

유산완충용액 내의 불소농도에 따른
법랑질 인공치아우식 형성과
수산화인회석 결정 형태의 변화

연세대학교 대학원

치 의 학 과

한 구 용

유산완충용액 내의 불소농도에 따른
법랑질 인공치아우식 형성과
수산화인회석 결정 형태의 변화

지도 이 찬 영 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2011년 1월 일

연세대학교 대학원

치 의 학 과

한 구 용

한구용의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2011년 1월 일

감사의 글

미약한 논문이지만, 이 논문의 완성까지 여러분의 도움이 있었고 그 과정에서 저는 많은 것을 느끼고 배웠습니다. 부족하지만 소중한 결실을 맺게 되어 한 없이 기쁘고 감사할 따름입니다.

먼저 본 논문이 완성되기까지 지도와 격려를 아끼지 않으신 이찬영 교수님께 무한한 감사를 드립니다. 바쁘신 중에도 본 논문 심사에 심혈을 기울여 고쳐주시고 좋은 가르침을 주신 배광식 교수님, 서정택 교수님, 정일영 교수님, 박정원 교수님께 감사를 드리며, 대학원 과정 동안 많은 격려와 조언을 해주신 이승중 교수님, 노병덕 교수님, 박성호 교수님, 김의성 교수님께 감사를 드립니다.

또한 본 연구를 위하여 투과전자현미경 시편제작 기술을 가르쳐주시고 장비의 사용을 허락해주신 연세대학교 공과대학 신소재공학과 의 이경천 선생님, 김선욱 선생님, 이규민 선생님, 반도체연구실 연구원 여러분께 진심으로 감사 드립니다.

연구가 진행되는 동안 힘든 일을 맡아 항상 적극적인 도움을 주신 신한열 선생님, 보존과 의국원 여러분에게도 다시 한번 감사 드립니다.

항상 자식의 건강을 걱정해주시고, 희생으로 돌봐주신 어머니, 장인어른, 장모님께 머리 숙여 감사 드립니다. 옆에서 격려의 말을 아끼지 않았던 동생 선영, 처제 은선 처남 태영에게도 감사의 말을 전합니다. 힘들고 지칠 때 보살펴주고 큰 힘이 되어준 아내와 논문을 쓴다고 소홀했던 태동, 태운에게 미안함을 전하며, 이 기쁨을 함께 나누고 싶습니다. 마지막으로, 살아계셨다면 누구보다도 기뻐하셨을 아버지께 이 논문을 드리고 싶습니다.

2010년 12월

한 구 용

목 차

그림 차례.....	ii
표 차례.....	iii
국문 요약.....	iv
제 1 장 서론.....	1
제 2 장 재료 및 방법.....	4
2.1 법랑질 시편 제작.....	4
2.2 실험용액의 제조.....	4
2.2.1 Stock 용액의 제조.....	4
2.2.2 탈회완충용액의 제조.....	5
2.3 법랑질 인공우식의 형성 및 편광현미경 관찰.....	6
2.4 편광현미경 실험 자료의 분석 및 통계처리.....	6
2.5 투과전자현미경 시편 제작 및 관찰.....	6
제 3 장 결과.....	8
3.1 편광현미경 관찰 소견.....	8
3.1.1 불소농도에 따른 법랑질 우식 병소 형성 관찰.....	8
3.2 투과전자현미경 관찰 소견.....	10
3.2.1 정상 법랑질의 투과전자현미경 소견.....	10
3.2.2 유산완충용액에서 법랑질 결정 형태의 변화.....	12
3.2.3 파괴된 결정의 재광화 양상.....	19
3.2.4 불소농도에 따른 법랑질 결정 형태의 변화.....	21
3.2.5 STEM 분석.....	29
제 4 장 고찰.....	31
제 5 장 결론.....	44
참고 문헌.....	45
영문 요약.....	50

그림 차례

Fig. 1. Comparison of demineralization depth of enamel by fluoride ion concentration after application of acid buffer solution.....	9
Fig. 2. Transmission electron microscopic view of normal enamel hydroxyapatite crystals.....	11
Fig. 3. Unaffected hydroxyapatite single crystal	13
Fig. 4. Longitudinal view of destruction of enamel hydroxyapatite crystal.....	13
Fig. 5. Cross sectional view of destruction of enamel hydroxyapatite crystal ...	14
Fig. 6. Transmission electron microscopic view of enamel hydroxyapatite crystal destruction	15
Fig. 7. Transmission electron microscopic view of enamel hydroxyapatite crystal destruction	16
Fig. 8. Transmission electron microscopic view of enamel hydroxyapatite crystal destruction	17
Fig. 9. Transmission electron microscopic view of enamel hydroxyapatite crystal destruction	18
Fig. 10. Remineralization of destructed hydroxyapatite crystals.....	20
Fig. 11. Transmission electron microscopic view of enamel hydroxyapatite crystals treated with acid buffer solutions with different fluoride ion concentration and application time	22
Fig. 12. The effect of fluoride ion on the shape of hydroxyapatite crystals	25
Fig. 13. The effect of fluoride ion on the shape of hydroxyapatite crystals	26
Fig. 14. Mineral deposition on the surface of hydroxyapatite crystals.....	28
Fig. 15. STEM mapping image of chemical elements (Ca, P, F) in hydroxyapatite crystals.....	30

표 차 례

Table 1. Initial composition of demineralization solution..... 5

국문요약

유산완충용액 내의 불소농도에 따른 법랑질 인공치아우식 형성과 수산화인회석 결정 형태의 변화

초기 법랑질 우식 병소는 표층은 비교적 건전하고 하부의 병소 본체에서 탈회와 재광화가 역동적으로 일어나는 과정이다. 불소는 여러 가지 다양한 기전을 통하여 치아의 탈회를 지연시키고 우식의 재광화를 촉진하여 초기 우식 병소의 치유에 기여한다고 알려져 있다. 초기 우식 병소의 치유를 위해서는 그 병소의 형성과정을 정확하게 이해하고 불소의 정확한 작용기전을 밝히는 것이 중요하며, 특히 법랑질의 단위체인 수산화인회석의 용해과정과 수산화인회석에 대한 불소의 영향을 이해하는 것이 중요하다.

본 연구는 불소이온농도를 각각 0, 1, 5, 10 ppm 으로 달리 한 4 가지의 탈회 완충 용액을 이용하여 법랑질 시편을 탈회시키고 탈회된 법랑질 시편을 편광현미경과 디지털 카메라로 촬영한 후에 ImageJ 컴퓨터 프로그램을 통해 정량적으로 깊이를 측정하여 인공우식형성의 특징을 정량적으로 분석하였다. 그리고 탈회 완충 용액 내의 불소이온농도를 0 ppm 과 10 ppm 으로 달리하여 법랑질 시편을 탈회시킨 후, 인공우식부위만을 제거하여 법랑질 분말 시편을 제작하였다. 이를 고해상도 투과전자현미경으로 관찰한 후, 법랑질 수산화인회석 결정의 변화를 정성적으로 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 편광현미경으로 관찰하였을 때, 유산완충용액내의 불소이온농도가 1ppm에서 10ppm으로 증가할 수록 인공우식병소의 탈회 깊이는 감소하였다 ($p < 0.05$).
2. 유산완충용액으로 인공우식이 형성된 수산화인회석 결정을 투과전자현미경으로 관찰하였을 때, 결정 외벽의 용해가 먼저 일어나 내부파괴를 유발하며, 일단 내부용해가 시작되면 내부가 외부보다 빠른 속도로 진행되어 내부가 비어있는 튜브(hollow tube) 형태가 되는 것이 관찰되었다.
3. 투과전자현미경으로 관찰하였을 때, 수산화인회석 결정이 용해되는 현상이 주로

관찰되지만, 무기질이 새로 침착 되고 용해된 부위가 무기질로 회복되는 재광화 현상도 관찰되었다.

4. 투과전자현미경으로 관찰하였을 때, 불소를 적용한 군에서 수산화인회석 결정이 더 느린 속도로 용해가 일어나는 경향을 보였고, 결정의 크기가 더 크고 더 둥근 형태를 보였다.

이상의 결과로부터, 불소가 수산화인회석 결정 표면에 무기질 침착을 증가시켜, 탈회의 진행속도를 늦추는 효과가 있음을 확인하였고, 탈회시 수산화인회석 결정은 외부파괴가 먼저 일어나 내부파괴를 유발하고, 일단 내부파괴가 시작되면, 내부가 외부보다 더 빠른 속도로 일어남을 관찰하였다.

유산완충용액 내의 불소농도에 따른 법랑질 인공치아우식 형성과 수산화인회석 결정 형태의 변화

연세대학교 대학원 치의학과

(지도 이찬영 교수)

한 구 용

제 1 장 서론

치아우식증은 대부분의 사람들에게 나타나는 만성, 혹은 급성으로 진행되는 치아 조직의 국소적인 파괴를 의미한다. 이것은 무기질 용해와 유기질 파괴로 치아 손상을 일으키는 만성질환으로서 치명적인 질병은 아니지만 동통과 저작불능 등의 불편과 함께 경제적 손실을 준다. 이러한 파괴는 초미세구조(ultrastructure)적 파괴에서부터 치아의 전체적인 소실까지 광범위하게 나타난다.

초기 우식이 시작되는 법랑질은 고도로 광화된 조직으로 96%의 무기질, 1%의 유기질, 4%의 수분으로 구성되어 있다. 치아의 무기질은 주로 수산화인회석(hydroxyapatite) 결정으로 이루어져 있는데, 우식이 발생할 경우 이 입자의 변화가 나타나게 된다. 칼슘과 인을 주성분으로 하는 무기질은 수산화인회석, DCPD(dicalcium phosphate dihydrate), TCP(tricalcium phosphate), OCP(octacalcium phosphate) 등 여러 가지 형태의 복합체로 형성될 수 있는데 이중 가장 안정되고 산에 대해 저항성이 큰 것이 수산화인회석 형태이다. 수산화인회석 결정은 c - axis 의 횡단면 중앙 부위에 검은 선(CDL, central dark line)을 가지면서 늘어진 육각형의 외형을 가진다. 8.17 Å 간격으로 존재하는 격자 무늬의 세 세트가 60° 각도로 서로 교차함으로써 $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ 로 구성된 수산화인회석 결정은 마름모 형태로 쌓이는 구조를 가진다. 원자 수준에서 수산화인회석 결정의 구조는 calcium triangle channel 안에

OH^- 가 위치하고, 이 때문에 이들 channel 은 OH^- , F^- , Cl^- , HCO_3^{3-} 가 쉽게 확산할 수 있는 통로를 제공한다. 우식이 발생할 경우 칼슘과 인의 결합이 깨어지게 되어 입자의 변화가 나타나게 되는데, Holmen 등은 인공우식 초기에 수산화인회석 결정에 부분적인 용해가 일어나고 그 결과 입자 사이의 공간이 증가하며 이 공간을 통해 무기질 이온이 이동할 수 있다고 보고하였다 (Holmen et al., 1985).

