상이한 치주병원균의 연속적 인공면역에 대한 세포성 및 체액성 면역반응에 대한 동물실험적 연구

전수경 · 김성조 · 최점일

부산대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

T 림프구 면역 반응은 치주질환의 면역병리기전에 중요한 역할을 한다[1-3] . T 세포 line 또는 클론에 대한 연구는 주로 *Porphyromonas gingivalis*(*P. gingivalis*)와 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*(*A. actinomycetemcomitans*)의 두가지 중요한 치주병원균에 집중되었다. 건강한 사람과 치주질환을 가진 사람에 있어 말초혈액 림프구(peripheral blood lymphocytes)와 치은조직 단핵구에서 분리한 T 림프구의 표현형에 대한 연구가 광범위하게 진행되었다[1,3,4] . Ishii 등[5]은 일반적으로 CD4 양성/CD8 양성 *P. gingivalis*-특이성 T세포의 상대적인 비율이 성인형 치주염 환자의 말초혈액 림프구에서 감소한다고 보고하였고, 이러한 현상은 Gemmell 등[4]에 의하면 치주병변의 치은조직 단핵구에서도 나타났다. 그러나 이 비율은 건강한 사람이나 변연성 치은염, 성인형 치주염 모두에서 차이가 없었다[7]. Gemmell 등[4]은 건강한 사람에서는 말초혈액 임파구의 60%가 CD4 양성이었고, *P. gingivalis*의 감염 후에도 memory T 림프구의 표현형에 있어서는 변화가 없었다고 하였다[8].

P. gingivalis-특이성 T 세포 line이나 클론의 분극과 사이토카인 생성 양상에 대한 연구에서, 말초혈액 림프구[9-11]와 치은조직 단핵구[8,11-13]가 다양한 INF-γ, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10등을 생성함으로써 T 림프구 분극의 이종형을 나타내었다. 이렇게 학자에 따라 다른 결과를 보고하고 있는 이유는[12,13] 상이한 세균이 각각 상이한 아류의(subsets) 말초혈액 림프구와 치은조직 단핵구를 자극했기 때문인 것으로 생각된다.

A. actinomycetemcomitans-특이성 helper T 세포 subset의 adoptive transfer model에 근거해[14-16] 저자들은 helper T 세포 클론 type 2(Th2)의 방어기능과 helper T 세포 클론 type 1(Th1)의 파괴기능에 관련이 있다고 주장하였다. 이는 치주질환에 있어 *P. gingivalis*-특이성 Th1 또는 Th2의 상호 반대 기능을 주장한 학자들과 상반되는 이론이다[2,4]. 치주질환은 다양한 원인 요소에 의한 치주파괴의 복잡한 임상증상으로 특징 지워진다[17]. 치아, 치은부의 복잡한 세균들은 미생물학적, 면역학적 견지에서 병리 기전이 특이하고 복잡한 형태를 구성한다[18,19]. 이러한 요인들이 T 림프구의 다양한 반응을 유발해서 성인형 치주염을 가진 환자의 말초혈액 림프구나 치은조직 단핵구가 다양한 사이토카인을 분비하는 subset의 양분화현상(dichotomy)을 초래하게 되기 때문이다. 치은연하 세균의 연속적 감염과 우연성(episodic) 파괴과정이 감염세균에 대한 T 세포 특이성 발현에 영향을 미칠 것이라고 추정된 바 있다[1]. 그러므로 동물을 이용한 연속적 감염에서 사이토카인 분비양상을 가진 T세포 표현형의 특이한 발현을 관찰하는 것이 필요하다.

*Fusobacterium nucleatum(F. nucleatum)*은 치은염과 치은염에서 치주염으로 전환되는 시기, 그리고 성인형 치주염의 핵심이 되는 주요 치주병원균 중의 하나이다[20-22]. 또한 치은연하 뿐만 아니라 biofilm[23]에서 다른 중요한 세균들과의 공동집락에 핵심적인 역할을 하고[20,24,25] 특히 사람의 치주질환 또는 동물실험에서 독성의 상승 효과를 갖는다[26-28]. 뿐만 아니라 *F. nucleatum*은 *A. actinomycetemcomitans*에 대한 숙주의 2차적인 면역반응에 대해서 조절기능을 가진다고 보고된 바 있다[29].

중기와 후기 세균집락군(intermediate and late colonizers)간에 연속적 세균군집과 세균간 집락 등이 부분적으로 숙주의 면역반응과 치주병소의 세균특이성 T 세포 표현형의 발현에 영향을 미칠 것이라고 추정된다. 본 연구는 동물을 실험모델로 사용하여 *F. nucleatum*과 *P. gingivalis*를 단일면역 또는 연속적 면역에 의한 T 세포 반응과 체액성 면역반응을 관찰하기 위해 시행되었다.

II. 연구대상 및 방법

1. 세균의 증식 및 유지

F. nucleatum ATCC 10953(American type Culture Collection, Manassus, VA)와 *P. gingivalis* 381(Dr. Schifferle, SUNY at Buffalo, Buffalo, NY)을 hemin(5 ㎍/㎖)과 menadion(0.5㎍/㎖)이 첨가된 tryptic soy broth(Difco, Detroit, MI) 또는 blood agar plate에 혐기성으로 배양 및 유지시켰다. 세균세포를 꺼내어 phosphate bufferedsaline(PBS)로 3회 세척하여 T 세포를 자극하기 위한 항원으로 사용하였다.

2. 세균세포에 의한 쥐의 면역

배양된 세균세포를 수거하여 미리 환원된 ½ 강도의 링거액으로 3회 세척한다. Balb/c를 무병원균 동물사육용 cage에서 사육하였다. 10마리 Balb/c 쥐는 PBS를 복강내 주사해 대조군으로 설정하였다(1군). 10마리의 Balb/c 쥐는 *F. nucleatum* 5×10^8개를 2주 간격으로 두 번, 그리고 연속해서 *P. gingivalis* 5×10^8개를 2주 간격으로 두 번 복강 내로 주사해서 면역시켰다(2군). 10마리의 Balb/c 쥐는 *P. gingivalis* 5×10^8개를 2주 간격으로 두 번 면역시켜 제 3군으로 하였다. tail bleeding으로 쥐의 말초혈액을 면역 전후에 각각 채득하여 혈청을 분리한 후 섭씨 -20도에 냉동 보관하였다.

