염 병소에서 16S rRNA 유전자 library를 제작법과 세균배양법을 동시에 실시한 연구 결과와 같은 것이었다.

본 연구에서 사용된 세균배양법은 아직까지 구강 내 세균 중 50% 이상을 배양할 수 없는 실정이지만, 치근관 병소에서 살아있는 세균을 얻을 수 있기 때문에 차후 숙주세포와 병원성 세균간의 상호작용에 대한 연구나 항생제 감수성 실험이나 세균 분류학적 실험 등을 진행할 수 있다는 장점이 있다. 이와는 반대로, 16S rDNA library 제작 및 핵산염기서열결정법은 배양할 수 없는 세균 종까지 검출할 수 있는 장점이 있지만, 살아있는 세균을 분리 배양할 수 없다는 단점이 있다. 그러므로, 향후 감염질환의 연구에 있어서 분자생물학적 방법 및 세균배양법을 동시에 수행하는 것이 바람직할 것으로 생각된다.

본 연구 결과 치아우식증이 존재하는 치근관 감염 병소(급성 치수염 병소)에서는 연쇄상구균들이 가장 많은 빈도로 검출되었으며, 그 다음으로 *Actinomyces* 속의 균주들이 검출되었다. 이는 치아의 초기 치면세균막을 구성하는 *Actinomyces* 속의 균종과 치아우식증의 발병 및 진행에 큰 영향을 미치는 연쇄상구균들이 치아우식증이 진행되면서 우식 상아질의 상아세관을 통하여 침입하거나 치아우식증에 의해 치수가 노출된 경우 직접치수를 통해 침입하기 때문이라고 생각된다. 이러한 결과는 Love와 Jenkinson¹⁶⁾의 치아우식증이 있는 경우 그람 양성의 세균들이 상아세관에 많이 존재하고, 이를 통해 치근부에 연속적인 감염이 일어난다는 보고가 이론적으로 뒷받침해 준다. 즉, 본 연구에서는 괴사된 치근부 치수를 이용하여 세균 배양을 했지만, 상아세관을 통해서 세균이 침입할 수 있다는 점을 고려할 때 치아우식증에 의한 치근관 감염 병소의 세균 기원이 상아세관의 노출에 의한 세균의 침입이라는 점을 간접적으로 증명해 준다고 할 수 있다.

또한 치근관 감염 병소(급성 치근단 농양)가 있는 경우에는 *Clostridia* 아문, *Bacteroidetes* 문 및 *Fusobacteria* 문의 균주가 빈번하게 검출되었다. 이는 Le Goff 등¹⁵⁾의 치아우식증이 없는 치근관 감염 병소에서 약 81%가 혐기성 세균인 *Bacteroides gracilis*, *Propionibacterium acnes*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella buccae* 및 *Eubacterium lentum* 이었다는 보고와 비슷한 결과였다. 하지만, 본 연구에서는 혐기성 세균들의 발현 빈도는 훨씬 낮았다. 이는 본 연구에서 사용된 샘플의 수가 적었고 전술한 바와 같이 샘플을 너무 희석했기 때문일 것으로 생각된다. 또 다른 이유로는 급성 치근단 농양 병소 주위의 치주질환이 심하지 않고, 외상성 치수 괴사에 의한 경우이기 때문인 것으로 사료된다.

본 연구에서는 아직까지 중 수준에서 동정되지 않은 2 균

주(ChDC B639 및 ChDC B631)의 *Actinomyces* 속에 속하는 균주가 분리되었다. *Actinomyces* sp. ChDC B631의 경우, Paster 등¹⁷⁾이 구강 내에서 치면세균막에서 16S rRNA 유전자 library 제작법에 의해 클로닝하여 발표한 *Actinomyces* sp. oral clone IP073의 16S rDNA 핵산염기서열과 99%, *Actinomyces oricola* CCUG 46090^T 균주의 것과는 94% 일치하였다. *Actinomyces* sp. oral clone IP073의 16S rDNA 핵산염기서열은 살아있는 균주로부터 얻은 데이터가 아니고, 치면세균막에서 모든 세균의 지놈 DNA를 추출하고 이를 주형으로 중합효소연쇄반응으로 얻은 증폭물을 무작위로 클로닝하여 얻은 것이기 때문에, 본 연구에서 배양한 *Actinomyces* sp. ChDC B631 균주는 *Actinomyces* sp. oral clone IP073과 같은 종이라 생각되는 살아있는 균주라 할 수 있다. 또한 *Actinomyces* sp. ChDC B639 균주도 *Actinomyces naeslundii*의 16S rRNA 유전자 핵산염기서열과 94% 밖에 일치하지 않은 것으로서 새로운 종일 확률이 매우 높은 균주이다. 그러므로, 향후 이들의 특성을 밝혀 새로운 종으로 확립하는 일이 중요할 것으로 사료된다.

