

pH 순환 모형을 이용한
CPP-ACP 연고와 불소 바니쉬의
재광화 효과 비교

연세대학교 대학원

치 의 학 과

황 지 원

pH 순환 모형을 이용한
CPP-ACP 연고와 불소 바니쉬의
재광화 효과 비교

지도 이 제 호 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2007년 12월 일

연세대학교 대학원

치 의 학 과

황 지 원

황지원의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2007년 12월 일

감사의 글

본 논문의 처음 연구 계획에서부터 완성에 이르기까지 학문적 기틀을 잡아주시고 친절하고 소상한 가르침을 베풀어 주셨던 이제호 지도 교수님께 진심으로 감사를 드립니다. 예방 치과학 교실 실험실과 장비를 이용하게 해주셨으며 실험 설계와 진행에 있어서 지도와 조언을 아끼지 않으셨던 김백일 교수님께도 깊이 감사드리며, 논문 심사 과정에서 많은 격려와 지도를 하여 주신 최형준 교수님께도 감사드립니다. 또한 많은 관심과 도움을 주신 소아 치과학 교실 교수님들, 선생님들과 예방 치과학 교실 선생님들께도 깊은 감사를 전합니다. 특히 실험 계획과 진행, 통계분석에 이르기까지 정말 많은 도움을 주신 예방 치과학 교실 정승화 선생님과 시편 제작에 도움을 주신 강시묵 선생님, 병원과 대학원 선배로서 따뜻한 조언의 말씀 주신 안소연 선생님께도 감사드립니다.

대학원 수업과 병원 근무를 병행하면서 진료에 부족함이 많았을 저에게 항상 따뜻한 배려와 많은 도움을 주신 목동 예치과병원 이영순 원장님께 진심으로 감사드립니다. 많은 응원을 보내준 목동예치과 어린이 청소년 진료부 식구들, 이재연 선생님, 예가족 여러분, 여러 원장님들께도 깊은 감사를 표합니다.

항상 부족한 며느리를 사랑으로 감싸주시고 배려해주시는 시어머님과 가족들 특히, 늘 든든한 지지자인 부모님과 남편, 아들 윤제에게 무한한 감사와 영광을 돌리며 이 작은 기쁨의 결실을 함께 나누고 싶습니다.

지금 이 순간도 제 앞길을 인도하시는 하나님께 이 모든 영광을 돌리며, 2008년 새해에는 다시 학교로 돌아가 새로운 출발을 시작하는 저와 저를 지금껏 도와주신 모든 분들에게 행운이 함께하기를 기도합니다.

2007 년 12 월

황 지 원 드림

차 례

그림 차례	iii
표 차례	iv
국문 요약	v
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	5
1. 실험 재료	5
가. 법랑질 시편	5
나. 탈회 용액(Demineralizing solution)	6
다. 재광화 용액(Remineralizing solution)	6
라. 불소 바니쉬와 CPP-ACP 연고	6
2. 실험 방법	7
가. 초기 표면 경도 측정	7
나. 인공 초기 우식 병소 형성과 탈회 후 표면 경도 측정	7
다. 실험군 설정과 pH 순환 처리	8
라. pH 순환 과정 처리 후 시편의 표면 경도 변화 측정	9
마. Confocal laser scanning microscope (CLSM)을 이용한 탈회층의 두께 관찰	10
바. Scanning Electron Microscope (SEM)을 이용한 법랑질 표면의 미세구조 관찰	10
3. 통계 분석	10

III. 연구 결과	11
1. 재광화 전후의 미세 표면 경도 변화(Δ VHN)	11
2. CLSM (Confocal Laser Scanning Microscope)을 이용한 탈회층의 두께 관찰	14
3. SEM (Scanning electron microscope)을 이용한 법랑질 표면의 미세 구조 분석	16
IV. 고 찰	18
V. 결 론	29
참고문헌	31
영문 요약	41

그림 차례

Figure 1. Bovine tooth specimens embedded in acrylic columns	5
Figure 2. A comparison of the percentages of surface microhardness recovery, or SMHR of six regimens	13
Figure 3. CLSM images of specimens	15
Figure 4. Surface appearance of the experimental groups observed under SEM $\times 5,000$ and $\times 50,000$	17

표 차례

Table 1. The names and main components of the products used	7
Table 2. Specimen numbers and treatment protocol for each group	9
Table 3. The treatment schedule used for pH cycling (Day 2-15)	9
Table 4. VHN values of baseline, after demineralization, after remineralization, and VHN change (Δ VHN) and the results of Duncan's Studentized range test	12

국문 요약

pH 순환 모형을 이용한 CPP-ACP 연고와 불소 바니쉬의 재광화 효과 비교

본 연구의 목적은 불소 바니쉬와 10% CPP-ACP(Casein Phosphopeptide Amorphous Calcium Phosphate)를 함유한 연고(Tooth MousseTM, GC corp, Japan)의 재광화 효과를 실험실 연구를 통해서 비교해 보는 것이다.

소의 전치를 이용하여 범랑질 시편을 제작하고, 초기 표면 경도를 측정하여 건전한 시편을 선별하고, 48시간동안 탈회시켜서 인공적으로 초기 우식을 유발시켰다. 이후 표면 경도를 측정하여 최종 실험에 사용될 시편을 선정하여 6개의 군으로 나누었다. 두 종의 불소 바니쉬 Fluor Protector[®] (0.1% wt F⁻, Ivoclar, USA; FP)와 Cavity Shield[®] (2.26% F⁻, Omnii, USA; CS)를 사용하였고, 이들을 1회씩만 도포한 군과 Tooth MousseTM (TM)만을 매일 2회 도포한 군, FP를 1회 도포 후 TM을 매일 2회 도포한 군, 아무것도 처리 안한 음성 대조군, FP를 격일 간격으로 도포한 군으로 나누었다. 구강 내의 조건을 최대한 유사하게 재현하기 위해 pH 순환 모델을 사용하여 15일간 탈회와 재광화를 반복하였다. 15일간의 pH 순환이 끝나고 최종 경도를 측정하여 경도의 변화값을 각 군별로 비교하여 재광화 효과를 평가해 보았다. 이 후 confocal laser scanning microscope (CLSM)을 이용하여 각 군의 탈회 층의 두께 비교를 하였고, scanning electron microscope (SEM)을 이용하여 각 군의 범랑질 표면 양상을 비교해보았다. 이상의 연구로 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

1. CPP-ACP 연고(TM)를 매일 아침, 저녁 10분씩 2회 처치한 군은 음성 대조군과 유사한 재광화 효과를 나타내었으며, 다른 군들과 비교 시 최저의 재광화율을 보였다.

2. 불소 바니쉬를 처리한 군들은 TM만 처리한 군이나 대조군과 재광화율에 통계적으로 유의한 차이가 있었다($p < 0.05$). 재광화율은 CS를 1회 도포한 군이 가장 높았으며, 이는 다른 불소 바니쉬 처리군들과 통계적으로 유의한 차이가 있었다($p < 0.05$). 그 다음 높은 군은 FP를 1회 처치하고, 매일 2회씩 TM을 병행하여 처리한 군이었고, 그 다음은 FP를 격일 처치한 군, FP를 1회 처치한 군 순이었으나 이 세 집단 간의 통계적으로 유의한 차이는 없었다($p > 0.05$).

3. CLSM으로 재광화 후 병소의 표면 깊이를 측정된 결과 CS를 처리한 군이 탈회 병소의 깊이가 가장 작았으며, 그 다음이 FP 바니쉬를 처리한 군들 순이었다. TM만 처리한 군은 대조군과 함께 가장 큰 탈회 병소 깊이를 나타냈다.

4. SEM으로 시편의 미세 표면 변화를 관찰한 결과, CS를 처리한 군이 가장 표면이 매끄러웠으며, 탈회된 치아의 공극을 가장 많이 매워주어 소공이 거의 없이 작고 조밀한 법랑 결정을 나타내었다. 마찬가지로 불소 바니쉬 군들에 비해 TM만을 단독 처치한 군은 대조군과 함께 표면의 소공이 크고 많이 형성되어 있었으며, 탈회된 양상이 뚜렷했다.

따라서 단기간의 실험실 평가 시 CPP-ACP 연고의 재광화 효과는 거의 없다고 평가할 수 있으며, 불소 바니쉬가 CPP-ACP 연고보다 재광화 효과

가 더 뛰어났다. 또한 CPP-ACP 연고와 불소 바니쉬를 병행하여 사용할 경우 상호간의 상승효과 역시 매우 미미했고, 불소 바니쉬의 도포 횟수와 효과 사이에는 용량-반응 관계가 성립하지 않았다. 그리고 저농도와 고농도의 불소 바니쉬의 효과를 비교해보았을 때, 고농도 불소 바니쉬의 재광화 효과가 더 우수함을 알 수 있었다.

핵심되는 말: 불소 바니쉬, CPP-ACP, 재광화, pH 순환 모형

pH 순환 모형을 이용한 CPP-ACP 연고와 불소 바니쉬의 재광화 효과 비교

<지도교수 : 이제호>

연세대학교 대학원 치 의 학 과

황 지 원

I. 서 론

영유아기의 구강 관리는 평생 건강의 기틀이 되므로 이 시기의 구강 관리에 대한 중요성은 널리 인식되고 있다. 영유아기에 우식에 이환된 어린이는 유치에 추가적으로 우식이 이환될 확률이 높으며, 유치의 우식이 심한 아동의 경우 영구치도 우식이 빈발하는 것으로 알려져 있다(Jaafar, 1988; Helm, 1990). 그러므로 치아 우식을 미리 예방할 수 있고, 조기에 발견하여 그 진행을 억제시키거나 반전시킬 수 있다면 많은 고통과 비용의 낭비를 줄일 수 있을 것이다.

과거의 치아 우식에 대한 접근은 병소를 외과적으로 제거하고, 충전, 수복 하는 것이었으나, 최근의 추세는 비침습적인 최소 개입의 추세로, 약물을 이용하거나 우식을 야기하는 미세 환경을 제어하여, 조직의 치유를 야기하고 우식의 진행을 정지시키며, 재광화를 유발하는 추세이다.

구강 건강 관리 방법으로 가장 보편적인 것은 양치질이지만 소와 열구나

치간부에 칫솔모가 잘 들어가지 못하여 치면 세균막을 효과적으로 관리하기 힘들 뿐만 아니라, 타액의 완충작용이 미치기도 어렵기 때문에 양치질만으로 완벽하게 우식증을 예방할 수는 없다(Newbrun, 1989). 따라서 우식 예방을 위해 보다 강력하고 효과적인 방법들이 연구되고 있으며, 불소 뿐만 아니라 다양한 구강위생 보조 제품들이 개발되어 활용되고 있다.

