

새로운 색지표를 이용한 우식활성검사법 개발

강시묵^{1,2}, 정회인^{1,2,3,4}, 정승화^{1,2,3,4}, 권호근^{1,2,3,4}, 김백일^{1,2,3,4}

¹연세대학교 치과대학 예방치과학교실, ²구강악안면경조직재생센터, ³구강과학연구소, ⁴두뇌한국21 연세치의과학사업단

Development of a new color scale for a caries activity test

Si-Mook Kang^{1,2}, Hoi-In Jung^{1,2,3,4}, Seung-Hwa Jeong^{1,2,3,4}, Ho-Keun Kwon^{1,2,3,4}, Baek-Il Kim^{1,2,3,4}

¹Department of Preventive Dentistry & Public Oral Health, College of Dentistry, Yonsei University,

²Research Center for Orofacial Hard Tissue Regeneration, ³Oral Health Research Center, ⁴Brain Korea 21 Project

Objectives. The aim of this study was to develop a new caries activity test based on colorimetric changes that could better reflect the amount of acid produced by oral bacteria as a broad spectrum of color than the previous test. The optimal candidates were combinations of pH indicators, and these were evaluated in pH buffering solutions and using dental plaque.

Methods. Six pH indicators, Bromocresol-purple (BCP), Bromocresol-green (BCG), Methyl-red (MR), Methyl-orange (MO), Resazurin (R), and Naphthyl-red (NR), were selected to show different colors at various pH environments (range pH 3.0~7.0). BCP and BCG are pH indicators that are already used in the Cariostat[®], and they can show color changes from blue to yellow. This study tried to broaden the color change spectrum from blue to red to give a more distinct differentiation at various pHs. Four pH indicators (MR, MO, R and NR) were blended with BCP and BCG. Each combination of the three indicators was assessed in different pH buffer systems: pH 7.0, 6.0, 5.0, 4.0, and 3.0. The selected combinations of pH indicators were applied to human dental plaque from 11 subjects (mean age: 27) to confirm the reproducibility of the *in vitro* results.

Results. According to the *in vitro* buffer system, the mixture of BCP, BCG and MR did not show any differences between pH 4.0 and pH 3.0. On the other hand, the mixtures of BCP-BCG-MO (ratio 2 : 1 : 1.5), BCP-BCG-R (1.5 : 1 : 0.5) and BCP-BCG-NR (2 : 1 : 1.5) showed distinguishable color changes from pH 7.0 to pH 3.0. Among the three candidates, the BCP-BCG-NR mixture showed the best color differences in the buffer solution and the human dental plaque cultivated solutions at various pHs.

Conclusions. This study evaluated a new colorimetric caries activity test that used a combination of several pH indicators. The new system can easily detect various pH environments from organic acid fermentation by using a wider range of colors (blue - dark green - green - orange - red).

Key Words: caries, caries activity test, cariogenic bacteria, cariostat, pH indicator

색 인: 우식유발균, 우식활성검사, 치아우식증, cariostat, pH 지시약

서론

치아우식증은 구강 내에 상주하는 세균이 대사 작용

을 통해 치아에 부착된 음식찌꺼기의 당분이나 전분 등 탄수화물을 분해하여 발생되는 젖산 등 유기산에 의해 치아 경조직이 탈회되는 질병이다¹⁾. 이를 방지하게 되면 치수염을 일으켜 심한 통증을 느끼게 되고, 이로 인해서

투고일자: 2010. 03. 03, 심사일자: 2010. 03. 05, 게재확정일자: 2010. 03. 16

책임저자: 김백일, 연세대학교 치과대학 예방치과학교실, (120-752) 서울시 서대문구 성산로 250 (신촌동 134)

Tel: 02-2228-3070, Fax: 02-392-2926, E-mail: drkbi@yuhs.ac

치아를 상실할 수도 있다. 따라서 치아우식증의 예방을 위해서는 치아우식증의 위험 요인을 조기에 발견하고 적절한 예방적 처치를 통해 치아우식증의 진행을 방지하는 것이 중요하다. 치아우식증을 유발하는데 관련된 요인으로는 크게 미생물요인²⁾, 숙주요인 및 식이요인³⁾ 등이 있는데, 이 중에서 미생물요인은 치아우식증의 원인균들과 관련된 중요한 인자이다. 그러므로 미생물요인의 변화를 조기에 탐지하여 치아우식증 고위험 집단을 선별할 수 있다면, 이는 치아우식증 예방에 획기적인 도움이 될 수 있다.

지금까지 이러한 치아우식증 검사로는 치아우식증의 원인균으로 알려진 다형연쇄구균(*Streptococcus mutans*)이나 유산균(*Lactobacilli sp.*)⁴⁾ 등이 선택적으로 자랄 수 있는 배지를 이용하여 배양된 세균의 양을 측정하는 방법이 주로 활용되어왔다. 비록 미생물학적인 검사는 실험설비가 충분히 갖추어 져야 하며 전문가에 의해 수행되어야 하는 단점을 갖고 있지만 특정 미생물을 명확하게 확인할 수 있는 장점이 있어 최근에는 검사를 용이하게 하기 위해 선택배지가 결합된 스트립형태의 간이 검사 키트(Dentocult SM과 Dentocult LB)가 개발되어 활용되고 있다⁵⁾. 하지만 이 방법 또한 구강 내에서 각각한 종류의 우식 유발 세균 종만을 배양할 수 있고, 검사 대상자의 샘플을 채취하기 위해서 왁스를 씹게 한 뒤 자극성 타액을 수집하는 번거로운 과정을 거쳐야 하는 불편함이 있다. 한편 최근에는 분자생물학적인 방법을 적용하여 다형연쇄구균의 단일 클론 항체(Monoclonal antibody)를 이용하여 해당 균의 존재 유무를 판별할 수 있는 진단방법이 소개되기도 하였지만^{6,7)}, 이 방법 역시 높은 가격과 해당 세균의 양을 상대적으로 표시하지 못한다는 제한점이 있다.

