

1

제 2형 당뇨병 환자의 근관 감염에서 나타난 병원균과 그 항생제 감수성

¹⁾계명대학교 의과대학 동산의료원 치과, ²⁾경북대학교 치과대학병원 치과보존과
조 주 연¹⁾, 김 성 교²⁾

ABSTRACT

Pathogens and Their Antimicrobial Susceptibilities of Endodontic Infection in Type II Diabetes Mellitus Patients

¹⁾Department of Dentistry, Keimyong University Dongsan Medical Center,
²⁾Department of Conservative Dentistry, Kyngpook National University Hospital
Ju-Yeon Cho¹⁾, Sung-Kyo Kim²⁾

Aim: The purpose of this study was to identify dominant pathogens and their antimicrobial susceptibilities of endodontic infection in type II diabetes mellitus (DM) patients to determine effective empirical antibiotics.

Methodology: Pathogens from endodontic infection in six patients with DM and in six patients without DM were cultured, identified and their antimicrobial susceptibility was tested using Vitek2 systems (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France). The results were analyzed using Chi-square test and Fisher's exact test at $P < 0.05$ level.

Results: Pathogens of opportunistic infection were dominant in DM patients ($P=0.015$).

However, there was no significant difference of antimicrobial susceptibility between DM and non-DM patients. Relatively high percent (27%) of pathogens showed resistance to penicillin.

Conclusions: More cautions should be paid to DM patients because they are prone to opportunistic infection. Penicillin is not effective in the control of endodontic infection.

Key words : Diabetes mellitus, Pathogen, Endodontic, Infection

Corresponding Author

Ju-Yeon Cho, D.D.S, Ph.D.

Department of Dentistry, Assistant Professor, Keimyong University Dongsan Medical Center

56 Dalseong-ro, Jung-gu, Daegu 700-712, Republic of Korea

Tel : 82-53-250-7805, Email : vice01@hanmail.net

본 연구는 2015년도 계명대학교 비사연구기금으로 이루어졌음

I. 서론

당뇨는 가장 흔한 대사성 질병 중의 하나로 고혈당이 그 특징이다¹⁾. 구강 건강과 당뇨와의 상관관계가 계속 연구되어 왔고, 당뇨 환자에서의 여러 가지 구강 내 특징들, 즉 구강건조증, 미각 손상, 우식, 그리고 특히 치주염 등이 발표된 바 있다²⁻³⁾.

하지만 당뇨가 치주질환과 연관이 되어있다는 연구는 많이 있었지만, 당뇨와 치수-치근단 질환과의 연관관계는 별로 알려져 있지 않다⁴⁻⁷⁾.

어떤 연구에서는 당뇨 환자는 건강한 사람과는 구강 내 상주균이 다르다는 결과를 제시하기도 했다^{2, 8)}. 당뇨 환자의 근관 감염에서, 특정 미생물이나 병원성이 강한 미생물이 존재한다는 것은 당뇨 환자가 심한 감염에 더 취약한 이유를 설명해줄 수 있는 한가지 가설이 될 수 있다²⁾. 비슷한 연구들이 당뇨와 비당뇨 환자의 근관 감염에서의 미생물에 대해 이루어졌는데, 통계적 유의성은 없지만, *Porphyromonas endodontalis*와 *Porphyromonas gingivalis*가 연관성을 가지고 있다는 결과를 보여주었다⁹⁾. 또 다른 임상실험에서는 *Eubacterium infirmum*이 당뇨와 유의성있게 연관되어 있다는 결과를 보이기도 했다⁸⁾. 이러한 연구들은 당뇨 환자의 근관에 어떤 특별한 병원균이 존재한다는 예비적인 자료를 보여주기도 했다. 그러나 근관이나 치근단에서 특정 미생물이 당뇨와 연관되어 있는지의 여부를 평가하는 연구는 많지 않다.

한편 근관 감염의 부가적인 치료방법으로 항생제를 자주 사용하게 되는데, 이러한 항생제에 대한 내성률이 증가하고 있다. 따라서 항생제 치료에 대한 최신 견과, 주기적이고 정확하게 업데이트되는 항생제 감수성 결과가 필요할 수 있다¹⁰⁾.