우식증 예방을 위해 가장 많이 사용되는 불소의 치아 우식 예방 효과는 주로 법랑질의 탈회 방지와 재광화로 알려져 있다. 불소는 치질에 침착되어 치아 표면의 경도를 증가시키고, 내산성을 높이거나 탈회된 치질의 재광화를 촉진시킨다(Mellberg, 1983; Margolis, 1986). 또한 치태의 성분, 성장, 대사에도 영향을 주고, 세균의 산 생성을 억제하며 치아 우식 예방 효과를 나타낸다고 생각되어진다(Brudevold, 1978; Ögaard, 1983).

불소의 영향에 대한 최근의 견해는 법랑질에 함유되어 있는 불소 이온의 농도의 중요성을 강조하는 내산성 강화 기전 보다는 치아가 맹출된 후에 치면 세균막이나 타액내에 존재하여 구강내 환경을 무기염이 많은 상태로 유지해 주는 재광화 향상 기전 쪽에 무게를 두고 있다(Wefel, 1984; Arend, 1990; Margolis, 1990). 따라서 오래전부터 여러 가지 불소 제제를 다양한 방법으로 적용시켰고 최근에는 치약, 양치액, 겔, 폼, 바니쉬 등 불소 농도, pH, 적용 방법에 따라 다양한 형태의 불소 제제가 소개되고 있다.

APF 겔은 현재 가장 일반적으로 사용되고 있는 국소 도포용 불소 제제이나, 어린이의 경우 도포 시 다량의 불소를 삼키는 것과 그 효과가 단시간만 유지되는 것이 문제점으로 지적되고 있다(Bawden, 1998). 이에 대한 대안으로 1960년대에 불소 바니쉬가 개발되었다. 불소 바니쉬는 고농도의 불소를 치아 표면에 직접 발라주게 되는데, 영구 접착은 아니지만, 법랑질 표면과의 접촉 시간을 연장시켜서 구강 내에 불소 이온을 증가시켜주는 효

과가 있다고 보고되고 있다(Bawden, 1998). 보통 불소 바니쉬는 충전 와동의 이장재로 쓰이거나, 치각 과민을 완화하는 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다. 아직까지 FDA에서 항우식제로 인정받지는 못하였지만, 항우식 역할을 하는 것이 많은 생체 내 연구와 생체 외 연구에서 입증되었으며, 이에 대한 많은 연구가 현재까지 활발히 진행되고 있는 상황이다. 불소 바니쉬는 치아에 부착성이 좋은 천연 레진에 불소를 결합시켜 고농도의 불소를 장기간 치아에 접촉시킴으로써 높은 우식 예방 효과를 얻는다고 알려져 있으며, 도포 술식이 간편하고 도포 시간이 짧으며, 타액 흡입이나 특별한 장비를 필요로 하지 않고, 다량의 불소를 섭취할 가능성이 적은 장점을 갖는다. 불소 바니쉬의 치아 우식 예방 효과는 불소겔이나 다른 불소 국소 도포 제제들보다 우수한 것으로 보고되고 있다(Seppa, 1995; Petersson, 1993; Blinkhorn, 1998; Beltran-Aguila, 2000).

최근에 CPP-ACP(Casein Phosphopeptide Amorphous Calcium Phosphate)가 새로운 우식 예방 물질로 각광받기 시작했다. CPP-ACP는 껌, 치약, 우유, 구강 양치액등 다양한 제품에 첨가되어 시판되고 있으며, 그 항우식 효과가 많은 실험실, in vivo, in situ 연구들에서 보고되고 있다. 우리나라에서는 CPP-ACP 연고(Tooth MousseTM, GC corp, Tokyo, Japan)가 판매되고 있다. Tooth MousseTM는 우유 단백질인 casein phosphopeptide(CPP)의 amorphous calcium phosphate(ACP)와의 nano-complex에 기초하고 있다. CPP는 ACP를 CPP내의 여러 phosphoserine 잔기들 (-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-)과 결합시킴으로써 수용액 내에서 칼슘과 인을 안정화시키고, CPP-ACP 복합체를 형성하여 칼슘과 인 이온의 저장고 역할을 한다. 만일 치태나 구강내의 pH가 떨어진다면 CPP-ACP가 자유 칼슘과 인 이온으로 분해되어 초기 법랑질 표면하 병소의 탈회를 방지하고 재광화를 가능케 한다. (Reynolds 1998, 1999)

불소 바니쉬와 CPP-ACP 연고가 우리나라에 도입되어 사용된 지는 불과 수 해 전부터이며, 아직 그 효과에 대한 연구들은 아직도 많이 미흡한 편이다. 또한 불소 바니쉬와 CPP-ACP 둘 다 재광화를 유도한다고 하지만 둘 중 어느 것이 더 효과적인지에 대한 선행 연구도 부족한 실정이다. 문헌 고찰 결과 지금까지 CPP-ACP와 불소 바니쉬의 재광화 효과를 직접 비교한 선행 연구들이 없었으므로, 본 연구를 계획하여 불소 바니쉬와 CPP-ACP 연고의 재광화 효과를 비교해보고자 하였다.

본 연구의 목적은 첫째, pH 순환 모형을 이용하여 불소 바니쉬와 CPP-ACP 연고의 재광화 효과를 비교하며, 둘째, 그 둘을 병용하였을 때 재광화 효과가 상승하는지를 알아보는 것과, 셋째, 불소 바니쉬의 농도 차이와 도포 횟수에 따라 재광화 효과의 차이가 있는 지를 알아보는 것이다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

가. 법랑질 시편

육안으로 보아 법랑질 형성 부전이나 치아 우식의 흔적이 없는 건전한 표면 법랑질을 가진 소의 영구 절치로부터 직경 3 mm의 원통형 법랑질 시편을 취한 후 아크릴 봉에 포매하고, 시편을 600번, 800번, 1000번, 1200번, 2000번 연마지로 단계별 연마를 하였고, 1 μm 의 다이아몬드 페이스트를 사용하여 법랑질 표면이 아크릴 봉의 장축에 대해 직각이 되도록 최종 연마하여 총 120개의 시편을 제작하였다(홍 등, 1997).



Fig 1. Bovine tooth specimens embedded in acrylic columns

나. 탈회 용액(Demineralizing Solution)

탈회 용액은 수산화인산칼슘(Calcium Phosphate; tribasic, Sigma, USA) 이 50% 포화된 0.1 M 젖산(lactic acid, Sigma[®], USA)을 50% NaOH (Sigma[®], USA)와 50% HCl(Sigma[®], USA) 용액을 이용하여 30분간 pH 5.0을 계속 유지시킨 후 0.55 μ m 여과지(Whatman No. 42)를 이용하여 여과 하였다. 여과된 용액은 0.2% carbopol 907(ETD 2050, Noveon Inc., USA)을 첨가한 후 50% NaOH를 이용하여 최종 pH를 5.0으로 맞추었다.

다. 재광화 용액(Remineralizing solution)

pH 순환 처리에 사용할 재광화 용액은 Featherstone 등(1988)과 같은 방법으로 인공 타액과 사람의 자극성 타액을 1:1로 혼합하여 사용하였다.

인공 타액은 2000 ml 증류수에 위점액소(0.22%, Difco[®], USA), 염화칼륨(KCl, Sigma[®], USA) 0.114%, 제2수화인산칼륨(KH₂PO₄, Sigma[®], USA) 0.0738%, 염화나트륨(NaCl, Duksan Pure Chemical Co. Ltd., South Korea) 0.038%, 염화마그네슘(MgCl₂, Sigma[®], USA) 1.033%, 염화칼슘(CaCl₂·2H₂O, Sigma[®], USA) 0.0213%로 구성하였고 pH 6.8로 조절하여 사용하였다. 자극성 타액은 전신 질환이 없는 20~50대 사람에게서 0.5 g의 파라핀 왁스를 씹어서 얻은 후 원심 분리하여 상층액만을 이용하였다.

라. 불소 바니쉬와 CPP-ACP 연고

두 종의 불소 바니쉬와 한 종의 CPP-ACP 연고를 사용하였는데, 그 상품명과 제조사, 주요 성분은 Table 1과 같다.

Table 1. The names and main components of the products used.

Name	Composition
Tooth MousseTM (GC corp., Tokyo, Japan : TM)	10% w/w CPP-ACP containing paste
Fluor Protector[®] (Ivoclar, North America: FP)	0.1% Fluoride containing 0.9% difluorosilane Fluoride varnish
Cavity Shield[®] (Omnii products, West palm beach, FL, USA: CS)	2.26% Fluoride containing 5% NaF Fluoride varnish

2. 실험 방법

가. 초기 표면 경도 측정

시편은 Vickers Diamond Indenter가 부착된 미세경도측정기(Microhardness tester, Zwick, Germany)를 이용하여 상, 하, 좌, 우측의 4부위에서 표면 경도계의 압인 방향이 시편의 법랑질 표면에 수직에 되도록 200 g의 하중을 10초 동안 가하여 압인하고 계측 현미경 400배의 배율에서 압흔의 크기를 계측하여 법랑질 표면의 Vickers hardness number (VHN)를 측정한 후 4부위의 평균을 구하였다. 정상 우치 법랑질의 표면경도인 평균 270-330 VHN범위에 해당하는 시편만을 선정하여 120개 중 108개의 시편만을 선택하여 탈회실험에 사용하였다.

나. 인공 초기 우식 병소 형성과 탈회 후 표면 경도 측정

모든 시편은 탈회 용액 13 ml에 넣어 37 °C 항온기에서 48시간 처리하여 인공 초기 우식 병소를 형성하였다(홍 등, 1997). 법랑질 표면의 미세 경도

변화를 관찰하기 위해 탈회 후 표면 경도를 측정하였는데, 평균 VHN이 25-70 범위의 초기 우식 법랑질의 표면 경도를 갖는 시편만을 실험에 사용하였으며, 평균의 10%를 벗어나는 경우에는 실험에서 제외하여 탈회시킨 108 시편 중 96개의 시편을 최종 선택하였다. 선택된 시편은 실험 전까지 증류수로 습도를 유지하여 냉장 보관하였다.