한편 최근에는 치아우식증 유발 미생물에 대한 기존의 패러다임이 변화되고 있다. 지금까지 치아우식증 발생 과정에는 다형연쇄구균이나 유산균 등 특정 미생물만이 관여하는 것으로 알려져 있었다. 그러나 최근 연구결과 치아우식증 발생과정에는 *Actinomyces*를 포함한 다양한 구강내 미생물종들이 복합적으로 작용하는 것으로 알려지고 있다⁸⁻¹¹⁾. 또한 대표적인 치아우식증 유발 균주라고 알려진 다형연쇄구균 종이라 할지라도 형질(Serotype)에 따라 유기산 생산력에 현격한 차이가 있고, 심지어는 일부 다형연쇄구균종의 경우는 산 생성 자체를 하지 못하

는 경우도 있다^{12,13)}. 그러므로 기존에 치아우식증 검사에 활용해왔던 다형연쇄구균이나 유산균의 집락 수(Colony Forming Unit, CFU)를 세는 방법론에는 많은 제한점이 존재하게 된다. 한편 치아우식증을 유발하는 것은 미생물 자체가 아니라 미생물이 생산하는 최종 대사산물인 유기산에 의한 것이기 때문에 개별적인 미생물을 동정하기보다는 치태 내 존재하는 미생물 총 균체의 산 생산 능력을 평가하는 것이 보다 타당하다는 주장도 있다. 1933년 Hadley¹⁴⁾는 치아우식증이 구강 내 존재하는 바실러스 에시도필러스(*Bacillus acidophilus*)와 밀접한 관련성이 있다는 사실을 토대로 이를 정량화하는 방법을 제안하였다. 이후 Snyder¹⁵⁾는 타액 내 존재하는 유산균의 양적 차이가 치아우식증과 밀접한 관계를 나타낸다는 사실을 토대로 타액을 배양한 배지의 pH 값을 이용해 개인의 우식증 발생을 예측하고자 하였다. 특히 그의 연구에서는 pH 변화를 한 가지 지시약(Bromocresol Green, BCG)을 통해 육안으로 쉽게 구분할 수 있도록 하여 비교적 간단한 우식증 검사방법을 제안하였다. 한편 1970년대 Shimono 등^{16,17)}은 유산균만이 아니라 다형연쇄구균 또한 포함할 수 있는 Cariostat라는 우식증 검사방법을 발표하였다. 이 연구에서 사용한 검사시약은 고농도의 자당이 함유된 중성용액으로 다양한 구강 내 미생물이 생장할 수 있도록 하였다. 또한 Snyder가 제안한 지시약에 새로운 지시약(Bromocresol Purple, BCP)을 추가하여 색 변화에 따른 우식증 정도를 구분할 수 있도록 하였다. 현재 이 검사시약은 일본에서 상품화가 이루어져 개인의 치아우식증 발생을 쉽게 검사하는데 사용되고 있으며, 어린이를 대상으로 한 추적연구를 통해 우식위험에 대한 예측력이 높다고 보고되었다¹⁸⁾. 한편 국내에서도 조 등¹⁹⁾이 Cariostat를 비롯하여 여러 가지 구강환경 검사와 현존 구강상태와의 상관관계에 관한 임상적 연구를 발표하였고, 백 등²⁰⁾은 Cariostat를 이용한 아동의 우식증 발생에 관한 임상적 연구를 통해 미생물이 생산한 유기산을 통한 우식증 검사 방법의 가능성을 보고하였다. 하지만 이들 국내 선행 연구들은 일본에서 이미 개발된 제품을 사용하여 임상적 평가만을 진행하였을 뿐, Cariostat의 원리와 관련된 근본적인 평가는 없었던 실정이었다.

일본에서 개발된 Cariostat은 미생물이 분비한 산의 양에 따라서 용액의 색이 파란색에서 노란색으로 점차 변화하는 색변화 과정을 갖고 있다. 그러나 파란색에서 노란

색에 이르는 가시광선의 스펙트럼 영역이 그다지 넓지 않기 때문에 우식활성이 높다고 알려진 산도가 낮은 노란색 영역의 미묘한 pH의 변화를 명확한 색상의 변화로 반영해주기에는 한계점이 있었다.

따라서 본 연구의 목적은 미생물이 분비하는 최종 대사산물인 산 생성량을 보다 정확하고, 쉽게 판별할 수 있는 새로운 방법을 개발하기 위해서 최적의 pH 지시약 조합을 탐색하고, 이러한 조합을 pH 완충용액 및 사람 치태를 이용한 임상시험을 통해서 그 효능을 평가하고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 미생물 생장을 위한 배양액

구강 내 존재하는 미생물이 성장하기 위해서는 미생물이 이용할 수 있는 최적의 조건이 필요하다. Shimono 등^{16,17)}이 발표한 선행 연구를 참고하여 200 g 수크로스 (Sucrose, Duksan, Kyungkido, Korea), 20 g 트립토스 (Tryptose, Difco, Detroit, MI, U.S.A), 0.5 g 염화나트륨

(NaCl, Junsei, Kyoto, Japan), 0.2 g 아지드화 나트륨(NaN_3 , Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.)을 첨가하였고, 미생물 생장에 필요한 미량성분을 추가한 뒤 전체 부피가 1,000 mL가 되도록 탈이온수를 첨가하여 충분히 녹인 후 살균 공정하였다. 살균이 완료된 조성액은 8 mL 바이알에 각 2 mL씩 분주하여 준비하였다. 한편 실험에 사용한 Cariostat은 상품화된 CAT 21[®] (Morita, Kyoto, Japan)을 사용하였다.

