

유기산 완충용액의 포화도가 범랑질 및
상아질의 재광화에 미치는 영향과
수산화인회석의 AFM 관찰

연세대학교 대학원

치의학과

박 정 원

유기산 완충용액의 포화도가 범랑질 및
상아질의 재광화에 미치는 영향과
수산화인회석의 AFM 관찰

지도 이 찬 영 교수

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2000년 6월 일

연세대학교 대학원

치의학과

박 정 원

박정원의 박사학위 논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2000년 6월 일

감사의 글

이 논문이 완성될 때까지 항상 따뜻한 격려와 지도를 해주신 이찬영 교수님께 진심으로 감사드리며, 실험에 지속적인 관심을 보내 주신 이승중, 윤태철, 노병덕, 금기연, 박성호, 정일영 교수님과 실험의 계획과 진행을 도와주신 김성교, 김교한, 류현모, 송근배 교수님, 그리고 연대와 경북대 보존과 의국원에게도 감사드립니다.

그리고 옆에서 힘이 되어준 부모님과 집에서 따뜻한 격려를 아끼지 않았던 아내에게도 고마움을 전하고 싶습니다.

2000년 6월 일

저자 씀.

목 차

국문요약	vii
I. 서론	1
II. 실험재료 및 방법	3
1. 시편제작	3
2. 실험용액의 제조	4
3. 인공치아 우식의 형성	6
4. 채광화	7
5. Microradiograph 분석과 통계	7
6. AFM 관찰	7
III. 실험 결과	8
1. Microradiograph 분석	8
2. AFM 관찰	13
IV. 총괄 및 고찰	17
V. 결 론	27
참고문헌	29
영문요약	35

그림, 도표 및 사진부도 목차

Fig. 1. Preparation of tooth section with thickness of 100~150 μ m	4
Fig. 2. Microradiographic image of enamel	8
Fig. 3. Microradiographic image of dentin	9
Fig. 4. Quantitative mineral volume change (%) of enamel during de- and remineralization and peak depth (%) of mineral deposition from the surface	10
Fig. 5. Quantitative mineral volume change (%) of dentin during de- and remineralization and peak depth (%) of mineral deposition from the surface	12
Fig. 6. The relationship of mineral change of enamel and dentin	13
Fig. 7. AFM image of hydroxyapatite crystals of normal enamel	14
Fig. 8. AFM image of hydroxyapatite crystals of demineralized enamel	14
Fig. 9. AFM image of hydroxyapatite crystals of normal dentin	15
Fig. 10. AFM image of hydroxyapatite crystals of demineralized dentin	16
Fig. 11. AFM image of hydroxyapatite crystals of remineralized dentin	17
Fig. 12. The image of demineralized dentin following the degree of polarizing light	18
Table 1. Initial composition of demineralization solution	5
Table 2. Initial composition of remineralization solution	6
Table 3. Quantitative mineral volume change (%) of enamel during de- and remineralization and peak depth (%) of mineral deposition from the surface	9
Table 4. Quantitative mineral volume change (%) of dentin during de- and remineralization and peak depth (%) of mineral deposition from the surface	11

국 문 요 약

치아 우식증은 구강악안면 영역에 가장 흔한 질환이지만 발생기전에 여러 가지 복합적인 요소가 작용하기 때문에 이의 완전한 이해와 예방법이 개발되지 않은 상태이며, 치관부와 치근부의 치아구조의 차이로 인해 치아의 탈회와 재광화 과정에 차이가 존재하는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 유기산 완충용액을 이용하여 법랑질과 상아질에 인공우식을 형성하고 이때의 무기질 소실을 측정하고, 탈회된 시편을 포화도를 달리한 네 가지 재광화 용액(포화도 ; 1군 0.268, 2군 0.309, 3군 0.339, 4군 0.390, PH 4.3 불소 2ppm)으로 재광화 시켰을 때 나타나는 무기질의 침착되는 양과 침착이 일어나는 부위의 깊이를 microradiograph를 이용하여 비교 분석하였다. 또한 atomic force microscope (AFM)을 이용하여 법랑질과 상아질의 수산화인회석(hydroxyapatite) 결정의 정상상태, 탈회된 상태, 그리고 재광화가 일어났을 때의 상태를 비교하여 다음의 결과를 얻었다.

1. 법랑질에서는 용액의 포화도가 증가할수록 재광화 양이 증가되는 경향을 보였고, 4군에서는 무기질 침착이 표층에 국한되는 경향을 나타내었다.
2. 상아질에서는 용액의 포화도가 증가할수록 재광화 양이 감소하였으며 무기질이 침착되는 부위가 심층부에 일어나는 경향을 나타내었다. 그러나 4군에서는 무기질의 침착이 표층에 일어나며 그 양이 증가하는 경향을 나타내었다.
3. 탈회 및 재광화 용액으로 처리하였을 때 같은 시편의 법랑질과 상아질에서 나타나는 무기질 양의 변화는 상호간에 유의한 상관 관계를 나타내었다(탈회 $r=0.44$, 재광화 $r=0.44$, $p<0.05$).
4. AFM소견에서 탈회시에는 수산화인회석 입자의 중앙부와 변연부가 용해되며 입자사이의 간격이 넓어지는 것이 관찰되었다.

5. 상아질의 재광화시에는 원래의 커다란 수산화인회석 입자사이에 작은 수산화인회석 결정이 침착되는 양상을 관찰할 수 있었다.

본 실험의 결과에 의하면 유기산 완충용액의 포화도 조절을 통하여 법랑질과 상아질 모두에서 재광화 양상을 조절하는 것이 가능할 것으로 사료되며, AFM이 법랑질과 상아질의 탈회 및 재광화시 수산화인회석 입자의 변화를 관찰하는데 유용하게 이용될 수 있다고 생각된다.

유기산 완충용액의 포화도가 법랑질 및 상아질의 재광화에 미치는 영향과 수산화인회석의 AFM관찰

연세대학교 대학원 치의학과
(지도 이 찬 영 교수)

박 정 원

I. 서 론

치아 우식증은 전 세계적으로 가장 흔한 만성 질환의 하나로서, 역사적으로 볼 때 근대에 오면서 그 발병률이 급격히 증가하다가 선진국에서는 1970-80년대 들어 오면서 감소하고 있지만 우리 나라를 비롯한 많은 나라에서는 아직도 증가하는 추세를 나타내고 있는 질환이다^{49, 62}. 일반적으로 치아 우식증이라고 하면 대개 유소년기에 호발하는 것으로 여겨져 왔지만 인간의 평균수명이 연장되면서 치은 퇴축과 치조골 소실로 인해 치근이 노출된 경우가 빈발하고 또한 구강 위생을 유지하기 힘든 고령의 환자가 많아지면서 치근 우식이 발생하는 빈도가 증가하였다^{7, 46}. Katz 등³¹은 치근우식이 21.7%에서 55.9%의 범위를 나타낸다고 하였고, Joshi 등³⁰은 환자의 연령에 따른 발생빈도를 조사하였는데 45-59세는 1년에 100개중 2.25개의 치면에서 우식이 발생하였고, 60-64세는 3.10개, 그리고 75세 이상의 환자에서 1년에 100개중 3.51개의 치면에서 우식이 발생하였다고 보고하였다.

치아의 우식을 관찰하고 연구하는 방법으로는 일반 조직 현미경을 이용하는 방법, 편광 현미경을 이용하는 방법, microradiograph를 이용하는 방법, 화학적 성

분 분석을 이용하는 방법, 전자현미경을 이용하는 방법 등이 있다³⁾. 편광 현미경을 이용할 경우 탈회된 각 층의 입자의 성질에 따라 복굴절의 변화를 나타내 병소의 진행에 따른 층의 구별이 가능하고, microradiograph에서 나타나는 상아질 교원섬유의 수축에 의한 영향을 줄일 수 있으며^{39, 59)}, microradiograph보다 치근에서 백아질과 상아질의 구별이 용이하다. 하지만 편광현미경을 이용할 경우 병소의 깊이는 측정이 가능하지만 실제 무기질의 소실을 정량적으로 비교하는 것은 불가능하고, 표층에 재광화가 일어난 경우 이 부위에 어느 정도 광물질의 소실과 침착이 일어났는지를 비교할 수 없다는 단점이 있다.

인공우식을 형성하는 방법은 in vivo 방법³⁹⁾과 in vitro 방법으로 나눌 수 있으며 in vitro 방법으로는 치근의 치태를 이용한 방법^{10, 12)}, acidified gelatin gel을 이용하는 방법^{17, 46)}, 그리고 partially saturated buffer를 이용하는 방법³⁸⁾ 등이 있는데, 세 번째 방법의 경우 용액의 영향이 빠른 시간 안에 나타나 결과를 관찰할 수 있으며, 다양한 조건을 손쉽게 변화시킬 수 있는 장점이 있다.

Moreno 등³⁸⁾에 의하면 치아의 우식이 일어날 때 영향을 미치는 인자로 pH 이외에 용액의 포화도가 중요한 요소가 되는데, 치아가 담긴 용액이 저포화상태일 경우 치아에서 무기질이 빠져나가서 탈회가 일어나게 되고 빠져나간 용액의 칼슘, 인 이온이 dicalcium phosphate dihydrate(DCPD)의 형태로 침착이 일어나 표면층을 형성한다고 하였다. 이⁶⁵⁾의 연구에 의하면 법랑질 우식을 유발할 경우 탈회 용액의 포화도를 조절하여 탈회양상을 조절할 수 있음을 보고하였다. Chow 등⁶⁾은 칼슘과 인 이온을 연속적으로 적용하여 치근병소를 재광화시키는 실험을 하였는데, 칼슘용액이 인산용액보다 더 알칼리성을 띄도록 하여야 칼슘 이온이 확산되기 쉽다는 결과를 보고하였지만 칼슘과 인을 동시에 적용하지는 않았다. 따라서 아직까지 여러 가지 이온을 혼합한 용액에서 치근 병소의 재광화에 대해서는 그 연구가 부족한 실정이다.

치아 우식은 발생하는 부위에 따라 소와 및 열구 우식과 평활면 우식으로 나눌 수 있으며 평활면 우식은 다시 치관부 우식과 치근 우식으로 나눌 수 있다⁴¹⁾. 법랑질과 상아질은 조직학적, 화학적 성질에서 많은 차이를 나타내는데, 법랑질은 무게의 95-98%가 무기질이고 1-2%만이 유기질로 이루어진데 반해, 상아질의 경우

무기질이 45-50%이고, 유기질이 30%를 차지하고 있다⁴⁹⁾. 따라서 범랑질의 우식과 치근 우식은 탈회와 재광화의 특성에 있어 차이가 있을 것으로 예측되는데, Silverstone 등⁴⁷⁾은 치근 우식을 발생 위치와 미생물의 종류의 차이를 들어 치관부 우식과는 별개의 것으로 여겼으나, Aamdal-Schei 등¹⁾은 구강내 치태의 pH와 세균 균종을 조사한 결과 별다른 차이가 없음을 보고하였다. Vehkalahti⁵⁶⁾는 치관부 우식과 치근 우식 발생률의 상관관계를 조사하여 치근부 우식이 많이 존재하는 경우 치관부 우식도 호발함을 보고하고 이것의 발생 원인과 예방법 사이에 공통점이 존재할 것이라 주장하였다.

