

Fusobacterium nucleatum 1차 면역의 *Porphyromonas gingivalis* 2차 면역에 대한 숙주반응 조절기능

손한용 · 김성조 · 최점일

부산대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

치주질환은 여러 복잡한 원인 요소에 의해 조직과 파괴가 발생하는 임상적 발현으로 특징지워진다¹⁾. 치아-치은부의 미생물학적 복잡성은 미생물학과 면역학적 측면에서 병인적 기전의 다양성을 구성한다^{2,3)}. T 림프구에 의한 세포성 면역반응은 치주질환의 면역병인론에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데^{4,6)}, 복잡한 미생물 요소들이 T 세포를 다양한 유형으로 활성화시켜 치주환자의 말초혈액 림프구나 치은 단핵세포에 의해 생산되는 다양한 사이토카인을 갖는 두 가지의 helper T 세포의 subset으로 발현하게 된다. 치은 연하 생태학적 환경에서의 연속적인 세균 감염과 파괴 과정의 간헐적(episodic) 성격이 감염균에 특이성을 띠는 T 세포의 개입에 영향을 준다⁴⁾. 따라서 연속적 감염의 동물 모델을 이용해 사이토카인 프로파일을 갖는 T 세포 표현형(phenotype)의 특이적 양태를 관찰해 봄이 적절하다.

여러 학자들의 보고에 의하면 파괴적인 치주질환 환자의 상승된 항체의 기능은 종종 방어기능을 나타내는 식균작용(opsonophagocytosis)이 적정 수준 이하로 낮아져 있다^{7,8,9)}. 반면에 단일 치주 병인균을 이용한 실험 동물로부터 얻은 면역 후(post-immune) 혈청은 동종의 세균 공략에 대해 만족한 수준의 방어 기능을 보여주는 것으로 보고되었다^{4,10)}. 치주질

환자에서 치주 병인균에 대한 증가된 IgG 반응이 반드시 항체의 방어 기능적인 적합성을 나타내지 못하는 이유는 아직 불분명하다. 이러한 면역 편차(immune deviation)는 치은 연하 환경에서 연속적으로 감염을 일으키는 일련의 세균들에 반응하는 면역 병리학적 병인과정에 축적된 영향을 주기 때문이라고 여겨진다.

Fusobacterium nucleatum(*F. nucleatum*)은 치은염, 치은염에서 파괴적인 치주염으로의 전이기, 그리고 성인형 치주염에서 핵심적인 병인균의 하나이다¹¹⁻¹³⁾. *F. nucleatum*은 또한 치은 연하 부위^{11,14,15)}와 biofilm¹⁶⁾에서 다른 주요 세균과의 공동응집(coaggregation)에 중심적 역할을 하는데, 특히 인체 치주조직이나 동물 모델에서 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)와 함께 독성의 상승작용을 일으킨다¹⁷⁻¹⁹⁾. 이 균은 또한 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*)에 대한 이차 면역반응의 면역 변조능을 가진 것으로 보고되고 있다²⁰⁾. 연속적인 집락과 중간 또는 후반의 집락군간의 세균간 공동응집이 치주병소에서 특이성 T 세포 표현형의 면역반응과 형성을 변조시키는 것으로 여겨진다. 최근에 *F. nucleatum* 면역후 *P. gingivalis*를 면역시킨 동물에서 *P. gingivalis* 특이성 helper T 세포 클론의 변조된 극화(polarization)를 증명하는 바 있다²¹⁾.

*F. nucleatum*이 초기에 면역세포에 사전 작용을

일으켜 후속의 감염균, 즉 *P. gingivalis*에 대한 면역 세포의 반응을 변화시킨 듯하다. 이것은 *P. gingivalis*만으로 면역된 동물에서 얻어진 항체와는 대조적으로 치주환자에서의 *P. gingivalis*에 대해 비기능적 혈청 항체가 빈번히 관찰되는 이유로 생각된다.

본 연구는 혈청의 식균작용(opsonophagocytosis) 기능과 *P. gingivalis*의 항원 인지에 대한 *F. nucleatum*의 면역 변조 효과를 조사하고, 면역 세포입양(adoptive transfer)에 의한 상이한 *P. gingivalis*-특이성 helper T 세포 클론의 방어기능을 측정하기 위해 수행하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 백서의 세균 면역법

혈기성으로 배양, 보관시킨 *F. nucleatum* ATCC 10953(American Type Culture Collection, Manassas, VA)과 *P. gingivalis* 381(Dr. Schifferle 제공, SUNY at Buffalo, Buffalo, NY)을 채취하여 이전에 설명한 방법²¹⁾에 따라 백서를 면역시키는데 사용하였다. 간단히 설명하면, 10 Balb/c mice에 PBS(phosphate-buffered saline)를 복강내 주사하여 대조군(제1군)으로 사용하였다. 10 Balb/c mice에게는 살아있는 *F. nucleatum*(5×10^8 cells)을 2주 간격으로 복강내 주사하여 두 번 면역시킨 후 *P. gingivalis*(5×10^8 cells)를 2주 간격으로 두 번 주사하였다(제2군). 10 Balb/c mice에게는 2주 간격으로 *P. gingivalis*(5×10^8 cells)만으로 두 번 면역시켰다(제3군).