3. P. gingivalis-특이성 T 세포 line과 클론의 확립

최종 면역 7일 후 쥐의 비장을 분리해서 T 림프구 enrichment column(R&D System, Minneapolis, MN)을 이용해 T세포를 분리 정제시켰다. 정제한 T 림프구(1×10^6 cell/well in 24-well plate)를 RPMI 1640(Lefe Technologies)에 10% fetal bovine serum(FBS)과 Penicillin/Streptomycin(각각 100 unit/ml 및 100 micrograms/ml)을 첨가한 배양용액(이하 RPMI/FBS+PS라 함)을 이용하여 배양하고 항원으로 *P. gingivalis*와 방사선으로 조사된(2500 rads) 비면역 비장세포를 항원전달세포(antigen presenting cell, 5×10^6 cell/well)로 첨가하여 자극시켰다. 2주간 배양 후 T 림프구를 세척해서 항원전달세포나 세균항원을 첨가하지 않고 1주간 휴지기를 가진 후에 항원전달세포와 세균항원을 다시 첨가해 T 림프구 증식을 유도하였다. 자극기와 휴지기를 교대로 해서 *P. gingivalis*-특이성 T 세포 line을 수립한다. 클론닝을 목적으로 항원전달세포(5×10^6 cell/well)와 *P. gingivalis*(1×10^7 cell/well)를 첨가한 96-well plate를 이용하여, 각 well 당 T 세포 line에서 얻은 T 림프구를 각각 1,3,10 cells/well씩 첨가하여 2주간 자극하였다. 24 replicates 중 T 림프구 증식을 보이는 것을 선택하여 6-well culture plate로 증폭시켰다. 72시간동안 증폭 한 후 T 림프구를 수거하여 활성을 보이는 T 세포 클론에 대한 표현형 검사를 시행하였다. 동시에 배양 상등액을 수거하여 T 림프구 사이토카인 농도를 분석하기 위해 -20 ℃에 냉동 보관하였다.

4. T세포의 증식 분석

96-well plate에 각각의 클론된 T림프구(1×105 cell/well)를 RPMI 1640/FBS+PS에서 배양하고 여기에 각각 F. nucleatum(1×10^5-1×10^8개/well)과 P. gingivalis(1×10^5-1×10^8개/well)를 첨가하였고, 항원전달세포로서 방사선 조사된 비장세포(2,500 rads, 1×106 cell/well)를 첨가하였다. 배양 72시간 후 3H-thymidine(1 μCi/well)을 첨가해서 세포를 24시간 더 배양하고 방사선동위원소 활성도를 측정하였다.

5. T세포 클론의 표현형

P. gingivalis-특이성 T 세포 클론을 FITC-conjugated rabbit anti-mouse CD4 또는 CD8 monoclonal antibody(Pharmingen, San Diego, CA)와 FITC-conjugated rabbit anti-mouse αβT cell receptor(TCR) 또는 γδ-T cell receptor monoclonal antibody (Pharmingen, San Diego, CA)로 염색하였다. 각 T 세포 클론의 표현형적 특성은 flow cytometry (Coulter Epics Elite XL Cytometry, Coulter, Hialeah, FL)를 이용하여 검사하였다.

6. ELISA를 이용한 혈청 IgG 항체 역가의 측정

쥐의 혈청 IgG 역가는 이전에 보고된 것의 약간 변형된 방법으로 측정하였다[51]. 96-well plate를 이용하여 *P. gingivalis* 혹은 *F. nucleatum*의 세균세포를 100 ㎕씩 triplicate로 코팅한 4℃에서 하루 밤동안 배양시킨 후 0.05% Tween 20을 함유한 PBS로 3회 세척하였다. PBS/Tween에 희석시킨 50㎕의 쥐의 혈청 샘플을 1:50으로 희석한 다음 각 well에 넣어서 실온에서 2시간 배양시킨 후 PBS/Tween으로 3회 세척하고 100㎕의 peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG(H+L)(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)를 각 well에 첨가해서 실온에서 2시간 배양하였다. PBS/Tween으로 3회 세척한 후 100㎕의 tetramethylbenzidine(1 mg/ml)을 각 well에 첨가해서 실온에서 15분간 배양한 후 반응을 중지시키기 위해 100㎕의 0.18M H_2SO_4를 첨가하였다. 450㎚의 파장에서 흡광도(optical density)를 측정하여 혈청희석 배율과의 회귀분석을 시행하였다. 대조군 혈청 중 하나를 ELISA unit 100으로 지정하고 다른 대조군과 실험군의 혈청 IgG 역가를 회귀분석을 이용하여 산출하였다. 각 군간의 항체수준을 통계적으로 비교하기 위해 paired Student's *t*-test를 시행하였다.