치아의 무기질은 주로 수산화인회석(hydroxyapatite)결정으로 이루어져 있는데 우식이 발생할 경우 이 입자의 변화가 나타나게 된다. Holmen 등²⁴⁾은 인공우식의 초기에 수산화인회석 결정에 부분적인 용해가 일어나고 그 결과 입자사이의 공간이 증가하고 이 공간을 통해 무기질 이온이 이동할 수 있다고 보고하였으며, Hayashi 등²¹⁾은 고해상도 TEM을 이용한 연구에서 우식 발생시 입자의 변연부가 소실되고, 동시에 수산화인회석 입자의 중앙에서 용해가 일어나 중앙부 천공이 일어나게 된다고 주장하였다.

이에 본 연구에서는 재광화 용액의 포화도 변화에 따른 범랑질과 치근의 재광화 양상을 microradiograph로 평가하고, 치아의 탈회 및 재광화시 수산화인회석 결정의 변화를 AFM을 이용하여 관찰하고자 하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 시편제작

발거한 영구치중 우식이 없고 탈회되지 않은 대구치를 선택하여 치근의 연조직 및 백악질을 curette으로 제거하고 불소가 함유되지 않은 pumice로 치근면을 연마한 다음 초음파세척기로 세정 후 증류수로 세척, 건조하였다. 건조된 치아는

5cc 주사기를 이용하여 제작한 직경 1cm, 높이 1cm의 원통에 자가중합형 레진을 이용하여 치관부 및 백악-법랑 경계부 하방 4mm가 노출되도록 고정하고 저속 diamond saw(ISOMET™, Buehler, U. S. A.)를 이용하여 치아 장축과 평행하게 두께 0.8-1.0mm가 되도록 절단하였다. 이 시편을 매몰한 레진 바로 위에서 치아장축에 수직으로 절단하였으며 #800사포를 이용하여 100-150 μ m 두께로 연마하고 초음파 세척 후 건조시켰다.

연마된 40개의 시편을 입체현미경(SZ-PT 40, Olympus, Japan)하에서 검사하여 법랑질과 상아질에 우식이나 결손부, 또는 금이 가지 않은 부분을 확인 후 여기에 폭 2-3mm의 window를 형성하였고, 이 부위를 제외한 나머지 부위는 nail varnish를 도포하였다. 연마된 면에는 인공우식 용액과의 접촉을 차단할 수 있도록 현미경 하에서 bonding resin(Scotchbond MP®, 3M Dental Product, U. S. A.)을 도포한 다음 질소가스 하에서 1차로 광중합 하였다. 이 시편에 원형의 금박 grid(SPI grid #2040G, Au 3mm 400 mesh, West Chester, U. S. A.)를 4등분하여 window부위의 치아표면에서 1mm 정도 떨어진 거리에 bonding resin을 이용하여 고정하고 2차 광중합 하였다(Fig.1).

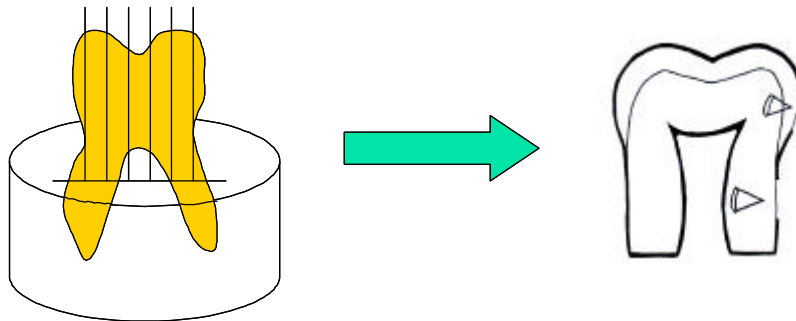


Fig. 1. Preparation of tooth section with thickness of 100~150 μ m.

2. 실험 용액의 제조

1) Stock용액의 제조

30% lactic acid(Sigma Co., 분자량 90.08, 밀도 1.080)를 이용하여 1M의 lactic acid

를 제조한 다음 페놀프탈레인(Sigma Co.)지시약과 8N 수산화칼륨(KOH, potassium hydroxide, Sigma Co.) 표준용액으로 적정하여 용액의 농도가 0.976M임을 확인하였다.

염화칼슘분말(Sigma Co., 분자량 147.0)을 이용하여 0.3M의 용액을 제조하고 이를 100배 희석한 후 자동분석기(747 Automatic analyzer, Hitachi, Japan)를 이용하여 제조한 용액의 농도가 0.276M임을 확인하였다.

인산칼륨분말(Sigma Co., 분자량 136.1)을 이용하여 0.9M의 용액을 제조한 후 이를 600배 희석하여 자동분석기(747 Automatic analyzer, Hitachi, Japan)로 분석하여 이 용액의 농도가 0.852M임을 확인하였다.

2) 탈회 완충용액의 제조

Stock 용액을 이용하여 칼슘 15mM, 인 9.5mM, NaN_3 3.08mM, Lactic acid 100mM을 함유하고 포화도 0.155가 되도록 탈회용액을 제조한 후, 8N KOH 표준용액을 이용하여 pH meter(pH meter MP220, Mettler-Toledo, Switzerland) 계측하에 pH 4.3이 되도록 조절하였다. 위의 용액을 자동분석기(747 Automatic analyzer, Hitachi, Japan)로 분석하여 제조된 용액의 농도가 칼슘 15.1mM, 인 9.6mM임을 확인하고 시편의 탈회용액으로 사용하였다(Table 1).

Table 1. Initial composition of demineralization solution

Composition	Concentration
Lactic acid (mM)	100
Calcium (mM)	15.1
Phosphate (mM)	9.6
Sodium azide (mM)	3.08
pH	4.3
Degree of saturation	0.155

3) 재광화 완충용액의 제조

농도 100ppm의 염화불소 표준용액(100ppm NaF Standard solution, Orion Research Inc., U. S. A.)을 이용하여 불소 농도 2ppm인 네가지 다른 포화도를 가지는 용액을 제조하기 위하여, stock 용액을 이용하여 Table 2의 조건으로 제조하고 이를 자동분석기로 정량 분석한 다음 재광화 용액으로 이용하였다.

Table 2. Initial composition of remineralization solution

Composition	Group			
	I	II	III	IV
Lactic acid (mM)	10	10	10	10
Calcium (mM)	20.2	28.4	31.2	37.4
Phosphate (mM)	10.0	10.0	12.0	15.0
Sodium azide (mM)	3.08	3.08	3.08	3.08
Fluoride (ppm)	2	2	2	2
pH	4.3	4.3	4.3	4.3
Degree of Saturation	0.268	0.309	0.339	0.390

3. 인공치아 우식의 형성

제작된 시편을 용액에 처리하기 전에 편광 현미경(SZ-PT 40 with Polarizing filter, Olympus, Japan)하에서 증류수에 침윤시켜 80배로 사진촬영하고 이를 다시 microradiograph 촬영한 뒤, 50cc 플라스틱 용기에 30cc의 탈회 완충용액을 채우고 용액에 시편이 잠기도록 한 후 실온에서 보관하였다. 2-3일 경과 후 탈회가 일어난 것을 편광 현미경으로 확인하고 이 상태를 사진 및 microradiograph로 촬영하였다.

4. 재광화

탈회된 시편을 4개의 군으로 나누어 각 군별로 10개씩의 시편을 재광화 완충용액에 담그고 실온에서 보관하면서 24시간 간격으로 7일간 사진과 microradiograph 촬영을 시행하였다.

5. Microradiograph 분석과 통계

Microradiograph를 현미경 하에서 80배로 관찰하면서 CCD camera (Panasonic, Japan)와 capture board(Miro Studio 200, Pinnacle, Germany)를 이용하여 컴퓨터에 상을 저장하였다. 이 상을 Scion image analyzer(Scion Corporation, Maryland, U. S. A)를 이용하여 탈회 전·후, 그리고 재광화 후를 합성하여 density를 표준화하고 Excel(MS Office 2000, Microsoft, U. S. A.)에서 graph로 처리한 뒤 graph의 면적을 계산하여 탈회가 일어난 양과 재광화가 일어난 양을 백분율로 분석하였다. 또한 표 면에서 탈회가 일어난 부위까지의 깊이와 가장 많은 재광화가 일어난 층까지의 깊이를 측정하여 재광화 층의 위치를 탈회된 깊이에 대한 백분율로 표시하였다.

위의 결과를 SAS 6.12 program에서 재광화 군간의 비교는 Duncan's multiple range test를 이용하였고 법랑질과 상아질의 탈회 및 재광화 양상은 paired t-test를 이용하여 통계처리 하였다.

6. AFM(atomic force microscope) 관찰

발거한 영구치중 우식이 없고 탈회되지 않은 대구치를 선택하여 치근의 연조직 및 백악질을 curette으로 제거하고 불소가 함유되지 않은 pumice로 치근면을 연마한 다음 초음파세척기로 세정 후 증류수로 세척, 건조하였다. 건조된 치아를 5cc 주사기로 제작한 원통에 치근단 부위가 잠기도록 고정된 후 치관과 치근부위 4mm가 노출되는 상태로 치아를 절단하고 이 치아의 절단면을 nail varnish로 2회 도포하였다. 이 치아를 위에서 제조한 탈회용액에 3일간 보관하고 표면에 백색반점이 나타난 것 중 탈회상태를 관찰할 것은 이 단계에서 치아 외면에 수직이 되

도록 저속 diamond saw로 절단하고 절단된 면을 #800, #1000, #1500, #2000 사포를 이용하여 연마한 후 $5\mu\text{m}$, $3\mu\text{m}$, $1\mu\text{m}$, $0.5\mu\text{m}$, $0.25\mu\text{m}$, $0.1\mu\text{m}$ 의 diamond polishing paste로 각각 3분씩 순서대로 연마 후 초음파 세척기로 세척하고 건조하였다.

탈회가 완료된 시편 중 재광화를 관찰할 시편은 재광화 용액에 7일간 보관하고 절단 및 연마과정을 위와 동일하게 시행하였다.

준비된 시편을 AFM(Digital Instruments Nanoscope III, Santa Barbara, CA, U. S. A.)에 고정하고 여기에 연결된 CCD camera를 이용하여 정상조직과 탈회조직, 그리고 재광화 층을 구별하여 각각의 상을 촬영하였다.

III. 실험 결과

1. Microradiograph 분석

Microradiograph상에서 법랑질은 표면하층병소를 형성한 것을 알 수 있었고, 재광화시 상아질과 같은 재광화층이 뚜렷이 관찰되지는 않았지만 표면하층에 무기질이 침착된 양상을 보였다(Fig. 2). 상아질은 본 실험의 탈회조건에서는 표면층을 형성하지 못하였고 재광화시에는 표층보다 하방에서 재광화층이 띠를 이루며 나타나는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

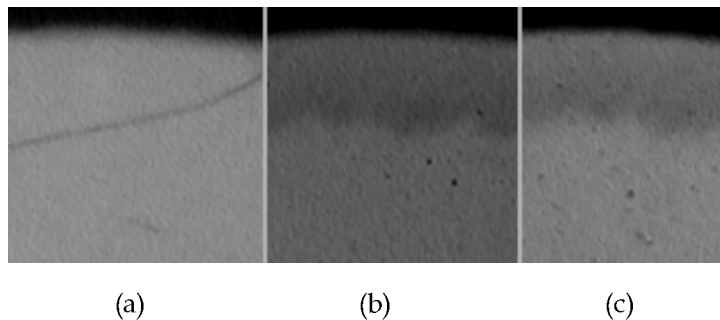


Fig. 2. Microradiographic image of enamel.

(a) Before demineralization (b) After demineralization

(c) After remineralization.