차아 우식의 진행에 대한 정확한 기전을 이해하기 위해서는 법랑질의 초미세구조인 수산화인회석의 구조를 관찰하는 것이 필수적이다. 수산화인회석 결정을 관찰할 수 있는 방법 중에 대표적인 것은 전자현미경을 이용하는 것이며 시편 제조의 용이성으로 인해 주사전자현미경을 많이 이용하고 있다. 그러나, 주사전자현미경은 수산화인회석 결정의 대략적인 형태를 확인 할 수 있고, 결정 간의 관계를 관찰하는데 용이하나, 시편 제조를 위한 코팅의 과정과 확대율, 그리고 해상도의 한계로 인해 결정의 미세 구조를 관찰하는 데에는 적절하지 않다. 투과전자현미경의 경우 결정 내부 구조를 관찰할 수 있고, 결정 형태를 주사전자현미경에 비해 더 정확히 관찰할 수 있는 장점이 있다.

초기 우식 상태의 혹은 인공적으로 산 처리된 법랑질 수산화인회석을 투과전자현미경으로 관찰하였을 때, 수산화인회석 결정의 중앙부가 특징적으로 파괴되는 중앙부 천공(central perforation)은 여러 학자들이 관찰한 잘 알려진 소견이다. Voegel 등은 수산화인회석 결정의 중앙부가 c - axis 를 따라 먼저 용해가 일어난 후에 결정 측면부의 파괴가 일어난다고 하였다 (Voegel and Frank, 1977). 그러나 Hayashi 등은 고해상도 투과전자현미경을 이용한 연구에서 우식 발생 시 입자의 변연부가 소실되고 동시에 수산화인회석 입자의 중앙에서 용해가 일어나 중앙부천공이 일어나게 된다고 주장하였다 (Hayashi, 1995). 또한 Tohda 등은 투과전자현미경을 이용한 연구에서 진행된 법랑질 우식에서 예상과는 달리 수산화인회석 결정의 중심부가 용해되는 양상이 명확하게 나타나지 않았다고 보고하였다 (Tohda et al., 1996). 이처럼 수산화인회석 결정의 파괴 양상에 대해서 비슷한 소견을 관찰하였지만, 연구자에 따라 서로 다른 해석을 내리고 있다. 이는 기존의 연구들이 ultramicrotomy 법을 이용하였기 때문에 결정의 a - axis 와 b - axis 를 나타내는 결정의 절단면만을 관찰한 후 결정의 파괴 양상을 추측하였을 뿐, 결정의 길이 방향인 c - axis 에 따른 3 차원적인 모습을 관찰할 수 없었기 때문이다.

초기 우식 상태의 혹은 인공적으로 산 처리된 법랑질을 탈회시키지 않은 상태로 투과전자현미경 시편 제작이 기술적으로 쉽지 않기 때문에 이에 대한 보고가 많지 않으며, 많은 연구가들의 지속적인 노력에도 불구하고 아직까지 확립된 이론이 없어 연구자에 따라 서로 다른 가설을 주장하였다. 게다가 국내에서는 치아경조직에 대한 투과전자현미경 시편제작에 대한 기술 부족으로 법랑질 인공우식에 대한 투과전자현미경적 연구는 거의 시도되지 않고 있는 실정이다.

Dean 등이 불소의 항우식 효과를 관찰한 이후 (Dean, 1947), 많은 연구가들이 불소를 이용하여 재광화를 촉진하기 위하여 노력하였으며 이러한 지속적인 노력을 통하여 불소가 치아의 탈회율을 감소시키고 재광화율을 증가시킨다는 사실을 확인하였다. 불소의 우식 저항 효과는 보통 2 가지 기전으로 설명된다. 재광화를 통해 법랑질 우식 병소의 회복속도를 증가시키거나 (ten Cate and Arends, 1980), 이차적 산 공격에 재광화된 부위의 저항성을 증가시키는 것이다 (Koulourides, 1982; ten Cate and Duijsters, 1982). 불소가 재광화를 증진시키는 것은 이미 여러 연구에서 정립되었으나 최근 몇몇 연구에서 이차적 산 저항이 훨씬 중요하다고 보고되었다. Ten Cate 와 Duijsters 는 in vitro pH 순환 모델을 이용하여 불소가 탈회속도를 감소시키는 작용이 재광화 속도 증가 효과보다 좀 더 초기에 더 많은 효과를 보인다고 하였다 (ten Cate and Duijsters, 1982). 재광화 속도의 증가는 탈회와 재광화에 관련된 확산과정을 복잡하게 하는 불소화된 광물질이 표면 세공에 침착하기 때문이다. Koulourides 는 불소에 의해 이후의 산공격에 면역을 가진 부분을 만들게 된다고 하였으며, 연구 결과 불소에 의해 구강 내 환경에서 광물질 침착은 증가하고 광물질 소실은 감소하게 된다고 하였다 (Koulourides, 1982). 이처럼 불소의 우식 저항 효과에 대한 대략적인 기전은 널리 알려져 있으나 법랑질 미세 구조의 단위체인 수산화인회석 결정에 대해서 불소가 어떤 작용을 하는 지에 대한 연구는 부족한 실정이다.

이에 본 연구에서는 투과전자현미경을 이용하여 인공 치아 우식 형성 시에 법랑질의 수산화인회석 결정의 용해 양상을 관찰하고, 불소가 수산화인회석 미세 결정 구조에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다.

제 2 장 재료 및 방법

2.1 법랑질 시편 제작

우식이 없고 탈회되지 않은 발거된 지 1 달 이내의 건전한 제 3 대구치를 선택하여 치면에 부착된 연조직과 치석을 periodontal curette 으로 제거하고 불소가 포함되지 않은 연마제로 치면을 연마 후 초음파 세척기로 10 분간 세정하고 증류수로 세척, 건조하였다.

10 ml 시린지를 이용하여 높이 1 cm, 직경 1 cm 의 tube 를 제작하고 여기에 치과용 아크릴 레진을 이용하여 치근 부위만 매몰하였다. 경화 후 저속 diamond wheel saw(Minitom, Struers, Copenhagen, Denmark)를 이용하여 치아 장축에 평행하게 협설 방향으로 0.9 - 1.0 mm 의 절편을 만든 다음 #800, #1200 사포(Deer abrasive, 고려연마, 인천, 한국)를 이용하여 150 - 200 μm 의 두께로 연마하였다. 연마 후 초음파세척기로 10 분간 세정한 후 협설 측의 손상이나 균열이 없는 법랑질 부위 중 약 2 - 3 mm 정도의 window 를 제외하고 bonding agent(Scotchbond MP, 3M ESPE, St. Paul, U.S.A)와 nail varnish 를 도포하였다. 1 군당 16 개의 시편이 되도록 하여 총 64 개의 시편을 준비하였다. 동일한 방법으로 10 개의 시편을 더 제작하여 투과전자현미경 관찰을 위한 시편을 준비하였다.

2.2 실험용액의 제조

2.2.1 Stock 용액의 제조

30% 유산용액(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, U.S.A., 분자량 90.09, 밀도 1.080)을 이용하여 1 M 의 유산용액을 제조, 적정하여 0.978 M 을 얻어서 이를 stock solution 으로 사용하였다. 염화칼슘(CaCl_2) 분말(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, U.S.A., 분자량 147)을 이용하여 0.1 M 의 용액을 제조하여 Ion chromatography(790 Personal Ion Chromatography, Metrohm AG, Herisau, Switzerland)로 정량 분석한 결과 0.118 M 을 얻었고, 인산칼륨(KH_2PO_4)

분말 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, U.S.A. 분자량 136.1)을 이용하여 0.1 M 의 용액을 제조하여 정량분석 결과 0.083 M 을 얻어서 이를 stock solution 으로 사용하였다.

2.2.2 탈회완충용액의 제조

Stock 용액으로부터 계산된 양을 취하고, 3.08 mM sodium azide (NaN_3)를 첨가한 다음, pH meter (Model 920A, Orion Research Inc., Beverly, U.S.A.) 계측 하에 8 N 수산화칼륨 표준용액을 첨가하여 pH 4.3 이 되도록 조절하였고 0, 1, 5, 10 ppm 의 불소농도에 따라 4 가지의 탈회용액을 제조하였다. 위 용액을 Ion chromatography 로 각 이온의 농도를 다시 정량 분석하여 Table 1 의 농도를 얻었고, 이를 시편의 탈회 용액으로 사용하였다.

Table 1. Initial composition of demineralization solution

Composition	Concentration			
	group 1	group 2	group 3	group 4
Lactic acid (mM)	100	100	100	100
Calcium (mM)	14.76	15.18	15.39	14.99
Phosphate (mM)	7.46	7.21	7.36	7.42
Sodium azide (mM)	3.08	3.08	3.08	3.08
Fluoride ion (ppm)	0	0.981	5.05	9.77
pH	4.3	4.3	4.3	4.3

2.3 법랑질 인공우식의 형성 및 편광현미경 관찰

50 ml 플라스틱 통에 탈회완충용액 30 ml 를 채우고 시편을 통의 중앙에 위치하도록 설치한 후, 섭씨 25° C 항온조에 24 시간, 48 시간, 72 시간을 반응시켰다. 시편은 편광현미경(I221, 동원정밀광학, 서울, 한국)하에서 증류수에 침윤시켜 40 배와 100 배의 배율로 디지털 카메라(Coolpix 950, Nikon corporation, Tokyo, Japan)로 0 시간, 24 시간, 48 시간, 72 시간 후 사진 촬영하였다.

2.4 편광현미경 실험 자료의 분석 및 통계처리

편광현미경을 이용하여 시편을 100 배로 관찰하고, 현미경에 연결된 디지털 카메라로 촬영한 후, 전체 탈회 깊이의 평가를 위해 ImageJ software(National Institutes of Health, Bethesda, U.S.A.)를 이용하였고, 병소에 수직 5 등분 선을 선택하여 표면에서 양성 복굴절 끝까지 수직 길이를 측정하였다. Stage micrometer (Stage micrometer, Westmont, U.S.A.)를 광학현미경하에 100 배로 촬영한 후 ImageJ software 에서 그 길이를 환산하여 탈회 깊이를 결정하였다. 위의 결과를 바탕으로 불소농도에 따른 군간의 전체 탈회 깊이 비교를 위해 Medcalc Statistical Software(Medcalc software, Mariakerke, Belgium)를 통해 통계 처리하였다. 통계처리는 Levene' s test 를 시행하여 표본의 등분산성을 확인하였고, 24 시간, 48 시간, 72 시간의 시간대에 따라 각군의 차이를 One way ANOVA 로 검정하고, 0.05 유의수준에서 Student-Newman-Keuls test 를 수행하여 사후 검정하였다.

2.5 투과전자현미경 시편 제작 및 관찰

10 개의 시편을 2 개의 군으로 나누어 각각 탈회완충용액 중에서 불소 0 ppm 군과 10 ppm 군에 반응시켰다. 투과전자현미경을 위해 준비된 시편을 50 ml 플라스틱 통에 탈회완충용액 30 ml 를 채우고 시편을 통의 중앙에 위치하도록 설치한 후, 섭씨 25° C 항온조에 각각 2 시간, 4 시간, 8 시간, 24 시간 동안 적용시킨 후 꺼내어 24 시간 동안 증류수에 보관하였다. 이렇게 만들어진 시편을 #1200 사포를

이용하여 내산성 바니쉬층을 제거하고 100 - 150 μm 두께로 연마하였다. 연마한 절편을 증류수로 10 분간 세정한 후, Dimple Grinder(Model 656, Gatan Inc, Pleasanton, U.S.A.)를 이용하여 50 - 100 μm 두께의 시편이 되도록 기계적 연마를 하였다.