7. T 세포 사이토카인 농도의 측정

클론된 T 세포를 항원전달세포 및 *P. gingivalis* 항원으로 72시간 동안 자극하여 배양액을 채득한 다음 배양액내의 사이토카인 수준을 ELISA를 이용해서 측정하였다. 96-well plates를 4℃에서 하룻밤 동안 sodium carbonate buffer에 희석시킨 rat anti-mouse INF-γ, IL-4 혹은 IL-10으로 각각 coating하였다. PBS/Tween으로 3회 세척한 후 PBS/FBS로 실온에서 30분간 blocking 한 다음 PBS/Tween으로 다시 3회 세척하였다. PBS/FBS + 0.05% Tween 20에 희석한 각 표본과 standard recombinant mouse IFN-γ, IL-4 또는 IL-10을 각각 첨가하여 실온에서 3시간동안 배양시킨 다음 PBS/Tween로 3회 세척하였다. biotinylated rat anti-mouse INF-γ, IL-4 또는 IL-10을 각각 첨가해 실온에서 1시간동안 배양시킨 후 PBS/Tween으로 4회 세척한 다음 hydroperoxidase-conjugated streptavidin을 첨가해서 37℃에 30분간 배양하였다. PBS/Tween으로 8회 세척한 후 o-phenylenediamine(1㎎/㎖ in 0.1M citrate buffer, pH 4.5)를 첨가하여 실온에서 20분간 배양하고 발색반응을 중지시키기 위해 4N H_2SO_4를 각 well에 넣고 490㎚파장에서 흡광도를 측정하였다. Standard 사이토카인의 희석비와 흡광도에 대한 회귀분석을 시도하고 이를 이용하여 각 표본의 사이토카인 농도를 산출하였다.

III. 연구성적

1. T 세포 cloning과 클론의 표현형 특성

*F. nucleatum*과 *P. gingivalis* 순으로 면역된 제 2군에서 *P. gingivalis*-특이성 T 세포클론 6개와 *P. gingi-*

Table 1. Cytokine concentration of culture supernatants of *P. gingivalis*-specific T cell clones from Groups 2 and 3*

Groups	Clone No.	INF-γ	IL-4	IL-10
Group 2**	1	-	11.2	4.6
	2	-	3.5	2.4
	3	-	8.4	4.6
	4	-	10.7	4.0
	5	-	1.9	2.4
	6	-	9.3	3.1
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

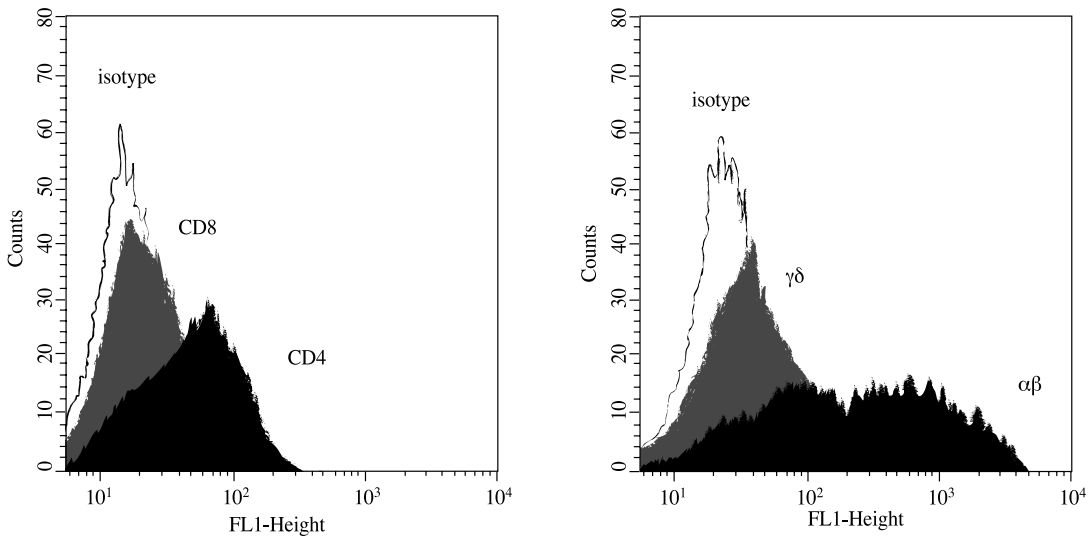


Figure 1. Flow cytometric analysis of *P. gingivalis*-specific T cell clones for CD4 or CD8 positivity(왼쪽), and αβ- or γδ-TCR(오른쪽).

*valis*만으로 면역시킨 제 3군에서 *P. gingivalis*-특이성 클론 4개를 얻었다. 제2군과 3군의 *P. gingivalis*-특이성 T 세포클론은 모두 helper T 세포(CD4)에 양성인 반면 cytotoxic T 세포(CD8)에 음성반응을 나타냈고(Figure 1의 왼쪽 사진), αβ-TCR에 양성반응, γδ-TCR에 음성 반응을 나타냈다(Figure 1의 오른쪽 사진). 쥐의 INF-γ, IL-4 또는 IL-10의 농도는 Table 1에 나타나 있는 바 제2군의 T 세포클론의 배양액은 다양한 양의 IL-4와 IL-10을 분비하였고, INF-γ는 분비하지 않은 반면, 제3군에서는 상당량의 INF-γ를 분비하고 IL-4나 IL-10은 분비하지 않았다(Table 1). 사이토카인 분비양상에 근거해 보면 제 2군에서 획득한 *P. gingivalis*-특이성 T 세포클론은 Th2 표현형인 반면 제 3군의 것은 Th1 표현형이었다(Table 2).

Table 2. Phenotype of T cell clones and T cell receptors obtained from Groups 2 and 3

Groups	Th1/Th2	T-cell receptor
Group 2*	Th2	αβ
	Th2	αβ
	Th2	αβ
	Th2	αβ
	Th2	αβ
	Th2	αβ
Group 3*	Th1	αβ
	Th1	αβ
	Th1	αβ
	Th1	αβ

* Group 2 : immunized first with *F. nucleatum* and then with *P. gingivalis*
Group 3 : immunized with *P. gingivalis* alone

2. *P. gingivalis 381*과 *F. nucleatum* 10953에 대한 혈청 IgG 항체 역가

Table 3에 나타나 있는 바와 같이 면역 후 제 2군과 제 3군의 쥐의 혈청 IgG는 *P. gingivalis* 381에 대해 각각 975.0±23.8, 1092.4±27.1이었고, *F. nucleatum* 10953에 대해 각각 844.0±28.3, 941.3±23.3으로서 면역 전에 비해 유의성있게 상승하였다 ($p < 0.01$).