Penicillin은 통성 혐기성균 (facultative anaerobe)과 절대 혐기성균(strict anaerobe) 모두에 효과적으로 작용하기 때문에 급성 치성 감염의

경험적 항생제로 쓰여왔다^{10, 11)}. 하지만 최근에는 penicillin에 대한 내성균들이 증가되고 있다는 보고가 있다¹²⁻¹⁴⁾. 근관 감염과 급성 치성 감염에서의 penicillin 내성률이 5% ~ 20%까지 증가되어 있으므로^{13, 15, 16)}, 현재 일반적으로 쓰고 있는 항생제치료에 변화가 필요할 것으로 보인다.

이 연구의 목적은 당뇨 환자의 근관 감염에서의 세균을 식별하여, 당뇨와 연관되어 우세하게 나타나는 병원균이 있는지 알아보고, 근관에서 검출된 세균의 항생제 감수성을 토대로 근관 감염에 효율적으로 사용할 수 있는 항생제를 알아보기 위함이다.

II. 재료 및 방법

1) 환자 선택

이 연구는 동산의료원의 Institutional Review Board의 승인 후에 이루어졌으며(IRB number: 2014-07-016), 2012년 3월에서 2013년 12월까지, 안면 및 치근단 부종으로 동산의료원 치과를 내원한 환자의 차트 리뷰를 포함하고 있다. 병소의 선택기준은 치근단의 부종이 있으며, 타진에 반응이 있고, 치수생활력이 없으며, 방사선 사진상 투과상을 보이는 치근단 병소가 관찰되는 영구치를 대상으로 하였다. 심한 변연 치조골 흡수나 만성 치주질환에 이환된 경우는 제외하였다.

근관 감염으로 내원한 21명의 환자를 대상으로 하여 12명의 환자를 선택하였다. 근관 감염을 나타낸 21명의 환자 중에서, 3명은 미생물의 성장이 없었는데 그 중 한 명은 비당뇨 환자였고 두 명은 당뇨 환자였다. 이 3명은 이 연구에서 제외되었다. 남은 18명의 환자 중 6명이 당뇨, 12명이 비당뇨 환자였다. 2형 당뇨에 이환되어 있고, 혈당 및 Hb1AC가 잘 조절되고 있는 6명을 당뇨 환자로 선택하여 실험군으로 설정하

였다. 문진에서 당뇨 병력이 없고, 혈당검사에서 정상인 환자 6명을 대조군으로 하였으며, 이 대조군은 통계 신뢰도를 위해 나이와 성별을 실험군과 비슷하게 매치하였다.

2) 병원균의 샘플링과 배양

임상 샘플 채취는 환부의 적절한 소독 후, 종창부위의 농양을 흡인하거나 swabbing법으로 시행하였다. 환부는 소독된 면구로 격리하고, 상부 점막은 0.5% chlorhexidine으로 30초간 닦아낸 후 normal saline으로 세척하였다. 샘플은 즉시 실험실로 옮겨져서 호기성 및 혐기성 환경에서 배양하였다.

호기성 배양을 위해서는, 샘플을 blood agar와 MacConkey agar plate에서 5%CO₂, 37°C 하에 overnight incubation" 하였다. 혐기성 배양을 위해서는, Brucella agar와 phenyl ethanol agar plate에서 85% N₂, 10% H₂, 그리고 5% CO₂ 환경 하에서 48시간 배양하였다.

배양된 콜로니의 특징을 관찰하여, 우세하게 발견되며 주된 콜로니를 Gram's stain하였다. 그람 양성균은 catalase test와 oxidase test를, 그람 음성균은 triple sugar로 동정하였다.

3) 병원균의 동정과 항생제 감수성 테스트

미세 희석법에 의한 비색 정량법을 원리로 하는 Vitek2 Systems(bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)로 우세하게 나타나는 병원균을 동정하고 항생제 감수성 검사를 시행하였다. 각 병원균은 Vitek2 Systems을 사용하여, 그람 양성균은 GPI card, 그람 음성균은 GNI card, 절대 혐기성균은 ANI card를 사용하여 동정하였다.

항생제 감수성은 AST cards를 사용해서 Vitek2 Systems에서 자동으로 확인하였고 suscepti

ble(S), intermediate susceptible(I), and resistant(R)로 결정하였는데, 대상이 되는 항생제는 penicillin G, cefotaxime, clindamycin, erythromycin, levofloxacin, tetracycline, cefepime, vancomycin이었다.