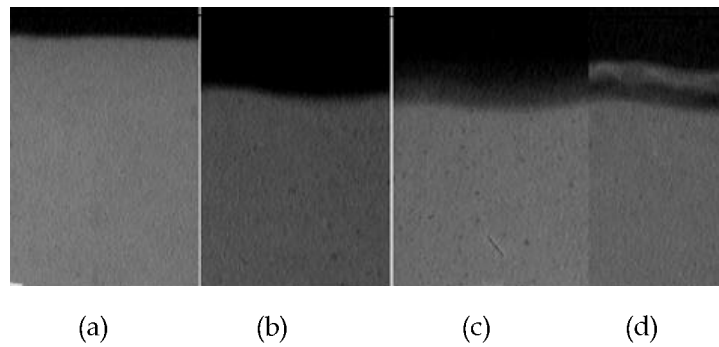


Fig. 3. Microradiographic image of dentin.

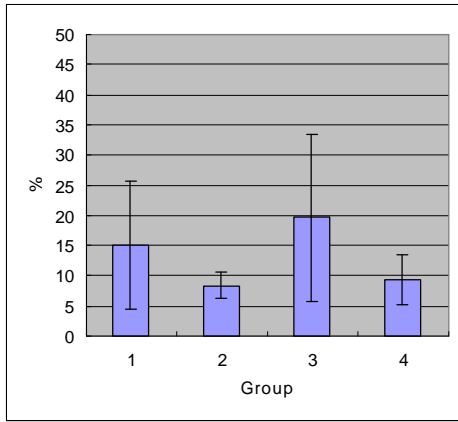
(a) Before treatment (b) After demineralization

(c) After 1 day remineralization (d) After 7 days remineralization.

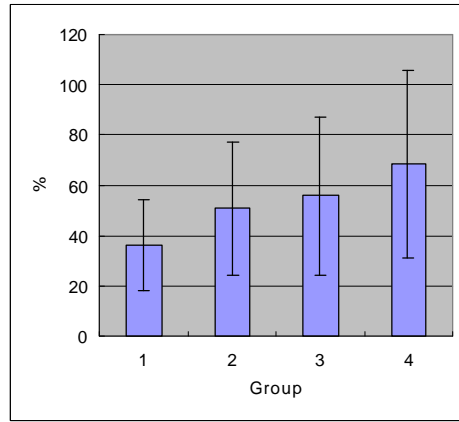
시편의 법랑질부위에서 탈회 및 재광화 용액 처리 후 무기질양의 변화와 재광화가 가장 많이 일어나는 부위의 표면으로부터의 깊이 백분율은 Table 3과 Fig. 4에 나타나 있다.

Table 3. Quantitative mineral volume change (%) of enamel during de- and remineralization and peak depth (%) of mineral deposition from the surface

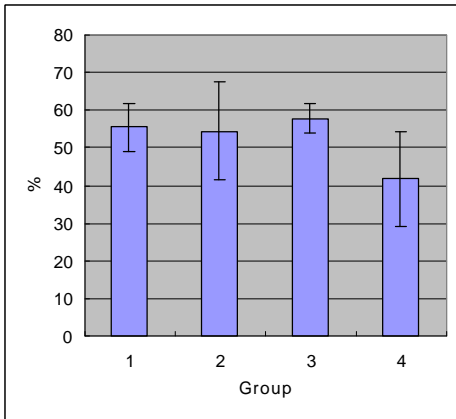
Group	Condition	Enamel	Enamel	Peak Enamel
		Demineralization	Remineralization	Remineralization
		(%)	(%)	Depth (%)
		Mean \pm S.D.	Mean \pm S.D.	Mean \pm S.D.
1		15.0 \pm 10.7	35.8 \pm 18.0	55.4 \pm 6.4
2		8.4 \pm 2.2	50.7 \pm 26.3	54.4 \pm 13.0
3		19.6 \pm 13.8	55.8 \pm 31.5	57.7 \pm 4.0
4		9.4 \pm 4.1	68.4 \pm 37.4	41.7 \pm 12.7



(a)



(b)



(c)

Fig. 4. Quantitative mineral volume change (%) of enamel during de- and remineralization and peak depth (%) of mineral deposition from the surface.

(a) Demineralization (b) Remineralization

(c) Peak enamel remineralization depth from surface.

법랑질 시편의 재광화시 침착되는 무기질의 양은 군에 따른 통계적 유의차는 없었지만($p>0.05$) 1군에서 4군으로 용액의 포화도가 증가함에 따라 침착되는 무기질의 양이 증가하는 추세를 나타냈으며, 침착이 일어나는 깊이는 용액의 포화도가 가장 높은 4군에서는 표층에 가까운 쪽에 침착되는 양상을 보였다.

시편의 상아질에서 탈회 및 재광화 용액 처리 후 무기질량의 변화와 재광화가 가장 많이 일어나는 부위의 표면으로부터의 깊이 백분율은 Table 4와 Fig. 5에 나타나 있다.

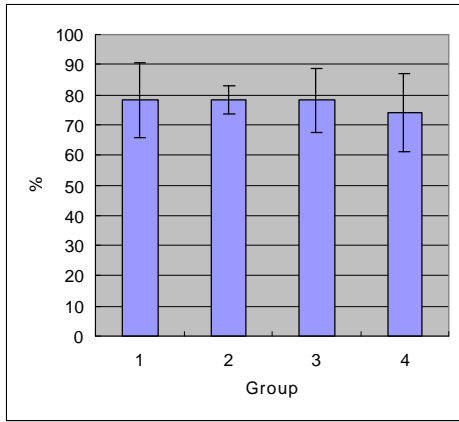
Table 4. Quantitative mineral volume change (%) of dentin during de- and remineralization and peak depth (%) of mineral deposition from the surface

Condition Group	Dentin	Dentin	Peak Dentin
	Demineralization (%)	Remineralization (%)	Remineralization Depth (%)
	Mean ± S.D.	Mean ± S.D.	Mean ± S.D.
1	78.2±12.3	33.4±20.1	54.1±18.1
2	78.3±4.6	29.3±14.0	62.0±8.8
3	78.0±12.9	20.3±9.9	64.4±7.8
4	73.9±12.9	34.5±12.7	53.7±13.1

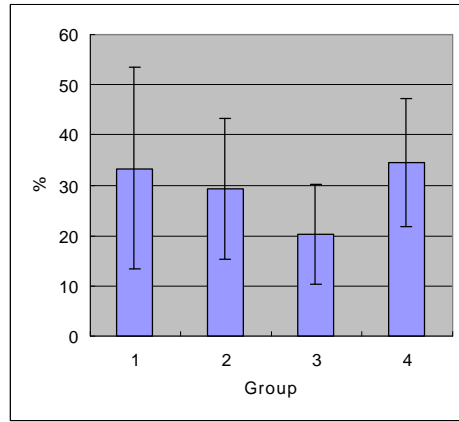
상아질 시편의 재광화시 침착되는 무기질의 양은 군에 따른 통계적 유의차는 없었지만($p>0.05$) 용액의 포화도가 1군에서 3군으로 증가함에 따라 무기질 침착이 심부에 일어나면서 그 양은 감소하였고, 4군에서는 표층으로 침착되면서 침착되는 무기질의 양이 증가하는 경향을 나타냈다.

탈회된 깊이를 보면 법랑질의 경우 $253.7\pm 102.3\mu\text{m}$ 였고 상아질의 경우에는 $319.9\pm 95.1\mu\text{m}$ 으로 상아질에서 법랑질보다 약 $66.2\mu\text{m}$ 더 깊은 곳까지 탈회가 일어난 것을 관찰할 수 있었다.

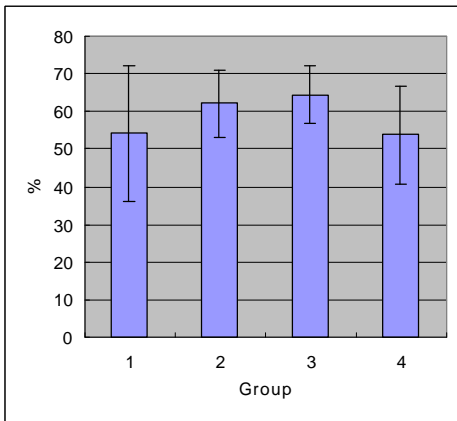
하나의 시편에서 법랑질과 상아질 사이에 탈회되면서 나타나는 무기질 소실의 양과 재광화될 때 침착되는 무기질의 양은 서로간에 상관관계를 갖고 있는 것으로 나타났다(탈회시 $r=0.44$, 재광화시 $r=0.44$, $p<0.05$). 즉 법랑질에서 탈회가 많이 일어난 시편의 경우 상아질에서도 탈회가 많이 일어나는 상관관계를 갖고 있었다 (Fig. 6).



(a)



(b)



(c)

Fig. 5. Quantitative mineral volume change (%) of dentin during de- and remineralization and peak depth (%) of mineral deposition from the surface.
 (a) Demineralization (b) Remineralization
 (c) Peak dentin remineralization depth from surface.

상아질의 재광화 양상 관찰결과 2일 경과 후 편광 현미경 및 microradiograph 상에서 재광화가 일어난 band가 관찰되기 시작하였고 이 band는 시간이 지날수록 더 명확하게 관찰되었다. 범랑질에서는 8개의 표본에서 재광화 과정중 추가로 탈회가 일어났으며 나머지 시편에서는 재광화가 일어났는데, 상아질과 같은 명확한 재광화 층이 관찰되지는 않았다.

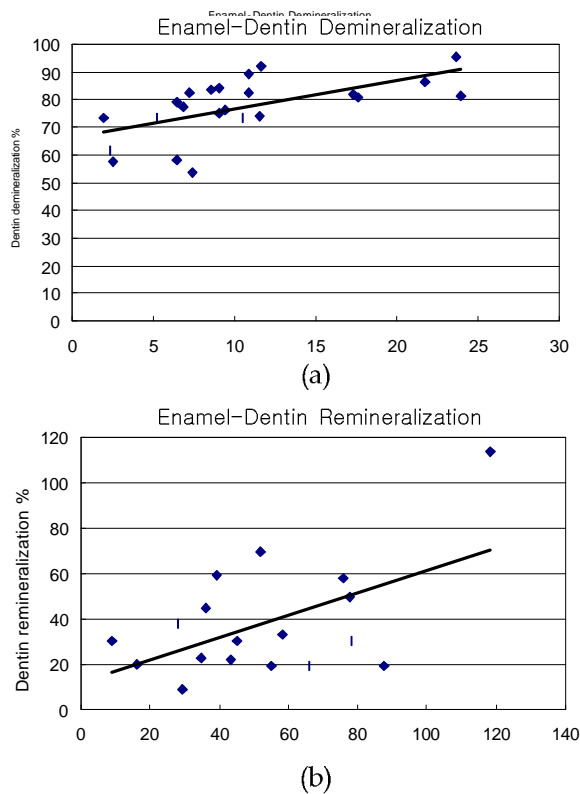


Fig. 6. The relationship of mineral change of enamel and dentin.
 (a) Demineralization ($r=0.44$, $p<0.05$)
 (b) Remineralization ($r=0.44$, $p<0.05$).

2. AFM 관찰

범랑질에서는 정상구조의 경우 수산화인회석 입자간의 간격이 비교적 치밀하게 이루어져 있는 것을 관찰할 수 있었지만(Fig. 7), 탈회가 일어난 부위를 관찰한 결과 수산화인회석 입자의 경계가 불명확한 경우가 많았고 입자사이에 공간이 많이 존재하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 8).

상아질의 경우 수산화인회석의 입자 형태는 범랑질과 유사하지만 일부에서는 크기가 더 큰 것이 관찰되었다(Fig. 9).