3. T 세포 증식에 관한 분석

제 2군에서 얻은 T 세포 클론은 *P. gingivalis*나 *F. nucleatum*으로 자극하였을 때 방사선 활성도가 3,119에서 13,451의 범위에서, 제 3군에서 얻은 T 세포 클론은 4,116에서 10,117까지 다양한 증식반응을 나타냈다(Table 4). 제 2군과 제 3군의 T 세포클론은 Table 4에서 보는 바와 같이 모두 두 종류의 세균에 대해 상당한 교차성 증식반응을 나타냈다.

IV. 총괄 및 고안

F. nucleatum 10953과 *P. gingivalis* 381에 순서적으로 면역된 제2군의 쥐로 부터 *P. gingivalis*-특이성 T 세포 클론 6개와 *P. gingivalis* 381만으로 면역된 제3군의 쥐로부터 4개 클론을 얻었다. 각 T 세포 클론의 표현형은 모두 CD4에 양성이고 CD8에는 음성으로 나타나 helper T 세포임을 시사하였다. 배양 상등액내의 사이토카인 프로필을 분석하였는 바, 제2군에서 얻은 T 세포클론은 다양한 양의 IL-4와 IL-10을

Table 3. Serum IgG titer to *P. gingivalis* 381 or *F. nucleatum 10953*(ELISA units± s.d.) of preimmune and immune mice

Groups	Ig G to *P. gingivalis* 381		Ig G to *F. nucleatum* 10953	
	Pre-immune	Post-immune	Pre-immune	Post-immune
Group 1 (n=10)	104.5±11.2	ND**	106.1±10.8	ND**
Group 2 (n=10)	101.1±14.7	975.0±23.8***	114.0±15.0	844.0±28.3***
Group 3 (n=10)	105.6±15.6	1092.4±27.1***	96.9±11.5	941.3±23.3***

* mean IgG antibody *titers* s.d. from repeated experiments
** ND : not determined
*** significantly higher than pre-immune serum IgG levels
($p < 0.01$ by the Students *t*-test)

Table 4. *In vitro* proliferating responses of *P. gingivalis*-specific T cell clones to *P. gingivalis* and *F. nucleatum* antigens*

Group	Clones	Antigens							
		P.gingivalis 381		*F. nucleatum* 10953		Control 1**		Control 2***	
Group 2	1	6,566	189	4,127	133	212	24	332	28
	2	13,451	576	9,112	327	420	31	449	58
	3	7,234	473	3,119	298	229	43	421	46
	4	7,161	329	8,328	457	267	92	816	79
Group 3	1	5,317	633	4,116	121	451	81	611	70
	2	9,481	535	4,192	182	539	87	539	87
	3	10,117	287	9,254	223	321	122	326	75

* unit expressed as mean counts per minute of triplicate measurements ± s.d.

** control 1 indicates only culture medium was used for stimulation of T cells

*** control 2 indicates T cells stimulated with *Streptococcus mutans*

분비함으로써 type 2 subset로, 제3군에서는 IL-4와 IL-10을 분비하지 않고 상당량의 INF-γ를 분비하는 type 1 subset로 각각 분극이 일어남을 보여주었다. 성인형 치주질환자의 말초혈액 림프구 또는 치은조직 단핵세포로 부터 유래된 *P. gingivalis*-특이성 T 세포클론은 상이한 사이토카인 프로필을 가진 type 1 또는 type 2 helper T 세포클론의 subset로 분극됨이 보고되었다. 예를 들어 rat를 이용한 *P. gingivalis* 감염 실험에서 *P. gingivalis*-특이성 T 세포클론은 Th1 표현형이었다[30]. 최근에 Gemmell 등[31]도 Balb/c를 이용한 실험에서 *P. gingivalis* 외막 항원으로 면역시킬 경우, 비장의 T 세포가 INF-γ를 생산함으로써 독특한 Th1 subset로의 극화를 나타내는 것이다. 이것은 본 연구에서 *P. gingivalis*만으로 면역되었을 때 *P. gingivalis*-특이성 T 세포클론이 type 1 helper T 세포클론으로 극화되는 결과와 일치한다. 한편 *P. gingivalis* 381 이전에 *F. nucleatum* 10953으로 면역시킬 때 type 2 helper T 세포클론으로 분극이 변이됨을 관찰하였다. 이와 같은 결과는 치주질환에서 교차반응성 항원을 가진 다른 세균에 의한 사전 감염이 *P. gingivalis*-특이성 T 세포클론의 표현형에 변화를 초래할 수 있다는 가능성을 시사하고 있다.

IL-4 또는 IL-10은 거의 생산하지 않고 상당량의 INF-γ만을 분비하는 *F. nucleatum*-특이성 T 세포 line은 얻을 수 있고 *F. nucleatum*-특이성 T 세포 clone은 얻을 수 없었다. 그러므로 제2군에 있어서의 *P. gingivalis*-특이성 Th subset의 변화는 *F. nucleatum*이 T 세포를 Th2 표현형으로 유도한 결과라고 추정된다. *F. nucleatum* 10953 항원이 *P. gingivalis* 381 항원과 교차반응하는 것이 제2군에서 Th2 subset의 생성을 유발할 것이라는 가능성을 시험해 보기 위해 *P. gingivalis* 또는 *F. nucleatum* 세포 항원으로 이용해서 T 세포증식이 분석을 시행하였는데 놀랍게도 Th1 또는 Th2 subset에 관계없이 모든 *P. gingivalis*-특이성 클론들이 *P. gingivalis*와 *F. nucleatum* 항원 모두에 교차반응성 증식됨을 관찰할 수 있었다. *P. gingivalis*-특이성 T 세포클론이 *F. nucleatum*으로 면역하지 않은 제3군에서 유도된 것임을 고려할 때 이 두 세균간에는 분자 수준에서 교차반응이 일어나는 것이 거의 틀림없다고 추정된다.