4) 통계분석

결과는 Chi-square test 시행 후, 표본 개수가 적은 것을 보완하기 위해 Fisher's exact test로 분석하였다(P<0.05).

Ⅲ. 결과

실험군과 대조군에 포함된 환자의 나이, 성별, 임상적 특징, 우세한 병원균 및 항생제 감수성은 Table 1과 Fig. 1, 2, 3에 나타나 있다.

1) 우세하게 나타난 병원균

통성 혐기성균이 12명 중 11명으로 우세하게 나타났다(Table 1, Fig. 1). *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus anginosus* (β -hemolytic or non-hemolytic group of *Streptococcus* spp.), *Bacillus*, *Staphylococcus hemolyticus*, *Staphylococcus warneri*와 같은 기회감염균이 당뇨와 매우 유의성을 가지고 검출되었다(P=0.015) (Table 1, Fig. 2). 반면, *Streptococcus viridians*(α -hemolytic group of *Streptococcus* spp.) group 만이 비당뇨 환자에게서 나타났다(Table 1, Fig. 2).

2) 항생제 감수성

Table 1. Predominant pathogens and their antimicrobial susceptibilities in patients with related clinical features

Age	Gender	Lesion	Predominant pathogens	DM	Resistance
64	F	#13 apical lesion, necrosis	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DM	penicillin G
61	M	#47 apical lesion, previous RCT*	<i>Streptococcus anginosus</i>	DM	none
72	M	#16 apical lesion, necrosis,	<i>Bacillus species</i>	DM	--
68	M	#46 apical lesion, caries	<i>Staphylococcus Hemolyticus</i>	DM	penicillin G
41	F	#46 apical lesion, necrosis	<i>Streptococcus α hemolytic</i>	DM	clindamycin
78	M	#36 apical lesion, previous RCT	<i>Staphylococcus warneri</i>	DM	none
78	F	#35 apical lesion necrosis, caries	<i>Streptococcus α hemolytic</i>	Non-DM	none
50	M	#34 apical lesion necrosis, caries	<i>Streptococcus oralis</i>	Non-DM	erythromycin
76	F	#13 apical lesion, caries	<i>Streptococcus α hemolytic</i>	Non-DM	clindamycin
55	M	#24 apical lesion, necrosis	<i>Streptococcus α hemolytic</i>	Non-DM	none
52	M	#44 apical lesion, necrosis	<i>Streptococcus parasanguis</i>	Non-DM	penicillin G
51	M	#22 apical lesion, previous RCT	<i>Streptococcus oralis</i>	Non-DM	none

*RCT : root canal treatment.
DM : diabetes mellitus.

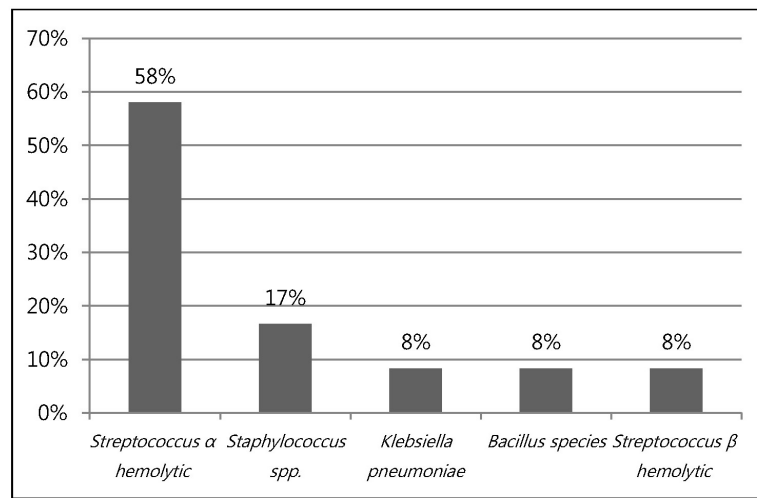


Fig. 1. The overall appearance rates of dominant pathogens expressed as a percentage.