이상의 연구결과를 종합할 때, 현재의 구강 내 세균 배양 기술로는 모든 세균을 배양할 수 없다는 단점 때문에 치수 및 치근단 감염 병소에서 세균배양법에 의한 세균 검출에 제한이 있지만, 살아있는 세균을 얻을 수 있다는 장점에 의해 향후 치수 및 치근단 질환의 병인론 연구에 좋은 자료를 본 연구에서 얻을 수 있었다. 본 연구 결과 치아우식증 및 치근단 병소 유무에 따른 특정 세균 종이 우세하게 검출됨을 알 수 있었지만, 치수 및 치근관 감염이 여러 세균의 복합적인 감염에 의해 발병 및 진행된다는 기존에 알려진 것처럼 본 연구에서도 각각의 환자 병소에서 주요한 원인균을 밝힐 수는 없었다. 이는 아직도 구강 미생물 분야에서 세균과 숙주와의 병인론 연구나 역학 연구가 미진하다는 것을 의미하며, 분자생물학적 방법 뿐만 아니라 많은 임상 균주들을 확립하여 면역학적, 분자생물학적, 세포학적 및 역학적 연구가 유기적으로 연계되어 이루어져야함을 시사한다.

V. 결 론

치아우식증 및 치주질환에 의한 여부와 치근단 병소의 존재 유무에 따라 급성 치수염 (acute pulpitis) 또는 급성 치근단 농양 (acute periapical abscess)이라고 진단된 17개 치아의 치관부 치수를 제거하고, 치근에 존재하는 괴사된 치수 및 농양부위의 샘플을 채취하여, 혐기성 상태에서 세균을 배양하고, 이들을 16S rDNA 클로닝 및 핵산염기서열 결정법으로 중 수준에서 동정하여 다음과 결과를 얻었다.

1. 17개의 치근관 감염 병소를 혐기성 조건에서 세균 배양

한 결과 모두 71 종류의 세균 군락이 자라났으며, 그 중 계대 배양을 통해서 적응하여 자라난 것이 56 균주였다.

2. 치아우식증에 의한 치근관 감염 병소와 치아우식증이 아닌 다른 원인에 의한 치근관 감염 병소에서 검출되는 세균은 서로 다른 양상을 보였다. 즉, 치아우식증에 의한 치아의 치근관 감염 병소에서 연쇄상구균들이 72.7% (8/11)로 가장 많은 빈도로 검출되었다. 반면에 치아우식증이 없는 치아의 치근관 감염 병소에서는 *Actinomyces* 속의 균주들이 66.7%로 가장 높은 빈도로 검출되었다.
3. 치근단 병소가 있는 경우의 치근관 감염 병소에는 대체로 혐기성 세균인 *Clostridia* 아문, *Bacteroides* 문, *Fusobacteria* 문의 균주들이 검출되었지만, 치근단 병소가 없는 치아에서는 검출되지 않았다.
4. 본 연구에서는 아직까지 종 수준에서 동정되지 않은 2 균주 (*Actinomyces* sp. ChDC B639 및 *Actinomyces* sp. ChDC B631)의 *Actinomyces* 속에 속하는 균주가 분리되었다.