제2군의 T 세포는 처음에 교차반응성 *F. nucleatum*에 노출되었고 뒤이어 *P. gingivalis*가 교차반응된 T 세포에 유도되어 T 세포 반응의 왜곡이 일어났다. 교차반응적이나 기능적으로 방어능력이 없는 항원에 의해 초기에 노출된 개체의 memory T 세포는 2차 세균감염시 기능적으로 부적절한 Th2 subset으로 전환된다고 본다. 항원의 원죄 현상(original antigenic sin)이[32] 치은 연하에서 다양한 치주병원균과 T 세포 사이에 실제적으로 일어날 수 있는 현상일 것이다. 가장 최근에 Klenerman과 Zinkernagel 등[33] 은

항원의 원죄현상이 바이러스를 포함한 다양한 항원에 대한 세포독성 T 림프구 반응을 왜곡시킨다고 보고한바 있다. 그러한 기전은 분자수준에서 아직 명확히 밝혀진 바 없으나, *P. gingivalis*-특이성 T 세포 클론이 type 1 helper T 세포나 type 2 helper T 세포를 막론하고 *F. nucleatum* 항원에 반응하여 증식된다는 것이 본 연구에서 관찰되었다. 이것은 아마도 두 항원간에 상호교차 반응이 일어난 때문인 것 같다. 그러나 *F. nucleatum*과 *P. gingivalis*는 유사성이 거의 없고 유사구조서열(homology sequence)에서 거리가 크게 있어 보인다. 펩타이드기에서의 아미노산 치환이 helper T 세포나 cytotoxic T 세포 아류(subset)의 이동과 함께 주요조직적합복합체(major histocompatibility complex)에 대한 친화력을 심하게 변화시킨다[34]. T 림프구가 펩타이드-주요조직적합복합체를 인지하는 특이성이 있음에도 불구하고 최근의 연구에서 T cell receptor가 높은 homology sequence를 나타내지 않는 상이한 펩타이드를 인지함에 있어서 상당한 교차반응이 일어난다고 보고하고 있다[35-37]. Quarantino 등[38]도 항원의 sequence homology라기보다는 오히려 항원 표면의 유사성이 T 세포 인지 epiptope을 모방할 수 있다고 보고하였다. Mason[39]은 T 세포 교차반응성이 제한된 수의 T 세포가 다양한 항원에 대한 적응능력을 가질 수 있는데 필요 불가결한 요소임을 보고하였다.

P. gingivalis 381 또는 *F. nucleatum* 10953에 대한 쥐의 IgG 항체 역가는 제2군과 제3군에서 공히 증가되었다. 이 현상은 이 두 세균간에 B 또는 T 세포 수준에서 상호 교차반응성 항원이라는 개념을 더욱 지지하는 것이다. 제3군에서 *F. nucleatum*에 대한 IgG 수준은 제2군의 IgG와 비교할 만한 수준이라서 *F. nucleatum*에 대한 증가된 IgG 항체 반응은 *P. gingivalis*만으로 면역된 쥐에서도 관찰할 수 있었음을 시사하고 있다.

상이한 방법으로 면역시킨 두 그룹의 쥐에서 얻어진 항 *P. gingivalis* IgG 항체가 *P. gingivalis*나 *F. nucleatum*에 대해 공히 유사한 방어능력을 소유하고 있는지는 알려져 있지 않기 때문에 제2군과 제3군에서 얻어진 혈청을 이용해 *P. gingivalis*와 *F. nucleatum*에 대한 혈청의 opsonophagocytosis 능력에 관해 연구가 진행되고 있다. 흥미롭게도 *P. gingivalis*로 면역시키면 *P. gingivalis*와 *F. nucleatum*을 공히 방어할 수 있었고 이 방어능력은 항 *P. gingivalis* IgG 항체수준과 관계가 있다고 보고된 바 있다[40]. 그 연구에서 *P. gingivalis*만으로 면역시킨 쥐에서 유리된 항 *P. gingivalis* 항체는 *F. nucleatum* 감염에 대해 교차 방어적임을 보여주었다. 현재는 이 두 세균간의 상호 교차반응적 항원을 B 또는 T 세포 수준에서 규명하기 위해 분자생물학적 분석을 시도하고 있다.

본 연구에서 *F. nucleatum*과 *P. gingivalis* 순으로 면역시킨 쥐의 T 세포클론만이 다양한 양의 IL-4를 생산함을 관찰했다. 복잡다양한 세균들과 연관된 질병에서 *F. nucleatum*이 *P. gingivalis* 또는 *A. actinomycetemcomitans*와 함께 상승작용 또는 면역 조절 기능을 가질 것이다. *F. nucleatum*으로 초기 감염된 T 세포는 IL-4를 포함하는 사이토카인을 생산하는 Th2 subset을 생산한다. 이 개념은 IL-4가 자극된 기억 T 세포에 의해서만 생산된다는 사실을 더욱 더 뒷받침해 준다[41,42]. 그러므로 *F. nucleatum*은 T 세포를 IL-4로 전환시켜 Th2 subset을 생산하게 해 치은염이 파괴적 치주염으로 진행되게 하는 주요 핵심 병원균임을 나타내 준다[43,44].

Th2 subset은 *P. gingivalis* 또는 *A. actinomycetemcomitans* 등과 같은 후속 감염세균에 대해 저항하는 기능이 적절하지 못했다. 교차 반응적인 T 세포클론이 Th2로 변이 되는 것은 IL-10의 생산과 관련이 있었다. *F. nucleatum* 항원에 대해 교차반응적인 *P. gingivalis* 반응적 Th2 클론이 *P. gingivalis* 항원으로 자극했을 때 세포배양 상등액에서 IL-10을 분비하는지의 여부를 관찰하는 것이 흥미롭다. 대부분의 Th2 클론은 IL-10을 분비하였다. IL-10은 INF-γ의 강력한 방해자로서 Th2 subset의 생성을 유발한다고 알려져 있다[45]. IL-4와 IL-10 또한 교차반응적인 항원에 반응하는 T 세포에 의해 많은 영향을 받는다[46-48]. 그리고 IL-4와 IL-10 역시 세포 면역을 방해해서[47,49,50] 질병을 더욱 악화시키는 역할을 한다[47]. 그러므로 교차반응적인 Th2 클론에 의해 선택적으로 IL-

4와 IL-10이 생산되는 것은 치주질환의 병리기전에서 Th subset 의 파괴 기능에 관여하는 기전에 대한 이론적 근거를 제시하고 있다. 따라서 Th1과 Th2 클론이 adoptive T 세포 전이를 이용한 동물실험에서 세균감염에 대한 방어능력에 어떤 역할을 하는지 연구가 필요하다.