탈회된 상아질의 경우 범랑질과 마찬가지로 입자사이에 넓은 공간이 존재하였고(Fig. 10), 재광화가 일어난 경우에는 수산화인회석과 동일한 성분을 가지는 작은 입자가 침착된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 11).

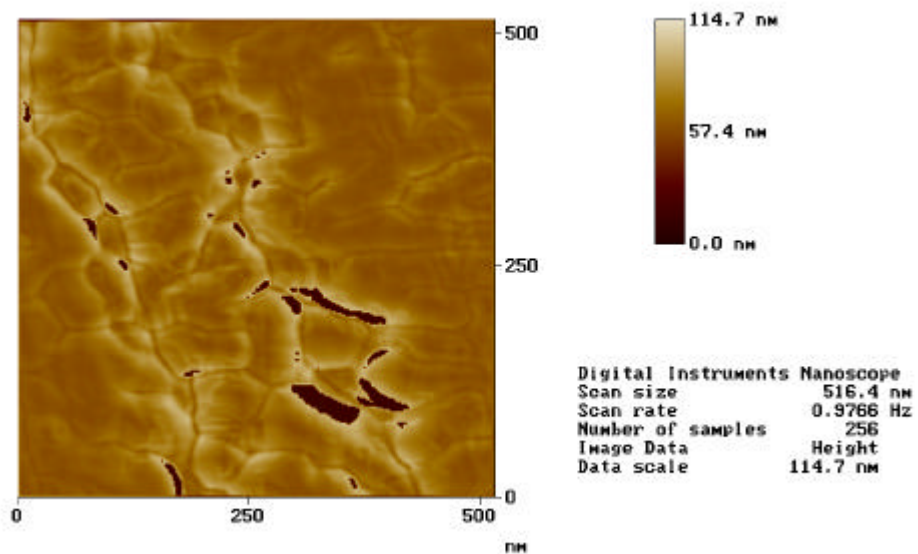


Fig. 7. AFM image of hydroxyapatite crystals of normal enamel.

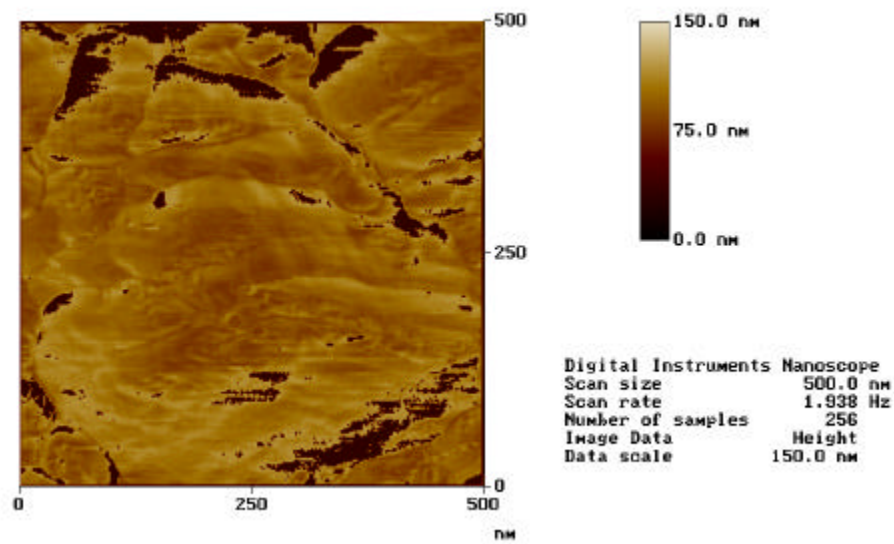
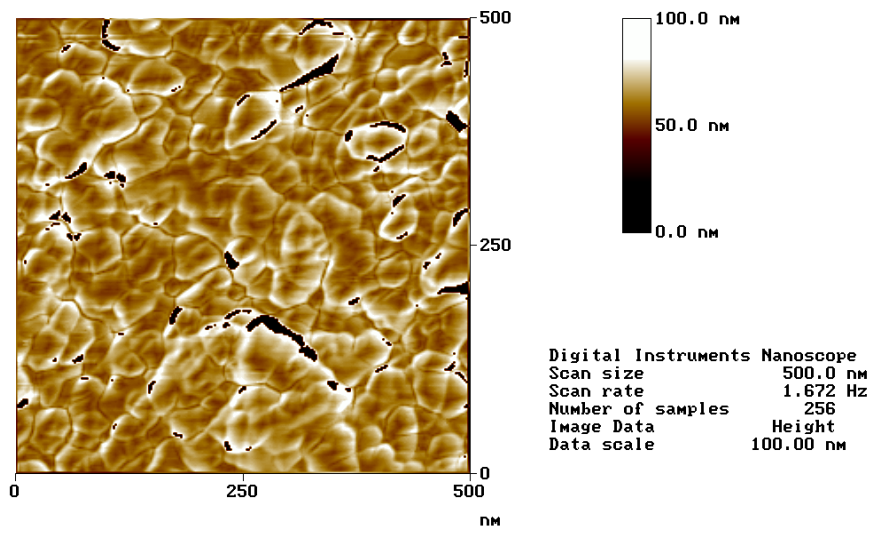
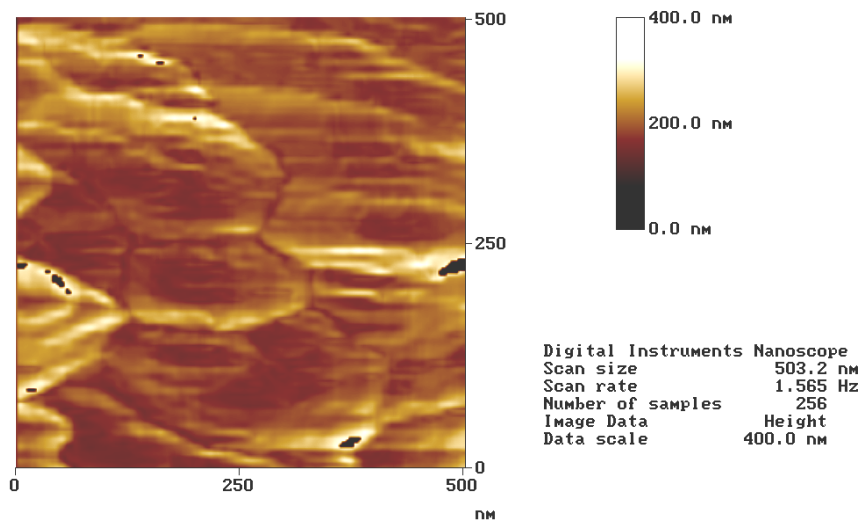


Fig. 8. AFM image of hydroxyapatite crystals of demineralized enamel.



(a)

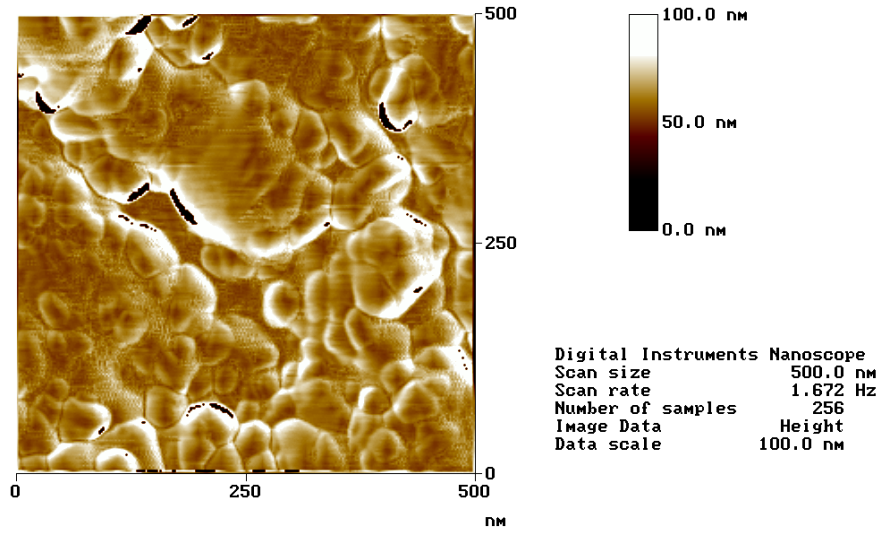


(b)

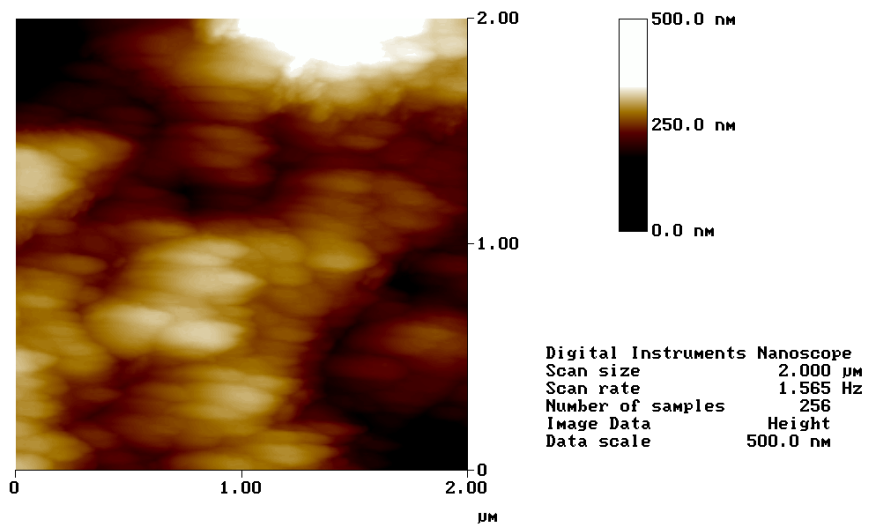
Fig. 9. AFM image of hydroxyapatite crystals of normal dentin.

(a) Normal size hydroxyapatite crystal

(b) Large size hydroxyapatite crystal.



(a)



(b)

Fig. 10. AFM image of hydroxyapatite crystals of demineralized dentin.

(a) Demineralized hydroxyapatite crystal

(b) Space between the cluster of hydroxyapatite crystal.

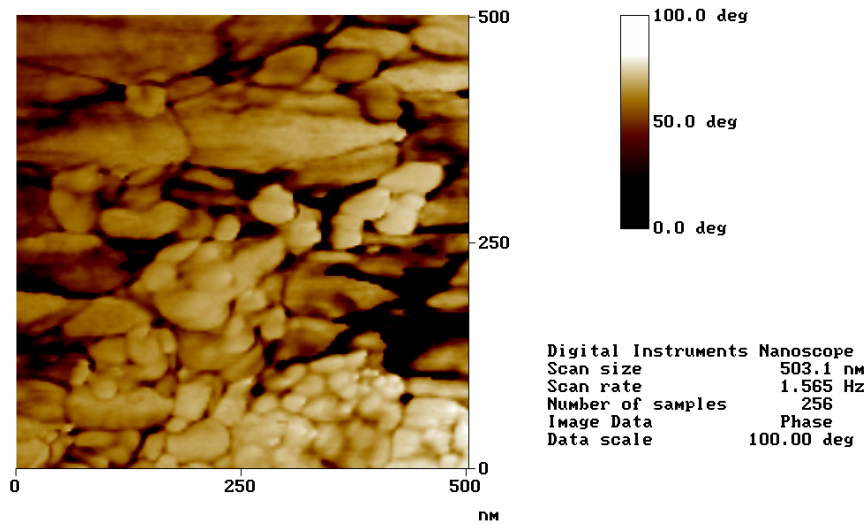


Fig. 11. AFM image of hydroxyapatite crystals of remineralized dentin.