2. pH 지시약 탐색

pH 지시약은 조염물질(Halochromic material)의 하나로 주변의 pH 변화에 따라 양자부과반응(Protonation)과 탈양자화(Depronation)를 통해 색이 가역적으로 변하는 물질이다. 지금까지 발견되거나 합성된 pH 지시약은 약 70여종 이상으로 그 종류에 따라 pH 0부터 pH 14 사이의 환경에서 특정한 색을 나타낸다. 일본에서 개발된 Cariostat은 다양한 지시약 중 pH 7.0부터 pH 3.0 사이의 환경에 따른 변화를 구분할 수 있도록 BCG와 BCP를 사용하고 있다. 그러나 이들 두 가지 지시약의 혼합은 파란색에

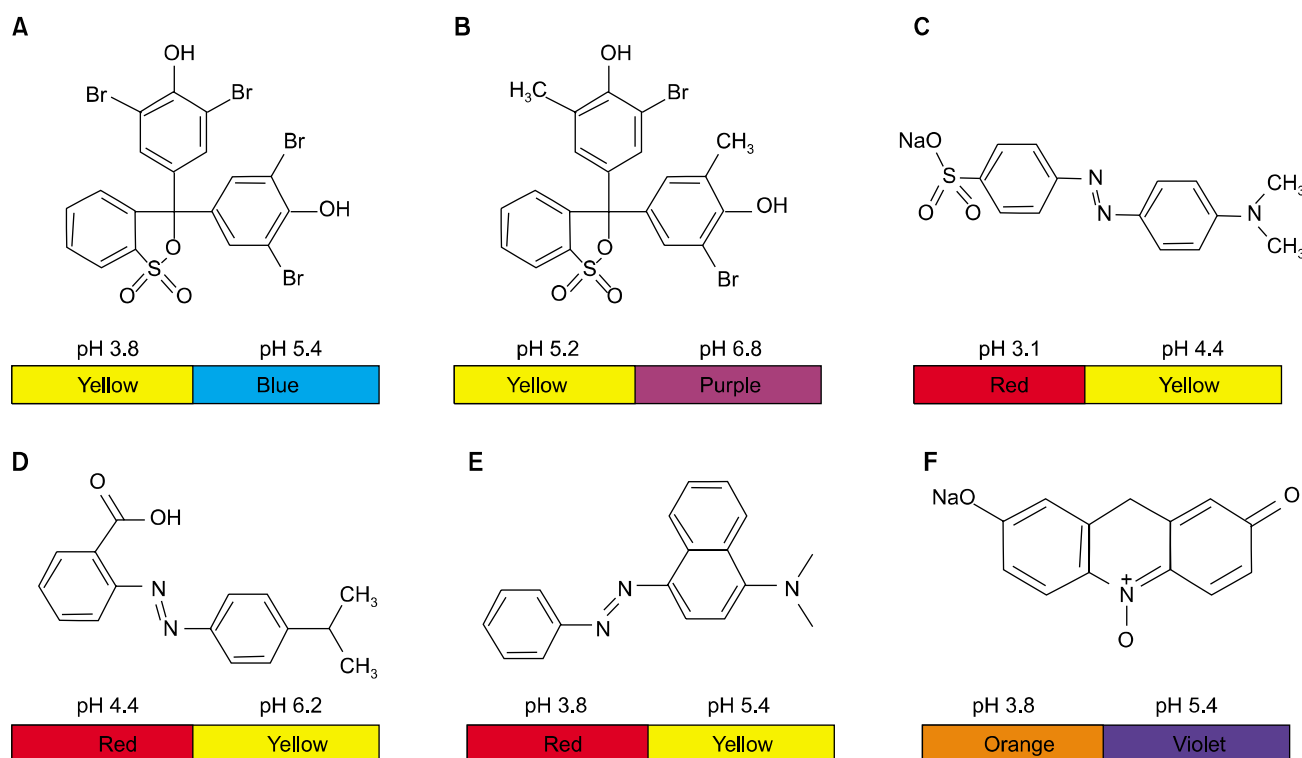


Fig. 1. pH indicators. (A) Bromocresol Green (BCG), (B) Bromocresol Purple (BCP), (C) Methyl Orange (MO), (D) Methyl Red (MR), (E) Naphthyl Red (NR) and (F) Resazurin (R).

서 노란색까지의 변화만을 나타낼 수 있다.

본 연구에서는 이들 지시약을 기본으로 하고 여기에 붉은색을 나타낼 수 있는 지시약을 탐색하고자 하였다. 왜냐하면 붉은색이 높은 우식 활성을 나타낼 경우 기존의 노란색에 비해서 표현할 수 있는 색의 스펙트럼 영역이 훨씬 더 넓어져서 다양한 pH 조건을 좀 더 명확하게 구별해 내는 것이 가능해지기 때문이다. 그래서 지금까지 알려진 여러 지시약 중 pH 7.0과 pH 3.0 사이에서 오렌지 또는 붉은 색을 나타내는 것으로 알려진 메틸레드(Methyl Red, MR), 메틸오렌지(Methyl Orange, MO), 레자주린(Resazurin, R), 나프틸레드(Naphthyl Red, NR) 이상 4가지의 후보 지시약을 선별하였다(Fig. 1).