두 가지 상이한 세균면역 방법에 의해 획득한 *P. gingivalis*-특이성 Th1 또는 Th2 세포클론이 모두 *F. nucleatum* 항원에 반응하여 증식한다는 사실은 rat를 이용한 실험에서 *P. gingivalis*-특이성 T 세포 클론이 *F. nucleatum*을 포함한 다른 세균항원에 반응하지 않는다고 보고한 결과와 서로 상반되는 내용이다[30]. 이렇게 상이한 연구결과를 만족스럽게 설명할 이유는 분명하지 않다. 그러나 염증질환에서 Th1 또는 Th2 형태를 결정하는 여러 가지 요소 즉, 항원의 양, 형태, 면역순서[52-55], 면역경로[56] 그리고 면역에 사용된 세균의 종류[57] 등을 고려한다면 본 연구에서 관찰된 결과들은 이론적으로 가능한 것이라 생각할 수 있다. 본 연구에서는 쥐를 면역시키는데 활성(live) 세균세포를 이용하였고 반면 다른 연구가들은 포르말린으로 처리한 죽은 세균을 사용하였다. 이것이 상이한 T 세포 subset이 면역과정에 사용된 세균의 상이한 항원 epitope을 인지하게 되는 원인으로 간주된다.

V. 결론

F. nucleatum ATCC 10953 또는 *P. gingivalis* 381로 면역시킨 쥐로부터 항원 특이성 T세포클론을 획득하기 위하여 각 실험군마다 10마리의 쥐에 *F. nucleatum* 후 *P. gingivalis*나, 또 *P. gingivalis*만을 복강 내 주사하여 면역시킨 다음 비장의 T 세포를 분리해서 *in vitro*에서 *P. gingivalis*-특이성 T 세포 클론을 얻고 *F. nucleatum*이나 *P. gingivalis*로 자극해 증식반응을 관찰하였다. 동시에 *F. nucleatum* 또는 *P. gingivalis*에 대한 혈청 IgG 항체 역가를 ELISA를 이용해 측정하였다. *F. nucleatum*과 *P. gingivalis* 순으로 면역시킨 쥐의 모든 T세포클론은 type 2 helper T 세포 클론 subset을 나타내고, 반면 *P. gingivalis*만으로 면역시킨 쥐에서는 type 1 helper T 세포클론 subset을 나타내었다. 두 군의 모든 T 세포 클론은 *P. gingivalis*와 *F. nucleatum*항원에 공히 교차반응하였고 양 실험군에서 얻은 T 세포 클론의 표현형은 CD4, TCR은 αβ에 모두 양성 반응을 나타냈다. *F. nucleatum* 또는 *P. gingivalis*에 대한 면역혈청 IgG항체 평균역가는 면역 전에 비해 현저히 높게 나타났으나($p < 0.01$) 두 군간에 유의성있는 차이는 없었다. 결론적으로 *F. nucleatum* 항원에 먼저 감염되고 후속적으로 P. gingivalis에 연속감염시킨 쥐에서 획득한 *P. gingivalis*-특이성 helper T 세포 클론은 *P. gingivalis*만으로 감염시킨 쥐에서 획득한 helper T 세포 클론과 상이한 극화현상을 나타내며 상이한 사이토카인 프로필을 나타냈다.

VI. 참고문헌

1. Ebersole JL, Taubman MA. : The protective nature of host response in periodontal disease. Periodontol 2000 1994: 5: 112-141.
2. Gemmell E, Seymour GJ. : Modulation of immune responses to periodontal bacteria. Curr Opin Periodontol 1994: 2: 28-38.
3. Taubman MA, Eastcott JW, Shimauchi H, Takeichi O, Smith DJ. : Modulatory role of T Lymphocytes in Periodontal Inflammation. In: Genco R, Hamada S, Lehner T, McGhee J, Mergenhagen S, eds. Molecular Pathogenesis of periodontal Disease. Washington, DC: Am Soc Microbiol, 1994: 147-157.
4. Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. : Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. Periodontol 2000 1997: 14: 112-143.
5. Ishii T, Mahanonda R, Seymour GJ. : The establishment of human T cell lines reactive with specific periodontal bacteria. Oral Microbiol Immunol 1992: 7: 225-229.
6. Gemmell E, Bartold PM, Seymour GJ. :

Establishment of peripheral and gingival T lymphocyte clones responsive to *Porphyromonas gingivalis*. Aust Dent J 1996: 41: 113-117.