2. *P. gingivalis*-특이성 T 세포 line과 클론의 획득과 분화능력

이전에 설명한 방법²¹⁾에 의해 *P. gingivalis*-특이성 T 세포 line과 클론을 채득하였다. 간단히 설명하면, 비장 T 세포(1×10^6 cells/well)를 12 well culture plate(Costar, Corning, Corning, NY)에 *P. gingivalis* (1×10^8 cells/well)와 항원전달세포로서 irradiated syngeneic splenocyte(2500 cGy)와 함께 배양하였

다. 2주간 배양 후, T 림프구는 일주일간 휴지기를 갖도록 하였다. 휴지기 후, 항원전달세포로서 방사선 조사된 비면역 비장세포와 세균 항원을 첨가하여 T 림프구 증식을 유도하였다. *P. gingivalis*-특이성 T 세포 line은 활동과 휴식의 반복적인 순환으로 확립시켰다. 증식하고 있는 T 림프구는 항원전달세포와 *P. gingivalis*를 포함한 96-well plate를 이용한 24 replicate에서 well 당 각각 1, 3, 10개의 T 림프구를 첨가시켰다. 24 replicate 중에서 증식반응을 보이는 대표적인 well들을 선택하여 클론으로 선택하고 계속 6-well로 확대시켰다. 각 T 세포 클론을 채득하여 표현형 특성을 검사하기 위해 세척하였다. 배양 상청액(culture supernatants)을 채취하여 사이토카인 분석을 위해 -20°C 에 보관하였다.

3. T 세포 클론의 표현형의 특성화

P. gingivalis-특이성 T 세포 클론을 FITC-conjugated rabbit anti-mouse CD4 또는 CD8 monoclonal antibody(PharMingen, San Diego, CA)로 염색하였다. 각 T 세포 클론의 표현형의 발현은 Epics Elite ESP(Coulter, Hialeah, FL)을 이용한 flow cytometry로 구분되었다.

4. *P. gingivalis*-특이성 T 세포 클론의 면역입양과 *P. gingivalis*의 체내 인공감염

제2군과 제3군의 백서에서 유래한 *P. gingivalis*-특이성 helper T 세포 클론(1×10^6 cells/mouse)을 tail vein 정맥주사를 통해 10 Balb/c에 각각 면역입양시켰다. 10 Balb/c의 백서에 면역시키지 않은 백서로부터 정제된 비장 T 세포를 주사하여 대조군으로 사용하였다. T 세포 면역입양 3일 후, 각 군의 백서에 치사량의 *P. gingivalis*(1×10^{11} cells)를 복강내 주사하여 감염시켰다.

5. ELISA를 이용한 혈청 IgG 항체 역가의 측정

백서의 혈청 IgG 역가는 이전에 보고한 방법²²⁾을

약간 변형하여 결정하였다. Phosphate buffer로 희석한 *P. gingivalis*의 전체 세포 항원(10 μ g/ml) 100 μ l를 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 배양한 후, 0.05% Tween 20을 함유한 PBS(PBS/Tween)로 plate를 3회 세척하였다. PBS/Tween에서 연속적으로 희석한 총 50 μ l의 백서 혈청표본을 각 well에 첨가하여 상온에서 두시간동안 배양하였다. Plate를 PBS/Tween으로 3회 세척한 후, 각 well에 100 μ l의 peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG(H+L chain specific, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)를 첨가하여 실온에서 두 시간동안 배양하였다. PBS/Tween으로 각 well에 100 μ l의 tetramethylbenzidine(1mg/ml, Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)을 첨가하여 실온에서 15분간 배양한 후 반응을 정지시키기 위해 100 μ l의 0.18 M H₂SO₄를 첨가하였다. 450 nm의 파장에서 읽어지는 흡광도와 혈청희석요소의 상호관계를 회귀 분석하였다. 대조군 혈청중 하나를 100의 ELISA unit으로 할당하고, 다른 대조군과 시험군 혈청의 혈청 IgG 역가를 산출하였다. 군간의 항체 수준을 통계적으로 비교하기 위해, paired Student *t*-test를 시행하였다.

6. 사이토카인 농도의 결정

배양 상청액을 항원전달세포와 *P. gingivalis* 항원과 배양된 T 세포의 72시간째에 채취하였다. 배양 상청액의 사이토카인 수준은 ELISA에 의해 triplicate로 측정하였다. 간단히 설명하면, 96-well plate(Corning, Corning, NY)을 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 sodium carbonate buffer에서 희석된 rat anti-mouse IFN- γ , IL-4 또는 IL-10(PharMingen, San Diego, CA, 4 μ g/ml)을 각각 coating하였다. PBS/Tween으로 3회 세척한 후, well을 PBS + 10% fetal bovine serum(PBS/FBS)에 의해 실온에서 30분간 block하고 PBS/Tween으로 3회 세척하였다. PBS/FBS + 0.05% Tween 20(PBS/FBS/Tween)에서 희석된 각 표본과 standard recombinant mouse IFN- γ , IL-4 또는 IL-10(PharMingen, San Diego, CA, 4 ng/ml)이 각각 첨가되어 실온에서 3시간동안 배양되고, plate를 PBS/Tween으로 3회 세