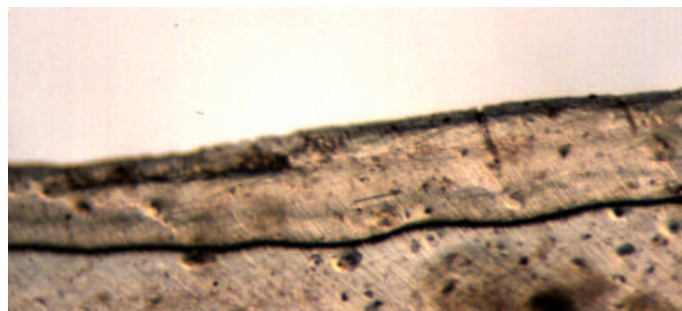
IV. 총괄 및 고찰

치아의 우식은 섭취된 음식이 구강내 세균에 의해 분해되면서 유기산이 발생하고 이것이 치아 경조직의 무기질을 용해시키면서 나타나는 현상으로 볼 수 있다. 치아 우식에는 여러 가지 요소가 영향을 미칠 수 있는데, 화학적으로 볼 때 유기산의 종류⁶⁰⁾, 유기산의 농도^{55, 63, 66)}, pH^{33, 49, 53, 66)}, 치아의 무기질 및 유기질의 화학적 조성²⁶⁾, 불소의 농도^{50, 52)} 그리고 구강내 타액의 성분등 복합적인 인자에 의해 결정되는 현상으로 볼 수 있다.

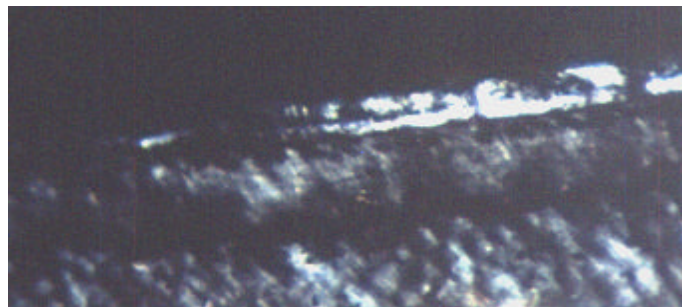
치아에서 우식을 인공적으로 유발하기 위해 plaque bacteria를 이용하는 방법¹¹⁾, acidified gelatin gel을 이용한 방법^{17, 18, 46, 48)}, 그리고 partially saturated buffers를 이용한 방법^{38, 64)}이 대표적으로 사용되었으며, Wefel 등⁵⁹⁾은 치근 우식을 유발하는 앞의 2가지 방법을 비교하였는데 partially saturated buffer model과 gel model에 있어 유사한 결과를 얻었다고 보고하였다. Partially saturated buffer를 이용할 경우 용액의 침투가 gel에 비해 빨리 일어나므로 결과를 빠른 시간내에 관

찰할 수 있고 성분의 변화를 손쉽게 할 수 있는 장점이 있으므로 본 실험에서는 이 방법을 이용하여 인공우식을 유발하였다.

우식의 평가를 위한 방법으로는 편광 현미경을 이용하는 방법, microradiograph를 이용하는 방법, 화학적인 성분을 분석하는 방법, 시편의 미세경도를 측정하는 방법, 그리고 전자 현미경을 이용하여 표면이나 단면의 변화를 관찰하는 방법 등이 이용되어져 왔다³⁾.



(a)



(b)

Fig. 12. The image of demineralized dentin following the degree of polarizing light.
(a) Microscopic image of demineralized dentin under non-90 degree polarizing light.
(b) Microscopic image of demineralized dentin under 90 degree polarizing light.

본 실험에서 시편을 물에 침적하여 편광 현미경하에서 관찰했을 때 범랑질의 경우 정상 범랑질과 탈회된 범랑질사이에 명확한 양성 복굴절과 음성 복굴절의 차이를 관찰할 수 있었지만 상아질의 경우에는 90도 편광으로 관찰하였을 때 층간의 구별이 어려웠고, 광원의 편광정도를 변화시킨 경우에는 구별이 용이하였다 (Fig. 12). 이는 상아질이 탈회되면서 양성 복굴절이 증가하기 때문에 나타나는 결과라 하였고⁵⁸⁾ 만약 본 실험에서 quinoline에 시편을 담그고 관찰하였다면 명확하게 층을 구별할 수 있었을 것이다. 이처럼 복굴절(birefringence)이 실제 역전되어 나타나는 것을 von Ebner는 "phenol reaction"이라 정의하였고 이것은 교원섬유가 광물질을 잃으면서 phenol 분자를 흡수하여 복굴절(birefringence)이 양성에서 음성으로 나타나는 것이라고 하였다. 본 실험에서는 편광 현미경으로 우식의 진행만을 관찰하고자 했으므로 quinoline을 이용하지는 않았고, 편광의 광원을 90도에서 10-20도 정도 조절한 경우 그 진행정도와 재광화정도를 쉽게 관찰할 수 있었다.

관찰방법에 있어 이전에 국내에서 주로 이용되었던 편광 현미경을 이용한 깊이의 측정을 통해 탈회된 정도를 평가하던 방법 대신, 이번 실험에서는 microradiograph를 이용하여 탈회된 정도를 정량적으로 분석하고자 하였다. Extercate 등¹⁶⁾은 범랑질의 탈회와 재광화를 single-section model을 이용하여 microradiograph로 분석한 결과, 이 방법이 병소의 무기질 소실 정도를 평가하는데 적합하다는 것을 보여주었다. 하지만 본 연구에서는 microradiograph를 촬영하는 과정에서 노출시간이 1시간 30분이라는 매우 긴 시간이 소요되므로, 중간에 sample의 움직임이 나타나 상의 선명도가 떨어진 것이 있었는데, Bowes 등⁵⁾은 이러한 문제를 해결하기 위하여 진공을 이용한 cassette를 제작하여 시편이 진공 속에서 고정된 상태로 방사선 촬영을 하여 이러한 오차를 줄이는 방법을 고안하였다. 또한 본 실험에서는 여러 장의 microradiograph 상을 분석할 때 항상 동일한 부위의 상에서 무기질의 변화를 측정할 수 있도록 gold grid를 부착하여 이것을 기준으로 방사선 상을 합성하여 분석의 정확성을 높이고자 하였다.

Microradiograph의 분석을 위해 본 연구에서는 현미경에 CCD camera를 부착하여 상을 컴퓨터에 저장하고 이것을 image analyzer를 이용하여 상의 density를 분석하고 다시 256단계로 표준화하여 촬영 및 현상에 의한 오차를 보정한 후 그

래프에서 나타나는 면적을 계산하여 탈회 및 재광화 정도를 비교하였다. 이것은 Inaba 등²⁹⁾이 소개한 방법에 기초하여 고안한 방법으로 그들의 연구에 의하면 이 방법의 오차는 알루미늄의 0.6 μ m 두께 정도의 오차를 보인다고 하였는데, 최근에 컴퓨터의 급속한 발전과 더불어 capture board의 해상도가 매우 높아져 이러한 오차의 폭도 계속 감소할 것으로 생각된다.

본 실험에서는 이전의 법랑질에 대해 여러 가지 조건을 변화시켜 행했던 실험의 일환으로 유기산 완충용액을 이용한 방법으로 법랑질과 상아질을 동일한 조건에서 같이 인공우식을 유발하고 이를 재광화 시켜 법랑질과 상아질의 우식양상을 비교하고 치근 우식에 대해 재광화 시키는 방법을 찾고자 하였다. 따라서 시편의 탈회 과정에서 이전의 연구결과를 바탕으로 하여 pH를 4.3으로 하였는데, 이는 박 등⁶³⁾, 오 등⁶⁴⁾의 실험을 참고하여 인공 우식부위에서 와동의 형성 없이 법랑질에서 표면하층이 관찰되면서 우식이 가장 잘 일어날 수 있는 pH를 선택한 것이다. Hoppenbrouwer 등^{26, 27)}은 치근의 무기질이 법랑질의 것보다 탈회가 더 쉽게 일어나며 치근에서 무기질의 탈회가 일어나는 임계 pH를 6.7이라 하였고, 법랑질의 임계 pH 5.5보다 매우 높은 pH에서 탈회가 일어날 수 있음을 보여주었다. 반면에 Aamdal-Scheie 등¹⁾은 치태의 pH를 측정된 결과, 우식이 없는 치근의 pH와 우식이 있는 부위의 값이 차이가 없는 것으로 나타났다고 하였고, 따라서 이전의 일반적인 개념과는 차이가 있을 수 있는 가능성을 언급하였다. 본 실험의 결과에서는 재광화 용액의 pH를 4.3으로 하여 앞에서 언급한 임계 pH보다 낮은 조건이었지만 용액에 불소를 첨가하고 포화도를 높인 결과 재광화 층이 표층보다 심부에 생성되고 이것이 시간이 지남에 따라 폭이 넓어지는 현상을 관찰할 수 있었다. 이는 치아의 우식이 pH의 영향뿐만 아니라 다른 복합적인 요소에 의해 조절되는 현상임을 보여주는 증거라 할 수 있다.

이러한 인자의 하나로 Stephan 등⁴⁹⁾이 언급한 임계 pH이외에 Margolis와 Moreno^{34, 35)}는 법랑질의 탈회율이 무기질인 칼슘, 인의 용해도와 완충액의 포화도 사이의 열역학적 용해도에 의해 결정된다고 하였다. 따라서 법랑질의 탈회시 표층 하 병소가 생기기 위해서는 첫 번째로 이온이 확산되어 용해되는 속도가 침전되는 비율을 초과해서는 안되며, 두 번째로 법랑질 내의 상태가 침전이 일어날 수

있는 조건을 가지고 있어야 한다고 하였다. 즉 탈회용액이 역학적으로 dicalcium phosphate dihydrate(DCPD)를 형성할 수 있는 조건을 만족시켜야 표층하 병소가 형성될 수 있다고 하였다.

본 실험에서는 법랑질과 치근부의 우식으로 나누어 탈회 및 재광화 양상을 비교한 결과 법랑질보다 상아질에서 더 많은 무기질 소실이 빠르게 나타나는 것이 microradiograph에서 관찰되었고, 우식이 진행된 깊이도 상아질에서 더 깊게 나타났다. Frank 등²⁰⁾은 이러한 현상이 상아질과 법랑질의 화학적 성분과 조직학적 구조의 차이에서 기인한다고 주장하였다. 무기성분에 있어 Hoppenbrouwers 등²⁶⁾은 상아질내의 광물질이 법랑질보다 구강내 조건에서 높은 용해도를 보인다고 했으며 이는 치근이 마그네슘과 탄산염(carbonate)성분이 높기 때문에 나타나는 현상으로 추측하였다.

상아질에는 유기질 성분이 법랑질보다 많이 존재하고, 이것은 치아의 우식과 재광화에 영향을 줄 수 있는 것으로 밝혀지고 있는데, Inaba 등²⁸⁾은 상아질의 인공 우식 병소를 재광화 시킬 때 NaOCl로 처리하여 유기질을 비선택적으로 제거한 경우 NaOCl 처리하지 않은 경우보다, 불소가 없을 때 무기질 침착이 27% 증가하였고, 10ppm의 불소를 첨가한 경우에는 4%의 무기질 침착의 증가가 관찰되었다고 하였으며, 이 결과에 의하면 상아질 병소에서 유기질을 제거하는 것이 재광화를 촉진할 수 있을 것이라고 주장하였다. Boskey 등⁴⁾에 의하면 치아의 발생시 phosphophoryn의 농도가 저농도(0.010-1 μ g/ml)로 존재할 경우 수산화인회석의 형성이 촉진되고 고농도(100 μ g/ml)로 존재할 경우에는 오히려 수산화인회석의 성장이 억제된다고 하였다. 하지만 phosphophoryn의 존재 여부가 결정성장에 절대적인 영향을 주기보다는 이차 nucleation을 억제하는 것으로 생각된다고 하였다.