이상의 결과를 종합할 때, 세균배양법에 의한 치수 및 치근단 감염 병소에서는 다양한 세균이 검출되었으며, 이는 치근관 감염이 여러 세균에 의해 발병 및 진행된다는 기존의 연구 결과와 동일함을 알 수 있었다. 또한 본 연구 결과 분리 동정된 균주들은 치근관질환과 이와 관련된 세균간의 역학조사에 중요한 자료로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Gomes BP, Lilley JD, Drucker DB. Clinical significance of dental root canal microflora. *J Dent* 24:47-55, 1996.
2. Fouad AF, Kum KY, Clawson ML, Barry J, Abenoja C, Zhu Q, Caimano M, Radolf JD. Molecular characterization of the presence of *Eubacterium* spp. and *Streptococcus* spp. in endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol* 18:249-255, 2003.
3. Kurihara H, Kobayashi Y, Francisco IA, Isoshima O, Nagai A, Murayama YA. Microbiological and immunological study of endodontic-periodontic lesions. *J Endod* 21:617-621, 1995.
4. Abou-Rass M, Bogen G. Microorganisms in closed periapical lesions. *Int Endod J* 31:39-47, 1998.
5. Baumgartner JC, Watkins BJ, Bae KS, Xia T. Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections. *J Endod* 25:413-415, 1999.
6. Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP, Saunders WP, MacKenzie D, Coldero L, Bagg J. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. *J Clin Microbiol* 39:3282-3289, 2001.
7. Tanner A, Stillman N. Oral and dental infections with anaerobic bacteria: clinical features, predominant pathogens, and treatment. *Clin Infect Dis* 4:S304-S309, 1993.
8. Siqueira JF Jr, Rocas IN, Souto R, de Uzeda M, Colombo AP. Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 89:744-748, 2000.
9. Baumgartner JC, Bae KS, Xia T, Whitt J, David LL. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and polymerase chain reaction for differentiation of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *J Endod* 25:324-328, 1999.
10. Siqueira JF Jr, Rocas IN, Oliveira JC, Santos KR. Molecular detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. *J Endod* 27:563-566, 2001.
11. Maidak BL, Olsen GJ, Larsen N, Overbeek R, McCaughey MJ, Woese CR. The ribosomal database project (RDP). *Nucleic Acids Res* 24:82-85, 1996.
12. Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *J Dent Res* 81:761-766. Erratum in: *J Dent Res*. 2003; 82:69. *J Dent Res* 2003; 82:247, 2002.
13. Yoo SY, Kim MK, Kim H-S, Hwang H-K, Kim P-S, Lim S-Y, Oh S-H, Min J-B, Kook J-K. Identification of bacteria from periapical abscess using 16S rDNA clone libraries. *Kor J Microbiol Biotechnol* 32:195-198, 2004.
14. Sundqvist G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 78:522-530, 1994.
15. Le Goff A, Bunetel L, Mouton C, Bonnaure-Mallet M. Evaluation of root canal bacteria and their antimicrobial susceptibility in teeth with necrotic pulp. *Oral Microbiol Immunol* 12:318-322, 1997.
16. Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med* 13:171-183, 2002.
17. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 183:3770-3783, 2001.

국문초록

급성 치수염 및 급성 치근단 농양의 치근관으로부터의 세균 분리 및 동정

이연재¹ · 김미광² · 황호길^{1,3} · 국중기^{2,3*}

조선대학교 치과대학 ¹치과보존학교실, ²구강생화학교실, ³구강생물학연구소

치아우식증 및 치주질환에 이환 여부와 치근단 병소의 존재 유무에 따라 급성 치수염 또는 급성 치근단 농양이라고 진단된 17개 치아의 치관부 치수를 제거하고, 치근에 존재하는 괴사된 치수 및 농양부위의 샘플을 채취하여, 혐기성 상태에서 세균을 배양하고, 이들을 16S rDNA 클로닝 및 핵산염기서열결정법으로 종 수준에서 동정하였다. 그 결과 17개의 치근관 감염 병소에서 모두 71 개의 세균 군락이 자라났으며, 그 중 계대 배양을 통해서 적응하여 자라난 것이 56 균주였다. 치아우식증에 의한 치근관 감염 병소와 치아우식증이 아닌 다른 원인에 의한 치근관 감염 병소에서 검출되는 세균은 서로 다른 양상을 보였다. 즉, 치아우식증에 의한 치아의 치근관 감염 병소에서 연쇄상구균들이 72.7%(8/11)로 가장 많은 빈도로 검출되었다. 반면에 치아우식증이 없는 치아의 치근관 감염 병소에서는 *Actinomyces* 속의 균주들이 66.7%로 가장 높은 빈도로 검출되었다. 치근단 병소가 있는 경우의 치근관 감염 병소에는 대체로 혐기성 세균인 *Clostridia* 아문, *Bacteroides* 문, *Fusobacteria* 문의 균주들이 검출되었지만, 치근단 병소가 없는 치아에서는 검출되지 않았다. 반면에 치근단 병소가 없는 치근관 병소에서는 연쇄상구균(60%)과 *Actinomyces* 속(50%)의 균주들이 높은 빈도로 검출되었다. 본 연구에서는 아직까지 종 수준에서 동정되지 않은 2 균주(ChDC B639 및 ChDC B631)의 *Actinomyces* 속에 속하는 균주가 분리되었다. 이상의 결과를 종합할 때, 세균배양법에 의한 치수 및 치근단 감염 병소에서는 다양한 세균이 검출되었으며, 이는 치근관 감염이 여러 세균에 의해 발병 및 진행된다는 기존의 연구 결과와 동일함을 알 수 있었다. 또한 본 연구 결과 분리 동정된 균주들은 치근관질환과 이와 관련된 세균간의 역학조사에 중요한 자원으로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

Key words: 급성 치수염, 급성 치근단 농양, 세균, 16S rRNA gene