연마된 시편을 편광현미경 하에서 인공우식의 병소 본체를 확인 한 후, 실체현미경으로 시편을 보면서 양날 면도날을 이용하여 한 두 방울의 증류수를 떨어뜨린 슬라이드 글라스 위에 우식 부위 만을 제거한 후, 미세한 분말 입자가 되도록 잘게 파쇄하였다. 증류수 내에서 법랑질 분말을 분산시킨 후, 폼바/탄소지지 메쉬 그리드(Formvar Carbon Film on 400 Square Mesh Copper Grid, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, U.S.A.)로 법랑질 분말을 건져 올린 후 여과지에서 건조시켰다 (이정용, 2000). 건조된 시편을 고해상도 투과전자현미경(JEM 2100F, JEOL Ltd., Tokyo, Japan)으로 200 kV 의 가속전압에서, x10,000 ~ x300,000 의 배율로 관찰하였다. JEM 2100F 에 설치된 STEM(scanning transmission electron microscopy) unit 을 이용하여 결정을 구성하는 원소의 정성분석을 위하여 칼슘, 인, 불소의 세 원소에 대하여 STEM 분석을 시행하였다.

제 3 장 결과

3.1 편광현미경의 관찰 소견

3.1.1 불소농도에 따른 법랑질 우식 병소 형성 관찰

이번 실험에서는 불소 농도를 0, 1, 5, 10 ppm 으로 달리하고 탈회 용액 적용 시간을 24 시간, 48 시간, 72 시간으로 하여 탈회 깊이를 측정하고 탈회 양상을 관찰하였다.

탈회 시간이 증가함에 따라 건전 표층이 소실되어 그 연속성이 상실되거나, 표층 하 탈회부의 양성 복굴절 밴드의 두께가 두꺼운 경우 건전표층이 명확하게 나타나지 않는 경우가 많았다. 탈회 시간이 증가함에 따라 황갈색의 양성 복굴절 밴드가 더 두꺼워졌고, 이는 탈회 깊이가 더 증가함을 의미하였다.

불소 농도가 1 ppm 에서 10 ppm 으로 증가함에 따라서 우식 병소의 깊이가 감소되는 양상을 보였다 (Fig. 1). 불소 농도가 가장 높은 10 ppm 의 경우 병소의 활발한 재광화를 의미하는 isotropic zone 이 관찰되는 빈도가 다른 불소농도에 비해서 높았다. 46 개의 10 ppm 적용 시편 중에서 20 개의 시편에서 isotropic zone 이 관찰되었다. 불소의 농도가 낮을수록 건전 표층의 소실이 빨리 일어나고 소실의 양도 증가하는 경향을 보였다. 불소농도에 따른 탈회 깊이의 측정값을 통계 처리를 하였을 때, 다음과 같은 결과를 보였다 (Fig. 1).

24 시간을 탈회시킨 경우 불소농도 0 ppm, 1 ppm 과 5 ppm, 10 ppm 사이에는 유의한 차이가 있었고 ($p < 0.05$), 0 ppm 과 1 ppm 사이 그리고 5 ppm 과 10 ppm 사이에는 유의한 차이가 없었다.

48 시간을 탈회시킨 경우 불소농도 0 ppm 과 1 ppm 사이에서는 유의한 차이가 없었지만, 다른 모든 관계에 있어서는 유의한 차이가 있었다 ($p < 0.05$).

72 시간을 탈회시킨 경우 불소농도 1 ppm 과 5 ppm 사이에서는 유의한 차이가 없었지만, 다른 모든 관계에 있어서는 유의한 차이가 있었다 ($p < 0.05$).

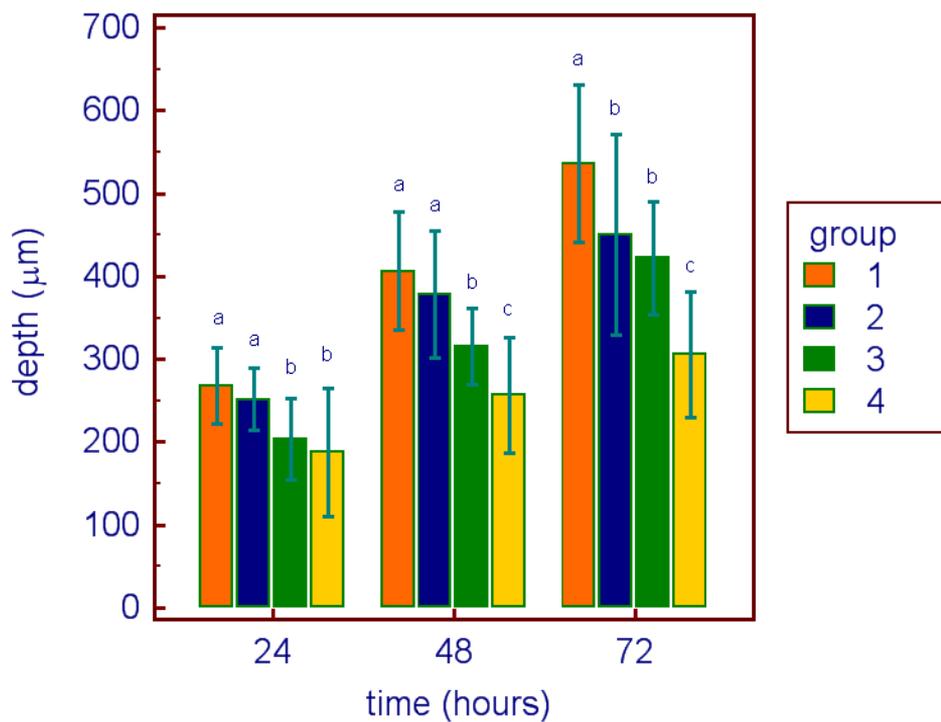


Fig. 1. Comparison of demineralization depth of enamel by fluoride ion concentration after application of acid buffer solution. Each point and bar represented the mean \pm SD. Different letters (a, b, c) represent statistically significant differences between fluoride ion concentration groups in the same demineralized time group ($p < 0.05$).

3.2 투과전자현미경 관찰 소견

3.2.1 정상 범랑질의 투과전자현미경 소견

본 실험의 정상 범랑질 시편에서는 대부분 longitudinal 한 방향으로 section 된 수산화인회석 결정이 관찰되었고, 결정들은 서로 밀집되고 중첩된 양상으로 배열되어 있고 경계가 정확히 보이지 않으며 같은 방향으로 배열되어 있음을 관찰할 수 있었다. longitudinal 한 방향으로 밀집되어 주행하는 사이사이로 배열을 달리 주행하는 crosscut 된 단면이 보이는 결정들이 관찰되었다. 이들의 단면 모양은 육각형이나 긴 육각형 형태를 가지고 있었다. 정상 범랑질 수산화인회석 단결정의 크기는 폭이 20 - 25 nm이었고 그 길이는 횡단된 각도에 따라 다양하게 나타났고 결정의 말단을 알 수 없기 때문에 측정을 할 수 없는 것으로 볼 때, 매우 긴 형태의 구조로 추측되었다. 다른 연구에서 관찰되었던 중앙부 검은 선은 이번 실험의 정상 범랑질 시편에서는 관찰되지 않았다 (Fig. 2).

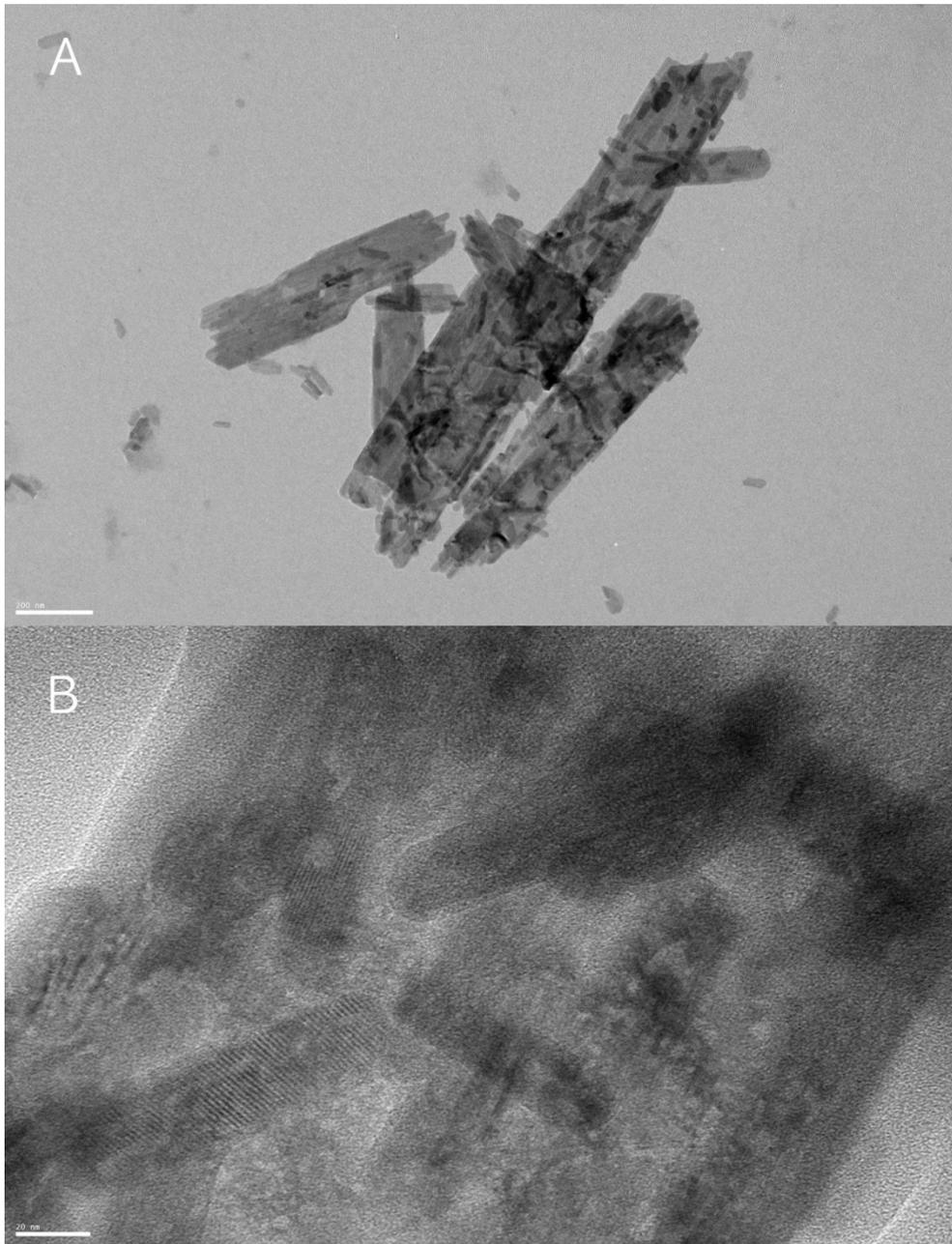


Fig. 2. Transmission electron microscopic view of normal enamel hydroxyapatite crystals.