다. 실험군 설정과 pH 순환 처리

가, 나의 과정을 거친 96개의 시편을 측정된 경도의 순서에 따라 각 군간의 처리 전 표면 경도 차이가 최소로 되도록 각 군에 고르게 배치하여 6개의 군으로 나누었다. 1군은 TM을 1일 2회, 각 10분간 표면에 처리하였고, 2군은 FP 5 μ l를 pH 순환 처리 첫날 1회만 처리하였다. 3군은 FP를 5 μ l씩 격일 간격으로 처리하였고, 4군은 FP 5 μ l를 pH 순환 처리 첫날 1회만 처리하고, 둘째 날부터는 TM을 1군과 동일한 조건으로 처리하였다. 5군은 CS를 2군처럼 pH 순환처리 첫날만 1회 도포하였고, 6군은 음성 대조군으로 아무것도 처리하지 않은 채 매일의 탈회와 재광화 과정을 반복하였다(Table 2).

구강 환경을 비슷하게 재현해 주기 위해 모든 용액의 온도를 37 °C로 조정하고 하루 4시간의 탈회 시간(음식물 섭취 시 pH가 떨어지는 시간)과 19시간의 재광화 시간(구강 내 타액만 존재하는 시간)을 부여하였다. 탈회는 탈회 용액 20 ml를 동일 용기에 분주하여 37°C에서 교반 없이 처리하였고, 재광화는 인공타액과 사람의 자극성 타액을 1:1로 혼합한 용액 20 ml에 시편을 담고 교반하였다. 타액은 1일 1회 교환해 주었으며, 이상의 과정을 15일간 반복하였다(Table 3).

Table 2. Treatment protocol for each group

Group	N	Treatment
1	18	Tooth Mousse, twice per everyday, for 10minutes each
2	18	Fluor Protector 5 μl , once(1st day only)
3	18	Fluor Protector 5 μl , once per every other day
4	18	Fluor Protector 5 μl once(1st day only)+ Tooth Mousse twice per everyday, for 10 minutes each
5	12	Cavity Shield once(1st day only)
6	12	Negative control

Table 3. Daily procedure of pH cycling(Day 2-15)

Time	Treatment
08:00 - 08:30	Treatment (Group 1, 4)
08:30 - 14:00	Remineralization (50% artificial+ 50% human saliva, Group 1-6)
14:00 - 18:00	Demineralization
18:00 - 20:00	Remineralization (50% artificial+ 50% human saliva, Group 1-6)
20:00 - 20:30	Treatment (Group 1, 4; Group 3- every other day)
20:30 - 08:00	Remineralization (50% artificial+ 50% human saliva, Group 1-6)

라. pH 순환 처리 후 시편의 표면 경도 변화 측정

15일 동안 pH 순환 처리된 시편은 순환과정 처리 전 표면경도를 측정하였던 4부위와 인접한 곳에서 재차 VHN을 측정하여 실험 전후의 VHN 차이를 재광화 효과로 판정하였다.

마. Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM)을 이용한 탈회층의 두께 관찰

처리 전후의 미세 경도를 비교한 후 각 군마다 상위 1, 3번째 값을 갖는 시편 두 개씩을 선택하여 절단기를 이용하여 시편장축에 따라 자른 후, 0.1mM Rhodamine B solution으로 1시간동안 염색하고, 증류수로 수세시키고 건조시킨 다음, Confocal Laser Scanning Microscope(LSM510, Carl Zeiss Meditec AG, Germany)를 이용하여 재광화 효과를 관찰하였다. CLSM은 543 nm 여기 파장(excitation wavelength)을 갖는 He-Ne 레이저와 560 nm의 long pass barrier filter를 사용하여 탈회된 병소가 있는 법랑질에서 형광을 나타낸다.

바. Scanning Electron Microscope(SEM)을 이용한 법랑질 표면의 미세구조 관찰

군별 법랑질 표면의 미세 구조 차이를 비교하기 위해 각 군마다 상위 2, 4번째 경도 값을 갖는 시편 두 개씩을 선택하여 scanning electron microscope (S 2000, Hitachi, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

3. 통계 분석

이상과 같은 실험을 통하여 수집된 모든 자료들은 SPSS 12.0 통계 package program을 이용하여 각 군의 표면 미세 경도의 평균과 표준편차 및 시편 처리전후 표면 경도차를 구하고, 각 군간의 유의성 검정을 위해 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 시행한 후, 던칸의 스튜던트화 범위 검정(Duncan's Studentized range test)을 시행하여 각 군 간의 표면 미세 경도 변화율(재광화율) 차이를 유의수준 $\alpha=0.05$ 로 사후 검정하였다.

III. 연구 결과

1. 재광화 전후의 미세 표면 경도 변화(Δ VHN)

15일간의 pH 순환 처리가 끝나고 재광화 후 표면 경도를 측정한 다음 통계분석을 하여 각 군별 재광화 전후의 경도 변화값(Δ VHN)의 평균 및 표준 편차와 던칸의 스튜던트화 범위 검정 결과를 구하였다(Table 4).

Δ VHN값은 Cavity Shield[®](CS)를 도포한 5군이 가장 높았으며, Fluor Protector[®](FP)와 CPP-ACP 연고(Tooth Mousse; TM)을 같이 도포한 4군이 그 다음으로 높았다. FP만을 도포한 2군과 FP를 격일로 도포한 3군은 Δ VHN이 거의 비슷했고, 거의 차이가 없었다. TM만을 도포한 1군은 아무 것도 도포하지 않은 대조군보다 오히려 Δ VHN값이 약간 낮게 나왔지만 통계적으로 유의한 차이는 없었다($P>0.05$).

Gelhard 등(1979)에 의한 재광화 정도 계산법을 이용하여 각 군별 재광화율을 표면 경도의 향상율(% surface microhardness recovery or %SMHR)을 이용하여 나타내었다(Fig.2).

$$\%SMHR = \frac{VHN_D - VHN_R}{VHN_D - VHN_B} \times 100$$

VHN_D = VHN after demineralization

VHN_R = VHN after remineralization

VHN_B = baseline VHN

던칸의 스튜던트화 범위 검정 결과는 TM을 처리한 1군과 대조군인 6군이 통계적인 차이가 없이 가장 낮은 재광화율을 보였으며, FP 처리군인 2, 3, 4군들 간에는 통계적 유의차가 없이 그 다음 높은 재광화율을 보였고($p>.05$),

CS를 처리한 5군은 다른 군들에 비해 통계적으로 유의하게 가장 높은 재광화율을 나타내었다($P<0.05$) (Table 4 and Fig2).

Table 4. VHN values of baseline, after demineralization, after remineralization, and VHN change(Δ VHN) and the results of Duncan's Studentized range test

Group [†]	Baseline VHN	VHN after demineralization	VHN after remineralization	Δ VHN	Duncan's test [‡]
1	305.58±15.87	44.24±11.42	57.80±11.44	13.17± 3.63	A
2	305.26±20.36	45.48±11.43	69.72±14.21	27.39± 9.63	B
3	304.54±15.52	46.21±12.06	77.19±17.97	28.82± 9.54	B
4	306.90±14.41	46.96±12.92	80.33±20.13	32.39±12.25	B
5	305.24± 8.04	44.55± 9.97	83.56±13.94	40.21± 9.10	C
6	304.51±19.10	44.78± 9.92	59.59±11.96	14.81± 6.13	A

† 1: Tooth Mousse, twice per everyday, for 10minutes each
2: Fluor Protector 5 μ l, once (1st day only)
3: Fluor Protector 5 μ l, once per every other day
4: Fluor Protector 5 μ l once(1st day only)+ Tooth Mousse twice per everyday, for 10 minutes each
5: Cavity Shield once (1st day only)
6: Negative control

‡ A,B,C: The same letter indicates no significant difference at $\alpha= 0.05$ by Duncan's Studentized range test.

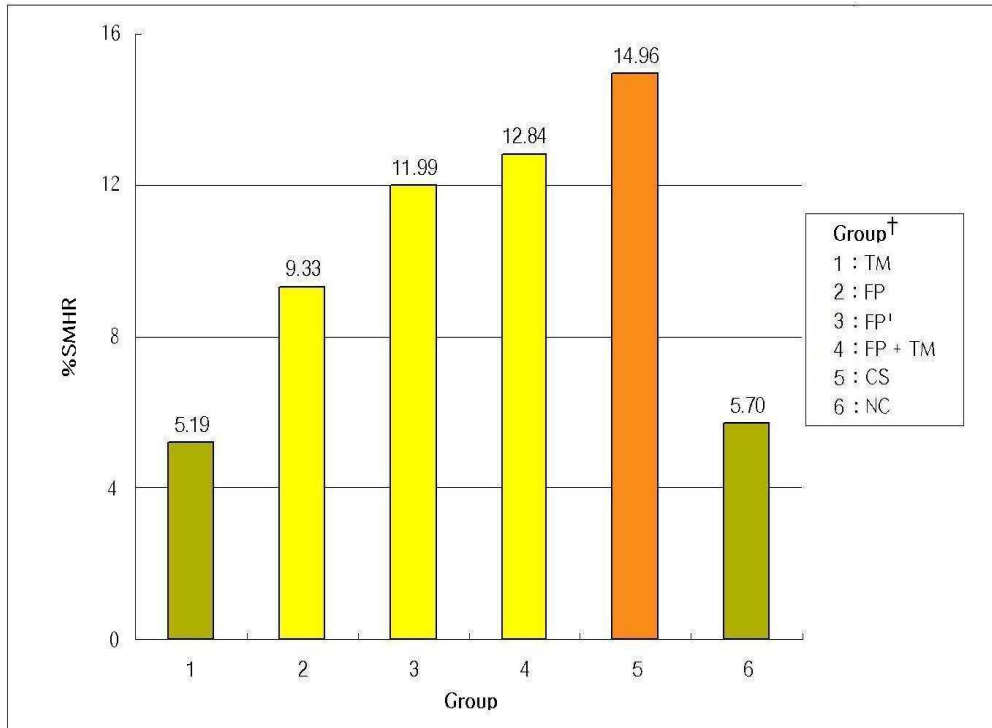


Fig 2. A comparison of the percentages of surface microhardness recovery, or SMHR of six regimens

† TM: Tooth Mousse
 FP : Fluor Protector, once
 FP' : Fluor Protector, once per every other day
 NC : negative control

* The same color indicates no significant difference at $P = 0.05$ by Duncan's Studentized range test.

2. CLSM(Confocal Laser Scanning Microscope)을 이용한 탈회층의 두께 관찰

미세 정도 측정을 통해 확인된 실험군들의 재광화 효과를 Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM)을 사용하여 $\times 10$ 의 배율로 평가해 보았다. 탈회된 치아 구조는 정상 치아 구조보다 더 많은 소공을 가지고 있으며, 이런 소공에 형광을 내는 염색액들이 침투할 수 있으므로, 탈회의 정도가 높아질수록 더 많은 소공이 형성되고 더 많은 염색액이 침투된다. 따라서, CLSM으로 관찰시 탈회가 많이 되었을수록 Rodamine B가 많이 침투되어 붉은 색 층의 두께가 증가하는 양상을 나타내었다. CS군이 Rhodamine dye 투과층(탈회층)이 가장 얇았으며, 그 다음이 FP군들(2-4군)순이었고, TM 단독 투여군은 대조군과 함께 가장 두꺼운 탈회층을 나타내었다(Fig. 2).