3. pH 완충용액을 이용한 pH 지시약의 혼합 조성 탐색

본 연구에서는 특정 pH에서의 지시약에 의한 색 변화를 관찰하기 위해 pH 완충용액을 사용하였다. pH 완충용액은 외부의 산 또는 염기의 유입에 의해 전체 pH가 급속히 변하는 것을 방지하고 본연의 pH 환경을 유지할 수 있는 특성이 있다. 또한 pH 완충용액은 현재까지 다양한 종류가 알려져 있어서 원하는 pH 환경을 미세하게 조절할 수 있는 장점을 갖고 있다²¹⁾. 본 연구에서는 여러 완충용액 가운데 pH 7.0부터 pH 3.0사이의 환경을 잘 재현할 수 있는 구연산-인산 완충용액(Citric acid-Phosphate buffer)를 선택하여 pH 1.0 단위로 세분하여 완충용액을 제조하였다. 완충 용액은 탈이온수 및 0.2 M Na₂HPO₄ (분자량: 141.96, Duksan) 용액과 0.1 M 구연산(분자량: 192.12, Jungbunzlauer) 용액을 이용하여 Table 1에서 제시한 함량비 대로 제조하였다.

본 연구에서는 완성된 pH 완충용액을 이용하여 위에서 언급한 지시약 중 BCG와 BCP를 바탕으로 MR, MO, R, NR 이상 4가지 지시약을 각각 다양한 조성비로 적용하여 각 pH 환경에서 색 구분이 명확하고, 낮은 pH에서

붉은색이 선명하게 나타나는 조성비를 탐색하였다.

4. 사람 치태를 활용한 지시약 평가

본 연구에서는 완충용액을 통해 탐색된 pH 지시약의 여러 조성들 중 실제 미생물을 배양하여 미생물이 생산한 유기산에 의해 변화되는 색을 관찰함으로써 우식활성검사에 가장 적합한 조성을 찾고자 하였다. 이를 위해 실제 사람의 치태를 적용하여 pH 완충용액을 통해 도출한 결과와 비교하여 최종적으로 가장 적합한 조성을 결정하고자 하였다. 사람 치태를 수집하기 위해 본 연구에는 평균 27세(23~35세)의 성인 11명(남: 6, 여: 5)을 대상으로 하였고 모든 대상자로부터 동의서를 받았다. 또한 실험 시작 전에 연세대학교 치과대학병원 임상시험 심사위원회로부터 IRB승인을 받았다(2-2009-0019). 대상자를 선별하는 기준으로는 전신질환이 있거나, 교정 치료중인 자, 그리고 1개월 내에 치과 치료를 받은 자는 제외하였다. 한편 본 연구에서는 피검자에 따른 치태성분의 변이를 최소화하기 위해 동일한 대상자로부터 일주일 간격으로 치태를 채취하였다. 사람으로부터 치태를 채취하기 위해 먼저 멸균된 흡착재료(면봉)를 준비하였고, 이를 이용하여 대상자 치아 표면에 존재하는 치태를 충분히 채취하였다. 치태 채취 과정은 특정 치아만을 대상으로 하지 않고 상악의 모든 치아에 골고루 흡착 재료를 문질러서 샘플을 얻었고 채취된 치태는 바로 배양액에 넣었다. 치태가 함유된 배양액은 혐기적 조건(37°C, 10% CO₂)에서 48시간 배양하였고, 배양이 끝난 배양액에 각 지시약 혼합물을 0.2 mL 첨가하여 변화된 색을 관찰하였다.

연구성적

1. 완충용액에서 pH 지시약에 의한 색 변화

본 연구에서는 총 6가지 pH 지시약을 사용하여 pH 7.0부터 pH 3.0 사이의 변화를 뚜렷하게 나타낼 수 있는 최적의 조성을 탐색하였다. 기존의 Cariostat에서는 BCP와 BCG 가 2 : 1 비율로 혼합되어 pH 7.0부터 pH 3.0 사이의 환경에서 파란색에서 점차 노란색으로 변화되는 색 변화 체계를 갖고 있었다(Fig. 2, Group A).

한편 본 연구에서는 각 pH 조건 별로 더욱 명확한 시각적 구분을 위해서 총 6가지 지시약 중 BCG와 BCP를

Table 1. Compositions of citrate-phosphate buffer solution (mL)

pH	D.W	0.2 M Na ₂ HPO ₄	0.1 M citrate
7.0	49.9	43.6	6.5
6.0	50.0	32.1	17.9
5.0	50.0	25.7	24.3
4.0	50.0	19.3	30.7
3.0	50.0	10.2	39.8

기본 지시약으로 하고 나머지 4가지 지시약(MR, MO, R, NR)의 함량을 각기 달리하여 최적의 조성을 찾고자 하였다. pH 지시약들을 다양한 조합으로 혼합한 후 pH 3.0 부터 pH 7.0의 환경을 갖는 완충용액을 첨가함으로써 색의 변화를 관찰하여 여러 조합 중 가장 육안으로 구분이 잘 되는 조합을 다음과 같이 선별하였다. 먼저 BCP, BCG, MR의 조합에서는 각 지시약의 비율이 2 : 1 : 1.5인 경우 비교적 다양한 환경에서 잘 구분되었지만 pH 3.0과 pH 4.0 사이의 색 차이가 뚜렷하지 않았다(Fig. 2, Group B). BCP, BCG, MO의 조합에서는 각 지시약의 비율이 2 : 1 : 1.5인 경우 전 범위에 걸쳐 색상이 뚜렷하게 구분되었다(Fig. 2, Group C). BCP, BCG, R의 조합에서는 각 지시약의 비율이 1.5 : 1 : 0.5인 조합 시료에서 전 범위에

걸쳐 뚜렷한 색상 차이를 보였다(Fig. 2, Group D). 마지막으로 BCP, BCG, NR의 조합에서는 각 지시약의 비율이 2 : 1 : 1.5인 조합시료에서 전 pH 범위에 걸쳐서 다양한 색상이 재현되어 뚜렷한 구분이 가능하였다(Fig. 2, Group E).