척하였다. Biotinylated rat anti-mouse IFN- γ , IL-4 또는 IL-10(PharMingen, San Diego, CA, 2 μ g/ml in PBS/FBS/Tween)을 각 well에 각각 첨가하여 실온에서 1시간 배양하였다. PBS/Tween으로 네 번 세척한 후, hydroperoxidase-conjugated streptavidin(PharMingen, San Diego, CA, 2 μ g/ml in PBS/FBS/Tween)을 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하였다. Plate를 PBS/Tween으로 8회 세척하고 o-phenylenediamine(1 mg/ml in 0.1 M citrate buffer, pH 4.5)을 첨가하여 실온에서 20분간 배양하였다. 발색반응을 정지시키기 위해, 4 N H₂SO₄를 각 well에 첨가하였고, 490 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준 사이토카인의 흡광도는 희석요소에 대하여 plotting한 후 회귀 분석을 시행하고, 표본의 사이토카인 농도를 결정하였다.

7. 식균작용 측정

*P. gingivalis*에 대한 면역 후 혈청의 식균작용 검증은 이전에 설명한 방법^{23,24)}에 따라 시행되었다. 간략히 설명하면, *P. gingivalis*를 PBS에서 세척하고 DAPI(4', 6-diamidino- 2-phenylindole dihydrochloride, 1 mg/ml)에서 재현탁시켰다. Polymorphonuclear leukocyte(PMNL)를 말초혈액에서 분리하여 식균작용을 위해 사용할 목적으로 Hank's balanced salt solution(Life Technologies, Grand Island, NY)에서 재현탁시켰다. 혈청, 염색된 세균 세포, PMNL과 propidium iodide의 혼합물을 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 배양하였다. cytopsin후에 피검물을 고정하고 cyanoacrylate로 덮었다. 형광 현미경하에서, 식균작용에 참여하는 PMNL의 백분율(% PMNL)을 이전에 설명한 방법^{23,24)}에 따라 blind examiner에 의해 측정하였다.

8. Western blot analysis

간략히 기술하면, Laemmeli가 기술한 방법²⁵⁾에 따라 1 mm-thick 10% running gel을 이용하여 tall Minigel system(Hoeffer Scientific Company)에서 SDS-PAGE를 시행하였다. 5 % β -mercaptoethanol의

존재하에 100℃에서 10분간 변성시킨(denaturing) 상태이거나 80℃에서 10분간 부분 변성시킨 상태에서 단백 표본을 준비하였다. SDS-PAGE에 의해 분리한 후, semi-dry blot system을 이용 nitrocellulose 막에 단백을 옮겼다²⁶⁾. 막의 비점유 부위는 nonfat dry milk의 4.5% 수용성 현탁액으로 Block하였다. block 후, 막을 세척하고 Decaprobe(Hoeffer Scientific Company)에 넣고 4℃에서 밤새 해당 항혈청으로 처치하였다. 0.5 M NaCl과 0.1% Tween 20(세척 완충제)를 함유한 pH 7.5의 20 mM Tris buffer로 5~6회 세척후, 막을 peroxidaseconjugated goat anti-rabbit IgG로 실온에서 1시간동안 배양하였다. 막을 세척 완충제로 충분히 세척하고는 결합된 항체를 4-chloro-1-naphthol을 색조 형성 시약으로 사용하여

발색반응을 시켰다.

III. 연구 성적

1. T 세포 클로닝(cloning)과 표현형의 특성화

제2군과 제3군의 *P. gingivalis*-특이성 helper T 세포 클론은 각각 4개를 획득하였으며, 모두 CD4에 양성이었으며, 세포독성 T 세포(Tc) 표식자인 CD8에는 음성이었다(Table 1). *P. gingivalis*-특이성 T 세포 클론에서의 배양 상청액의 사이토카인 프로파일에 기초하여, 제2군 유래의 T 세포 클론은 IFN- γ 없이 다양한 양의 IL-4와 IL-10을 생산하는 helper T 세포 클론 type 2 subset이었고 반면에 제3군에서 유래한

Table 1. Phenotypes of *P. gingivalis*-specific T cell clones from Groups 2 and 3 based on the flow cytometric analysis

Groups	Clone No.	CD4	CD8	Th/Tc subsets*
Group 2	1	+	-	Th2
	2	+	-	Th2
	3	+	-	Th2
	4	+	-	Th2
Group 3	1	+	-	Th1
	2	+	-	Th1
	3	+	-	Th1
	4	+	-	Th1

* based on the cytokine concentration in Table 2

Table 2. Cytokine concentration of culture supernatants of *P. gingivalis*-specific T cell clones from Groups 2 and 3*

Groups	Clones	INF- γ	IL-4	IL-10
Group 2**	1	-	6.8	-
	2	-	7.9	4.2
	3	-	4.3	3.7
	4	-	3.2	1.9
Group 3**	1	8.3	-	-
	2	1.5	-	-
	3	5.3	-	-
	4	4.0	-	-

* cytokine concentration(ng/ml)

** Group 2 : immunized first with *F. nucleatum* and then with *P. gingivalis*,

Group 3 : immunized with *P. gingivalis* alone

T세포 클론은 IL-4나 IL-10 없이 상당량의 IFN- γ 를 생산하는 helper T 세포 클론 type1 subset이었다 (Table 2).