A: x10,000 view (scale bar = 200 nm) B: x100,000 view (scale bar = 20 nm)

3.2.2 유산완충용액에서 법랑질 결정 형태의 변화

법랑질을 유산완충용액에 처리한 시편의 경우 모두 수산화인회석의 용해가 일어났으며 수산화인회석 결정 구조의 용해가 일어남으로 해서 밀집되어있던 결정 사이에 공간이 형성되는 것을 관찰 할 수 있었다 (Fig. 6). 수산화인회석 결정들은 일직선의 정상형태에서 결정 내부가 파괴되어 빈 공간을 형성하는 hollow tube 의 형태가 되었다. 대부분의 결정들이 내부가 비어있으면서 간헐적으로 외벽이 파괴되어있는 것을 관찰할 수 있었다. 이를 통해 외벽의 파괴는 내부에 비해 천천히 일어남을 관찰하였다. 결정의 파괴가 심하지 않은 결정을 관찰 시 내부의 파괴가 시작되기 전에 외부 파괴만 존재하는 모습이 관찰되었고 (Fig. 4), 외부파괴가 외벽으로부터 역 V 모양으로 진행되어 내부에 영향을 주어 내부파괴가 유발되는 것으로 추정되는 모습이 관찰되었다 (Fig. 5). 투과전자현미경으로 수산화인회석 관찰 시에 결정 파괴의 여러 단계의 결정들이 동시에 관찰이 되었으며, 그 단계를 다음과 같이 분류하고 배열할 수 있었다.

- 1 단계: 결정 외벽이 파괴되면서 결정의 반경이 감소하여 원래의 일정한 모양에서 불규칙하고 가늘어진 부분을 가지는 결정으로 변한다 (Fig. 3, Fig. 4).
- 2 단계: 결정 외벽의 작은 파괴는 내부 구조를 침투하여 내부 파괴가 일어나고 내부 파괴는 급속히 외부 파괴보다 빠른 속도로 진행된다 (Fig. 5, Fig. 6).
- 3 단계: 외부에서 시작되는 외벽 파괴와 내부에서 시작된 내부 파괴는 외벽의 완전한 파괴를 하게 되어 외부와 내부가 소통되는 형태가 시작된다 (Fig. 7).
- 4 단계: 외벽의 파괴 부위가 더 커지면서 결정의 분절이 나타나고. 파괴된 결정은 작은 조각으로 나누어지고 불규칙한 모양으로 변화한다 (Fig. 8, Fig. 9).

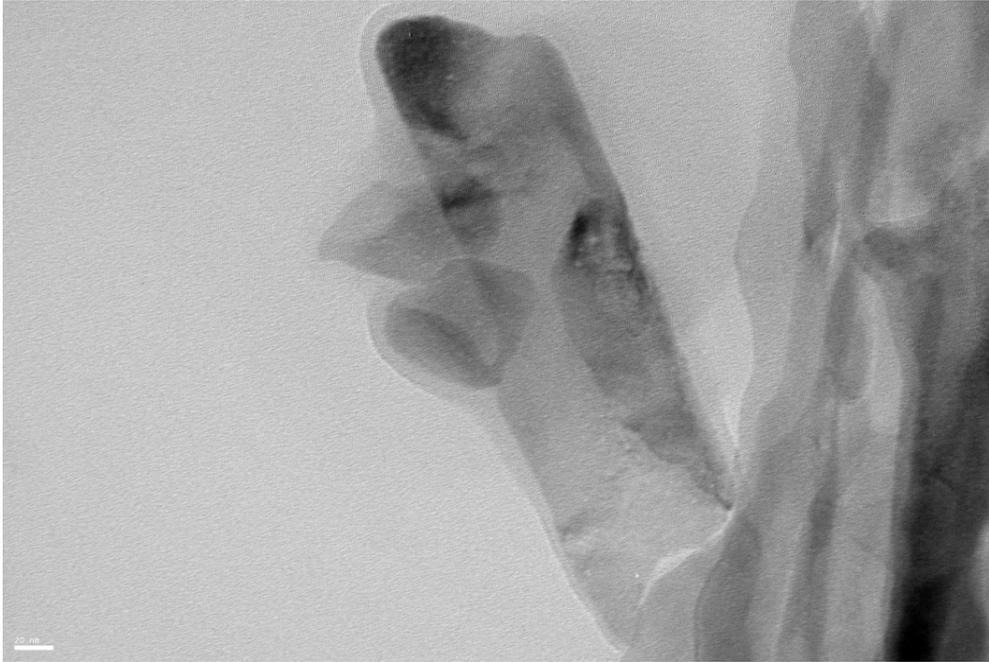


Fig. 3. Unaffected hydroxyapatite single crystal. (x50,000, scale bar = 20 nm)

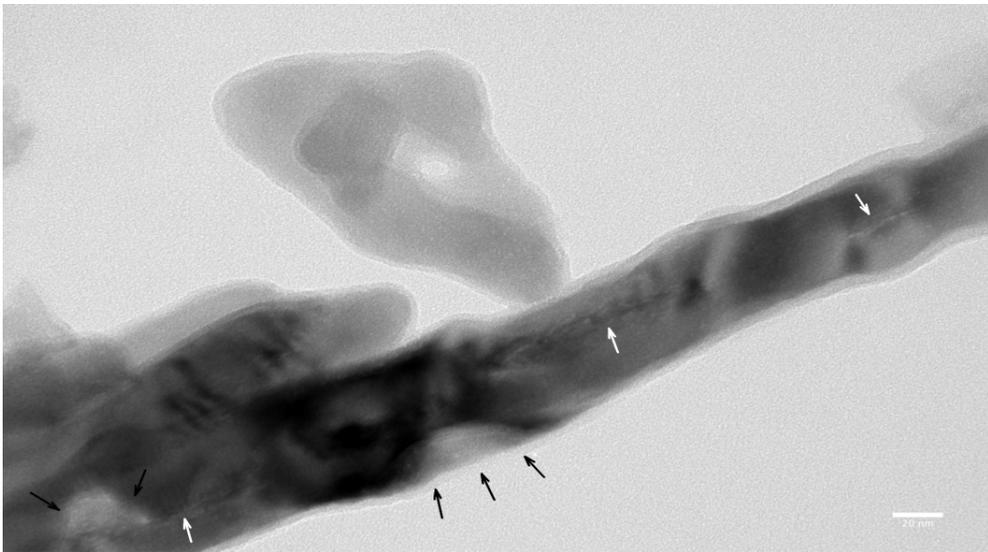


Fig. 4. Longitudinal view of destruction of enamel hydroxyapatite crystal. (x50,000, scale bar = 20 nm) The black arrows indicate lateral dissolution of hydroxyapatite crystal wall. The white arrows indicate the central dark line (CDL) which is not still affected.

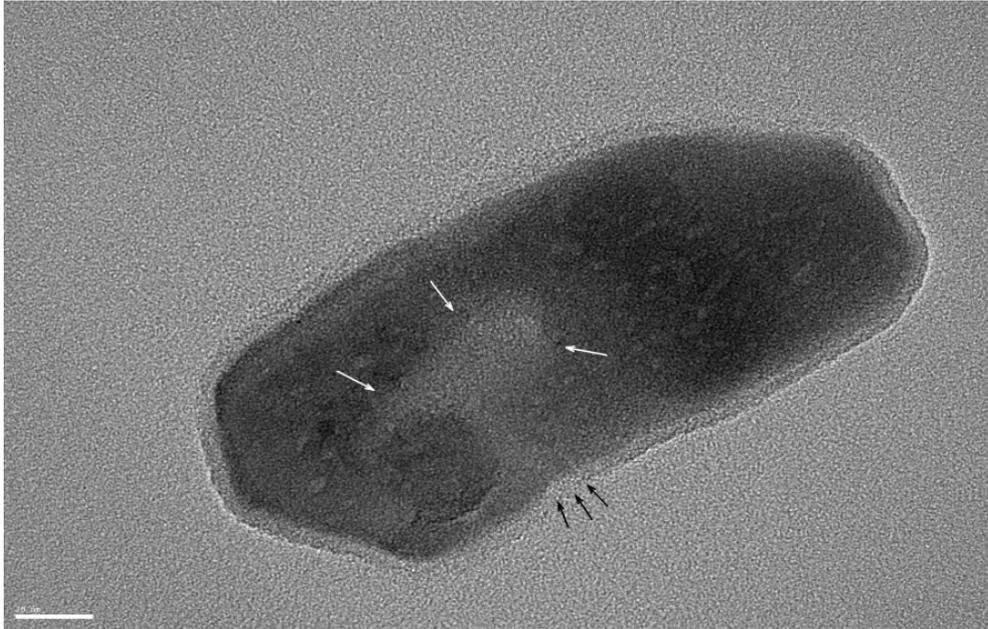


Fig. 5. Cross sectional view of destruction of enamel hydroxyapatite crystal. (x100,000, scale bar = 20 nm) The lateral wall dissolution (black arrows) initiates the central dissolution of hydroxyapatite core (white arrows).

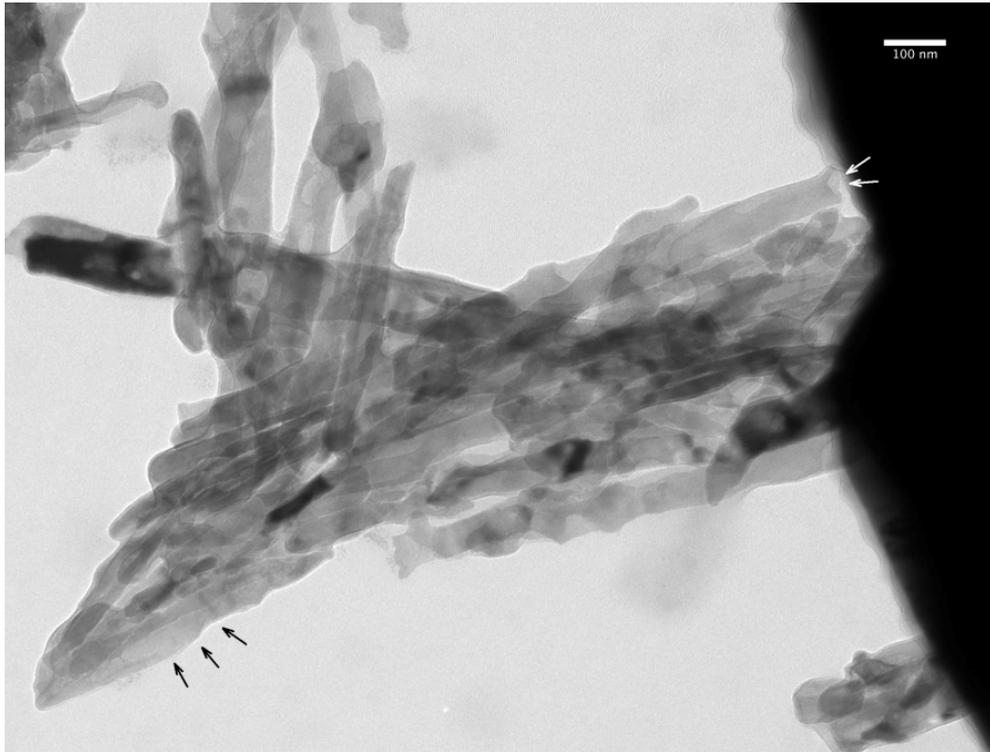


Fig. 6. Transmission electron microscopic view of enamel hydroxyapatite crystal destruction. (x10,000, scale bar = 100 nm) The black arrows show the suspected fractured site that shows hollow tube appearance of hydroxyapatite crystal. The white arrows also show hollow tube appearance.