2. 치태 내 미생물에 의한 pH 변화를 통한 최적의 지시약 조성 탐색

본 연구에서는 11명의 동일한 피검자로부터 채취시기를 달리 하여 총 4회에 걸쳐서 치태를 수집하였다. 먼저 1차로 채취한 치태를 현재 상품화된 Cariostat에 적용한 결과는 Fig. 3 (Group A)와 같았다. 이후 동일한 사람으로부터 일주일의 간격을 두고 치태를 채취하여 48시간

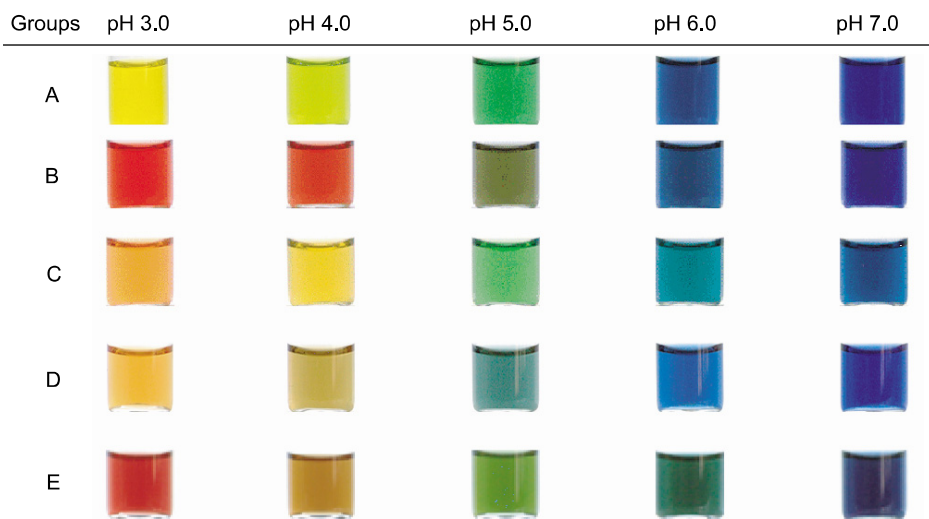


Fig. 2. Optimized combinations of pH indicators. Group A=BCP and BCG (2 : 1); Group B=BCP, BCG and MR (2 : 1 : 1.5); Group C=BCP, BCG and MO (2 : 1 : 1.5); Group D=BCP, BCG and R (1.5 : 1.0.5); Group E=BCP, BCG and NR (2 : 1 : 1.5).

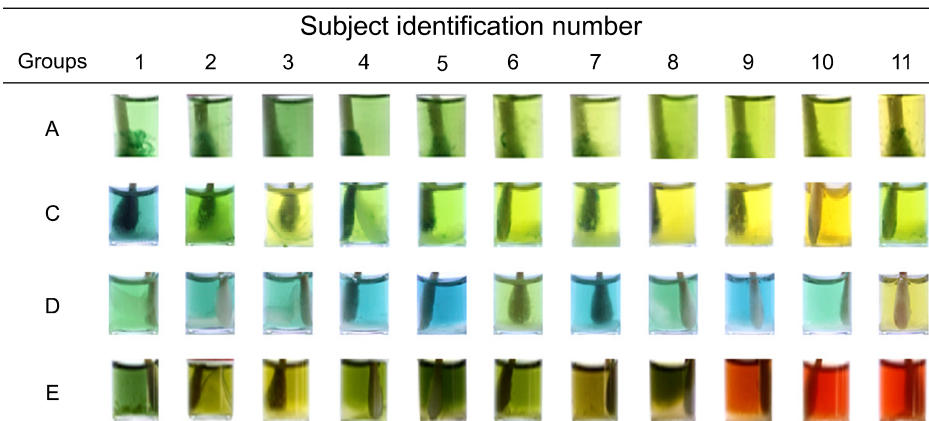


Fig. 3. Images of caries activity test of eleven subjects. Group A=BCP and BCG; Group C=BCP, BCG and MO; Group D=BCP, BCG and R; Group E=BCP, BCG and NR.

동안 배양한 후 pH 완충용액을 통해 선택된 3가지의 지시약 조성물(Group C, D, E)을 적용하였다. 먼저 BCP, BCG 그리고 MO를 이용한 조성물(Group C)에서는 낮은 pH 환경에서 오렌지 또는 붉은 색이 나타나지 않은 현상이 나타났다. 또한 BCP, BCG 그리고 R의 조성물(Group D)을 적용한 경우에도 기존 제품인 Cariostat과 뚜렷한 차이는 보이지 않았다. 하지만 마지막으로 BCP, BCG 그리고 NR의 조성물(Group E)을 적용하여 11명의 치태와 반응시킨 결과 다양한 우식활성도를 나타냈으며 Cariostat과 비교해서 보다 뚜렷하게 개인의 우식활성을 구분할 수 있었다.

3. 우식활성시약의 척도

기존에 개발된 Cariostat은 우식활성도를 0.0부터 3.0까지 0.5단위로 세분하여 총 7단계로 점수화 하였다. 이에 본 연구에서 새롭게 제안된 검사시약도 우식활성단계를 분별할 수 있도록 하기 위해 색 변화에 따른 척도를 정하고자 하였다. 이를 위해 사람 치태를 이용했을 때 가장 색 구분을 잘 확인할 수 있었던 BCP, BCG 그리고 NR의 조성물을 이용하여 pH 7.0부터 pH 3.0사이의 환경을 0.2 pH 단위로 완충용액을 만들어 동일한 지시약 조성물을 적용하였다. 이렇게 준비된 총 21단계의 다양한 pH 환경 중 색 차이가 비교적 뚜렷한 조건을 선별하여 이들의 색 차이를 통해 Score 0.0부터 3.0까지 총 7단계의 척도를 결정하였다(Fig. 4). 기존의 Cariostat의 경우 낮은 pH를 반영하는 영역인 1.5-3.0점 부분에서 노란색 사이의 명확한 구별이 어려운 데 비해서, 새롭게 개발된 시약의 경우 남색, 녹색, 황색, 오렌지색, 적색 등으로 다양하고 명확

한 색상의 차이로 인해서 보다 쉽게 구별이 가능하였다.