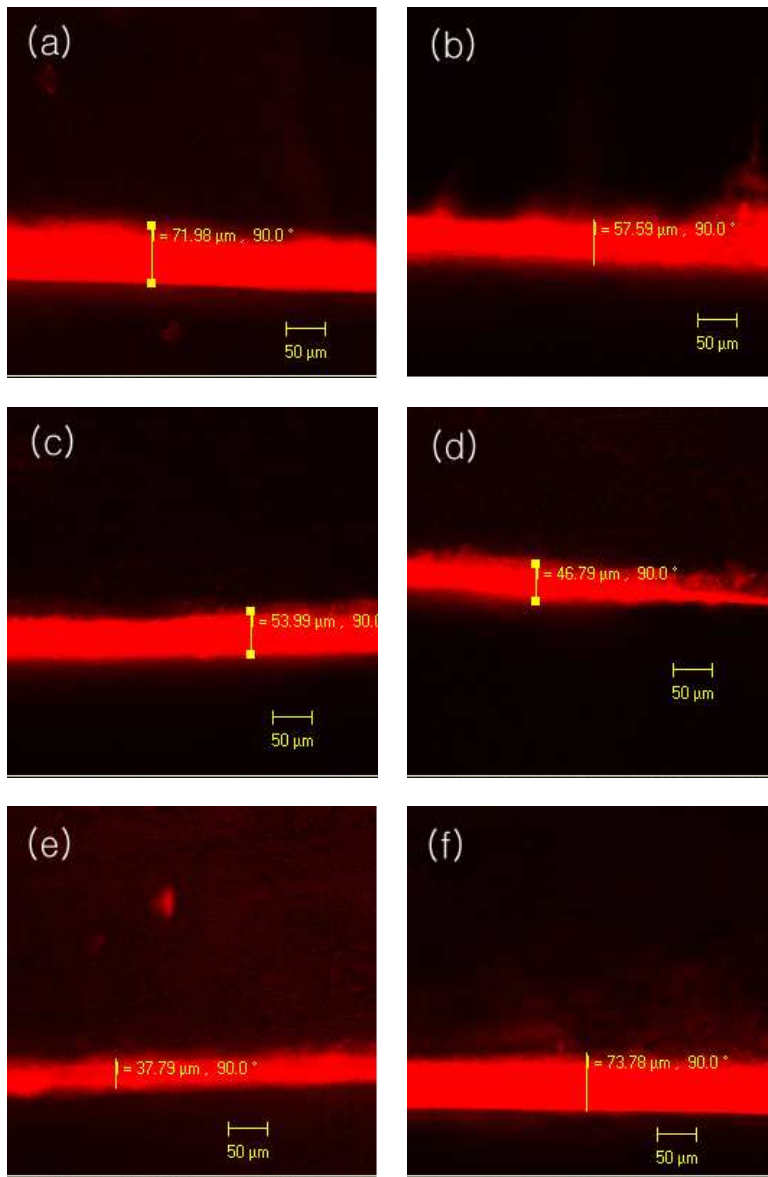


Fig 3. Confocal laser scanning microscopy images of specimens ($\times 10$):

After the specimens' demineralization, they were treated with various agents, in various ways; Tooth Mousse, twice per everyday, for 10 minutes each (a), Fluor Protector 5 μl , once (b), Fluor Protector 5 μl , once per every other day (c), Fluor Protector 5 μl once (1st day only) + Tooth Mousse twice per everyday, for 10 minutes each (d), Cavity Shield once (e), Negative control (f)

3. SEM(Scanning Electron Microscope)을 이용한 법랑질 표면의 미세 구조 분석

SEM 소견 상 대조군과 1군이 재광화가 가장 적게 일어나서 표면 거칠기가 가장 심하였고, 법랑 소주간 공극 부위의 무기질 소실이 많이 일어났을 보였고, 고배율에서는 결정의 크기가 크고 모양이 긴 타원형도 있었으며, 간격이 듬성듬성하여 소공이 형성된 곳도 많이 관찰되었다. 2군과 3군 모두 1, 6군에 비해서는 매끈한 표면을 보였고, 결정의 크기도 작았다. 4군과 5군은 거의 비슷하게 표면이 매우 매끄러웠고, 법랑소주의 가장 자리가 채워져 있는 소견을 보였으며, 고배율에서 결정의 크기가 매우 작고 조밀했다(Fig. 3).

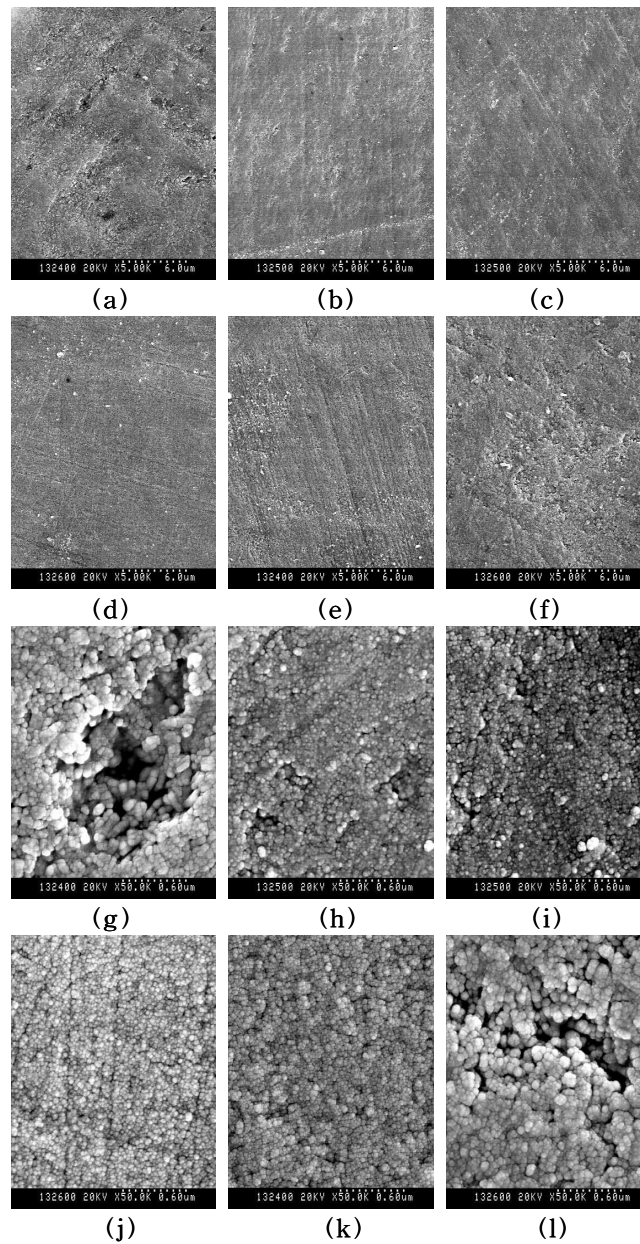


Fig 4. Scanning electron microscopy images of specimens (a-f: x 5,000, g-l: x 50,000)

After the specimens' demineralization, they were treated with various agents, in various ways; Tooth Mousse, twice per everyday, for 10minutes each(**a, g**), Fluor Protector 5 μl , once(**b, h**), Fluor Protector 5 μl , once per every other day(**c, i**), Fluor Protector 5 μl once(1st day only)+ Tooth Mousse twice per everyday(**d, j**), Cavity Shield once(**e, k**), Negative control(**f, l**)

IV. 고 찰

본 실험에서는 우치의 법랑질에 인공 우식을 유발한 후, pH 순환 모형을 이용하여 10% CPP-ACP 연고(Tooth Mousse, GC corp, Japan)와 불소 바니쉬 간의 재광화 효과를 비교해보고, 그 둘의 병용 시 상승효과의 유무를 알아보고자하였다.

CPP-ACP는 치아면에 ACP를 국소화 시켜서 자유 칼슘과 인 이온의 활성을 완충하는 역할을 하고, 법랑질에 상기 이온들의 과포화 상태를 유지시켜서 탈회를 억제하고, 재광화를 촉진하는 것이 기전으로 알려져 있다(Reynolds, 1999). 즉, CPP-ACP는 치아 표면에 calcium phosphate를 운반하고 안정화시켜서 칼슘과 인 이온의 높은 농도 기울기를 유지하고, 산 공격을 받은 법랑질의 순 광물 손실을 감소시키며, 수산화인회석을 형성하여 재광화를 촉진한다(Shen et al. 2001; Reynolds et al., 2003; Iijima et al., 2004).

CPP-ACP의 항우식 효과는 많은 실험실과 임상 연구들에서 입증되어왔다(Reynolds 1995, 1997, 1998, 1999, 2003 ;Rose 2000; Shen et al. 2001; Maki 2006; Kanako 2007). CPP-ACP는 불소처럼 이미 재광화된 병소의 탈회 저항 효과도 있으며, CPP-ACP에 의해 유도된 광물은 타액 자체만으로 유도된 광물보다 산 저항성이 더 크다고 보고되었다(Iijima et al. 2004; Cai et al., 2007). CPP-ACP는 타액 피막과 치면 세균막의 세균 표면뿐만 아니라 세포 간 기질에도 결합하는 것이 입증되었다(Reynolds et al, 2003). 그러나 최근의 CPP-ACP 껌을 이용한 in situ 연구에서는 CPP-ACP를 함유한 껌이나 그렇지 않은 껌이나 하악 구치부 협면의 초기 병소 재광화에 큰 차이가 없다는 것이 보고되기도 하였다(Schirrmeyer, 2007).