모든 환자에게서 다양한 항생제 감수성이 나타났다 (Fig. 3). Vitek2 Systems로는, *Bacillus species*의 항생제 감수성을 측정할 수 없어서, *Bacillus species*는 제외되었다. 당뇨와 비당뇨 환자군 간의 항생제 감수성에 유의한 차이는 없었다 (P=1) (Fig. 4). 그러나 penicillin G에 대한 항생제

내성이(27%) 높게 나타났고, 이어서 clindamycin(18%)이 그 뒤를 따랐다. erythromycin(9%)에 대한 내성도 보였는데, cefotaxime, levofloxacin, tetracycline, cefepime and vancomycin에 대한 내성은 관찰되지 않았다. 어떤 항생제에도 내성을 나타내지 않은 환자는 전체의

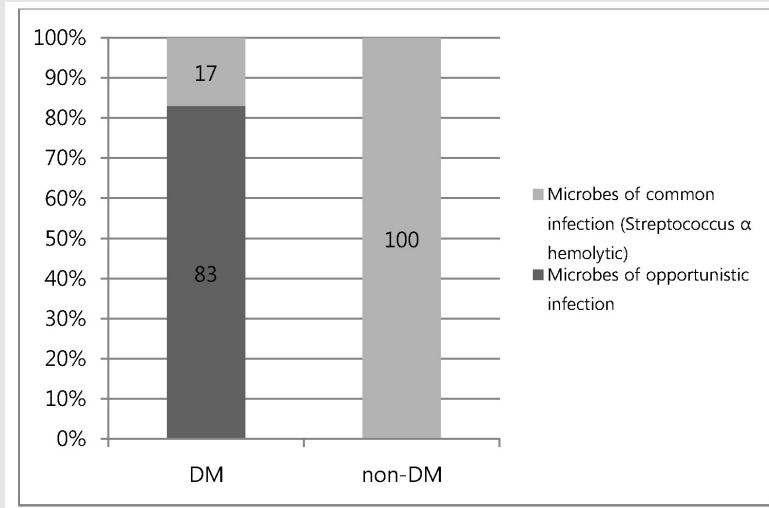


Fig. 2. Microorganisms found in DM and non-DM patients.

45%였다(Fig. 3, 4).

IV. 고찰

본 연구는 근관 감염에서 발견된 병원균이 주로 통성 혐기성균이고, 당뇨 환자와 비당뇨 환자군에서 나

타나는 균에서 통계적 유의성을 가지는 차이가 있음을 보여주고 있다.

당뇨 환자의 근관 감염에서 특이하게 나타나는 병원균이 있는지를 평가한 연구들은 많지 않다. 이전에, 당뇨와 비당뇨 환자의 근관 감염에서 근관 내의 미생물을 분석한 연구에서는, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*,

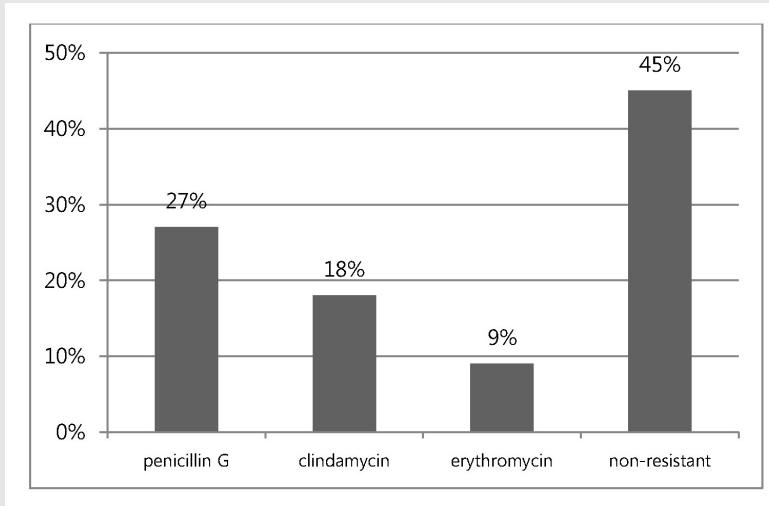


Fig. 3. The overall resistance rates against antibiotics expressed as a percentage.