고안

현재까지 분자생물학적 방법을 통해 알려진 구강 바이오 필름(Dental biofilm)내 존재하는 미생물 종은 약 500여종으로 알려져 있다⁸⁾. 하지만 여전히 구강 안에서 성장하고 있는 전체 미생물 종을 명확히 파악하지 못하고 있는 실정이다. 뿐만 아니라 이미 존재가 알려져 있다 하더라도 실험실 상에서 배양할 수 있는 종류는 극히 제한되어 있어 개별 미생물 종에 대한 이해도 부족한 실정이다. 치아우식증은 구강 내 존재하는 수많은 미생물 복합체와 더불어 식이나 개개인의 전신건강과도 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다²²⁾. 이렇듯 여러 요인들의 복잡한 관련성으로 인해서 어느 한 가지 요인의 평가만으로 치아우식증의 발생을 예측하는 것은 매우 어려운 실정이다.

현재 치아우식 활성을 진단하기 위해 사용되는 방법 중 가장 널리 이용되는 것은 우식을 유발하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 다형연쇄구균 또는 유산균과 같은 특정 미생물을 선택적으로 파악하는 것이다. 이를 위해 MSB²³⁾ (mitis-sucrose-bacitracin) 또는 MRS²⁴⁾ (de Man-Rogosa-Sharpe medium) 같은 다양한 선택 배지가 개발되었고, 최근에는 분자생물학적인 기술을 도입하여 다형연쇄구균에 특이적인 단일 클론 항체를 만들어 보다 정확히 구강 내 존재하는 다형연쇄구균의 개체수를 측정하는 방법도 개발되었다^{6,7)}. 하지만 이들 모두는 다형연쇄구균 또는 유산균 등 단일 균종에 대해서만 파악

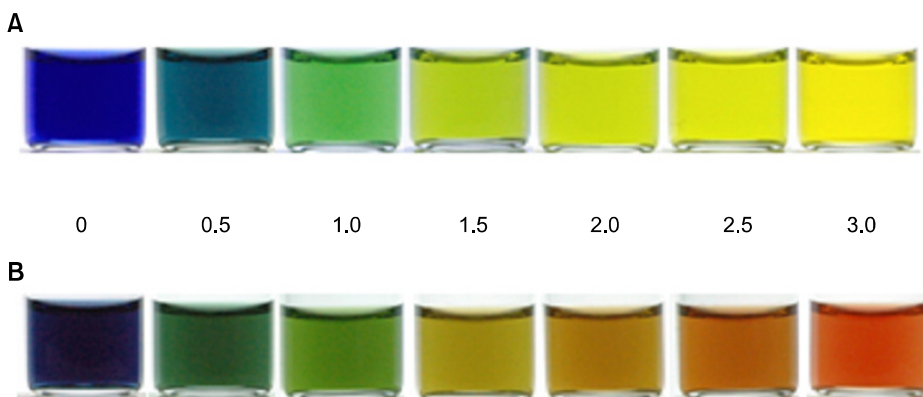


Fig. 4. Scales for diagnostic agent of Cariostat (A) and new development (B).

이 가능한 방법으로 실제로 우식발생에 관여하는 복잡한 구강 생태계를 전부 반영한다고 말할 수는 없다. 최근에 Takahashi와 Nyvad는 치아우식증 발생과정을 더욱 명확하게 설명할 수 있는 새로운 모형을 제시하였다¹¹⁾. 이 모형에서는 우식 발생 과정에 관여하는 바이오필름에는 기존의 우식병원균으로 잘 알려진 Mutans streptococci뿐만 아니라 훨씬 더 다양한 미생물이 관여하고 있으며, 특히 산성 환경에 적응하고 지속적으로 산 생산을 할 수 있는 low pH Non-Mutans streptococci와 *Actinomyces* 등이 치아우식발생에 핵심적인 역할을 한다고 보고하였다. 이러한 주장은 임상에서 특정 미생물만을 동정하는 우식활성검사법들을 활용할 경우 우식예측 정확도가 크게 떨어지는 현상에 대해서 설득력 있는 근거를 제시하고 있다. 한편 치아우식증의 발생과정을 확인해보면 미생물의 종류와는 상관없이 미생물이 분비한 최종 대사산물인 유기산의 양이 치아우식증을 유발하는데 직접적인 영향을 주는 것을 알 수 있다¹⁾. 따라서 본 연구에서는 특정 미생물의 양을 평가하는 기존의 평가법 대신에 구강 내 모든 미생물에 의해 최종적으로 생산된 유기산의 양을 평가하는 것이 보다 타당한 방법이라고 생각하였다.

특정 용액의 pH를 측정하기 위해서는 pH 전극을 이용하는 방법이 가장 일반적이다²⁵⁾. 하지만 이는 실험 장비가 따로 준비된 실험실 상에서만 가능한 방법으로 보다 쉽고 간편하게 pH를 확인하는 방법은 pH 지시약을 통해 색상변화를 관찰하는 것이다. 비록 pH 지시약을 이용한 측정은 색의 변화를 통해 판별하기 때문에 pH 전극을 사용한 경우보다 정확하진 않겠지만 육안으로 누구나 쉽게 구분할 수 있다는 장점을 갖고 있다. 이러한 비색법을 이용한 치아우식 활성검사는 Snyder에 의해 제시되었고¹⁵⁾, 이후 이와 관련된 많은 연구가 진행되었다^{8,26,27)}. 하지만 Snyder가 제시한 방법은 배지의 초기 pH가 5.0으로 많은 미생물 중 비교적 산성에서 잘 생존할 수 있는 락토박실리와 같은 미생물 종으로 그 범위를 국한시켰다는 한계점이 있다. 한편 1970년대 일본에서 개발된 Cariostat은 다양한 미생물들이 성장할 수 있도록 초기 배양액의 산도를 중성으로 설정하였고, 구강 미생물의 특성을 반영하여 고농도의 자당을 첨가한 방법을 개발하였다²⁸⁾. 그러나 기존 Cariostat 시스템에서는 pH가 낮아짐에 따라 파란색에서 점차 노란색으로 색상이 변화는 과정을 거