2. 세균 탐식작용 검증

P. gingivalis 381에 대한 면역 전과 면역 후 각각 IgG 역가와 평균 % PMNL을 표 3에 나타내었다. 면역 백서의 두 군에서 공히 면역 전과 대조군 IgG 역가와 비교시 실질적인 IgG 역가의 증가를 보였다 ($p < 0.01$). 비록 양 군간에 *P. gingivalis*에 대한 IgG 역가에서 통계적으로 유의성있는 차이는 없었지만,

제2군 백서의 평균 % PMNL은 제3군보다 유의성있게 높았다. *P. gingivalis* 381에 대한 면역후 IgG 역가의 % PMNL에 대한 상관관계를 도식화하고 회귀분석을 시도한 바, 제3군($r^2=0.82$)과 비교시 제2군($r^2=0.37$)에서 훨씬 미약하게 나타났다(Figure 1).

3. 면역 입양된 보조 T 세포 클론의 방어 기능

치사량의 *P. gingivalis*(1×10^{11} cells/mouse)를 복강내 주사하여 백서 각 군의 생존율을 결정하였는데, 대조군의 백서는 3일까지는 10마리 중 9마리가 사망하였다. Th1 클론으로 면역 입양된 백서 10마리중 8마

Table 3. Pre-immune and post-immune serum IgG titer against *P. gingivalis* 381(ELISA units \pm s.d) and the mean % PMNL

	IgG titer to <i>P. gingivalis</i> 381	
	pre-immune	post-immune
Group 1(N=10)	112.5 \pm 12.3	117.4 \pm 3.2
mean % PMNL	ND**	2.4 \pm 2.1
Group 2(N=10)	101.9 \pm 18.2	1243.8 \pm 131.5*
mean % PMNL	ND	16.5 \pm 12.1
Group 3(N=10)	105.3 \pm 10.0	1318.1 \pm 138.9*
mean % PMNL	ND	42.2 \pm 14.6 [@]

* significant higher than pre-immune serum IgG titer($p < 0.01$) or control group, and no statistical difference between Groups 2 and 3($p > 0.05$) by Students *t*-test

** ND: not determined

[@] significantly higher than Groups 1 or 2($p < 0.01$) by Students *t*-test

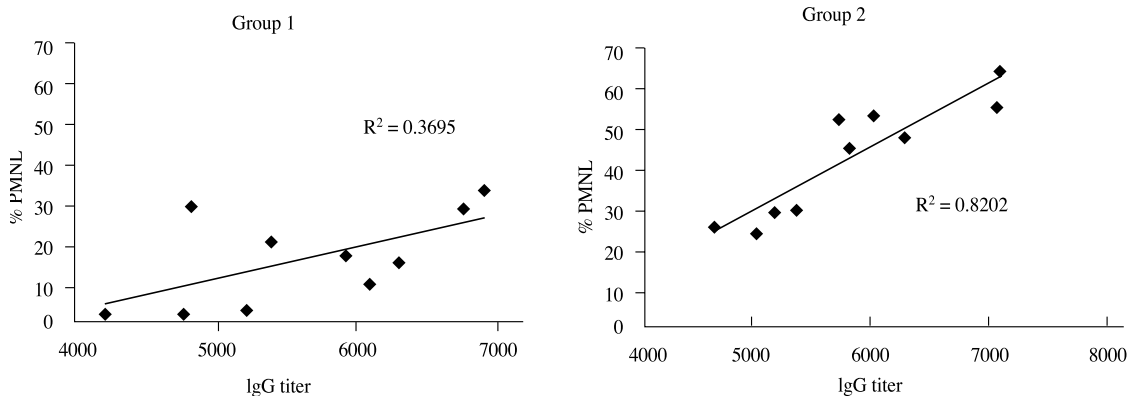


Figure 1. Plotting of linear relationship between anti-*P. gingivalis* IgG titers and opsonophagocytosis function of sera from groups 2 and 3

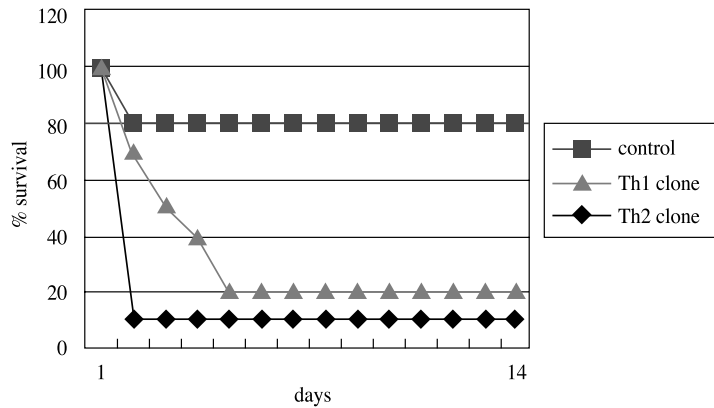


Figure 2. Survival rate of mice against the lethal dose of *P. gingivalis* which have been adoptively transferred with Th1 or Th2 clone derived group 2 or group 3, respectively.