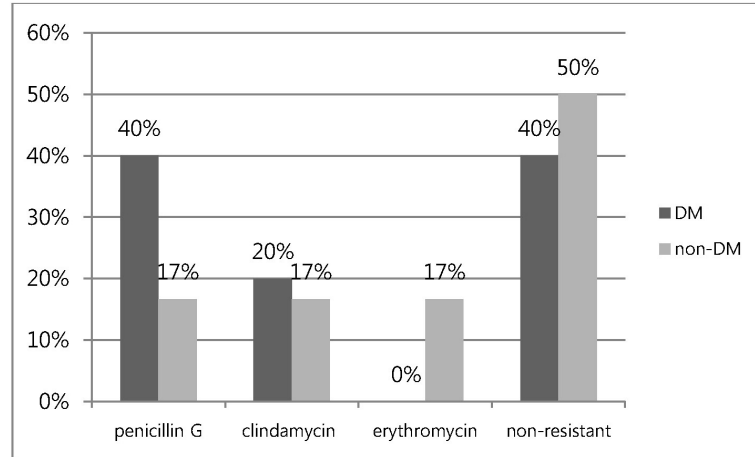


Fig. 4. The resistance rates against antibiotics between DM and non-DM expressed as a percentage.

Streptococcus spp.가 전반적 근관 내에서 흔하게 검출되었다고 한다⁹⁾. 당뇨병환자에서는 *Porphyromonas endodontalis*나 *Porphyromonas gingivalis*가 많이 검출되었으나, 통계적 유의성은 없는 것으로 밝혀졌다⁹⁾. Eubacterium-specific-primers를 사용하여 연구한 논문에서는, Eubacterium infirmum과 당뇨와의 통계적 유의성이 입증되었다⁸⁾. 이러한 연구들과 본 연구의 차이점은 샘플링한 부위와 세균의 검출 방법이다. Fouad 등은 PCR amplification법을 사용하였고, 근관 내 나괴사 치수의 미생물을 채취하여 동정하였다^{8, 9)}. 본 연구에서는 배양법을 기초로 하여 Vitek2 Systems를 사용해서 자동 동정 및 항생제 감수성 테스트를 시행하였는데, 이는 배양이 되지 않는 세균의 동정에는 다소의 한계가 있을 수 있다.

본 연구에서는 당뇨병 환자에게서 기회감염균이 주로 검출되었다. *Klebsiella pneumonia*와 여러 *Staphylococcus* genus는 사람의 구강 내에서 검출되며, 일시적으로 잔류하는 미생물에 속하기도 한다^{17, 18)}. 이러한 미생물들은 건강한 사람의 95%에서 검출되며, 항생제 내성을 발현시킬 수 있다는 점에서

주의의 대상이 되고 있다¹⁹⁾. *Streptococcus anginosus*는 정상적인 구강 상주균 중 하나이고 건강한 사람에서는 좀처럼 감염을 일으키지 않지만, 드문 경우 뇌수막염이나 뇌농양 같은 심한 감염을 일으키기에 충분한 병원성을 가지고 있기도 하다²⁰⁾. 다른 coagulase-negative *Staphylococci*와 마찬가지로 *S. warneri*는 질병을 좀처럼 일으키지 않지만, 면역이 억제된 환자들에게서는 가끔 감염을 일으킨다²¹⁾. 한편 *Streptococcus viridians* 종류들은 치성 감염, 세균성 심내막염, 패혈증을 일으키는 대표적인 미생물 중 하나로서, 본 연구에서는 비당뇨 환자에게서 검출되었다^{22, 23)}. 덧붙여, 본 연구에서 당뇨와 비당뇨 환자군 간의 항생제 감수성 결과에서는 통계적 유의성이 없었다.

구강 내 감염에서의 penicillin내성은 5%에서 20%로 보고되고 있다^{14, 15, 24)}. 본 연구에서는 penicillin 내성이 27%로 비교적 높게 나타나서, penicillin 단독으로는 그 내성 때문에 경험적 항생제로 쓰지 않는 것이 고려된다. 그러므로 혐기성 균에 효율적인 metronidazole과 함께 쓰거나, amoxicillin/clavulanate: Augmentin[®]과 같은

광범위 penicillin을 사용하는 것이 추천된다. 3세대 cephalosporin: Meiact[®]로 전환하는 것도 고려될 수 있으나, 이러한 항생제들에 대한 내성도 같이 생각해 보아야 할 것이다^{11, 16, 25~27}.