오 등⁶⁴⁾은 상아질의 탈회시 상아세관이라는 구조를 통해 산의 침투가 급격히 일어나므로 초기에는 탈회가 급격하게 증가되다가 이후에는 완만한 증가를 보이는 것을 알 수 있다고 보고하였다. 위와 같은 법랑질과 상아질의 차이로 인하여 본 실험에서 탈회시간을 2일 정도로 짧게 설정하였는데 그 이유는 법랑질에 기준하여 탈회시킬 경우 상아질에서 과도한 탈회가 일어나 이후의 재광화 실험에 영향을 미칠 수 있는 것으로 여겨졌기 때문이다.

본 실험에서는 탈회 후 microradiograph에서 Schüpbach 등^{42~45)}이 언급했던 radiopaque surface는 명확하게 관찰할 수 없었지만 재광화 후에는 일부 시편에서 이러한 층이 관찰되었다. 이러한 차이의 원인에 대해 Wefel 등⁵⁸⁾은 치근의 표층에 있는 백악질이 칫솔질이나 치주치료의 결과 제거되고 나면 상아질이 노출되고 이 부위는 백악질과는 다른 우식 양상을 in vivo에서 나타낸다고 하였으며, 실제 40% 정도에서만 microradiograph상에서 surface layer를 관찰할 수 있었다고 하였다. 본 실험에서는 이와 유사한 조건을 만들기 위하여 가능하면 백악질을 제거하도록 치아 시편을 처리하였고, 이것이 표층층을 관찰하기 힘든 하나의 원인이 되었을 것으로 사료되며, 또 다른 이유는 본 실험에서는 탈회기간을 2일 정도로 매우 짧게 맞추었던 것이 하나의 원인이 되었을 것으로 사료된다.

탈회된 시편을 재광화 시키기 위하여 불소농도는 2ppm, pH는 4.3으로 정하고 칼슘과 인 이온농도를 조절하여 포화도가 다른 재광화 용액을 4가지로 제조하였다. 여기서 재광화 용액의 pH를 4.3으로 정한 것은 이전의 실험에서 중성에 가까운 pH에서 재광화시 무기질의 침착이 표층부위에 국한되어 일어났기 때문에 탈회의 과정과 동시에 탈회된 병소의 심층부에서 무기질이 침착되는 효과를 보기위함이며 일반적인 용액보다 산성의 조건을 취하였다.

우식 병소의 재광화에 불소가 미치는 영향에 관해서는 많은 연구가 이루어져 왔는데^{13~15, 17, 23, 37, 67)}, 한 등⁶⁷⁾은 법랑질의 재광화에 불소농도가 미치는 영향을 평가한 실험에서 1, 2, 4ppm중 2ppm에서 심부까지 불소가 침착되어 재광화가 잘 일어난 것을 보고하였다. Kawasaki 등³²⁾은 인간의 상아질에 EDTA를 처리하여 비교원 단백질(noncollagenous protein)을 제거하고 이를 재광화할 때, 불소가 없는 경우에는 재광화가 일어나지 않았지만 2ppm의 불소를 첨가한 경우에는 비교원 단백질을 제거한 것과 상관없이 재광화가 일어난 것으로 보아 불소가 핵으로 작용하여 비교원 단백질의 효과를 극복하였다고 보고하였다. 본 실험에서는 이를 참고하여 재광화 용액의 불소농도를 2ppm으로 정하였고 실험 결과에서도 이러한 영향으로 인해 pH가 임계점 이하였음에도 불구하고 상아질에서 활발하게 재광화가 나타난 것으로 생각된다. 본 실험의 결과를 보면 재광화에 대한 불소의 영향은 법랑질보다 상아질에서 더 크고 명확하게 나타나는 것을 알 수 있었다.

네가지 재광화 용액으로 재광화 시킨 결과 탈회시킬 때와 마찬가지로 군간에 통계적 유의차는 나타나지 않았지만, 범랑질에서는 용액의 포화도가 증가함에 따라 침착되는 무기질의 양도 비례하여 증가하는 양상을 관찰할 수 있었다. 하지만 무기질 침착이 일어나는 부위를 관찰해 보면 포화도가 가장 높은 4군에서는 심부보다는 표층에 국한되어 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 이처럼 표층에 침착된 무기질은 이후 심부의 재광화가 일어나는데 있어 무기질 침투를 방해하는 기능을 하기 때문에 탈회병소의 완전한 재광화를 억제할 가능성이 있는 것으로 생각된다.

상아질에 있어서는 범랑질과 달리 탈회시 표면하층이 형성되지 않았기 때문에 무기질의 침착 역시 병소의 심부에서 나타나기 시작했는데 1군에서 3군으로 포화도가 높아지면서 범랑질과는 달리 무기질이 침착되는 부위가 병소의 깊은 곳에서 일어나면서 침착되는 무기질의 양은 감소하는 추세를 나타내었고, 4군의 경우에는 표면에 침착되면서 침착되는 무기질의 양은 증가한 결과를 보여주었다. 이와 같이 상아질이 재광화에 있어 범랑질과 차이를 나타내는 것은 상아세관을 통한 용액의 이동이 심부까지 비교적 자유롭게 일어나고, 상아질에 잔존하는 phosphophoryn의 영향과 상아질과 범랑질의 산에 대한 용해도 차이에 의한 것 등 복합적인 요소의 작용에 의한 것으로 사료된다.

Clarkson 등¹⁰⁾은 유기산에 의해 탈회된 상아질은 재광화 능력이 없다고 보고하였지만, Wefel 등⁵⁹⁾은 잔존하는 유기 기질이 재광화를 위해서는 적절하지 않지만 잔존 무기질에서 재광화가 일어났다고 보고하였다. 이후 상아질의 재광화에는 비교원 단백질, 특히 phosphoprotein의 역할에 의해 재광화가 영향을 받을 수 있다고 하는 연구 결과들^{8, 9)}이 발표되었으며 따라서 재광화의 결과가 범랑질보다 더 다양한 양상을 나타낼 수 있다고 하였다²²⁾. 본 실험에서는 유기산인 lactic acid를 이용하여 탈회를 시켰지만 불소를 함유한 재광화용액에서 재광화가 일어난 것으로 보아, Ten Cate 등⁵¹⁾이 실험에서 보고했던 교원질과 결합한 10%정도의 용해되지 않은 무기질이 핵으로 작용하였을 것으로 사료되나 이에 대해서는 탈회 시편의 성분 분석과 같은 추가 연구가 행해져야 할 것으로 사료된다.

위의 조건을 고려해 볼 때 범랑질과 상아질은 이온의 용해도가 다르고 또 용액의 침투경로와 이온이 침착할 수 있는 조직학적인 구조가 다르므로 이번 실험

에서 탈회 양상뿐만 아니라 재광화 양상에서도 차이를 나타낸 것으로 사료된다. 법랑질의 경우에는 2일만에 탈회가 일어나고 표면하층이 형성된 것이 관찰되는 시편이 있었지만, 일부에서는 탈회정도가 불완전한 것도 관찰되었는데 이 시기에 동일한 시편의 상아질에서는 이미 심층부까지 탈회가 일어난 것이 관찰되었다. 상아질의 탈회가 일어난 시편을 재광화 용액에 담그고 재광화 되는 정도를 관찰한 결과, 시편의 법랑질에서 8개의 시편은 계속적인 탈회가 일어난 것을 관찰할 수 있었는데 이것은 재광화 용액의 pH를 4.3으로 낮게 설정하였기 때문에 나타난 현상으로 생각되며, 김 등⁶¹⁾의 실험에서 알 수 있듯이 pH가 높은 경우 더 많은 재광화를 기대할 수 있을 것으로 기대된다. 이에 반해 상아질은 이처럼 낮은 pH의 용액에서도 모든 시편에서 2일정도 경과 후부터 미약한 띠(band)가 형성되고 7일 경과 후에는 명확한 재광화 층이 관찰되었으며, 경우에 따라서는 무기질의 과침착(hypermineralization)이 일어난 시편도 있었다. 이것은 상아질의 무기질 함량이 법랑질보다 상대적으로 낮기 때문에 용액의 포화도는 상대적으로 높은 상태가 되므로 탈회보다는 무기질의 침착이 일어난 것으로 사료된다. 또 재광화가 일어난 시간이 탈회와 마찬가지로 법랑질에 비해 상아질에서 빠르게 나타났는데, 이는 상아세관을 통해 이온의 이동이 급격하게 일어날 수 있었기 때문으로 생각된다.

구강내 치근 우식의 경우에는 오랜 시간동안 구강내의 변화하는 조건에서 탈회와 재광화의 과정이 반복하여 일어나고, 치은 퇴축으로 치근이 노출된 초기에는 백악질이 표층에 존재하지만 시간이 경과함에 따라 치경부의 마모에 의해 백악질이 제거되고 상아질이 노출된다. 노출된 상아질에서는 dead tract, 상아세관의 sclerosis, 그리고 이차 상아질의 침착 등의 반응이 일어나므로 우식의 진행을 방해할 것으로 생각되지만 *in vitro* 실험에서는 이러한 현상을 기대할 수는 없다⁵⁹⁾.

이번 실험에서 백악질을 제거하려는 노력에도 불구하고 일부 시편에서는 잔존하는 백악질이 관찰되었지만 실험의 결과에는 특별한 영향을 미치지 않은 것으로 보인다. 이는 아마도 백악질의 두께가 백악-법랑질 경계부위에서 20-50 μm 로 전체 탈회된 깊이의 평균인 319.9 μm 에 비해 표층에 국한되어 존재하고 백악질의 구조가 상아질이나 법랑질보다 수분이 많고 광물질이 적으며 다공성이어서 이온의 이동이 빨리 일어날 수 있었기 때문으로 여겨진다⁴⁰⁾.

법랑질과 상아질의 탈회 및 재광화 사이의 상관관계를 보면, 하나의 시편에서 법랑질에 탈회가 많이 일어난 경우 이 시편의 상아질 역시 탈회가 일어날 가능성이 높은 것으로 나타났으며 재광화 과정도 이와 같은 결과를 보여주었다(Fig. 6). 이는 우식에 대한 저항성이 치아 자체의 성질에 의해서 치관부와 치근부에서 유사한 경향을 나타낼 수 있음을 보여준 것으로 생각된다. 즉 치관부 우식이 적은 환자의 경우 치근 우식의 발생 가능성이 낮을 수 있음을 의미하며, Vehkalahti⁵⁶⁾가 보고한 치근 우식과 치관 우식의 발현빈도 조사에서 서로간에 상관 관계가 있음을 설명할 수 있는 하나의 근거가 될 수 있을 것으로 여겨진다.