리는 2주의 관찰 기간까지 생존한 반면, Th2 클론으로 입양된 백서에서는 2마리가 생존하였다(Figure 2).

4. Western blot analysis

P. gingivalis 전에 *F. nucleatum*으로 미리 면역시킨 제 2군 백서에서 얻은 면역 혈청은 단지 *P. gingi-*

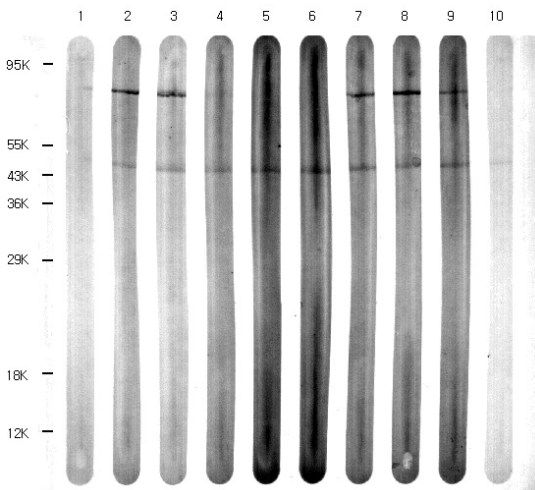


Figure 3. Western blot pattern of serum reaction with *P. gingivalis* fimbrial antigens. Upper band is 75-kDa and lower band is 43-kDa proteins, respectively. Lanes 1-3 and 7-9 denotes sera from group 3 and lanes 4-6 denotes from group 2, respectively.

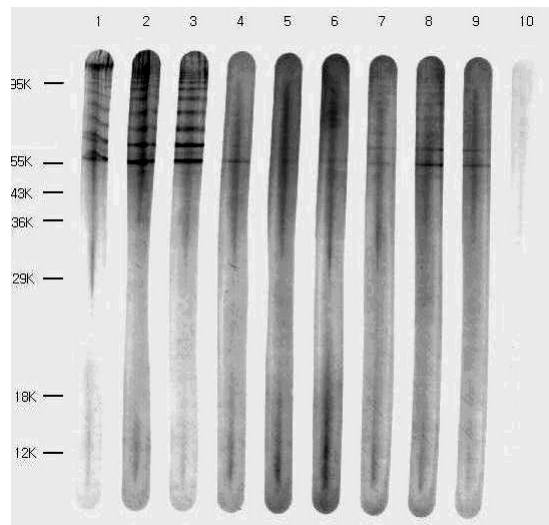


Figure 4. Western blot pattern of serum reaction with heat-dissociated *P. gingivalis* fimbrial antigens. Lanes 1-3 and 7-9 denotes sera from group 3 and lanes 4-6 denotes sera from group 2, respectively.

valis 43-kDa fimbrial protein과만 양성 반응을 일으켰다(Figure 3, lane 4-6). 그러나, *P. gingivalis*만으로 면역시킨 제 3군 백서의 혈청은 43-kDa와 75-kDa fimbrial protein에 공히 반응하였다(Figure 3, lane 1-3과 7-9). Fimbriae를 열변성시켜 항원으로 사용했을 때, 제 2군의 혈청은 부분적으로 변성된 native fim-

brial oligomer에 음성으로 반응하였다(Figure 4, lane 4-6). 대조적으로, 제3군의 혈청은 oligomer와 양성 반응을 나타내었다(Figure 4, lane 1-3, 7-9).

IV. 총괄 및 고안

T 세포 면역반응은 치주질환의 면역병원론에서 중요한 역할을 하는 것으로 간주되고 있다^{4,5,6}. T 세포 계통이나 클론에 관한 연구는 주로 *P. gingivalis*와 *A. actinomycetemcomitans*의 두 중요한 치주병인균에 집중되어 왔다. *P. gingivalis* 특이성 T 세포 계통이나 클론은 PBL과^{27,28,29} GMC에 의해^{29,30,31,32,33,34} 다양한 양의 IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6과 IL-10을 생산하는 T 세포 분화(polarization)에서의 이종(heterogeneity)을 나타냈다. 여러 저자에 따라 일치하지 않는 관찰을 제시하였으며^{30,31}, 다른 세균은 인간 PBL과 GMC의 다른 subsets을 자극한다고 주장하고 있다. 우리는 *P. gingivalis*에 앞선 *F. nucleatum*의 감염은 *P. gingivalis* 특이성 T 세포 분화에 왜곡을 일으킨다는 점을 관찰해 왔다²¹.

*F. nucleatum*과 *P. gingivalis*의 독성에 있어서의 상승적 상호작용이 동물 모델을 통해 살펴져 왔다^{17,18,19,35}. 이 상승작용은 이들 유기체간의 상호응집 효과에 의한 것으로 설명될 수 있으며, *F. nucleatum*은 *P. gingivalis*에 대한 면역 변조기능을 하는 것으로 제시되었다¹⁸. 우리는 *F. nucleatum*이 *P. gingivalis* 특이성 T 세포의 Th2 표현형으로의 분화를 왜곡시킴으로서 활성 질병과정에서 관여하고 있다는²¹ 또 다른 기전을 관찰해 왔다. *F. nucleatum*의 교차반응 항원(cross-reaction antigen)에 사전 감지되었던 기억 T 세포는 *P. gingivalis*에 대한 방어능력이 부적합한 *P. gingivalis* 특이성 보조 T 세포로 이행된다고 가정할 수 있다. 이러한 관찰에 기초하여, 우리는 백서에 면역입양시킨 Th1과 Th2 subset의 체내 방어 능력을 검사하는데 관심을 쏟았다. *P. gingivalis* 특이성 Th1 클론은 유기체의 치사량을 주사하였을 때 방어 역할을 해냄을 보여 주었다. 이러한 개념은 일부 학자들과는 일치하고^{5,36}, 일부에서는 상반된다^{37,38,39}. 본 결과는 *P. gingivalis* 특이성 subset가 기능

적으로 방어적임을 제시한다.