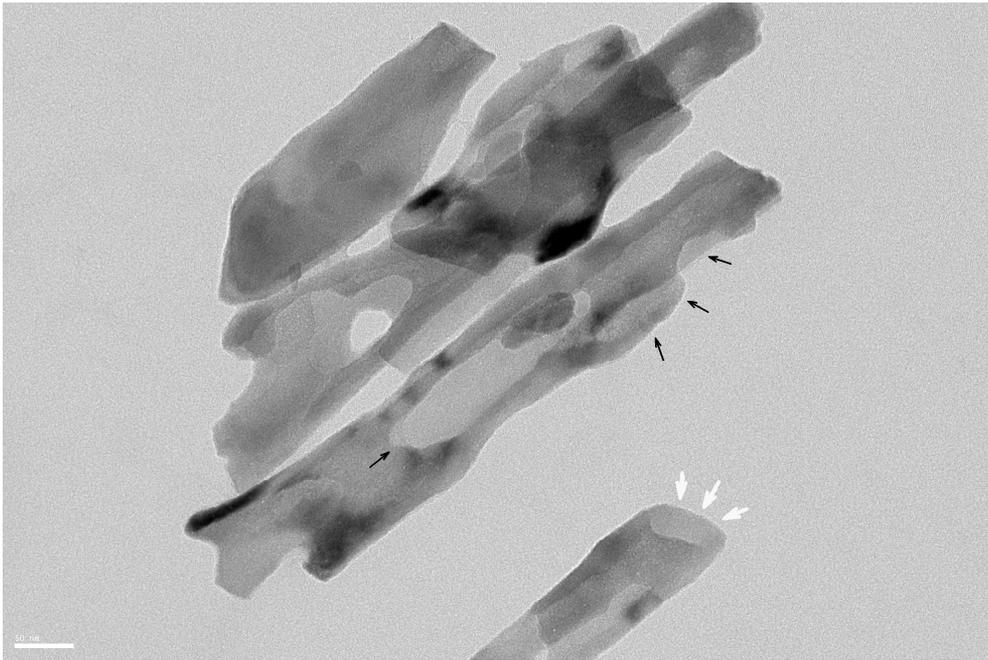


Fig. 7. Transmission electron microscopic view of enamel hydroxyapatite crystal destruction. (x30,000, scale bar = 50 nm) Lateral wall destruction and central destruction communicate each other (black arrows). The hollow tube appearance was also observed inside a crystal (white arrows).

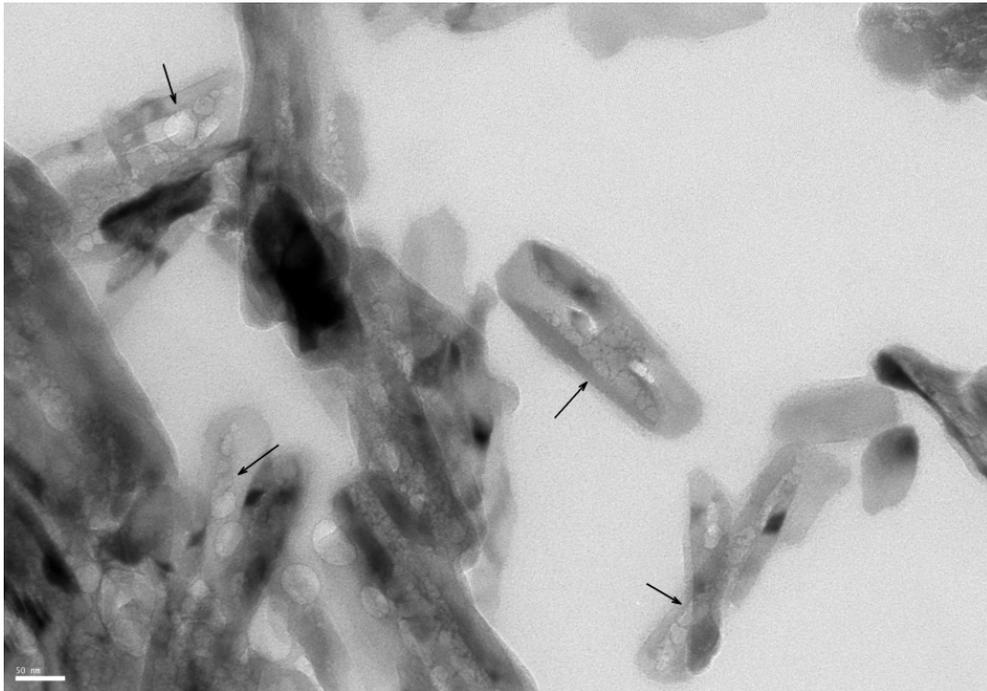


Fig. 8. Transmission electron microscopic view of enamel hydroxyapatite crystal destruction. (x50,000, scale bar = 50 nm) The hydroxyapatite crystals are fragmented. The outer walls of crystals are being dissolved (black arrows).

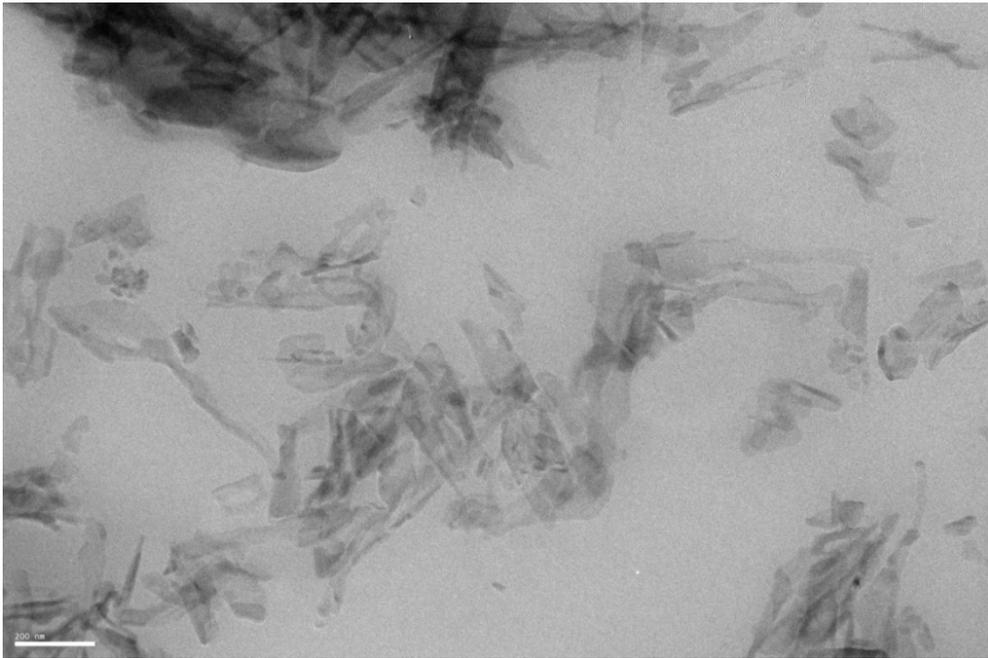


Fig. 9. Transmission electron microscopic view of enamel hydroxyapatite crystal destruction. (x10,000, scale bar = 200 nm) The hydroxyapatite crystals are fragmented and irregularly shaped.

3.2.3 파괴된 결정의 재광화 양상

우식이 진행되는 경우 탈회와 재광화가 동시에 진행된다고 알려져 있다. 투과전자현미경 관찰에서도 이러한 경우가 관찰이 되었다. 다른 결정에 비해 크기가 매우 작고 고유의 육각형 단면 모양을 거의 유지하고 있는 것으로 보아 새로 형성된 것으로 추정되는 결정이 관찰되었고 (Fig. 10-A), 파괴된 결정과 결정 입자가 서로 연결된 경우 (Fig. 10-B, C), 파괴된 perforation 내부에 새로운 결정이 침착 되어 이를 다시 회복하려는 변화 (Fig. 10-D) 등이 관찰되었다.

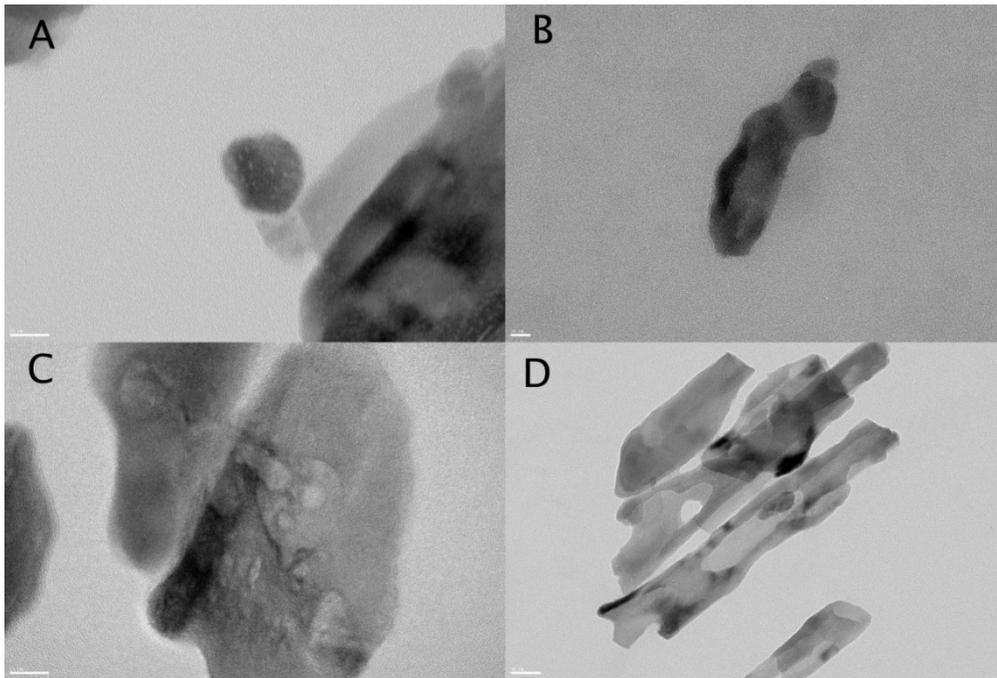


Fig. 10. Remineralization of destroyed hydroxyapatite crystals.

A: a newly shaped crystal. (x100,000, scale bar = 20 nm)

B: fusion of destroyed crystals. (x50,000, scale bar = 20 nm)

C: fusion of destroyed crystals. (x100,000 scale bar = 20 nm)

D: a newly shaped irregular crystal around lateral wall perforation. (x30,000, scale bar = 50 nm)

3.2.4 불소농도에 따른 법랑질 결정 형태의 변화

1) 불소 농도와 결정 파괴 속도

유산완충용액 적용 시간이 증가함에 따라 결정 파괴가 증가하여 결정의 일정한 배열이 점점 느슨해지는 양상을 보였다. 결정들이 밀집되어있어 결정 사이 공간이 거의 관찰되지 않았던 정상 법랑질에 비해 유산완충용액 적용 후의 법랑질은 외벽의 파괴로 인하여 결정과 결정 사이의 공간이 시간에 따라 점점 증가하였다. 결정의 모양은 긴 rod 의 형태를 가지고 있다가 점점 불규칙하고 날카로운 needle 형태로 변화였다.