AFM은 1992년에 개발된 scanning probe의 일종으로 laser beam과 photo detector sensor가 부착된 microfabricated tip이 기계에 cantilever식으로 고정되어 있는데, 이것이 원자간의 반발력에 따라 시료의 표면을 이동하면서 표면의 형태 및 성질을 분석하는 장치이다. 원하는 측정 영역을 지정하면 probe tip이 시료의 표면에 10^{-8} N의 힘을 가하면서 표면을 laser로 scanning하고 이 결과를 detector가 받아들여 상을 나타내게 된다. 일반적으로 측정할 수 있는 영역의 해상도는 tip의 반지름에 해당하는 크기로 보통 20nm정도이고 수직적으로는 0.1nm까지 측정이 가능하다³⁶⁾. 최근에는 tip에 붙이는 원자를 조절하여 이보다 해상도가 높은 상을 얻는 것도 가능하다.

Arends 등³⁾은 초기 우식 병소의 표면을 SEM을 이용하여 관찰하였는데, 이 경우 시료의 처리과정에서 인공 결손부가 발생할 수 있으며 도말층의 제거를 위한 산처리 과정에서 다공성이 증가할 수 있는 문제점이 있음을 보고하였다. 이들의 연구결과에서는 탈회시킨 군과 대조군간의 결정구조에 큰 차이가 없다고 하였지만 이는 본 실험의 결과와 차이를 보이고 있다. Warshawsky 등⁵⁷⁾은 수산화인회석 결정의 TEM 관찰시 나타나는 중앙부가 천공된 상은 시편의 절단과정 중 절단면이 중앙에 함몰된 부위를 지나가서 얻게되는 결과라고 주장하였다. 하지만 Hayashi 등²¹⁾은 TEM으로 법랑질의 수산화인회석의 결정 구조를 관찰하였고 탈회가 일어난 부위에서 수산화인회석 결정의 종단면에서 중앙부위가 먼저 용해되어 중앙 천공이 일어난 모습을 관찰하여 보고하였다. Holmen 등²⁵⁾은 SEM을 통한 수산화인회석 결정을 관찰하였는데 치아에서 용해된 무기질이 결정으로 재침착되는 것을 관찰할 수는

없었다고 하였다.

이전에는 치아가 탈회되는 경우에 나타나는 미세구조의 변화를 SEM이나 TEM을 이용하여 관찰하였지만, 이러한 방법들은 시편의 물리적, 화학적 처리과정과 diamond-cutting knife를 이용한 절단 과정 등을 거쳐야 하는데 반해, AFM을 이용한 본 실험에서는 시편의 복잡한 처리과정을 거치지 않고도 수산화인회석 입자의 미세구조를 관찰하는 것이 가능하였다. 또한 AFM은 입자의 중앙부위에서 녹는 형태를 3차원적으로 관찰하고 그 깊이를 측정하는 것도 가능하며 Phase기능을 이용할 경우 탈회 및 재광화 과정에서 나타나는 크기가 다른 입자들이 동일한 성분의 입자인지 아닌지에 대한 분석도 간편하게 할 수 있는 기능을 가지고 있다.

본 실험에서는 AFM을 이용하여 법랑질의 정상구조와 탈회구조, 그리고 상아질의 정상구조와 탈회면, 재광화 면을 관찰하였다. 정상적인 수산화인회석 입자의 크기는 다양한 정도를 나타냈는데 법랑질에서는 주로 50-80nm의 입자가 관찰되었고, 상아질에서 50-80nm의 입자이외에 100-200nm 크기의 입자가 관찰되었다. 탈회된 부위에서는 Hayashi 등²¹⁾이 관찰하였던 것과 유사한 형태로 수산화인회석의 결정이 중앙에서 먼저 녹는 것을 관찰할 수 있었다. 탈회가 일어난 부위에서는 탈회정도에 따라 수산화인회석 입자의 경계가 불명확한 경우도 관찰되었으며, 입자 사이의 틈새도 정상구조보다 넓게 관찰되는 것을 알 수 있었다. 탈회가 진행되면 수산화인회석 입자 자체의 용해가 완전히 일어나기 전에 입자 사이에 공간이 생기면서 이온의 이동이 일어나고 이 공간이 우식 표면하층 형성의 통로로 이용된다고 하였던 이전의 주장⁵⁴⁾을 이번의 AFM 관찰에서 증명할 수 있었고, 상아질의 재광화층 관찰 시에는 이 부위에 작은 크기의 결정이 침착되는 것을 볼 수 있었다. 하지만 법랑질 재광화층의 AFM상은 탈회부위와 명확히 구별이 되지 않아 본 실험에서는 관찰결과를 제외하였으며, 이를 구별하여 관찰하는 방법의 개발이 필요한 것으로 사료된다.

표면 관찰을 위해 AFM을 이용할 경우, 이번 실험과 같이 절단면뿐만 아니라 하나의 시료 표면에서 탈회 전·후 및 재광화 처리 후를 비교하는 것이 가능할 것으로 사료된다. 하지만 AFM에서는 매우 고배율로 상을 관찰하므로 동일한 영역을 다시 관찰하는 것이 매우 어려운 점이 있고, 또한 곡면에서는 상이 흐려질

가능성이 높기 때문에 넓은 영역의 관찰 시에는 한계점이 있으므로 이는 앞으로 해결하여야 할 문제로 보인다.

이번 실험에서는 재광화 용액의 포화도만 변화시켰지만 앞으로 pH, 용액의 농도, 불소의 농도를 변화시켜 상아질에 대한 영향에 대해 추가 연구가 필요할 것으로 보이며, 이러한 작업 후에는 재광화 용액의 농도를 하나로 일정하게 하는 것이 아니라 연속적으로 변화시키면서 심층에서 표층으로 재광화가 연속적으로 일어날 수 있는 조건을 찾고 재광화시에 나타나는 수산화인회석 결정이 원래의 형태를 가질 수 있도록 조건을 맞추는 연구가 계속되어야 할 것으로 생각된다.

V. 결 론

본 연구에서는 유기산 완충용액을 이용하여 법랑질과 상아질을 같은 조건에서 탈회시키고, 이 시편을 포화도를 달리한 네 가지 재광화 용액으로 재광화 시켰을 때 나타나는 무기질의 양적 변화와 가장 많은 무기질 침착이 일어나는 부위의 깊이를 microradiograph를 이용하여 비교 분석하였다. 또한 AFM을 이용하여 법랑질과 상아질의 수산화인회석(hydroxyapatite) 결정의 정상 상태, 탈회된 상태, 그리고 재광화가 일어났을 때의 상태를 비교하여 다음의 결과를 얻었다.

1. 법랑질에서는 용액의 포화도가 증가할수록 재광화 양이 증가되는 경향을 보였고, 4군에서는 무기질 침착이 표층에 국한되는 경향을 나타내었다.
2. 상아질에서는 용액의 포화도가 증가할수록 재광화 양이 감소하였으며 무기질이 침착되는 부위가 심층부에 일어나는 경향을 나타내었다. 그러나 4군에서는 무기질의 침착이 표층에 일어나며 그 양이 증가하는 경향을 나타내었다.
3. 탈회 및 재광화 용액으로 처리하였을 때 같은 시편의 법랑질과 상아질에서 나타나는 무기질 양의 변화는 상호간에 유의한 상관 관계를 나타내었다(탈회 $r=0.44$, 재광화 $r=0.44$, $p<0.05$).
4. AFM소견에서 탈회시에는 수산화인회석 입자의 중앙부와 변연부가 용해되

며 입자사이의 간격이 넓어지는 것이 관찰되었다.

5. 상아질의 재광화시에는 원래의 커다란 수산화인회석 입자사이에 작은 수산화인회석 결정이 침착되는 양상을 관찰할 수 있었다.

본 실험의 결과에 의하면 유기산 완충용액의 포화도 조절을 통하여 법랑질과 상아질 모두에서 재광화 양상을 조절하는 것이 가능할 것으로 사료되며, AFM이 법랑질과 상아질의 탈회 및 재광화시 수산화인회석 입자의 변화를 관찰하는데 유용하게 이용될 수 있다고 생각된다.

참 고 문 헌

1. Aamdal-Scheie, A., Luan, W. M., Dahlen, G. and Fejerskov, O.: Plaque pH and microflora of dental plaque on sound and carious root surfaces. *J. Dent. Res.*, 75: 1901-1908, 1996.
2. Arends, J. and Christoffersen, J.: The nature of early caries lesions in enamel. *J. Dent. Res.*, 65: 2-11, 1986.
3. Arends, J., Jongebloed, W., Ogaard, B. and Rolla, G.: SEM and microradiographic investigation of initial enamel caries. *Scand. J. Dent. Res.*, 95: 193-201, 1987.
4. Boskey, A. L., Maresca, M., Doty, S., Sabsay B. and Veis, A.: Concentration-dependent effects of dentin phosphophoryn in the regulation of in vitro hydroxyapatite formation and growth. *Bone and Mineral*, 11: 55-65, 1990.
5. Bowes, D. N. and Dunn, E. J.: A simple vacuum cassette for microradiography. *Stain Technology*, 50: 355-357, 1975.
6. Chow, L. C. and Takagi, S.: Remineralization of root lesions with concentrated calcium and phosphate solutions. *Dent. Mat. J.*, 14: 31-36, 1995.
7. Christensen, G. J.: A new challenge-root caries in mature people. *J. Am. Dent. Assoc.*, 127: 379-380, 1996.
8. Clarkson, B. H., Chang, S. R. and Holland, G. R.: Phosphoprotein analysis of sequential extracts of human dentin and the demineralization of the subsequent remineralization potential of these dentin matrices. *Caries Res.*, 32: 357-364, 1998.
9. Clarkson, B. H., Feagin, F. F., McCurdy, S. P., Sheetz, J. H. and Speirs, R.: Effects of phosphoprotein moieties on the remineralization of human root caries. *Caries Res.*, 25: 166-173, 1991.
10. Clarkson, B. H., Hall, D. L., Heilman, J. R. and Wefel, J. S.: Effect of proteolytic enzymes on caries lesion formation in vitro. *J. Oral Pathol.*, 15: 423-429, 1986.

11. Clarkson, B. H., Krell, D., Wefel, J. S., Crall, J. and Feagin, F. F.: In vitro caries-like lesion produced by *Streptococcus mutans* and *Actinomyces viscosus* using sucrose and starch. J. Dent. Res., 66: 795-798, 1987.
12. Clarkson, B. H., Wefel, J. S. and Miller, I.: A model for producing caries-like lesion in enamel and dentin using oral bacteria in vitro. J. Dent. Res., 63: 1186-1189, 1984.
13. Damen, J. J. M., Buijs, M. J. and Ten Cate J. M.: Fluoride-dependent formation of mineralized layers in bovine dentin during demineralization in vitro. Caries Res., 32: 435-440, 1998.
14. Derand, T., Lodding, A. and Petersson, L. G.: Effect of topical F solutions on caries-like lesions in root surfaces. Caries Res., 23: 135-140, 1989.
15. Dunipace, A. J., Zhang, W., Beiswanger, A. J. and Stookey, G. K.: An in vitro model for studying the efficacy of fluoride dentifrices in preventing root caries. Caries Res., 28: 315-321, 1994.
16. Exterkate, R. A. M., Damen, J. J. M. and Ten Cate, J. M.: A single-section model for enamel de- and remineralization studies. 1. The effects of different Ca/P ratios in remineralization solutions. J. Dent. Res., 72: 1599-1603, 1993.
17. Feagin, F. F. and Graves, C. N.: Evaluation of the effect of F in acidified gelatin gel on root surface lesion development in vitro. Caries Res., 22: 145-149, 1988.
18. Feagin, F. F., Clarkson, B. H. and Wefel, J. S.: Chemical and physical evaluation of dialyzed reconstituted acidified gelatin surface lesions of human enamel. Caries Res., 19: 219-227, 1985.
19. Featherstone, J. D. B.: Diffusion phenomena during artificial carious lesion formation. J. Dent. Res., 56(Spec Iss): D48-52, 1977.
20. Frank, R. M.: Structural events in the caries process in enamel, cementum, and dentin. J. Dent. Res., 69(Spec Iss): 559-566, 1990.
21. Hayashi, Y.: High resolution electron microscopy of enamel crystallites