본 연구의 실험 결과는 불소 바니쉬를 처리한 모든 군이 CPP-ACP만을 처리한 1군에 비해서 법랑질 재광화 효과가 우수한 것으로 나왔고, 1군의

경우 통계적으로 차이가 없었으나, 대조군보다 약간 낮은 재광화 효과를 보였다. 본 연구에서 기존의 CPP-ACP 연고의 훌륭한 재광화 효과를 보고한 다른 연구들과 다른 결과를 보인 이유로는 다음과 같은 요인들에 기인한다고 생각된다. 첫째, 장시간의 탈회 처리 때문으로 생각된다. Kanako(2007)와 Maki(2006) 등의 연구처럼 대부분의 in vitro CPP-ACP 연구에서는 하루 2회, 각 10분간, 즉 하루에 20분만 탈회 처리하였으나 본 실험에서는 하루에 4시간씩 탈회 과정을 거쳤다. 따라서 CPP-ACP에 의한 재광화 효과가 다른 선행 연구들에 비해 낮게 나타났다고 생각된다. 둘째, 비교적 짧은 연구 시간 때문인 것 같다. 예를 들면, Kanako(2007)와 Maki(2006) 등의 연구들에서는 28일간 재광화를 시행하였고, Kanako(2007)의 연구에서는 21일까지는 대조군과 비교 시 뚜렷한 차이가 없었으나, 28일 이후에는 광화도가 증가한 것으로 보고되었다. 본 연구는 15일이라는 비교적 짧은 기간 동안 시행되었으므로 CPP-ACP에 의한 극적인 재광화 효과를 관찰하기에는 한계가 있었던 것 같다. 셋째로는 실제 구강 내에서는 CPP-ACP가 치면 세균막이나 치태액, 타액, 연조직등에 결합하여, 장시간 동안 유리되고, 세균의 부착을 억제하여 산 생성을 저해하는 등의 효과가 있을 것으로 생각되나, 본 in vitro 연구에서는 실제 인체 내에서와 동일한 CPP-ACP의 효과를 얻는데 한계가 있었을 것이다.

불소 바니쉬는 지난 30여년간 유럽과 북미 등지에서 여러 제품들이 활발히 사용되어 왔으며(Bawden 1998), 그 탈회 예방과 재광화 효과가 이미 많은 실험실과 임상 연구들에서 입증되었고, 그에 대한 review 논문과 메타분석만 해도 수십 편에 달한다(Clark, 1985; Helfenstein, 1994; Strohenger, 2001; Donly, 2003; Petersson, 2004; Seppa, 2004; Marinho, 2007). 불소 바니쉬는 불소 겔보다 안전하며, 도포 술식 자체가 간단하고 흡입기나 특별한 기구들이 필요치 않으며, 단시간 내 도포할 수 있는 장점

들이 있으므로 영유아기 치아 우식증을 예방하는 가장 효율적인 방법 중 하나이다(Weintraub, 2006). 또한 다른 불소 국소 도포법들에 비해 효과적으로 불소를 운반하는데, 고농도의 불소를 치면에 직접 도포하여 영구적인 접착은 아니지만 불소가 법랑질 표면에 부착되는 시간을 늘려주어서 저농도의 불소를 천천히 유리하고 구강 내에 불소 이온을 증가시켜 주는 효과를 나타낸다(Ögaard, 1994).

Fluor Protector[®]와 Cavity Shield[®]의 다른 조성은 두 바니쉬 간의 부착력의 차이뿐만 아니라, 불소 이온의 생체 이용도까지 차이를 준다. Fluor Protector[®]는 산성을 띠고 있어서, APF 겔처럼 법랑질로의 불소흡수를 증가시킨다(Arends and Christoffersen, 1990). Cavity Shield[®]는 최근에 판매되기 시작했고, 문헌 검색 결과 Cavity Shield[®]의 우식 예방 효과에 대한 연구가 거의 없었다. Cavity Shield[®]와 Fluor protector[®]의 우식 예방 효과를 비교한 논문도 없었으나, Cavity Shield[®]와 그 조성이 거의 동일한 Duraphat[®](Colgate Oral Pharmaceuticals, USA)과 Fluor Protector[®]의 효과를 비교한 논문은 많았다. 또한 Cavity Shield[®]와 Duraphat[®]의 효과를 비교한 문헌도 거의 없었으나, 지금까지 보고된 바로는 Duraphat[®]과 우식 예방 및 재광화 효과가 거의 동등하다고 생각되어진다. 따라서 간접적으로나마, Cavity Shield[®] 대신 Duraphat[®]의 문헌 고찰을 통하여 그 효과를 가늠해보고자 하였다.

Marinho 등(2007)에 의하면 영구 치열, 유 치열 모두에서 5% NaF 바니쉬 사용 시, 치아 우식 예방 분율이 DMFT가 46%, dmfs는 33% 이었다. 불소 바니쉬와 불소 겔의 효과를 비교한 대표적인 연구로는 Shobha 등(1987)의 연구와 Seppa 등(1995, 2004)의 연구가 있다. 두 연구 모두 두 불소 재제의 효과가 비슷하거나 불소 바니쉬가 약간 더 우수한 효과를 보인다고 하였고 Borutta등은 불소 바니쉬가 우식 고 위험군의 환자에서 APF

젤보다 효과적이라고 하였다. 그러나 2003년 Marinho 등의 review에서는 두 가지 불소 제품을 비교했을 때 불소 바니쉬가 다른 것보다 더 효과적이라는 분명한 증거를 제시하지 못했고, 아직까지 결론에 도달하지 못하였다. 교합면에서 sealant와 불소 바니쉬의 효과를 비교한 review에서는 교합면 우식 예방에는 불소 바니쉬보다 sealant가 더 효과적임을 보고 하였다(Hiiri A, 2006).

다른 불소 국소 도포제가 갖는 용량-반응 관계가 불소 바니쉬에서는 적용되지 않는 듯하며, Haugejorden and Nord(1991)와 Seppa(1991)는 낮은 농도의 불소 바니쉬가 높은 농도의 바니쉬보다 효과가 떨어진다는 증거를 발견하지 못하였다. Duraphat[®]와 Fluor Protector[®]를 비교한 20여건의 임상 연구들은 고농도인 Duraphat[®]이 약간 더 우수하거나, 두 바니쉬가 거의 차이가 없음을 보고하였다(Kolehmainen L; James, 1998). 그러나 몇몇 연구들에서는 Fluor Protector[®]가 훨씬 더 낮은 농도의 불소를 함유하였고, 타액내 불소 농도의 향상도 경미하지만 Duraphat[®]보다 유의하게 더 많은 불소를 법랑질에 침착시켰으며, 6개월 후에도 치아 표면에 더 고농도의 불소 이온이 잔존하는 것이 보고되었다. 그러나 이러한 결과가 나온 이유는 불확실하였다(Seppa, 1982; De Bruyn H, 1988; Seppa, 1994). 그럼에도 불구하고 Fluor Protector[®]가 Duraphat[®]보다 더 나은 효과를 보인다는 것은 임상적으로 입증되지 못하였고, 이는 단단하게 결합한 불소가 불소 바니쉬에 의한 우식 예방의 주 기전이 아니라는 것을 제시한다. 따라서 Duraphat[®]와 Fluor Protector[®] 중에 어느 것이 더 효과적이라는 명확한 결론에 아직까지 도달하지 못하였다.

본 연구에서는 CS를 1회 처치한 5군의 경우 TM나 FP를 도포한 다른 군들(1-4군)에 비해 가장 우수한 재광화 효과를 보였으며 이 결과는 통계적으로 유의했다($P < 0.05$). 이전의 선행 연구들에서는 고농도 바니쉬인

Duraphat[®]이 더 우수한 재광화 효과를 보이거나, Fluor Protector[®]와 거의 동일한 효과를 보인다고 하였는데, 아직 어느 것이 더 우세한지는 결론이 나지 않은 상태이다. 본 실험에서는 불소 농도가 22.6배 더 높은 CS가 FP보다 더 우수한 재광화 효과를 보였다.

불소 바니쉬의 최적의 효과를 위한 도포 기간 역시 다양한 주장이 있다. 불소 바니쉬 도포 횟수를 증가시킬수록 우식 예방 효과가 증가할 것이라는 제안들이 있었으나 명확한 증거는 아직 없다. 매 3-4개월마다 도포해야 효과적이라는 주장도 있으며, 몇몇 연구는 년2회 도포도 비슷한 효과를 보인다고 보고하였다. Seppa와 Tolonen(1990) 등의 연구들도 연 4회 도포가 연 2회 도포보다 더 나은 효과를 보여주지 못했다. 그러나 1년에 한번만 일주일에 3회 도포하는 것이 더 효과적이라는 많은 보고들이 있었다(Pettersson 1994; Castillo 2004). 이 도포 방식이 더 우수하다는 이론적 근거는 불명확하나, 북 유럽에서는 현재 많이 쓰이고 있고, 영유아나 정기적인 내원이 힘든 사람들에게는 편리한 방법이 될 수 있다. 최근 출판된 미국 치과의사 협회의 추천 사항은 고 우식 위험 아동군에서는 연 4회 도포가 추천된다(JADA Council on Scientific Affairs, 2006). 하지만 어떤 간격으로 도포를 하든지, 불소 바니쉬는 그 효과가 시간이 지남에 따라 반감하므로 반드시 정기적인 도포가 필요하다(Seppa, 1984).

본 연구의 결과들을 살펴보면, Fluor Protector[®] (FP)를 격일로 처리한 3군은 FP를 1회만 처리한 2군보다 재광화 효과가 우수했으나, CPP-ACP 연고(TM)와 FP를 병행 처리한 4군보다는 재광화 효과가 떨어졌는데, 이 세 집단간의 통계적 차이는 없었다. 본 실험을 계획할 때에 3군은 매우 높은 우식 위험군에서나 백색 반점등 초기 우식 병소를 재광화할 때 또는, 영유아 우식증(ECC; Early childhood caries)이 있을 경우에 그 진행을 늦추거나, 재광화를 위한 목적으로 불소 바니쉬를 단기간 집중 투여하는 것

과 1년에 한번 일주일에 3회 집중 투여하는 것의 효과를 재현하기 위한 군으로 설정하였다. 그러나 그 효과는 불소 바니쉬를 1회 도포하는 것보다 약간 더 재광화를 증가시켰으나, 그 차이는 거의 없었으며, 이는 선행 연구들의 불소 바니쉬의 정비례적인 용량-반응 관계가 성립하지 않는다는 결과들과 일치했다.