치며 특히 우식활성의 위험도를 알리는 색상이 노란색으로 나타난다. 즉, 물리학적으로 기존의 Cariostat는 색상 변화가 파란색($\lambda=470$ nm)에서 녹색($\lambda=550$ nm) 그리고 노란색($\lambda=600$ nm)으로 이어지고 있다. 하지만 실제 육안으로 볼 수 있는 빛의 영역은 가시광선영역으로 약 400 nm (보라색)부터 700 nm (붉은색)에 이른다. 또한 일반적으로 사람들이 노란색을 보면 희망, 쾌활, 따뜻함 등을 느낀다고 알려져 있으므로 직관적으로 위험성을 알리기에 부족한 실정이다.

이에 본 연구에서는 Cariostat의 장점을 유지하는 동시에 우식활성검사를 수행한 대상자가 보다 직관적으로 위험도를 알 수 있게 하기 위해 색상의 변화가 파란색에서 점차 붉은색으로 변화도록 다양한 pH 지시약을 적용하여 최적의 조건을 확인하였다. 완충용액을 통해 1차로 선별된 3가지 조성물 중 MO와 R이 함유된 조성물은 치태배양액에 적용한 경우 색상이 제대로 발현되지 않았는데, 이러한 결과는 아조 염료(Azo dye)의 경우 바이오필름에 존재하는 미생물에 의해서 분해된다는 Coughlin 등²⁹⁾의 보고와 일치하는 것으로 보인다. 그러나 NR이 함유된 조성물은 치태 배양액에서도 안정하여 우식활성이 높은 치태에 적용한 경우에도 붉은 색을 나타냈다. 따라서 본 연구를 통해 도출된 새로운 우식활성검사법은 육안으로 식별 가능한 빛의 영역인 가시광선에 해당하는 모든 색을 활용하여 우식활성을 보다 명확하게 구분할 수 있도록 하였다. 또한 일반적으로 붉은 색상은 사람에게 정열, 위험, 경고 등의 느낌을 주는 것으로 알려져 있어 본 연구를 통해 도출된 새로운 색지표를 이용하면 누구나 쉽게 우식활성에 대하여 인식할 수 있을 것으로 사료된다. 한편 본 연구에서 제시한 우식활성검사방법은 기존의 상품화된 방법과 달리 2단계로 나뉜다. 첫 번째 치태를 배양하는 단계와 두 번째 새롭게 개발된 지시약 조성물을 추가하는 단계이다. 물론 기존의 1단계 방법에 비해 번거로울 수 있지만, 본 연구에서 적용한 방법은 치태 배양이 완료된 후 피검자가 재방문했을 때 직접 대상자 앞에서 색이 변하는 과정을 보여줌으로써 우식활성에 대한 경각심을 보다 효과적으로 전달 할 수 있을 것으로 생각된다. 특히 어린이의 경우 실제 눈앞에서 변화되는 색을 통해 많은 호기심을 불러일으킬 수 있으며 동시에 적절한 교육을 통하여 보다 쉽고 재미있게 구강관리를 하도록 유도할 수 있으리라 사료된다.

본 연구에서는 선행연구를 통해 소개된 비색법을 이용한 간편한 우식활성검사법을 개선하고자 하였다. 이를 통해 향후 국내 기술을 이용하여 비교적 쉽고 편리한 우식활성검사를 수행할 수 있을 것으로 보인다.

본 연구에서는 11명이라는 제한된 수의 피검자로부터 채취한 치태를 이용하여 새로운 우식활성검사법의 효과를 평가하여 대상인원이 충분하지 못하였다. 따라서 추후 연구를 통해 다양한 대상자를 선별하여 새롭게 개발된 검사시약의 타당도를 평가하는 과정이 반드시 필요하다고 생각된다. 이를 위해서 기존에 우식활성검사로 많이 활용하고 있는 Dentocult system과의 비교를 비롯하여 대상자의 구강 상태와의 관련성에 대한 연구가 필요할 것이다. 또한 우식 활성이 높은 어린이나 교정치료 환자를 대상으로 오랜 기간 추적연구를 수행하여 새로운 검사법의 예측력을 확인하는 과정 역시 필요할 것이라 사료된다.

결론

본 연구는 새로운 치아우식증 활성 검사법을 개발하기 위해서 미생물이 분비하는 최종 대사산물인 산 생성량을 보다 정확하고, 쉽게 판별할 수 있는 최적의 pH 지시약 조합을 탐색하고, 이러한 조합을 pH 완충용액 및 사람 치태를 이용한 임상시험을 통해서 그 효능을 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. BCP, BCG, MR의 조합에서는 색 변화가 뚜렷하지 않은 반면 BCP, BCG, MO의 조합에서는 비율이 2 : 1 : 1.5인 조성물, BCP, BCG, R의 조합에서는 비율이 1.5 : 1 : 0.5인 조성물, 마지막으로 BCP, BCG, NR의 조합에서는 각 지시약의 비율이 2 : 1 : 1.5인 조성물에서 pH 7.0부터 pH 3.0사이의 pH 완충용액에서 비교적 뚜렷한 색 차이를 보였다.
2. 본 연구를 통해 선별된 3가지 조성물들을 이용하여 11명의 피검자에서 직접 채취한 치태를 배양한 배양액에 적용한 결과 BCP, BCG, NR가 2 : 1 : 1.5인 조성물이 완충용액을 이용한 결과와 가장 유사하게 다양한 색을 보였고, Cariostat과 비교해도 보다 뚜렷한 구분이 가능하였다.