본 연구 결과 penicillin에 알레르기 반응이 있는 환자에게 주로 처방되는 erythromycin과 clindamycin에 대한 내성도 관찰되었다. Clindamycin은 신부전이 있는 환자에게 용량 감소가 필요하지 않아 신부전 환자에게 쉽게 사용되고, penicillin의 금기증인 환자의 치성 감염에서도 자주 사용된다. 본 연구 결과, 테스트한 세균 중 82%만이 감수성을 보였고, 이는 이전에 발표된 연구들보다 내성이 높아진 결과를 보인다^{16, 28, 29}. 그러므로 신부전이나 penicillin알레르기 환자에게 clindamycin을 단독으로 사용하는 것은 그 내성을 주의 깊게 고려하여야 할 것이다.

본 연구 결과에 포함하지 않았던 비당뇨 환자 6명에서는 Streptococcus α -hemolytic균이 검출되었는데, 통계적 분석에 포함하여도 결과에 차이는 보이지 않았다. 그리고 본 연구에 포함하지 않은 비당뇨 환자 중 4명에서 항생제에 대한 중복 내성(한가지 이상의 항생제에 내성을 보이는 현상)을 보였고, 당뇨 환자 중에는 중복 내성을 나타낸 균종은 관찰되지 않았다. 항생제 내성을 나타낸 모든 환자를 대상으로, 중복 내성의 발현과 당뇨와의 관계를 통계적으로 분석해보았으나 당뇨의 존재여부와 중복 내성의 출현여부는 통계적인 유의성은 나타나지 않았다. 본 연구 분야에

대해서 좀 더 광범위한 환자 데이터와 치료 성과의 고찰, 그리고 좀 더 세부적으로 미생물 생태학에 대한 점검이 더 필요할 것으로 보인다. 또한, 균 자체만이 아니라 다른 여러 요소들도 근관 감염의 병인론에 작용한다는 것을 고려해 보아야 하는데, 이러한 요소에는 병원성의 차이, 혼합 균 종에서의 균 종 간 상호작용, 균의 밀도, 환경적 조절과 숙주의 저항성 등을 포함할 수 있겠다^{30, 31}.

V. 결론

혈당이 잘 조절되고 있는 제 2형 당뇨 환자의 근관 감염에서 주로 기회감염균이 검출되었다. 당뇨 환자를 치료할 때는 그들이 기회감염에 취약하다는 점을 알고, 근관 감염이 심화되지 않도록 주의해야 한다. 또한 근관 감염을 유발한 세균을 대상으로 시행한 항생제 감수성 테스트에서 penicillin에 대한 내성이 기존 연구 결과들 보다 증가되어 있었다. 그러므로 근관 감염의 보조적 요법으로 항생제를 사용할 때, penicillin을 단독 사용하는 것은 피해야 한다. 심한 근관 감염의 부가적인 치료로 항생제 투여 시, penicillin과 다른 항생제를 병용하거나, 광범위 penicillin(amoxicillin/clavulanate) 또는 다른 항생제(3세대 cephalosporin)로 전환하는 것을 고려해야 한다.