불소농도에 따른 결정의 파괴 속도를 알기 위해 유산완충용액 적용 시간이 동일한 불소적용 군과 비적용군의 파괴양상을 비교하였을 때 불소적용 군의 파괴가 비적용군에 비해 파괴진행이 훨씬 덜 된 것을 관찰할 수 있었다. 저 배율에서 관찰하였을 때 불소적용 군이 비적용군에 비해 직선 배열을 더 잘 유지하는 형태이고 더 밀집되어있는 형태이다. 불소비적용군은 결정의 형태는 더 날카롭고 분절이 많이 되어있는 양상을 보였다. 이는 불소적용 군이 전반적으로 결정 파괴가 덜 일어난 것을 보여주고 있다 (Fig. 11).

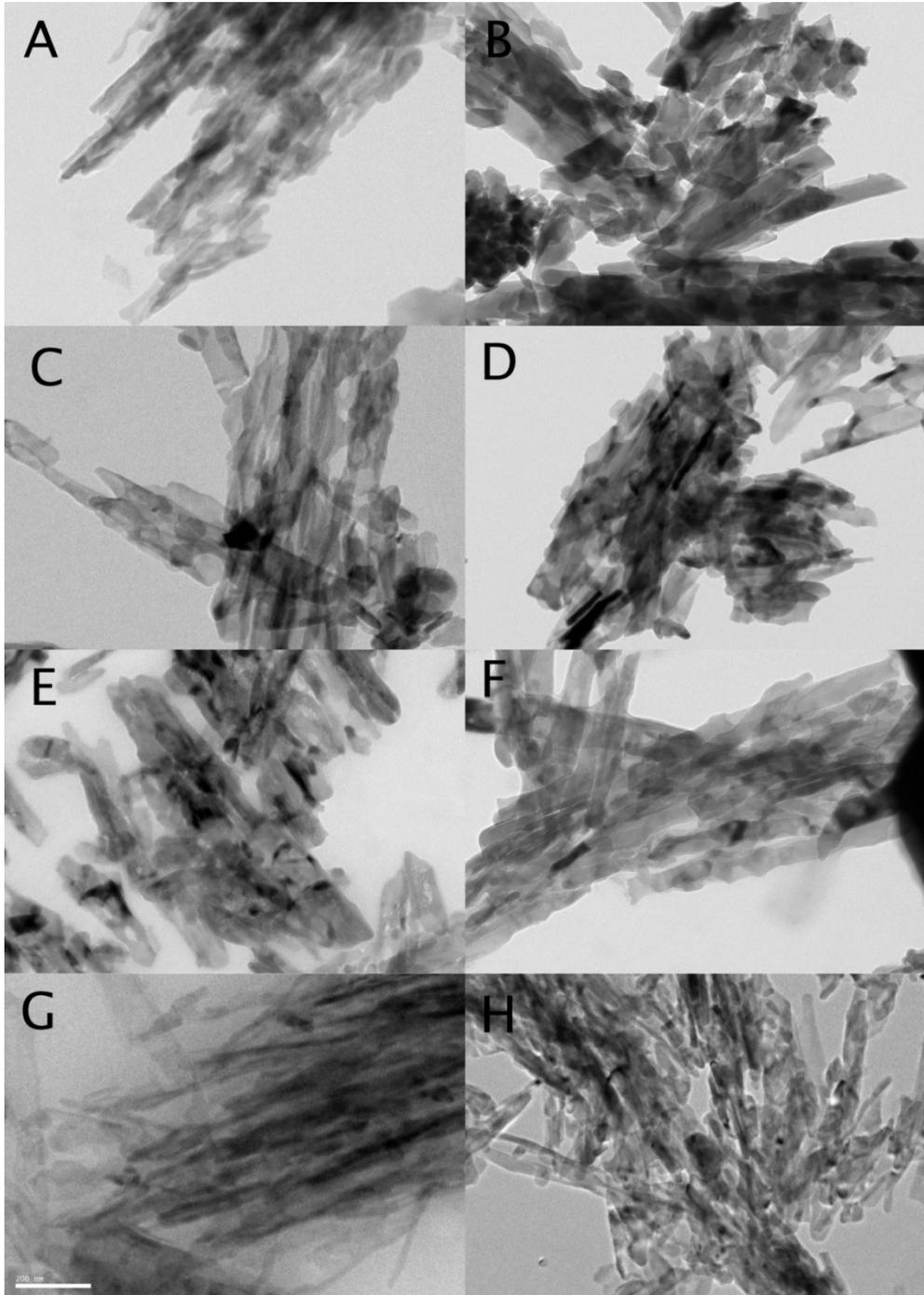


Fig. 11. Transmission electron microscopic view of enamel hydroxyapatite crystals treated with acid buffer solutions with different fluoride ion concentration and application time. (x10,000, scale bar = 200 nm)

A: a specimen treated with 0 ppm fluoride ion for 2 hours.

B: a specimen treated with 10 ppm fluoride ion for 2 hours.

C: a specimen treated with 0 ppm fluoride ion for 4 hours.

D: a specimen treated with 10 ppm fluoride ion for 4 hours.

E: a specimen treated with 0 ppm fluoride ion for 8 hours.

F: a specimen treated with 10 ppm fluoride ion for 8 hours.

G: a specimen treated with 0 ppm fluoride ion for 24 hours.

H: a specimen treated with 10 ppm fluoride ion for 24 hours.

2) 불소농도에 따른 결정 크기와 모양의 변화

불소를 적용한 경우, 투과전자현미경의 고해상도 소견에서 불소를 적용하지 않은 경우에 비해 결정의 크기가 더 크고, 결정의 모양이 원래의 육각형 모양보다 더 둥근 모양으로 변화하는 것을 관찰할 수 있었다. 불소를 적용하지 않은 경우, 결정의 파괴가 많이 일어나 있고 결정의 모양이 불규칙하고 경계가 날카로운 양상을 나타내고 있는 것을 관찰 할 수 있었다 (Fig. 12, Fig. 13).

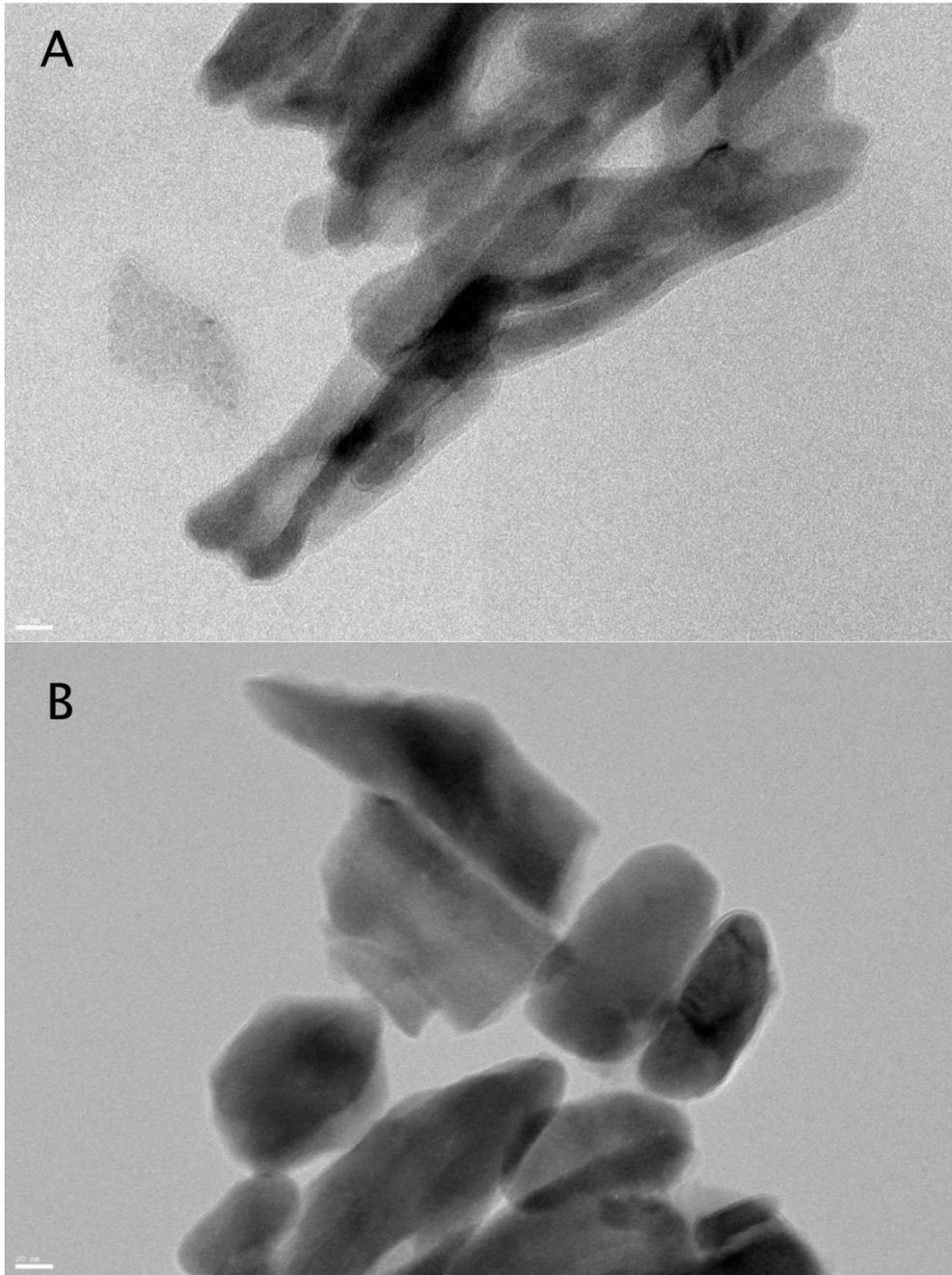


Fig. 12. The effect of fluoride ion on the shape of hydroxyapatite crystals.

(x50,000, scale bar = 20 nm)

A: a specimen treated with 0 ppm fluoride ion for 2 hours.

B: a specimen treated with 10 ppm fluoride ion for 2 hours.