7. Mahanonda R, Seymour GJ, Powell LW, Good MF, Halliday MF & JW. : Limit dilution analysis of peripheral blood T lymphocytes specific to periodontopathic bacteria. Clin Exp Immunol 1989: 75: 245-251.
8. Gemmell E, Feldner B, Seymour GJ. : CD45RA and CD45RO positive CD4 cells in human peripheral blood and periodontal disease tissue before and after stimulation with periodontopathic bacteria. Oral Microbiol Immunol 1992: 7: 84-88.
9. Gemmell E, Kjeldsen M, Yamazaki K, Nakajima T, Aldred MJ, Seymour GJ. : Cytokine profiles of *Porphyromonas gingivalis*-reactive T lymphocyte lines and clones derived from *P. gingivalis*-inflected subjects. Oral Dis 1995: 1: 139-146.
10. Mahanonda R, Prachaney S, Tirawatanpong S. : Cytokine profiles of *Porphyromonas gingivalis*-reactive T cell lines from periodontitis patients. J Dent Res 1997: 76: 230(Abstr #1732).
11. Yamazaki K, Nakajima T, Kubota Y, Gemmell E, Seymour GJ, Hara K. : Cytokine messenger RNA expression in chronic inflammatory periodontal disease. Oral Microbiol Immunol 1997: 12: 281-287.
12. Fujihashi K, Beagley KW, Kono Y, Aicher WK, Yamamoto M, DiFabio S, Xu-Amano J, McGhee JR, Kiyono H. : Gingival mononuclear cells from chronic inflammatory periodontal tissues produce IL-5 and IL-6, but not IL-2 and IL-4. Am J Pathol 1993: 142: 1239-1250.
13. Fujihashi K, Yamamoto M, McGhee JR, Kiyono H. : Type 1/type 2 cytokine production by CD4+ T cells in adult periodontitis. J Dent Res 1994: 73: 204(Abstr #818).
14. Kawai T, Wilson ME, Nagasawa T, Watanabe H, Eastcott JW, Smith DJ, Taubman MA.: Adoptive transfer of cloned antigen-specific Th1 lymphocytes produces periodontal bone loss. J Dent Res 1997: 76: 231(Abstr #1738).
15. Shimauchi H, Taubman MA, Eastcott JW, Smith DJ. : Migration of Th1 and Th2 *Aa*-specific clones into infected and noninfected gingival tissues. J Dent Res 1993: 72: 243(Abstr #1121).
16. Yamashita K, Eastcott JW, Taubman MA, Smith DJ, Cox DS. : Effect of adoptive transfer of cloned *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-specific T helper cells on periodontal disease. Infect Immun 1991: 59: 1529-1534.
17. Caton J. Periodontal Diagnosis and Diagnostic Aids. In: Nevins M, Becker W, Kornman K, eds. : Proceedings of The World Workshop in Clinical Periodontics. Chicago: Am Acad Periodontol, 1989: I-1-I-22.
18. Astemborski JA, Boughman JA, Myrick PO, Goodman SB, Woolen RK, Agarwal S, Vincent JW, Suzuki JB. : Clinical and laboratory characterization of early onset periodontitis. J Periodontol 1989: 61: 557-563.
19. Ranney RR. : Diagnosis of periodontal diseases. Adv Dent Res 1991: 5: 21-36.
20. Bolstad AI, Jensen HB, Bakken V. : Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. Clin Microbiol Rev 1996: 9: 55-71.
21. Moore WE. : Microbiology of periodontal disease. J Periodont Res 1987: 22: 335-341.
22. Moore WE, Moore LV. : The bacteria of periodontal diseases. Periodontol 2000 1994: 5: 66-77.
23. Marsh PD, Bradshaw DJ, Watson GK, Allison C. : Role of *Fusobacterium necleatum* in anaerobe survival in microbial communities. J Dent Res 1997: 76: 226(Abstr #1700).
24. Bolstad AI, Tommassen J, Jensen HB. :

Sequence variability of the 40-kDa outer membrane protein of *Fusobacterium necleatum* and a model for topology of the proteins. Mol Gen Genet 1994: 244: 104-110.

25. Kolenbrander PE, London J. : Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. J Bacteriol 1993: 175: 3247-3252.
26. Brook I, Walker I. : The relationship between *Fusobacterium* species and other flora in mixed infection. J Med Microbiol 1986: 21: 93-100.
27. Feuille F, Ebersole JL, Kesavalu L, Steffen MJ, Holt SC. : Mixed infection with *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* in a murine lesion model: potential effects on virulence. Infect Immun 1996: 64: 2094-2100.
28. Gemmell E, Seymour GJ. : Interleukin 1, interleukin 6 and transforming growth factor-production by human gingival mononuclear cells following stimulation with *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. J Periodont Res 1993: 28: 122-129.
29. Tew JG, Thomas SS, Ranney RR. : *Fusobacterium necleatum*-mediated immunomodulation of in vitro secondary antibody response to tetanus toxoid and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Periodont Res 1987: 22: 506-512.
30. Sakurai K, Yamashita K, Hara K. : Development and characterization of *Porphyromonas gingivalis* specific rat T-cell clones. Arch Oral Biol 1992: 37: 983-990.
31. Gemmell E, Winning TA, Bird PS, Seymour GJ. : Cytokine profiles of lesional and spenic T cells in *Porphyromonas gingivalis* infection in a murine model. J Periodontol 1998: 69:1131-1138.
32. Francis Jr. T. Influenza : The new acquayantance. Annals Int Med 1953: 39: 203-221.
33. Klenerman P, Zinkernagel RM. : Original antigenic sin impairs cytotoxic T lymphocyte responses to virus bearing variant epitopes. Nature 1998: 394: 482-485.
34. Murray JS, Pfeifer C, Madri J, Bottomly K. : Major histocompatibility complex(MHC) control of CD4 T cell subset activation. II. A single peptide induces either humoral or cell-mediated responses in mice of distinct MHC genotype. Eur J Immunol 1992: 22: 559-565.
35. Bhardwaj V, Kumar V, Geysen HM, Sercarz EE.: Degenerate recognition of a dissimilar antigenic peptide by myelin basic protein-reactive T cells. Implications for thymic education and autoimmunity. J Immunol 1993: 151: 5000-5010.
36. Kersh GJ, Allen PM. : Structural basis for T cell recognition of altered peptide ligands: a single T cell receptor can productively recognize a large continuum of related ligands. J Exp Med 1996: 184: 1259-1268.
37. Reay PA, Kantor RM, Davis MM. : Use of global amino acid replacement to define the requirements for MHC binding and T cell recognition of moth cytochrome c. J Immunol 1994: 152: 3946-3957.
38. Quarantino S, Thorper CJ, Travers PJ, Londei M. : Similar antigenic surfaces, rather than sequence homology, dictate T cell epitope molecular mimicry. Proc Natl Acad Sci USA 1995: 92: 10398-10402.
39. Mason D, : A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T cell receptor. Immunol Today 1998: 9: 395-404.
40. Ebersole JL, Feuille F, Kesavalu L, Holt SC. : Host modulation of tissue destruction caused by periodontopathogens: effect on a mixed microbial infection composed of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. Micro Pathos 1997: 23: 23-32.
41. Battens F, Walker C, Gauchat JF, Gauchat D, Wyss T, Picher WJ. : Lymphokine gene expres-

sion related to CD4 T cell subset(CD45R /CDw29) phenotype conversion. Eur J Immunol 1989: 19: 1569-1574.