*F. nucleatum*의 사전 면역은 또한 *P. gingivalis*에 대한 옥소닌식작용 기능을 방해하였다. 이는 단일 병인균에 면역된 동물에서 유래한 혈청과는 달리, 다수의 병인균에 감염된 치주환자에서 유래한 혈청에서는 빈번히 방어적 기능이 적정수준이하를 보인다는 점을 부분적으로 설명해준다. *P. gingivalis* 특이성 보조 T 세포가 부적절한 기능성을 가진 Th2 subset으로 왜곡시킨다는 점에 추가하여, 이 현상은 치은염에서 파괴적인 치주염으로 전환되는 과정에서 *F. nucleatum*의 또다른 면역 일탈 기전을 증명하고 있다.

분자 수준에서 *F. nucleatum*의 면역 변조 효과를 규명하려는 시도로서, 우리는 파괴적인 치주염에서 immunodominant antigen으로 널리 알려져 있는 *P. gingivalis*의 fimbrial protein에¹⁰ 대한 두 군의 혈청의 항원 인지에 있어서의 차이를 조사하였다. *P. gingivalis*에 앞서 *F. nucleatum*으로 면역시킨 백서로부터 얻은 면역 혈청은 *P. gingivalis*의 43-kDa fimbrial protein만 양성으로 반응하였다. 그러나, *P. gingivalis*만으로 면역시킨 백서로부터의 혈청은 43-kDa와 75-kDa fimbrial protein에서 모두 양성으로 반응하였다. Fimbriae를 열변성시켜 항원으로 사용시, 75-kDa protein에게만 반응했던 혈청은 부분적으로 변성된 native fimbrial oligomer와 음성반응을 나타냈다. 반대로, 제3군의 혈청은 oligomer와 양성반응하였다. 75-kDa fimbrial protein과 반응한 혈청만이 heat-dissociated oligomer와 양성반응을 보이는 점이 흥미롭다. 제3군에서의 혈청이 유의성있게 높은 수준의 옥소닌식작용 기능을 보인 사실을 고려할 때, 43-kDa와 75-kDa fimbrial protein 모두의 항원 인지는 *P. gingivalis* 감염에 대한 혈청의 방어 기능에 중요한 것으로 여겨진다. 또한 *F. nucleatum*으로 면역 세포를 사전 감지시키는 것은 *P. gingivalis* 75-kDa fimbrial protein에 대한 항원 인지의 일탈을 초래한다. 이것이 치은염을 파괴적인 치주염으로 전환시키는 *F. nucleatum*의 기전중의 하나인 지는 불명확하다. 이 개념은 *P. gingivalis*의 75-kDa fimbrial antigen이 기능적으로 부적합하다는 다른 보고¹⁰와 대립

된다.

이상의 모든 점을 고려할 때, 핵심적인 치주 병원균에 우선한 단일 또는 다수의 병원균의 치은 연하에서의 집락이 *P. gingivalis*에 대한 숙주 면역 반응을 체액성, 세포성 그리고 분자 수준에서 변조시킬 수 있는 것으로 사료된다. 이 개념은 치주질환의 병인적 기전을 이해하고 치주 백신을 고안하는데 있어서 진지하게 고려되어야 한다.

V. 결론

동물을 이용한 치주병원균 연속면역실험을 통해 한 종류의 세균에 의한 사전 감염을 2차적인 상이한 세균에 대한 세포성 면역과 체액성 면역의 변화를 초래하는 조절기능을 나타냄을 보여 주었다. 이 조절기능은 2차 감염세균에 대한 항체의 항원인자 변화와 식균능력의 감소로 나타났고, T 임파구의 극화의 변위를 초래하는 것으로 나타났다.