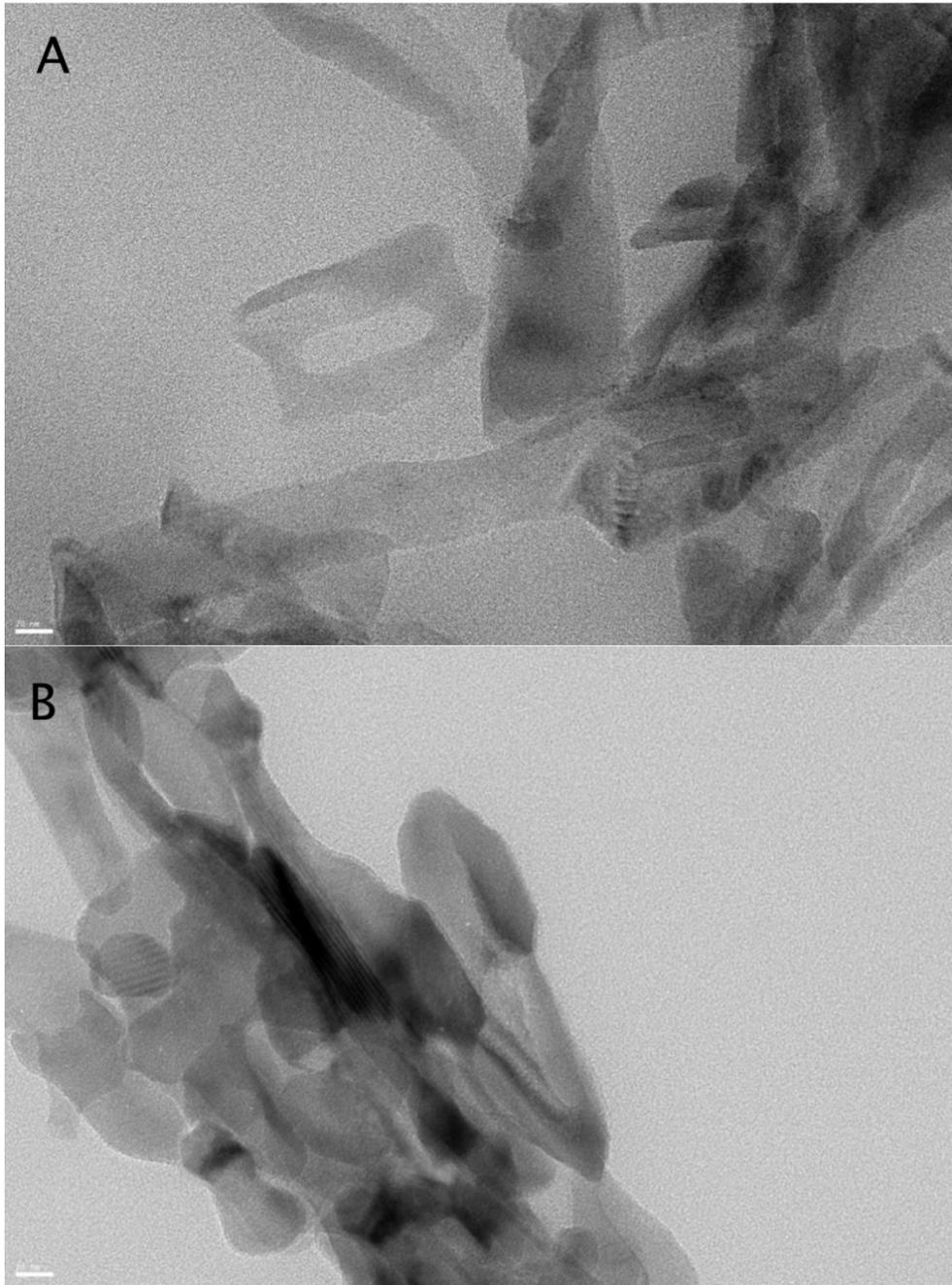


Fig. 13. The effect of fluoride ion on the shape of hydroxyapatite crystals.
(x50,000, scale bar = 20 nm)

A: a specimen treated with 0 ppm fluoride ion for 24 hours.

B: a specimen treated with 10 ppm fluoride ion for 24 hours.

3) 불소농도에 따른 결정 표면에 무기질 침착의 증가

불소를 적용한 경우, 결정 주변에 무기질이 더 많이 침착 되는 양상을 관찰할 수 있었다. 이미 결정 벽이 용해가 일어난 형태 위에 무기질이 침착 되어 결정의 모양을 거의 회복하고 결정 형태가 더 진하게 나타나는 것을 관찰하였다 (Fig. 14-A). 결정과 결정 사이에 비정형의 무기질이 존재하여 결정과 결정을 연결시키고 결정과 결정이 분리되지 않는 역할을 하는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 14-B).



Fig. 14. Mineral deposition on the surface of hydroxyapatite crystals.

A: a specimen treated with 10 ppm fluoride ion for 2 hours. (x50,000, scale bar = 20 nm)

B: a specimen treated with 10 ppm fluoride ion for 8 hours. (x30,000, scale bar = 50 nm)

3.2.5 STEM 분석

STEM mapping image 에서 결정내의 칼슘과 인 그리고 불소의 원소 분포 양상을 관찰할 수 있었다. 칼슘, 인, 불소의 순서로 결정 내에 많이 분포하였다. 불소는 칼슘이나 인에 비해 분포하는 비율이 매우 적었으며, 분포양상도 결정 내에서 임의적이고 불규칙적으로 위치하고 있었다. 불소를 적용한 군과 불소를 적용하지 않은 군에서 원소의 분포 양상에 있어서 명확한 차이를 보이지 않았다 (Fig. 15).

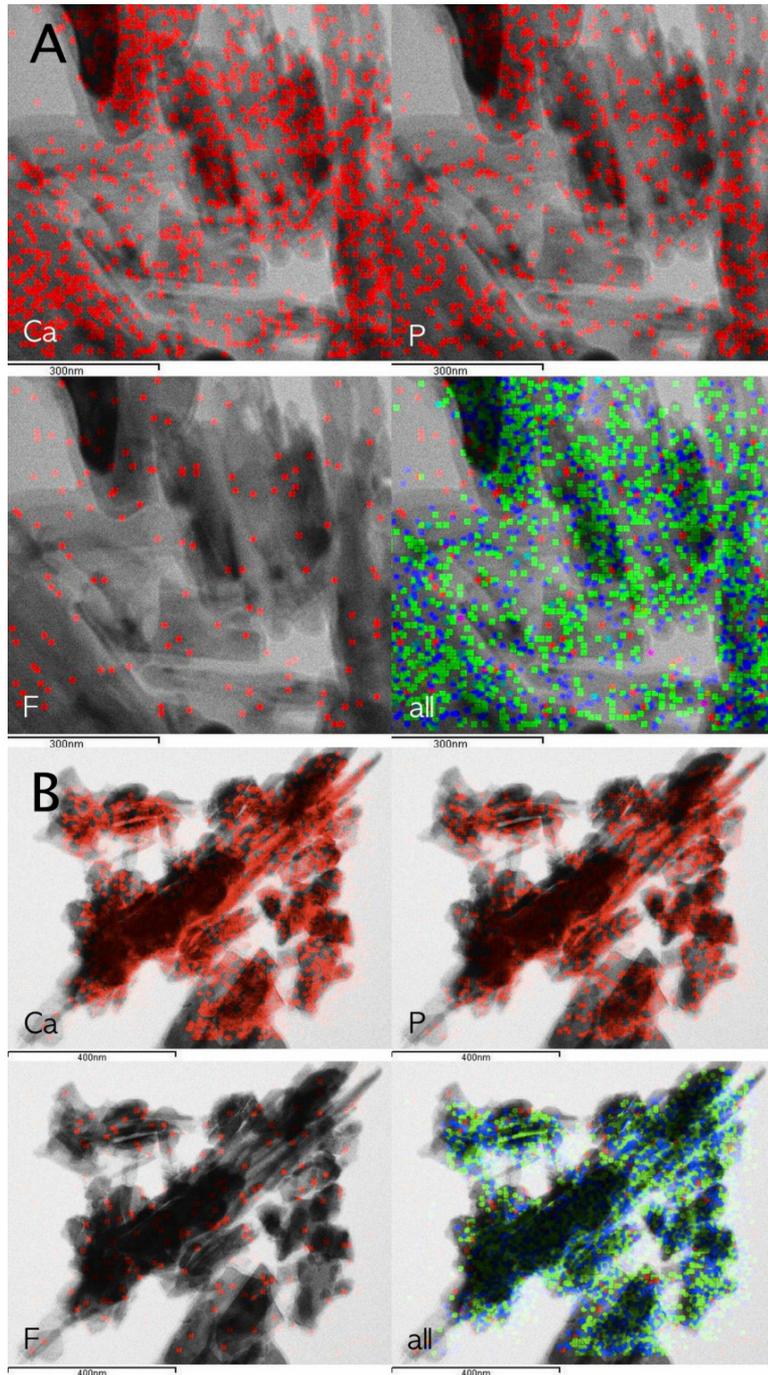


Fig. 15. STEM mapping image of chemical elements (Ca, P, F) in hydroxyapatite crystals. (Ca: green, P: blue, F: red)

A: a specimen treated with 0 ppm fluoride ion for 4 hours

B: a specimen treated with 10 ppm fluoride ion for 4 hours.

제 4 장 고찰

이번 연구에서는 인공치아우식의 발생을 불소농도를 0 ppm 에서 10 ppm 으로 달리하여 적용한 후에 편광현미경으로 관찰하여 인공치아우식의 진행양상과 불소의 효과를 개략적으로 확인하였고 그 후, 수산화인회석 결정의 형태가 인공우식이 발생하면서 변화하는 과정과 불소의 적용에 따른 수산화인회석 결정 형태의 차이를 투과전자현미경으로 관찰할 수 있었다.

이번 연구에서는 우식의 진행을 규격화된 조건에서 실험하기 위하여 자연적으로 형성된 우식 병소가 아닌 인공우식 병소를 형성시켜 연구를 시행하였다. 인공우식 병소로 치아 우식의 진행을 연구할 때 병소를 비교적 규격화하여 재현함으로써 실험의 변이를 최소화 할 수 있으며 어느 정도 넓은 병소를 얻을 수 있어 여러 가지 실험 조건을 한 병소에 적용시킬 수 있다는 장점을 가지고 있다 (Featherstone et al., 1983).

이러한 인공우식을 형성하는 대표적인 방법으로는 Silverstone 이 제안한 acid gel system 과 (Silverstone, 1967) Moreno 등과 이가 제안한 acid buffer system 이 (이찬영, 1992; Moreno and Zahradnik, 1974) 있다. Acid gel system 은 실제 자연 치아의 초기 우식과 유사한 형태의 병소가 재현되는 장점을 가지고 있으나, 오랜 시간이 필요하고 예상치 못한 성분이 포함되어 실험에 영향을 줄 가능성이 있다. Acid buffer system 은 수일 내에 병소를 진행시킬 수 있어 단 시간 내에 탈회 및 재광화 등의 실험을 진행시킬 수 있고 우식 형성에 관계하는 여러 인자를 분리해서 독립적으로 관찰할 수 있는 장점을 가지고 있다. 그러나, 우식 형성이 빠름으로써 암층, 투명층 등의 자연 우식 병소에서 관찰되는 특징을 관찰할 수 없다. 그러나 이는 포화도 조절을 통해 탈회 진행 속도를 느리게 하여 자연 치아 우식 병소와 유사하게 병소를 형성할 수 있다 (이찬영, 1992). 이러한 점을 고려하여 이번 실험에서는 acid buffer system 을 사용하였다. 이번 실험에서도 모든 시편이 24 시간 안에 초기우식병소가 형성 될 정도로 우식 형성이 빨랐으나 편광현미경에서 관찰되는 초기우식병소의 특징적인 층들이 명확하게 관찰되지는 않았다.

치아 우식의 진행 및 재광화를 연구하는 방법으로는 크게 정량적 분석과 정성적 분석으로 구분할 수 있다. 이번 실험에서는 인공 우식의 형성과 불소의 영향으로

나타나는 법랑질의 수산화인회석 결정 미세구조의 변화를 관찰하기 위해서 정성적 분석과 정량적 분석을 같이 사용하였다. 이를 위하여 우선 종단 시편의 부위에 따른 시간 별 탈회양과 변화를 편광현미경을 통해 정량적으로 관찰하고, 이를 토대로 수산화인회석의 정밀한 미세 구조 변화를 투과전자현미경으로 관찰한 후 시편의 표면 원소 분포를 STEM 으로 정성적인 관찰을 하였다.