- demineralized by initial dental caries. *Scanning Microscopy*, 9: 199-206, 1995.
22. Heilman, J. R. and Wefel, J. S.: Effect of remineralization on demineralized root surfaces. *J. Dent. Res.*, 68: 351, abstract 1354, 1989.
 23. Heilman, J. R., Jordan, T. H., Warwick, R. and Wefel, J. S.: Remineralization of root surfaces demineralization in solutions of differing fluoride levels. *Caries Res.*, 31: 423-428, 1997.
 24. Holmen, L., Thylstrup, A., Featherstone, J. D. B., Fredebo, L. and Shariati, M.: A scanning electron microscopic study of surface changes during development of artificial caries. *Caries Res.*, 19: 11-21, 1985.
 25. Holmen, L., Thylstrup, A., Ogaard, B. and Kragh, F.: A scanning electron microscopic study of progressive stages of enamel caries in vivo. *Caries Res.*, 19: 355-367, 1985.
 26. Hoppenbrouwers, P. M. M., Driessens, F. C. M. and Borggreven, J. M. P. M.: The mineral solubility of human tooth roots. *Archs Oral Biol.*, 32: 319-322, 1987.
 27. Hoppenbrouwers, P. M. M., Driessens, F. C. M. and Borggreven, J. M. P. M.: The vulnerability of unexposed human dental roots to demineralization. *J. Dent. Res.*, 65: 955-958, 1986.
 28. Inaba, D., Ruben, J., Takagi, O. and Arends, J.: Effect of sodium hypochlorite treatment on remineralization of human root dentine in vitro. *Caries Res.*, 30: 218-224, 1996.
 29. Inaba, D., Takagi, O. and Arends, J.: A computer-assisted videodensitometric method to visualize mineral distributions in in vitro and in vivo formed root caries lesions. *Eur. J. Oral Sci.*, 105: 74-80, 1997.
 30. Joshi, A., Papas, A. S. and Giunta, J.: Root caries incidence and associated risk factors in middle-aged and older adults. *Gerodontology*, 10: 83-89, 1993
 31. Katz, R. V., Hazen, S. P., Chilton, N. W. and Mumma, R. D. Jr.: Prevalence and intraoral distribution of root caries in an adult population. *Caries Res.*, 16: 265-271, 1982.

32. Kawasaki, K., Ruben, J., Stokroos, I., Takagi, O. and Arends J.: The remineralization of EDTA-treated human dentine. *Caries Res.*, 33: 275-280, 1999.
33. Larsen, M. J.: Chemical events during tooth dissolution. *J. Dent. Res.*, 69(Spec Iss): 575-580, 1990.
34. Margolis, H. C. and Moreno, E. C.: Kinetic and thermodynamic aspects of enamel demineralization. *Caries Res.*, 19: 22-35, 1985.
35. Margolis, H. C., Murphy, B. J. and Moreno, E. C.: Development of caries-like lesions in partially saturated lactate buffers. *Caries Res.*, 19: 36-45, 1985.
36. Marshall, G. W. Jr., Balooch, M., Tench, R. J., Kinney, J. H. and Marshall, S. J.: Atomic force microscopy of acid effects on dentin. *Dent. Mater.*, 9: 265-268, 1993.
37. Mellberg, J. R. and Sanchez, M.: Remineralization by a monofluorophosphate dentifrice in vitro of root dentin softened by artificial caries. *J. Dent. Res.*, 65: 959-962, 1986.
38. Moreno, E. C. and Zahradnik, R. T.: Chemistry of enamel subsurface demineralization in vitro. *J. Dent. Res.*, 53: 226-235, 1974.
39. Nyvad, B., Ten Cate, J. M. and Fejerskov, O.: Microradiography of experimental root surface caries in man. *Caries Res.*, 23: 218-224, 1989.
40. Ogaard, B., Rolla, G. and Arends, J.: In vivo progress of enamel and root surface lesions under plaque as a function of time. *Caries Res.*, 22: 302-305, 1988.
41. Schwartz, R. S., Summitt, J. B. and Robbins, J. L.: *Fundamentals of operative dentistry*. Chicago: Quintessence books, pp. 31-32, 1996.
42. Schüpbach, P., Guggenheim, B. and Lutz, F.: Histopathology of root surface caries. *J. Dent. Res.*, 69: 1195-1204, 1990.
43. Schüpbach, P., Guggenheim, B. and Lutz, F.: Human root caries: histopathology of advanced lesions. *Caries Res.*, 24: 145-158, 1990.
44. Schüpbach, P., Guggenheim, B. and Lutz, F.: Human root caries: histopathology

- of initial lesions in cementum and dentin. *J. Oral Pathol. Med.*, 18: 146-156, 1989.
45. Schüpbach, P., Lutz, F. and Guggenheim, B.: Human root caries: Histopathology of arrested lesions. *Caries Res.*, 26: 153-164, 1992.
 46. Shay, K.: Root caries in the older patient. *Dent. Clin. North Am.* 41: 763-793, 1997.
 47. Silverstone, L. M., Johnson, N. W., Hardie, J. M. and Williams, R. A. D.: Dental caries, aetiology, pathology and prevention. Hong Kong: the MacMillan Press, pp. 176-177, 1981.
 48. Silverstone, L. M.: Observations on the dark zone in early enamel caries and artificial caries-like lesions. *Caries Res.*, 1: 261-274, 1967.
 49. Sturdevant C. M., Roberson T. M., Heymann H. O. and Sturdevant J. R. The art and science of operative dentistry. 3rd Ed. St. Louis: Mosby, pp. 60-128, 1995.
 50. Ten Cate, J. M., Damen J. J. M. and Buijs, M. J.: Inhibition of dentin demineralization by fluoride in vitro. *Caries Res.*, 32: 141-147, 1998.
 51. Ten Cate, J. M., Nyvad, B., Van de Plassche-Simons, Y. M. and Fejerskov, O.: A quantitative analysis of mineral loss and shrinkage of in vitro demineralized human root surface. *J. Dent. Res.*, 70: 1371-1374, 1991.
 52. Ten Cate, J. M.: In vitro studies on the effects of fluoride on de- and remineralization. *J. Dent. Res.*, 69(Spec Iss): 614-619, 1990.
 53. Theuns, H. M., Van Dijk, J. W. E., Driessens, F. C. M. and Groeneveld, A.: Effect of the pH of buffer solutions on artificial carious lesion formation in human tooth enamel. *Caries Res.*, 18: 7-11, 1984.
 54. Theuns, H. M., van Dijk, J. W. E., Driessens, F. C. M. and Groeneveld, A.: Effect of time and degree of saturation of buffer solutions on artificial carious lesion formation in human tooth enamel. *Caries Res.*, 17: 503-512, 1983.
 55. Theuns, H. M., Van Dijk, J. W. E., Driessens, F. C. M. and Groeneveld, A.:

- Effect of time, degree of saturation, pH and acid concentration of buffer solutions on the rate of in-vitro demineralization of human enamel. *Archs Oral Biol.*, 30: 37-42, 1985.
56. Vehkalahti, M. M.: Relationship between root caries and coronal decay. *J. Dent. Res.*, 66: 1608-1610, 1987.
 57. Warshawsky, H. and Nancy, A.: Stereo electron microscopy of enamel crystallites. *J. Dent. Res.*, 61:1504-1514, 1982.
 58. Wefel, J. S., Clarkson, B. H. and Heilman, J. R.: Natural root caries: a histologic and microradiographic evaluation. *J. Oral Pathol.*, 14: 615-623, 1985.
 59. Wefel, J. S., Heilman, J. R. and Jordan, T. H.: Comparisons of in vitro root caries models. *Caries Res.*, 29: 204-209, 1995.
 60. 금기연과 이찬영: 수종의 유기산이 법랑질 인공우식의 형성에 미치는 영향. *대한치과보존학회지*, 21: 470-488, 1996.
 61. 김민경, 금기연과 이찬영: 법랑질 인공우식의 재광화에 미치는 pH의 영향에 관한 연구. *대한치과보존학회지*, 22: 193-208, 1997.
 62. 김종배와 최유진: *공중구강 보건학*. 2판. 서울: 고문사, pp. 43-52, 1991.
 63. 박성호, 이찬영과 이정석: 유산완충액을 이용한 인공치아우식의 형성에 미치는 산의 농도와 pH에 관한 연구. *대한치과보존학회지*, 18: 277-290, 1993.
 64. 오현석, 금기연, 노병덕과 이찬영: 산 완충용액의 pH가 인공치근우식의 형성에 미치는 영향. *대한치과보존학회지*, 24: 495-502, 1999.
 65. 이찬영: 산 완충용액을 이용한 인공치아우식 형성. *연세치대논문집*, 7: 34-41, 1992.
 66. 임유경, 허복과 이희주: 젖산의 농도와 pH가 인공 치근 우식 병소의 형성에 미치는 영향. *대한치과보존학회지*, 22: 637-647, 1997.
 67. 한원섭, 금기연과 이찬영: 인공치아우식의 재광화에 미치는 불소의 영향. *대한치과보존학회지*, 21: 161-173, 1996.

Abstract

The effects of the degree of saturation of acidulated buffer solutions in enamel and dentin remineralization and AFM observation of hydroxyapatite crystals

Jeong-Won Park, D.D.S., M.S.D.

Department of Dentistry, The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Chan Young Lee, D.D.S., M.S.D., Ph.D.)

Dental caries is the most common disease in the maxillofacial area. There are many factors contributing to its development, but complete understanding and prevention is not fully known.

Since the structure of the coronal and root portion of the tooth is different, the remineralization and demineralization process is also known to be different. In this study, by using a partially saturated buffer solution, we created artificial enamel and dentin caries and evaluated mineral loss. A remineralization solution with four different degrees of saturation (degree of saturation ; group 1, 0.268, group 2, 0.309, group 3, 0.339, group 4, 0.390, PH 4.3, F 2ppm) was used on a demineralized specimen. The mineral precipitating quantity and depth was evaluated by using microradiography.

Using an atomic force microscope(AFM), hydroxyapatite crystals of normal, demineralized, and remineralized enamel and dentin were evaluated.

The results were as follows:

1. As the degree of saturation of the remineralizing solution increased, the mineral precipitation in the enamel was increased. In group 4, mineral precipitation was limited near the surface.

2. As the degree of saturation of the remineralizing solution increased, the mineral precipitation in the dentin was decreased and it occurred in a deeper portion. In group 4, however, mineral precipitation occurred on the surface and its quantity increased.
3. There was a statistically significant interaction between enamel and dentin mineral content changes on specimens treated with remineralization and demineralization solution (demineralization $r=0.44$, remineralization $r=0.44$, $p<0.05$).
4. Demineralized hydroxyapatite crystals showed central and peripheral dissolving and widening of intercrystal spaces under the AFM.
5. In dentin remineralization small crystal precipitation occurred between the large crystals.

We conclude that by adjusting acidulated buffer solution's degree of saturation, we can control enamel and dentin remineralization. In addition, the AFM is highly useful in evaluating changes in remineralized and demineralized hydroxyapatite crystals.

Key words : dental caries, root caries, demineralization, remineralization, degree of saturation, AFM(atomic force microscope), hydroxyapatite