VI. 참고문헌

1. Caton, J. : Periodontal Diagnosis and Diagnostic Aids. In: Nevins M, Becker W, Kornman K, eds. Proceedings of The world Workshop in Clinical Periodontics. Chicago: American Academy of Periodontology I-I-22, 1989.
2. Astemborski, J.A., J.A. Boughman, P.O. Myrick, S.B. Goodman, R.K. Woolen, S. Agarwal, J.W. Vincent, and J.B. Suzuki : Clinical and laboratory characterization of early onset periodontitis. J. Periodontol. 61: 557-563, 1989.
3. Ranney, R.R. : Diagnosis of periodontal diseases. Adv. Dent. Res. 5:21-36, 1994.
4. Ebersole, J.I., nad M.A. Taubman : The protective nature of host response in periodontal disease. Periodontol. 2000. 5: 112-141, 1994.
5. Gemmell, E., and G.J. Seymour : Modulation of immune responses to periodontal bacteria. Curr. Opin. Periodontol. 2: 28-38, 1994.
6. Taubman, M.A., J.W. Eastcott, H. Shimauchi, O. Takeichi, and D.J. Smith : Modulatory role of T Lymphocytes in Periodontal Inflammation In: Genco R, Hamada S, Lehner T, McGhee J, Mergenhagen S, ed. Molecular Pathogenesis of periodontal Disease. Washington, DC: American Society for Microbiology, 147-157, 1994.
7. Baker, P.J., S. Carter, M. Dixon, R.T. Evans, and D.C. Roopenian : Serum antinody response to oral infection precedes but does not prevent *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss in mice. Oral. Microbiol. Immunol. 14: 194-196, 1999.
8. Sjostrom, K., R. Darveau, R. Page, C. Whitney, and D. Engel : Opsonic antibody activity against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in patients with rapidly progressive periodontitis. Infect. Immun. 60: 4819-4825, 1992.
9. Whitney, C.J. Ant, B. Mocla, B. Johnson, R.C. Page, and D. Enge : Serum immunoglobulin G antibody to *Porphyromonas gingivalis* in rapidly progressive periodontitis: titer, avidity, and subclass distribution. Infect. Immun. 60: 2194-2200, 1992.
10. Evans, R. T., B Clausen, H. Sojar, G. C. Bedi, C. Stintescu, N.S Ramamurthy, L.M. Golub, and R.J. Genco : Immunization with *Porphyromonas gingivalis* fimbriae protects against periodontal destruction. Infect. Immun. 60: 2926-2935, 1992.
11. Bolstad, A.I., H.B. Jensen, and V. Bakken : Taxonomy, biology, and perodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. Clin. Microbiol. Rev. 9: 55-71, 1996.
12. Moore, W.E. : Mirobiology of periodontal disease. J. Periodont. Res. 22: 335-341, 1987.
13. Moore, W.E., and L./V. Moore : The bacteria of periodontal diseases. Periodontol. 2000 5: 66-77, 1994.
14. Bolstard, A.I., J. Tommassen, and H.B. Jensen :

- Sequence variability of the 40-kDa outer membrane protein of *Fusobacterium nucleatum* and a model for topology of the proteins Mol. Gen. Genet, 244: 104-110, 1994.
15. Kolenbrander, P.E., and J. London : Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. J. Bacteriol. 175: 3247-3252, 1993.
 16. Marsh, P.D., D.J. Bradshaw, G.K. Watson, and C. Allison : Role of *Fusobacterium nucleatum* in anaerobe survival in microbial communities. J. Dent. Res. 76: 226(Abstr #1700), 1997.
 17. Brook I., and I. Walker : The relationship between *Fusobacterium* species and other flora in mixed infection. J. Med. Microbiol. 21: 93-100, 1986.
 18. Feuille, F., J.L. Ebersole, L. Kesavalu, M.J. Stefan, and S.C. Holt : Mixed infection with *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* in a murine lesion model: potential effects on virulence. Infect. Immun. 64: 2094-2100, 1996.
 19. Gemmell, E., and G.J. Seymour : Interleukin 1, interleukin 6 and transforming growth factor- β production by human gingival mononuclear cells following stimulation with *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. J. Periodont. Res. 28: 122-129, 1993.
 20. Tew, J.G., S.S. Thomas, and R.R. Ranney : *Fusobacterium nucleatum*-mediated immunomodulation of in vitro secondary antibody response to tetanus toxoid and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J. Periodont. Res. 22: 506-512, 1987.
 21. 전수경, 김성조, 최점일 : 상이한 치주병원균의 연속적 인공면역에 대한 세포성 및 체액성 면역 반응에 대한 동물실험적 연구. 대한치주과학회지(투고중), 2000.
 22. Choi, J.I., R.E. Schifferle, F. Yoshimura, and B.W. Kim : Capsular polysaccharide- fimbrial protein conjugate vaccine protects against *Porphyromonas gingivalis* infection in SCID mice reconstituted with human peripheral blood lymphocytes. Infect. Immun. 66: 391-393, 1998.
 23. Cutler, C.W., R.R. Amold, and H.A. Schenkein : Inhibition of C3 and IgG proteolysis enhances phagocytosis of *Porphyromonas gingivalis*. J. Immunol 151: 7016-7029, 1993.
 24. Genco, C.A., R.E. Schifferle, T. Njoroge, R.Y. Forng, and C.W. Cutler : Resistance of a Tn4351-generated polysaccharide mutant of *Porphyromonas gingivalis* to polymorphonuclear leukocyte killing. Infect. Immun. 63: 393-401, 1995.
 25. Laemmli, U.K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature(London) 227: 680-685, 1970.
 26. Towbin, H., T. Staehelin, T., and J. Gordon : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350-4354, 1979.
 27. Gmmell, E., M. Kjeldsen, K. Yamazaki, T. Nakajima, M.J. Aldred, and G.J. Seymour : Cytokine profiles of *Porphyromonas gingivalis*-reactive T lymphocyte lines and clones derived from *P. gingivalis*-infected subjects. Oral Dis. 1: 139-146, 1995.
 28. Mahanonda, R., S. Prachaney, and S. Tirawatanpong : Cytokine profiles of *Porphyromonas gingivalis*-reactive T cell lines from periodontitis patients. J. Dent. Res. 76: 230(Abstr #1732), 1997.
 29. Yamazaki, Y, T. Nakajima, Y. Kubota, E. Gemmell, G.J. Seymour, and K. Hara : Cytokine messenger RNA expression in chronic inflammatory periodontal disease. Oral Microbiol. Immunol. 12: 281-287, 1997.
 30. Fujihashi, K., K.W. Beagley, Y. Kono, W.K. Aicher, M. Yamamoto, S. DiFabio, J. Xu-Amano