참고 문헌

1. Manfredi M, McCullough MJ, Vescovi P, et al. Update on diabetes mellitus and related oral diseases. *Oral Dis* 2004;10(4):187-200.
2. Fouad AF. Diabetes mellitus as a modulating factor of endodontic infections. *J Dent Educ* 2003;67(4):459-467.
3. Katz J. Elevated blood glucose levels in patients with severe periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2001;28(7):710-712.
4. Marotta PS, Fontes TV, Armada L, et al. Type 2 diabetes mellitus and the prevalence of apical periodontitis and endodontic treatment in an adult Brazilian population. *J Endod* 2012;38(3):297-300.
5. Lopez-Lopez J, Jane-Salas E, Estrugo-Devesa A, et al. Periapical and endodontic status of type 2 diabetic patients in Catalonia, Spain: a cross-sectional study. *J Endod* 2011;37(5):598-601.
6. Bender IB, Bender AB. Diabetes mellitus and the dental pulp. *J Endod* 2003;29(6):383-389.
7. Lima SM, Grisi DC, Kogawa EM, et al. Diabetes mellitus and inflammatory pulpal and periapical disease: a review. *Int Endod J* 2013;46(8):700-709.
8. Fouad AF, Kum KY, Clawson ML, et al. Molecular characterization of the presence of *Eubacterium* spp and *Streptococcus* spp in endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18(4):249-255.
9. Fouad AF, Barry J, Caimano M, et al. PCR-based identification of bacteria associated with endodontic infections. *J Clin Microbiol* 2002;40(9):3223-3231.
10. Vigil GV, Wayman BE, Dazey SE, et al. Identification and antibiotic sensitivity of bacteria isolated from periapical lesions. *J Endod* 1997;23(2):110-114.
11. Gomes BP, Jacinto RC, Montagner F, et al. Analysis of the antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria isolated from endodontic infections in Brazil during a period of nine years. *J Endod* 2011;37(8):1058-1062.
12. Ranta H, Haapasalo M, Ranta K, et al. Bacteriology of odontogenic apical periodontitis and effect of penicillin treatment. *Scand J Infect Dis* 1988;20(2):187-192.
13. Baker PJ, Evans RT, Slots J, Genco RJ. Antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria from the human oral cavity. *J Dent Res* 1985;64(10):1233-1244.
14. Lewis MA, MacFarlane TW, McGowan DA. Antibiotic susceptibilities of bacteria isolated from acute dentoalveolar abscesses. *J Antimicrob Chemother* 1989;23(1):69-77.
15. Brook I, Frazier EH, Gher ME. Aerobic and anaerobic microbiology of periapical abscess. *Oral Microbiol Immunol* 1991;6(2):123-125.
16. Baumgartner JC, Xia T. Antibiotic susceptibility of bacteria associated with endodontic abscesses. *J Endod* 2003;29(1):44-47.
17. Pereira CA, Toledo BC, Santos CT, et al. Opportunistic microorganisms in individuals with lesions of denture stomatitis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;76(4):419-424.
18. Loberto JCS, Martins CAP, Santos SSF, et al. *Staphylococcus* spp. in the oral cavity and periodontal pockets of chronic periodontitis patients. *Braz J Microbiol* 2006;20:202-206.
19. Casey AL, Lambert PA, Elliott TSJ. *Staphylococci*. *Int J Antimicrob Agents* 2007;29(SUPPL. 3):S23-S32.
20. Lin GY, Yang FC, Lee JT, Wang CW. *Streptococcus anginosus*, tooth extraction and brain abscess. *QJM* 2013.
21. Ivic I, Karanovi? J, Pavicic-Ivelja M. Sepsis with multiple abscesses caused by *staphylococcus warneri*: a case report. *Central European Journal of Medicine* 2013;8(1):45-47.
22. Fowell C, Igbokwe B, MacBean A. The clinical relevance of microbiology specimens in orofacial abscesses of dental origin. *Ann R Coll Surg Engl* 2012;94(7):490-492.
23. Skucaite N, Peciuliene V, Vitkauskiene A, Machiulskiene V. Susceptibility of endodontic pathogens to antibiotics in patients with symptomatic apical periodontitis. *J Endod* 2010;36(10):1611-1616.

• 참고 문헌 •

24. Lewis MA, Parkhurst CL, Douglas CW, et al. Prevalence of penicillin resistant bacteria in acute suppurative oral infection. *J Antimicrob Chemother* 1995;35(6):785-791.
25. Sandor GK, Low DE, Judd PL, Davidson RJ. Antimicrobial treatment options in the management of odontogenic infections. *J Can Dent Assoc* 1998;64(7):508-514.
26. Kuriyama T, Williams DW, Yanagisawa M, et al. Antimicrobial susceptibility of 800 anaerobic isolates from patients with dentoalveolar infection to 13 oral antibiotics. *Oral Microbiol Immunol* 2007;22(4):285-288.
27. Poeschl PW, Crepaz V, Russmueller G, et al. Endodontic pathogens causing deep neck space infections: clinical impact of different sampling techniques and antibiotic susceptibility. *J Endod* 2011;37(9):1201-1205.
28. Khemaleelakul S, Baumgartner JC, Pruksakorn S. Identification of bacteria in acute endodontic infections and their antimicrobial susceptibility. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;94(6):746-755.
29. Ellison SJ. The role of phenoxymethylpenicillin, amoxicillin, metronidazole and clindamycin in the management of acute dentoalveolar abscesses--a review. *Br Dent J* 2009;206(7):357-362.
30. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Distinctive features of the microbiota associated with different forms of apical periodontitis. *J Oral Microbiol* 2009;1.
31. Siqueira JF, Jr. Microbial causes of endodontic flare-ups. *Int Endod J* 2003;36(7):453-463.