42. Salmon M, Kitas GD, Bacon PA. : Production of lymphokine mRNA by CD45R+ and CD45R- helper T cells from human peripheral blood and by human CD4+ T cell clones. J Immunol 1989: 143: 907-912.
43. Manhart SS, Reinhardt RA, Payne JB, Seymour GJ, Gemmell E, Dyer JK, Petro TM. : Gingival cell IL-2 and IL-4 in early-onset periodontitis. J Periodontol 1994: 65: 807-813.
44. Yamazaki Y, Nakajima T, Gemmell E, Polak B, Seymour GJ, Hara K. : IL-4 and IL-6 producing cells in human periodontal disease tissue. J Oral Pathol Med 1994: 23: 347-353.
45. de Waal Malefyt R, Yssel H, Roncarolo M-G, Spits H, de Vries JE. : Interleukin-10. Curr Opin Immunol 1992: 4: 314-320.
46. Koziel MJ, Dudley D, AfDhal N, Grakoui A, Rice CM, Choo QL, Houghton M, Walker BD. : HLA class I-restricted cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus. Identification of multiple epitopes and characterization of pattern of cytokine release. J Clin Invest 1995: 96: 2311-2321.
47. Murray HW, Hariprashad J, Coffman RL. : Behavior of visceral *Leishmania donovani* in an experimentally induced T helper cell 2(Th2)-associated response model. J Exp Med 1997: 185: 867-874.
48. Nicholson LB, Greer JM, Sobel RA, Lees MB, Kuchroo VK. : An altered peptide ligand mediates immune deviation and prevent autoimmune encephalomyelitis. Immunity 1995: 3: 397-405.
49. Powrie F, Coffman RL. : Inhibition of cell-mediated immunity by IL4 and IL10. Res Immunol 1993: 144: 639-643.
50. Powrie F, Menon S, Coffman RL. : Interleukin-4 and interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity in vivo. Eur J Immunol 1993: 23: 2223-2229.
51. Choi JI, Schifferle RE, Yoshimura F, Kim BW. : Capsular polysaccharide- fimbrial protein conjugate vaccine protects against *Porphyromonas gingivalis* infection in SCID mice reconstituted with human peripheral blood lymphocytes. Infect Immun 1998: 66: 391-393.
52. Bretscher PA, Menon JN, Ogunremi O. : Towards a strategy of universally efficacious vaccination against pathogens uniquely susceptible to cell-mediated attack. J Biotechnol 1996: 44: 1-4.
53. Bretscher PA, Wei G, Menon JN, Bielefeldt-Ohmann H. : Establishment of stable, cell-mediated immunity that makes susceptible mice resistant to *Leishmania major*. Science 1992: 257: 539-542.
54. Guery JC, Galbiati F, Smiroldo S, Adorini L. : Selective development of T helper(Th) 2 cells induced by continuous administration of low dose soluble protein to normal and 2-macroglobulin-deficient BALB/c mice. J Exp Med 1996: 183: 485-497.
55. Menon JN, Bretscher PA. : Characterization of the immune memory state generated in mice susceptible to *Leishmania major* following exposure to low doses of *L. major* and resulting in resistance to a normally pathogenic challenge. Eur J Immunol 1996: 26: 243-249.
56. Constant SL, Bottomly K. : Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. Ann Rev Immunol 1997: 15: 297-322.
57. Yang J, Kawamura I, Mitsuyama M. : Requirement of the initial production of γinterferon in he generation of protective immunity of mice against *Listeria monocytogenes*. Infect Immun 1997: 65: 72-77.

Cellular and Humoral Immune Responses to Sequential Periodontopathic Bacterial Immunization in Animal Model

Soo-Kyung Jeon, Sung-Jo Kim, Jeom-Il Choi

Department of Periodontology, College of Dentistry, Pusan National University

Antigen-specific T cell clones were obtained from mice immunized with *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953(*F. nucleatum*) and/or *Porphyromonas gingivalis* 381(*P. gingivalis*). 10 Balb/c mice per group were immunized with *F. nucleatum* followed by *P. gingivalis*, or with *P. gingivalis* alone by intraperitoneal injection of viable microorganisms. Spleen T cells were isolated and stimulated in vitro with viable *P. gingivalis* cells to establish *P. gingivalis*-specific T cell clones. T cell phenotypes and cytokine profiles were determined along with T cell responsiveness to *F. nucleatum* or *P. gingivalis*. Serum IgG antibody titers to *F. nucleatum* or *P. gingivalis* were also determined by ELISA.

All the T cell clones derived from mice immunized with *F. nucleatum* followed by *P. gingivalis* demonstrated Th2 subsets, while those from mice immunized with *P. gingivalis* alone demonstrated Th1 subsets based on the flow cytometric analysis and cytokine profiles, All T cells clones from both groups were cross-reactive to both *P. gingivalis* and *F. nucleatum* antigens. Phenotypes of T cell clones were all positive for CD4. Mean post-immune serum IgG antibody levels to *F. nucleatum* or *P. gingivalis* were significantly higher than the pre-immune levels($p < 0.01$, respectively). There were no significant differences in the antibody titers between the two groups. It was concluded that *P. gingivalis*-specific T cells initially primed by cross-reactive *F. nucleatum* antigens were polarized to Th2 subsets, while T cells stimulated with *P. gingivalis* alone maintained the profile of Th1 subset.