- J, J.R. McGhee, and H. Kiyono : Gingival mononuclear cells from chronic inflammatory periodontal tissues produce IL-5 and IL-6, but not IL-2 and IL-4. *Am. J. Pathol.* 142: 1239-1250, 1993.
31. Fujihashi, K., M. Yamamoto, J.R. McGhee, and H. Kiyono : Type 1/type2 cytokine production by CD4⁺ T cells in adult periodontitis. *J. Dent. Res.* 73: 204(Abstr #818), 1994.
 32. Gemmell, E., B. Feldner, and G.J. Seymour : CD45RA and CD45RO positive CD4 cells in human peripheral blood and periodontal disease tissue before and after stimulation with periodontopathic bacteria. *Oral Microbiol. Immunol.* 7: 84-88, 1992.
 33. Manhart, S.S., R.A. Reinhardt, J.B. Payne, G.J. Seymour, E. Gemmell, J.K. Dyer, and T.M. Petro : Gingival cell IL-2 and IL-4 in early-onset periodontitis. *J. Periodontol.* 65: 807-813, 1994.
 34. Yamazaki, Y, T. NakaJima, E. Gemmell, B. Polak, G.J. Seymour, and K. Hara : IL-4 and IL-6 producing cells in human periodontal disease tissue. *J. Oral. Pathol. Med.* 23: 347-353, 1994.
 35. Ebersole, J.L., F. Feuille, L. Kesavalu, and S.C. Holt : Host modulation of tissue destruction caused by periodontopathogens: effect on a mixed microbial infection composed of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. *Micro. Pathog.* 23: 23-32, 1997.
 36. Gemmell, E., R.I. Marshall, and G.J. Seymour : Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol.* 2000 14: 112-143, 1997.
 37. Kawai, T., M.E. Wilson, T. Nagasawa, H. Watanabe, J.W. Eastcott, D.J. Smith, and M.A. Taubman : Adoptive transfer of cloned antigen-specific Th1 lymphocytes produces periodontal bone loss. *J. Dent. Res.* 76: 231(Abstr #1738), 1997.
 38. Shimauchi, H., M.A. Taubman, J.W. Eastcott, and D.J. Smith : Migration of Th1 and Th2 Aa-specific clones into infected and noninfected gingival tissues. *J. Dent. Res.* 72: 243 (Abstr #1121), 1993.
 39. Yamashita, K., J.W. Eastcott, M.A. Taubman, D.J. Smith, and D.S. Cox : Effect of adoptive transfer of cloned *Actinobacillus actinomycetemcomitans*- specific T helper cells on periodontal disease. *Infect. Immun.* 59: 1529-1534, 1991.

Prior Exposure of Mice to *Fusobacterium Nucleatum* Modulates Host Response to *Porphyromonas Gingivalis*

Han-Yong Son, Sung-Jo Kim, Jeom-Il Choi

Department of Periodontology, College of Dentistry, Pusan National University

Multiple periodontal pathogens sequentially colonize the subgingival niche during the conversion from gingivitis to destructive periodontal disease. An animal model of sequential immunization with key periodontal pathogens has been developed to determine whether T and B lymphocyte effector functions are skewed and fail to protect the host from pathogenic challenge. The present study was performed to evaluate immunomodulatory effect of exposure to *Fusobacterium nucleatum*(*F. nucleatum*) prior to *Porphyromonas gingivalis*(*P. gingivalis*). Group 1(control) mice were immunized with phosphate-buffered saline, Group 2 were immunized with *F. nucleatum* prior to *P. gingivalis*, while Group 3 were immunized *P. gingivalis* alone. All the T cell clones derived from Group 2 demonstrated type 2 helper T cell clone(Th2 subsets), while those from Group 3 mice demonstrated Th1 subsets. Exposure of mice to *F. nucleatum* prior to *P. gingivalis* interfered with opsonophagocytosis function of sera against *P. gingivalis*. In adoptive T cell transfer experiments, in vivo protective capacity type 2 helper T cell clones(Th2) from Group 2 was significantly lower than type 1 helper T cell clones(Th1) from Group 3 against the lethal dose infection of *P. gingivalis*. Western blot analysis indicated the different pattern of recognition of *P. gingivalis* fimbrial proteins between sera from Group 2 and Group 3.

In conclusion, these study suggest that colonization of the subgingival niche by *F. nucleatum* prior to the periodontal pathogen, *P. gingivalis*, modulates the host immune responses to *P. gingivalis* at humoral, cellular and molecular levels.