본 연구를 통해 도출된 새로운 염기성 화합물인 pH 지시 혼합 시약을 이용할 경우 앞서 개발된 우식활성검사법과는 달리 다양한 pH 환경에서 남색, 녹색, 황색, 오렌지색, 적색 등으로 다양하고 명확하게 변화하는 우식활성검사법의 개발이 가능하였다. 본 연구결과를 토대로 향후 새로운 형태의 치아우식증 활성 검사제품의 개발도 가능하리라 사료된다.

참고문헌

1. Hojo S, Komatsu M, Okuda R, Takahashi N, Yamada T. Acid profiles and pH of carious dentin in active and arrested lesions. J Dent Res 1994;73(12):1853-1857.
2. Drucker DB. The role of sugar in the aetiology of dental caries: 4. The microbiological evidence. J Dent 1983;11(3):205-207.
3. Holloway PJ, Moore WJ. The role of sugar in the aetiology of dental caries: 1. Sugar and the antiquity of dental caries. J Dent 1983;11(3):189-190.
4. Angulo M, Cabanas B, Camporeale N, Emilson CG. Dental caries and caries-associated microorganisms in Uruguayan preschool children. Acta Odontol Scand 1999;57(6):301-305.
5. Jensen B, Bratthall D. A new method for the estimation of mutans Streptococci in human saliva. J Dent Res 1989;68(3):468-471.
6. Matsumoto Y, Sugihara N, Koseki M, Maki Y. A rapid and quantitative detection system for *Streptococcus mutans* in saliva using monoclonal antibodies. Caries Res 2006;40(1):15-19.
7. Everhart DL, Rothenberg K, Carter WH, Klapper B. The determination of antibody to *Streptococcus mutans* serotypes in saliva for children ages 3 to 7 years. J Dent Res 1978;57(4):631-635.
8. Kroes I, Lepp PW, Relman DA. Bacterial diversity within the human subgingival crevice. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96(25):14547-14552.
9. Kleinberg I. A mixed-bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria in dental caries causation: an alternative to *Streptococcus mutans* and the specific-plaque hypothesis. Crit Rev Oral Biol Med 2002;13(2):108-125.
10. Wolff MS, Larson C. The cariogenic dental biofilm: good, bad or just something to control? Braz Oral Res 2009;23(1):31-38.
11. Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. Caries Res 2008;42(6):409-418.
12. de Soet JJ, Nyvad B, Kilian M. Strain-related acid production by oral Streptococci. Caries Res 2000;34(6):486-490.
13. Bazzarraghaa T, Nishimura M, Hulan U, Matsumura S. The differences in acid-producing abilities among *Streptococcus sobrinus*. Pediatr Dent J 2001;11(1):37-42.
14. Hadley FP. A quantitative method for estimating *Bacillus acidophilus* in saliva. J Dent Res 1933;13(5):415-428.
15. Snyder ML. A Simple colorimetric method for the estimation of relative numbers of lactobacilli the saliva. J Dent Res 1940;19(4):349-355.
16. Shimono T, Sobue S. A new colormetric caries activity test. Dent Outlook 1974;43(6):829-835.

17. Shimono T. 齧蝕活動性 試驗(カリオスタット)의 細菌學的 ならびに 疫學的研究. 小兒齒科學雜誌 1983;21(1):107-130.
18. Nishimura M, Oda T, Kariya N, Matsumura S, Shimono T. Using a caries activity test to predict caries risk in early childhood. The JADA 2008;139(1):63-71.
19. 조용휘, 신승철. 수중의 구강환경검사 결과와 현존 구강상태와의 상관관계에 관한 임상적 연구. 대한구강보건학회지 1990;14(2): 243-258.
20. 백병주, 양정숙, 이영수, 양연미, 김재근. Cariostat를 이용한 아동의 우식활성에 관한 임상적 연구. 대한소아치과학회지 1998; 25(3):576-582.
21. Beynon RJ, Easterby JS. Buffer solutions. The basics. Oxford: Oxford University Press;1996:1-6.
22. Sayegh A, Dini EL, Holt RD, Bedi R. Food and drink consumption, sociodemographic factors and dental caries in 4-5-year-old children in Amman, Jordan. Br Dent 2002;193(1):37-42.
23. Bracquart P. An agar medium for the differential enumeration of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in yoghurt. J Appl Bacteriol 2008;51(2):303-305.
24. de MAN JC, Rogosa M, Elisabeth SM. A medium for the cultivation of lactobacilli. J Appl Bacteriol 1960;23(1):130-135.
25. Prestona AJ, Edgar WM. Developments in dental plaque pH modelling. J Dent 2005;33:209-222.
26. Birkhed D, Edwardsson S, Andersson H. Comparison among a dip-slide test (Dentocult), plate count, and Snyder test for estimating number of *lactobacilli* in human saliva. J Dent Res 1981;60(11):1832-1841.
27. Sims W. A modified Snyder test for caries-activity in humans. Arch Oral Biol 1968;13(8):853-856.
28. Rodis OMM, Okazaki Y, Ji Y, Matsumura S, Shimono T. Comparison of plaque samples and saliva samples using the CAT21 Test (Cariostat method). Pediatr Dent J 2005;15(1):6-9.
29. Coughlin MF, Kinkle BK, Bishop PL. Degradation of acid orange 7 in an aerobic biofilm. Chemosphere 2002;46(1):11-19.