불소와 CPP-ACP 사이에 우식 예방의 상승효과가 있음이 보고되었다(Cross 2007; Reynolds, 2007). 0.5-1.0% CPP-ACP는 500 ppm의 F⁻ 용액과 비슷한 우식 활성 감소 효과가 있다고 보고되었고, 불소가 존재 시 CPP-ACP는 빠르게 불소 이온과 결합하여, casein phosphopeptide-amorphous calcium fluoride phosphate(CPP-ACFP)를 형성한다(Reynolds, 2007). 구강 내 불소 이온의 문제점은 타액 칼슘과 인 이온의 존재 하에서 불소 이온은 용해성이 낮아서, 법랑질 병소 표면층에 칼슘, 인 이온들과 함께 빠르게 축적된다. 이러한 표면 침착은 우식의 본체로 향후 더 많은 이온이 침투되는 것을 방해하고 따라서 깊숙히 재광화 되는 것을 제한한다. 그러나, CPP-ACFP의 형성은 칼슘, 인, 불소 이온을 천천히 유리하여, 법랑질 표면에 불화인회석($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$)이 빠르게 침착되는 것을 방지하고, 병소의 깊숙이 재광화가 되는 것을 돕는다. 궁극적으로는 불화인회석으로 광물이 침착되는 것이 바람직하다. 법랑질 표면하 병소를 1 mol의 불화인회석으로 재광화하기 위해서는 매 10 mol의 칼슘과 6 mol의 인 이온들마다 2 mol의 불소 이온이 필요하다(Ca: P: F= 5: 3: 1). 따라서 불화인회석을 많이 생성하기 위해서는 칼슘, 인 이온의 양이 재광화를 위한 제한 요인이 될 것이며, 이러한 칼슘과 인을 CPP-ACP가 충분히 제공해 주는 역할을 할 수 있을 것이다. CPP-ACP는 불소와 같이 도포시 Ca, P, OH(F) 이온들을 치아 표면에 공동으로 운반하고, 국소화시키며, 안정화시켜, 불화인회석 형성을 촉진하여 법랑질 표면하 병소의 재광화를 증진시킬 수 있다(Cross 2007).

본 실험에서 TM와 FP를 복합 처리한 4군의 경우 TM이나 FP 단독 처리 군들(1, 2, 3군)에 비해서 재광화가 효과적이었다. TM만 처리한 1군과는 통계적으로 유의한 차이가 있었으며, FP 단독 투여군들과는 통계적 차이는 없었으나, 약간 더 높은 정도의 증가를 나타내었다. 따라서 불소와 CPP-ACP의 병용 시 재광화 상승효과(synergistic effect)는 거의 없었다고 평가할 수 있다. 이는 CPP-ACP와 불소간에 상승 효과가 있다고 보고된 기존의 여러 연구들의 결과들에 부합되지 못했다. 이러한 결과가 나온 원인으로서는 우리가 사람 타액을 인공 타액과 반씩 섞어서 사용했다 하더라도 실제 구강 내에서 일어나는 상황을 재현하는 데에 한계가 있기 때문인 것 같다. 실제 상황에서는 매일 불소치약으로 양치질하여 일정량의 불소가 꾸준히 공급되고 유지되는 환경에 놓여 있으나 본 실험에서는 in vitro 실험상 그렇지 못하였고, 불소 바니쉬의 코팅막이 CPP-ACP와 치면과의 직접적인 접촉을 방해하여 재광화 효과의 상승이 적게 나타난 것으로 생각된다. 또한 이러한 상승효과는 꾸준히 장시간 사용할 때에 더욱 뚜렷하게 나타나므로, 향후 연구 시 CPP-ACP 도포 시간을 15일보다 늘여서 장시간 관찰한다면 향상된 재광화율을 보일 수도 있을 것이라고 생각된다.

FP는 도포 후에 타액과 접촉하면 경화되어 막을 형성한다. 구강내에서라면 매일의 칫솔질과 단단한 음식물의 섭취등으로 인해 이러한 막이 쉽게 제거되겠으나 본 in vitro 실험에서는 비정기적으로 아세톤이나 scapel로 제거를 한다고 해도 이런 막이 잘 제거 되지 않은 채 불소가 반복적으로 도포되어 두꺼운 막이 치면에 형성되었으므로 이후에 도포되는 불소가 치면과 접촉하지 못하고 투과되지 못하여 기존의 연구들보다는 낮은 재광화 효과를 보인 것으로 생각된다. 만일 매회 코팅막을 제거하고 바니쉬를 재도포했다면 TM과 병용한 4군이나 CS를 1회 도포한 5군에 비해서 더 우수한 재광화 효과를 얻는 것도 가능하지 않았을까 라는 조심스러운 추측도

해보며, 향후 이 부분을 보강하여 연구를 하는 것이 필요하다고 생각된다. 하지만 아세톤으로는 코팅막이 잘 제거되지 않았고 scapel로는 비교적 잘 제거되었으나 제거 할 때마다 법랑질 표면에 미세한 흠집과 스크래치를 내게 되므로 매번 제거하는 것도 무리가 있다고 생각된다. 따라서 in vitro 실험의 한계를 절감하게 되었으며 더 깨끗하고 안전하게 바니쉬 코팅을 제거하는 방법에 대한 고심도 필요하리라 사료된다.

Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM)으로 재광화 후 탈회층의 두께를 관찰하였다. 탈회가 많이 되었을수록 붉은 색 층의 두께가 증가하는 양상을 나타내었는데, 역시 CS군이 탈회층이 가장 얇았으며, 그 다음이 다른 Fluor Protector 바니쉬를 처리한 군들(2-4군) 순이었고 CPP-ACP 단독 투여군은 대조군과 함께 가장 두꺼운 탈회층을 나타내었다. 이후 모든 실험군을 주사 전자 현미경(Scanning Electron Microscopy, SEM)으로 시편의 표면을 관찰한 결과 CS 군이 가장 표면이 매끄러웠으며, 탈회된 치아의 공극을 가장 많이 매워주어서 소공이 거의 없었으며, 법랑 결정 입자가 매우 작고 조밀했다. 마찬가지로 불소 바니쉬 군들에 비해 CPP-ACP 연고만을 단독 처리한 군은 대조군과 함께 표면이 거칠고 소공이 크고 많이 형성되어 있었으며, 탈회된 양상이 뚜렷했다. 나머지 군들은 2, 3, 4군으로 갈수록 표면이 매끄럽고 결정입자가 조밀하며 소공이 거의 없었다.

사람의 치아는 구강 내에서 탈회와 재광화의 지속적인 순환과 동적 평형 상태에 있으므로, in vitro로 법랑질의 탈회와 재광화 실험을 함에 있어서 이러한 상황들을 고려해야 하며, 이러한 순환을 재현할 수 있어야 한다. 법랑질 표면의 재광화 효과에 관한 이전의 많은 연구들은 정적조건(static condition)하에서 측정하여 법랑질의 탈회와 재광화가 연속적으로 반복되는 구강 내에서의 효과를 설명하는데 한계가 있었다. 이러한 한계를 극복하기 위해 ten Cate와 Duijsters(1982), Featherstone 등(1988)은 법랑질의 재광

화 효과를 구강내 환경과 유사한 동적 순환 조건(dynamic cycling condition)하에서 측정할 필요성이 있음을 보고하였다. In vitro pH 순환 모형은 우식 예방 처치들과 치료 효과를 연구하기 위해 고안된 방법으로, 제한된 기간 동안 탈회와 재광화의 교대를 반복하여 어떤 약제를 처치한 후에 재광화가 일어나는 쪽으로 광물 균형의 이동이 일어나는 것을 쉽게 관찰할 수 있다. 또한 pH 순환 모형은 병소의 진행 감소를 모의하는 데 있어서 매우 민감하며 실제적인 방법으로, 일관된 결과의 도출이 가능하고, 우식 유발요인들의 조절이 가능하며, 비교적 간단한 방법으로서 조건이 다른 상황에서 실험해도 같은 조직학적 특성을 재현할 수 있으며, 저렴하고 신속하게 결과를 평가할 수 있다는 장점이 있다. 따라서 본 연구에서는 pH 순환 모형을 이용하여 불소 바니쉬와 CPP-ACP 연고의 재광화 효과를 확인해보고자 하였다.

본 연구에서는 가급적 제조사의 지시대로 각 처치들을 시행하였다. 또한 인공우식을 형성하기 위해 사람 치아를 사용하지 않고 비교적 물리적 성분이 균일한 소의 영구절치를 이용하였으며 인위적인 인공우식을 이용함으로써 병소를 비교적 규격화하고 실험상 변이를 최소화 하고자 하였다. 또한 본 연구에서는 자연 병소와 유사하며 재현성이 높은 인공 우식 병소를 만들기 위해 lactic acid에 carbopol을 첨가하여 만든 탈회 용액을 사용하였다. White(1987)와 Budz 등(1988)은 polyacrylic acid 계통인 Carbopol system을 사용하여 만든 인공 우식은 비교적 건전한 표층과 탈회가 진행되는 표층하부로 구성되어 있어서 자연우식 상태와 유사하며, 법랑질 외형에 평행하고 거의 균일한 깊이를 가진 병소를 유발할 수 있어서 동일한 조건하에서 재현성이 높다고 하였다. 그럼에도 불구하고, 본 연구의 제한점을 살펴보면 in vitro 연구이므로 실제로 인간의 구강내 상황과 많은 부분에서 차이가 있을 수 있는데 첫째, 구강 내에는 타액이 지속적으로 새롭게 분비

된다. 그러나 본 연구에서는 아침에 사용한 타액을 다음날 아침에 새로 교체하여 24시간 동안 사용하였다. 또 지속적인 새로운 생성은 어려웠지만 지속적인 타액의 저류상태를 재연하기 위해 4시간의 탈회나 불소 바니쉬와 CPP-ACP 연고 처리 시간을 제외한 모든 시간을 사람+인공 타액에 침지하였다. 둘째, 사람타액의 성분과 인공 타액의 성분은 많은 차이가 있다. 비록 이번 실험에서 Fetherstone 등 (1988)에 의한 사람 타액과 인공 타액을 1:1로 혼합한 타액을 사용하였고, 인공 타액이 사람타액을 최대한 재연한 상태이기는 하지만 완전히 같다고는 할 수 없고, 구강내의 많은 요인들이 동시에 상호작용하게 되는 것을 그대로 재연할 수 없는 상태였다. 셋째, 여러 번 표면경도를 측정함으로써 시편마다 여러 번 압흔을 남기고 한번 찍을 때마다 생기는 잔금으로 인해 탈회 용액과 인공타액에의 접촉 면적을 넓게 하여 측정값들에 영향을 미쳤을 것으로 생각되었다. 또한 실제 구강 환경 내에서는, 여러 숙주 인자들(예를 들면 치아의 광물 함량, 획득 피막과 치태 형성)이 우식의 진행에 영향을 미친다. 타액의 흐름 속도나 분비량, 조성, 완충능 등의 타액 요인들도 아마 치아 표면에 보호 기능을 할 것이다. 그리고, 실제 구강에서는 어린아이에게 동일한 양의 불소를 도포할 수도 없고, 수분 조절도 잘 안 된다 따라서 치아에 도포되는 불소의 양도 다르고, 구강 기능, 연하, 저작, 타액 분비, 양치 등의 기계적 작용에 의해 본 실험과 다른 효과를 나타낼 수도 있을 것이다. 본 연구에 사용된 법랑질 표면경도 측정으로 법랑질 시편내의 광물질 조성을 검증하는 것은 불가능하지만 재광화 및 병소의 진행을 평가하는 데에는 간단하고 유용하게 사용할 수 있다. 그러나 표면층만 한정된 비교이므로 좀 더 깊은 우식이나 표면하층의 변화를 관찰하기 위해서는 추가적인 평가방법을 고려해야한다.

CPP-ACP의 장점이자 단점은 전문가 도포가 아니라 가정 내에서 자가로 도포할 수 있다는 것이다. 이러한 자가 용법은 비교적 저렴하고, 편리할

수 있으나, 전적으로 환자의 순응도에 그 효과가 의존적이며, 그러한 환자 순응도는 불확실한 예측성을 가지고 있다. 또한 대부분의 구강 위생이 불량한 사람들은 자가 요법에 대한 순응도가 낮은 편이므로 그 효과를 완전히 기대할 수는 없다. 따라서 전문가 도포법으로 크게 환자의 순응도가 문제가 되지 않는 불소 바니쉬를 년 2-4회 사용하는 것이 영 유아, 장애인, 심한 구토반사등으로 기존의 젤을 도포할 수 없는 조건을 가진 환자들, 우식 고위험군 환자들에서 우식 예방에 더욱 효과적일 것으로 생각된다. 불소 바니쉬는 다른 불소 국소 도포법들 보다 적용이 쉽고, 치면과 불소의 접촉 시간이 증가되어 우식 예방의 효과가 우수하며, 독성이 거의 없어 안전하고 도포시간이 짧은 것 등 많은 장점이 있으며, 이런 장점들은 특히 우식이 호발하는 어린 아이들에게 적용 시 우식 예방에 많은 이점이 있을 것으로 사료된다. 이러한 우식 예방 제품들이 효과를 보기 위해서는 초기 우식에 대한 정확한 진단이 선행되어야 할 것이며, 비용-효과 측면으로 최소의 비용으로 최대의 효과를 보기 위해서는 우식 위험도를 측정하여 개인의 우식 위험도에 따른 처방이 필요하리라고 생각된다.

지금까지 불소 바니쉬와 CPP-ACP의 우식 예방 효과를 비교한 시도가 없었고, 본 연구가 그 최초의 시도라는 데에 이번 연구의 의의가 있다고 생각되며 여러 한계점등을 보완하여 추후 더 많은 연구가 필요하리라고 사료된다.

V. 결 론

본 연구는 in vitro에서 우치의 법랑질에 인공 우식을 유발한 후, pH 순환 모형을 이용하여 10% CPP-ACP 연고(Tooth MousseTM, GC corp, Japan)와 두 종류의 불소 바니쉬 간의 재광화 효과를 비교해보고, CPP-ACP 연고와 불소 바니쉬를 병용 시 상승효과가 존재함을 알아보기 위하여 수행되었다. 인공 우식 유발 후 정도와 재광화 후 정도를 측정하여 그 차이 값을 재광화 정도로 평가하였고, Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM)와 Scanning Electron Microscopy(SEM)을 이용하여 탈회 정도와 법랑질 표면을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. CPP-ACP 연고를 매일 아침, 저녁 10분씩 2회 처치한 1군은 음성 대조군인 6군과 그 재광화 효과가 비슷하였고, 거의 재광화 효과가 없었다.

2. 불소 바니쉬를 처리한 군은 CPP-ACP 연고를 단독 처치한 군이나 음성 대조군과 재광화율에 통계적으로 유의한 차이가 있었다($P < 0.05$). 재광화 정도는 Fluor Protector[®]를 1회 처치한 2군, 격일 처치한 3군, Fluor Protector[®]를 1회 처치하고 매일 2회씩 CPP-ACP 연고를 병용하여 처치한 4군 순으로 높아졌으나, 세 집단간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

3. 고농도의 불소를 함유한 Cavity Shield[®]를 1회 처치한 5군이 가장 재광화율이 높았으며 다른 군들과 통계적으로 유의한 차이가 있었다 ($P < 0.05$).

4. 모든 실험군을 Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM)를 통해 재광화 후의 병소의 표면 깊이를 측정한 결과 역시 Cavity Shield군이

Rhodamine dye 투과층(탈회층)이 가장 얇았으며, 그 다음이 다른 Fluor Protector[®] 바니쉬를 처리한 군들(2, 3, 4군)순이었고 CPP-ACP 단독 투여 군은 대조군과 함께 가장 두꺼운 탈회층을 나타내었다.

5. 모든 실험군을 주사 전자 현미경을 통해 치아 시편의 표면을 관찰한 결과 Cavity Shield[®] 군이 가장 표면이 매끄러웠으며, 탈회된 치아의 공극을 가장 많이 매워 주어 소공이 거의 없이 작고 조밀한 범랑 결정을 나타내었다. 마찬가지로 불소 바니쉬 군들에 비해 CPP-ACP 연고만을 단독 처리한 군은 대조군과 함께 표면의 소공이 크고 많이 형성되어 있었으며, 탈회된 양상이 뚜렷했다. 나머지 군들은 2, 3, 4군으로 갈수록 매끈하며 작고 조밀한 결정 크기를 나타내었다.

이상의 결과로 CPP-ACP 연고는 본실험과 같은 단기간의 in vitro 실험에서 재광화 효과가 거의 없으며 불소 바니쉬보다 재광화 효과가 떨어짐을 알 수 있었다. 또한 불소 바니쉬는 용량-반응 효과와 무관하게 여러 번 도포하여도 그 효과가 정비례하지 않으며, CPP-ACP와 불소 바니쉬의 상승 효과도 매우 미미하고 고농도 불소 바니쉬가 저농도 불소 바니쉬보다 재광화 효과가 우수함을 보여주었다.

참 고 문 헌

홍석진, 박기철, 이상대, 정성숙, 김완규: 불소와 생귀나리아 함유 치약의 초기 우식 법랑질에 대한 효과. 대한 구강 보건 학회지. 21(2): 341-350, 1997.

American Dental Association Council on Scientific Affairs: Professionally applied topical fluoride: evidence based clinical recommendations. *J Am Dent Assoc.* 137(8): 1151-9, 2006.

Arends J, Chrisffersen J: Nature and role of loosely bound fluoride in vitro. *J Dent Res.* 69(spec iss): 601-605, 1990.

Bawden JW: Fluoride varnish: A useful new tool for public health dentistry. *J Public Health Dent.* 58: 226-269, 1998.

Beltran-Aguilar ED, goldstein JW, Lockwood SA: Fluoride varnishes: a review of their clinical use, cariostatic mechanism, efficacy and safety. *JADA.* 131: 589-96, 2000.

Blinkhorn A, Davies R: Using Fluoride varnish in the practice. *Br Dent J.* 185: 280-281, 1998.

Borutta A, Reuscher G, Hufnagl S, Mobius S: Caries prevention with fluoride varnishes among preschool children. *Gesundheitswesen.* 68(11): 731-4, 2006.

Brudevold F, Naujoks R: Caries preventive fluoride treatment of the individual. *Caries Res.* 12(suppl 1): 35-42, 1978.

Budz JA, Lo Re M, Nancollas GH: The influence of high- and low-molecular-weight inhibitors on dissolution kinetics of hydroxyapatite and human enamel in lactate buffers: a constant composition study. *J Dent Res.* 67(12): 1493-8, Dec, 1988.

Cai F, Shen P, Morgan MV, Reynolds EC: Remineralization of enamel subsurface lesions in situ by sugar-free lozenges containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *Australian Dental Journal* 48: 240-243, 2003.

Castillo, JL: Fluoride release from varnishes in two in vitro protocols. *J Am Dent Assoc*, 135(12): 1696-1699, 2004.

ten Cate JM: Current concepts on the theories of the mechanism of action of fluoride. *Acta Odontol Scand.* 57(6): 325-329, 1999.

ten Cate JM, Duijsters PP: Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. *Caries Res.* 16: 201-210, 1982.

Christos Rahiotis, George Vougiouklakis, Effect of a CPP-ACP agent on the demineralization and remineralization of dentine in vitro, *Journal of Dentistry* 35: 695-698, 2007.

Clark DC, Hanley JA, Stamm JW, Weinstein PL: An empirically based system to estimate the effectiveness of caries- preventive agents. A comparison of the effectiveness estimates of APF gels and solutions, and fluoride varnishes. *Caries Research*. 19: 83-95, 1985

Cross KJ, Huq NL, Reynolds EC: Casein phosphopeptides in oral health chemistry and clinical applications. *Curr Pharm Des*. 13(8): 793-800, 2007.

De Bruyn H, Buskes H: Caries preventive effectiveness of Fluor Protector and fluoride lacquer, Duraphat under very cariogenic conditions. *Oralprophylaxe*. 10(2): 61-67, 1988.

Dijkman AG, de Boer P, Arends J: In vivo investigation on the fluoride content in and on human enamel after topical application. *Caries Res* 17: 392-402, 1983.

Donly KJ: Fluoride varnishes. *Journal of The California Dental Association*, 31(3): 217-219, 2003.

F. Cai, DJ Manton, P. Shen, G.D. Walker, K.J. Cross, Y. Yuan, C. Reynolds, E.C. Reynolds: Effect of addition of citric acid and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate to a sugar- free chewing gum on enamel remineralization in situ. *Caries Res*. 41: 377-383, 2007.

Featherstone JD, Shariati M, Brugler S, Fu J, White DJ: Effect of an anticalculus dentifrice on lesion progression under pH cycling conditions in vitro. *Caries Res.* 22(6): 337-341, 1988.

Gelhard TB, ten Cate JM, Arends J: Rehardening of artificial enamel lesions in vivo. *Caries Res.* 13(2): 80-83, 1979

Glenn Walker, Fan Cai, Peiyan Shen, Coralie Reynolds, Brent Ward, Christopher Fone, Shuji Honda, Megumi Koganei, Munehiro Oda, Eric Reynolds: Increased remineralization of tooth enamel by milk containing added casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *Journal of Dairy Research* 73: 74-78, 2006.

Haugejorden O, Nord A: Caries incidence after topical application of varnishes containing different concentrations of sodium fluoride: 3-year results. *Scand J Dent Res.* 99(4): 295-300, 1991.

Helm s, Helm T: Correlation between caries experience in primary and permanent dentition in birth-cohorts 1950-70. *Scand J Dent Res* 98: 225-227, 1990.

Helfenstein U, Steiner M: Fluoride varnishes(Duraphat): a meta-analysis. *Community Dent Oral Epidemiol.* 22: 1-5, 1994

Hiiri A, Ahovuo-Saloranta A, Nordblad A, Mäkelä M: Pit and fissure sealants versus fluoride varnishes for preventing dental decay in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev*. 18(4): CD003067, Oct, 2006.

Iijima Y, Cai F, Shen P, Walker G, Reynolds C, Reynolds EC: Acid resistance of enamel subsurface lesions remineralized by a sugar-free chewing gum containing casein phosphopeptide- amorphous calcium phosphate. *Caries Res*. 38: 551-556, 2004.

Jaafar N, Razak IA: Correlation between caries experience at age 7 and 12: A longitudinal study. *J Pedod*. 13: 11-16, 1988.

James W. Bawden: Fluoride Varnish: a useful new tool for public health dentistry. *J Public Health Dent*. 58(4): 266-9, 1998.

Kanako Yamaguchi, masashi Miyazaki, Toshiki Takamizawa, Hirohiko Inage, B. Keith Moore: Effect of CPP-ACP paste on mechanical properties of bovine enamel as determined by an ultrasonic device. *Journal of Dentistry* 34: 230-236, 2006.

Kolehmainen L: Evaluation a fluoride- containing varnish in children with low caries incidence. *Scand J Dent Res*, 89; 228-34, 1981

Maki Oshiro, Kanako Yamaguchi, Toshiki TaKamizawa, Hirohiko Inage:

Effect of CPP-ACP paste on tooth mineralization: anFE-SEM study. *Journal of Oral Science*. 49(2): 115-120, 2007.

Margolis HC, Moreno EC: Physicochemical perspective on the cariostatic mechanism of systemic topical fluoride. *J Dent Res*. 69(spec iss): 606-613, 1990.

Margolis HC, Moreno EC, Murphy BJ: Effect of low levels of fluoride in solution on enamel demineralization in vitro. *J Dent Res*. 65: 23-29, 1986.

Marinho VCC, Higgins JPT, Logan S, Sheilham A: Fluoride varnishes for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev*. 4, 2007.

Marinho V, Higgins J, Logan S, Sheiham A: Topical fluoride(toothpastes, mouthrinses, gels or varnishes) for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Sys Rev*. 4, 2003.

Mellberg JR, Ripa LW, Leske GS: Fluoride in preventive dentistry: Theory and clinical applications. Chicago: Quintessence 151-179, 1983. Newbrun E: Cariology, 3rd ed. Chicago: Quintessence Publishing Co, Inc. 1989.

Ögaard B, Seppa L, Rolla G: Professional topical fluoride applications-clinical efficacy and mechanism of action. *Advances in Dental Research*. 8; 190-201, 1994.

Ögaard B, Rolla G, Helgeland K: Alkali soluble and alkali insoluble fluoride retention in demineralized enamel in vivo. *Scand J Dent Res.* 91(3): 200-4, 1983.

Petersson LG, Twetman S, Kahlgren H, et al: Professional fluoride varnish treatment for caries control: A systematic review of clinical trials. *Acta Odontol Scand.* 62: 170-176, 2004.

Petersson LG, Twetman S, Pakhomov GN: The efficiency of semi annual silane fluoride Varnish applications: A two-year clinical study in preschool children. *J Public Health Dent.* 58: 57-60, 1998.

Petersson LG: Fluoride mouthrinses and fluoride varnish. *Caries Res.* 27 (suppl 1): 35-42, 1993.

Reynolds EC, Cai F, Shen P, Walker GD: Retention in plaque and remineralization of enamel lesions by various forms of calcium in mouthrinse or sugar- free chewing gum. *Journal of Dental Research.* 82(3): 206-211, 2003.

Reynolds EC, Black CL, Cai F, Cross KJ, Eakins D, Huq NL, Morgan MV: Advances in enamel remineralization: casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *Journal of Clinical Dentistry.* 10: 86-88, 1999.

Reynolds EC: Anticariogenic complexes of amorphous calcium phosphate stabilized by casein phosphopeptides: a review. *special care in dentistry*. 18: 8-16, 1998.

Reynold EC: Remineralization of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptide stabilized calcium phosphate solutions. *J Dent Res*. 76: 1587-1595, 1997.

Reynolds EC, Cain CJ, Weber FL, Black CL, Riley PF, Johnson IH, et al: Anticariogenicity of calcium phosphate complexes of tryptic casein phosphopeptide in the rat. *Journal of Dental Research*. 74: 1272-9, 1995.

Reynolds EC, Johnson IH: Effect of milk on caries incidence and bacterial composition of dental plaque in the rat. *Archives of Oral Biology*. 26: 445-51, 1981.

Rose RK: Effect of anticariogenic casein phosphopeptide on calcium diffusion in streptococcal model dental plaques. *Archives of Oral Biology*. 45: 569-575, 2000.

Schirrmeister JF, Seger RK, Altenburger MJ, Lussi A, Hellwig E: Effects of various forms of calcium added to chewing gum on initial enamel carious lesions in situ. *Caries Res*. 41(2): 108-114, 2007.

Seppä, L: Fluoride varnishes in caries prevention. *Medical Principle and Practice*. 13(6): 307-311, 2004.

Seppä L, Leppanen T, Hausen H: Fluoride varnish versus acidulated phosphate fluoride gel: A 3-year clinical trial. *Caries Res*. 29: 327-330, 1995.

Seppä L, Pöllänen L, Hausen H: Caries-preventive effect of fluoride varnish with different fluoride concentrations. *Caries Res*. 28(1): 64-7, 1994.

Seppä L, Tolonen T: Caries preventive effect of fluoride varnish applications performed two or four times a year. *Scand J Dent Res*. 98(2):102-5, 1990

Seppä L: Fluoride content of enamel during treatment and 2 years after discontinuation of treatment with fluoride varnishes. *Caries Res*. 18: 278-281, 1984.

Seppä L, Tuutti H, Luoma H: Three-year report on caries prevention using fluoride varnishes for caries risk children in community with fluoridated water. *Scand J Dent Res*. 90: 89-94, 1982.

Shen P, Cai F, Nowicki A, Vincent J, Reynolds EC: Remineralization of enamel subsurface lesions by sugar-free chewing gum containing casein

phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *Journal of Dental Res.* 80(12): 2066-2070, 2001.

Shobha T, Nandlal B, Prabhakar AR, Sudha P: Fluoride varnish versus acidulated phosphate fluoride for schoolchildren in Manipal. *J Indian Dent Assoc.* 59(6,7,8,9):157-60, 1987.

Strohmenger L, Bambrilla E: The use of fluoride varnishes in the prevention of dental caries- A short review. *Oral Dis.* 7: 71-80, 2001.

Wefel JS, Harless JD: Topical fluoride application and lesion progression in vitro. *J Dent Res.* 63: 1276-1278, 1994.

Weintraub JA, Ramos-Gomez F, Jue B, Shain S, Hoover CL, Featherstone JD, Gansky SA: Fluoride varnish efficacy in preventing early childhood caries, *J Dent Res.* 85(2): 172-6, 2006.

White DJ: Use of synthetic polymer gels for artificial carious lesion preparation. *Caries Res.* 21(3): 228-42, 1987.

Abstract

Comparison of the remineralization effect between CPP-ACP paste and fluoride varnishes by using pH cycling model

Ji Won Hwang

*Department of Pediatric Dentistry
The Graduate School, Yonsei University
(Directed by Professor Jae Ho Lee, D.D.S., Ph.D.)*

In this research, we tried to compare the remineralization effect of Tooth MousseTM, which contains 10% CPP-ACP, and two kinds of fluoride varnishes in vitro.

We produced enamel specimen by using incisors of bovine, assorted healthy specimen by measuring the initial surface hardness, artificially induced initial caries by demineralizing for 48 hours, and selected specimens which will be used for the final test by measuring surface hardness again, and we divided it into separate groups. We used two kinds of fluoride varnishes, which are Fluor Protector[®] and Cavity Shield[®] and divided all specimens into 6 groups. Two groups where either of varnish was applied only once (exp. group 2 and 6, 18 specimens per each), a group where CPP-ACP paste was applied twice per everyday (exp. group 1, 18 specimens), negative control group where nothing was applied (exp. group 6, 12 specimens), and a group where Fluor Protector was applied for every 2 days (exp. group 3, 18

specimens). In order to simulate the condition within the mouth as maximum, we repeated both demineralization and remineralization for 15 days by using pH cycling model. After the 15 days of pH cycling were done, we evaluated the remineralization effect by measuring final surface hardness and comparing the alteration on each group. We compared the thickness of demineralization level of each group by using confocal laser scanning microscope (CLSM), demineralization grade of enamel surface by using scanning electron microscope (SEM). Finally, we got the following results.

1. Group that applied the CPP-ACP paste for 2 times a day, morning and evening for 10 minutes each, everyday (exp. group 1), showed similar remineralization effect as well as negative control group (exp. group 6).

2. The groups that applied fluoride varnish (exp. group 2-5) had statistically significant difference in terms of remineralization rate compared to the group that solely applied CPP-ACP paste (exp. group 1) and the negative control group (exp. group 6) ($P < 0.05$). The remineralization level of the group that applied Fluor Protector[®] on every other day (exp. group 3) was higher than the group that applied Fluor Protector for only once (exp. group 2), and the remineralization level of the group that applied Fluor Protector[®] once and combined CPP-ACP paste twice per everyday (exp. group 4) was higher than exp. group 3. But there was no statistic difference among these 3 groups.

3. The Cavity Shield[®] exp. group (exp. group 5) had the highest remineralization effect and had statistically significant difference from other groups.

4. The result of the surface demineralization depth of the lesion after remineralization, measured by CLSM, showed that Rhodamine dye penetration thickness of Cavity Shield[®] was the thinnest, the next ones were groups that applied Fluor Protector[®] (exp. group 2, 3, and 4). The application group of CPP-ACP only (exp. group 1) and control group (exp. group 6) showed the thickest demineralization layer.

5. As a result of observing specimens' surface through SEM, surface of Cavity Shield[®] group was the smoothest, it mostly blocked the gaps of demineralized tooth, thus it had almost no pore and showed small and dense enamel crystal. The groups that solely applied the CPP-ACP paste (exp. group 1) compared to fluoride varnish had big and many pores on the surface as same as control, and showed an obvious demineralization. Other groups showed smooth and small form of crystal as it went through group 2, 3, and 4.

Keywords : fluoride varnish, CPP-ACP, remineralization, pH cycling model