편광현미경, microCT, microradiography 등은 무기질의 분포 양상을 알 수는 있지만 수산화인회석의 결정 형태와 내부 구조를 확인하기에는 한계가 있다. 전자현미경은 결정 구조의 실험 전후의 변화를 정성적으로 확실히 관찰할 수 있다. 결정 구조를 확인하는 데에는 투과전자현미경에 비해 시편 형성의 용이성 등의 이유로 인해 주사전자현미경이 많이 사용되었다. 그러나 주사전자 현미경은 시편의 절단면 상의 표면에 위치한 결정들의 배열이나 외적 형태를 확인할 수 있으나 내부의 결정 구조나 정확한 단면 형태를 관찰하기에는 제한적이다.

법랑질의 초기인공우식형성을 전자현미경으로 관찰하였을 때, 법랑소주 수준에서의 변화와 수산화인회석 결정수준에서의 변화로 분류할 수 있다.

법랑소주 수준의 법랑질 탈회 현상에 대해서는 주사전자현미경을 이용하여 많이 규명이 된 상태이다. 송 등은 법랑질 초기 우식의 진행이 법랑질 표면의 주과선조(perikymata)와 그 주변의 법랑소주에서 시작됨을 주사전자현미경을 통하여 관찰하였다(송윤정 and 이찬영, 2009). 법랑소주 내에서는 법랑소주와 소주간 법랑질로의 경계부위에서 intercrystalline space 가 증대되면서 하방으로 diffusion pathway 가 형성된다고 하였다. 이것은 Wang 등의 연구에서도 동일하게 확인되었다(Wang et al., 2005). 이들은 탈회가 법랑소주의 core/wall interface 에서 시작된다고 하였다. 이들이 관찰한 core 는 송 등이 관찰한 법랑소주이고 wall 은 소주간 법랑질을 의미한다. Cussler 등은 법랑질 무기물은 다공성의 solid 한 구조로써, interprismatic substance 나 법랑소주 경계부위의 법랑질의 무기물은 수산화인회석과 비슷하지만 결정구조에 2-4% carbonate 가 금속이나 anion 과 혼합된 구조인 carbonated apatite 로 구성되어있고 이러한 무기물은 단백질, 지질, 물로 둘러 쌓여 있으며 법랑질의 탈회시 확산 통로로 이용된다고 하였다(Featherstone and Cussler, 1987).

전 등은 법랑질 인공우식 병소에 대한 원자현미경과 주사전자현미경 관찰에서 수산화인회석 결정은 정상보다 그 크기가 감소하고 입자들이 무질서하게 배열되어

있으며 결정 사이에 빈 공간이 관찰되는 소견을 확인할 수 있었다 (전영의 et al., 2007). 이는 Haikel 등의 주장처럼 탈회가 진행되면 수산화인회석 입자 자체의 용해가 완전히 일어나기 전에 입자 사이에 공간이 형성되면서 이온의 이동이 일어나고 이 공간이 법랑질 표면에서부터 병소 본체까지 연결되어 우식 표면하층 형성의 통로로 이용된다는 것을 의미한다 (Haikel et al., 1983).

이처럼 수산화인회석 결정 입자 사이까지의 diffusion pathway 는 주사전자현미경으로 어느 정도 규명된 상태이지만 법랑소주의 단위체인 수산화인회석 결정 수준에서의 변화를 정확히 규명하기 위해서는 주사전자현미경의 단점을 보완할 수 있는 투과전자현미경적 연구가 필요하다.

미세구조적인 면에서 볼 때, 정상 법랑질의 수산화인회석 결정은 육각형의 단면을 가지고 길게 방향성을 가지는 육각형의 기둥 모양을 하고 있다. 정상적인 법랑질 내에서는 결정들이 서로 밀접하게 연결되어있고 법랑소주의 방향에 맞게 많은 결정 단위들이 서로 방향성을 가지고 밀접하게 붙어있다. 투과전자현미경으로 보았을 때 이들의 단면은 육각형이나 긴 육각형 형태를 가지고 있었다.

정상 법랑질 수산화인회석 결정을 투과전자현미경으로 관찰하게 되면, 결정의 중앙 부위를 가로지르는 특이한 구조물인 중앙부 검은 선이 특징적으로 관찰되는 것을 많은 연구자들이 보고하였다 (Marshall and Lawless, 1981; Yanagisawa et al., 1989). 단결정의 중앙부에서 발견되는 중앙부 검은 선에 관해서는 2 가지의 가설이 있는데 첫째, 중앙부 검은 선은 성숙법랑질에서 관찰되는 grain boundary 같은 bidirectional defect 로서 국소적인 결정학적 변이(local crystallographic variation)일 수 있으며, 둘째, 중앙부 검은 선은 결정 중앙에 위치한 탄산기 같은 이온 대체물의 결과일 수도 있다고 하였다 (Cuisinier et al., 1992). 최근의 연구에서는 첫 번째 가설을 더 지지하고 있으며 그 이유는 octacalcium phosphate 가 가수 분해되면서 수산화인회석 결정 구조가 형성된다고 추측되고 있으며, 가수 분해되는 과정에서 내부에 함입되어 잔존된 octacalcium phosphate 가 planar defect 를 만들게 될 수 있는데, 이와 같은 현상이 중앙부 검은 선의 형성과 관계가 있는 것으로 추측하고 있기 때문이다 (Nelson and Barry, 1989). 이번 실험에서는 다른 연구에서 많이 관찰되었던 정상 법랑질의 투과전자현미경 관찰 소견인 중앙부 검은 선이 많이 관찰되지 않았다. 탈회를 시키지 않은 정상 법랑질 시편의 투과전자현미경 관찰

상에서는 중앙부 검은 선이 전혀 관찰되지 않았다 (Fig. 2). 하지만 탈회를 시킨 시편들 중에 드물게 일부에서 중앙부 검은 선이 관찰되었다 (Fig. 4). Nylen 등은 중앙부 검은 선의 형태는 전자현미경의 beam 에 대한 결정의 방향성에 따라 달라질 수 있다고 하였다 (Nylen et al., 1963). Marshall 등은 중앙부 검은 선이 Lattice image 와 microdiffraction 을 관찰하였을 때 single [100] plane 의 특징을 가지며 특정한 diffraction pattern 의 상태에 따라 그 모양이 달라질 수 있다고 하였다 (Marshall and Lawless, 1981). 이번 실험에서는 법랑질 분말 시편을 이용하여 시편을 제작하였기 때문에 각각의 단결정의 beam 에 대한 각도가 모두 다를 수 밖에 없었다. 그리고 ultramicrotomy 를 이용한 시편에 비해 시편 두께가 더 두꺼울 수 밖에 없었다. 이러한 이유로 인해 다른 연구에 비하여 중앙부 검은 선이 관찰되는 빈도가 적었던 것으로 추측된다.

인공우식이 형성된 수산화인회석 결정을 투과전자현미경으로 관찰하였을 때 특징적으로 나타나는 소견은 중앙부 천공이다. Warshawsky 등은 수산화인회석 결정의 투과전자현미경 상에서 나타나는 중앙부가 천공된 상은 시편의 절단 과정 중 절단면이 중앙에 함몰된 부위를 지나가서 얻게 되는 결과라고 주장하였다 (Warshawsky and Nanci, 1982). 하지만 Hayashi 는 투과전자현미경으로 탈회가 일어난 부위에서 수산화인회석 결정을 관찰하였을 때 표층에는 주로 변연부 소실이 일어나고 표층 하 병소에서는 결정의 종단면에서 중앙부위가 먼저 용해되어 중앙부 천공이 일어난다고 보고하였다 (Hayashi, 1995). 박 등은 AFM 소견으로 수산화인회석 입자의 중앙부와 변연부가 용해되며 입자 사이의 간격이 넓어지는 것을 관찰하였다 (박정원 et al., 2000). 이로써 중앙부 천공의 소견이 시편 형성 과정에서 생기는 인위적 구조물이 아니라는 것으로 의견이 모아지고 있다.

이러한 중앙부 천공이 어떠한 기전과 순서에 의해 형성되는 지에 대해서는 학자마다 해석이 분분하였다. 용해가 수산화인회석 결정 내부에서 먼저 시작되고 외부로 진행되는 것인지, 아니면 외부에서 용해 부위가 생긴 후에 이를 통로로 하여 내부가 용해되기 시작하는 것인지 확실하지 않았다.

Voegel 등은 수산화인회석의 파괴 과정을 다음과 같이 기술하였다. Monocrystal 의 파괴는 monocrystal 의 말단에서 시작하여 central core 가 완전히 파괴된 후 lateral defect 가 시작된다고 하였다. Lateral defect 의 파괴방식은 lateral wall 의 일부가

파괴되는 방식과 [100] plane 을 따라 완전히 파괴되는 방식, 2 가지로 나타난다고 하였다 (Voegel and Frank, 1977). Yanagisawa 등은 수산화인회석의 용해를 결정 외면으로부터의 용해와 중심부로부터 일어나는 용해의 2 가지 형태로 분류하고 이들이 일어나는 순서를 언급하지 않고 독립적으로 기술하였다 (Yanagisawa and Miake, 2003).

Voegel 등이 주장한 central core 가 완전히 파괴된 후에 lateral defect 가 시작된다는 가설은 lateral defect 가 많이 일어났음에도 불구하고 중앙부의 용해가 거의 일어나지 않았던 Yanagisawa 등의 투과전자현미경 이미지와 모순을 가지고 이로 인해 Voegel 등의 가설은 재고를 요구 받게 된다. 이번 실험에서도 내부파괴는 거의 일어나지 않았지만 외부파괴만 일어난 결정의 모습을 관찰할 수 있었다 (Fig. 4). 이처럼 이번 실험의 결과도 Voegel 의 가설과는 다른 견해를 보이고 있다. 하지만 외부 용해와 중심부 용해의 2 가지 형태만을 기술하고 둘의 연관성을 언급하지 않은 Yanagisawa 등의 연구만을 가지고 2 가지 형태의 용해가 서로 독립적으로 일어난다고 믿기에는 Voegel 등의 관찰이 완전히 부정되는 모순을 가지게 된다. 두 가지 실험의 시편제작 방법은 ultramicrotomy 법이며, ultramicrotomy 법으로 투과전자현미경 시편을 제작하게 되면, 결정의 절단면 만을 관찰할 수 있게 된다. 앞서 진술한 것처럼 수산화인회석 단결정의 모양은 육각형의 절단면을 가지는 기둥형태이다. 수산화인회석 결정의 구조를 정확하게 이해하려면 육각형의 절단면과 함께 길이 방향의 longitudinal surface 의 구조도 함께 관찰이 되어야 한다. Voegel 등과 Yanagisawa 등의 연구와 마찬가지로 대부분의 수산화인회석 결정의 투과전자현미경적 연구는 ultramicrotomy 법을 사용하기 때문에 수산화인회석에 대한 제한적인 정보를 얻게 되어 같은 현상에 대해 다른 해석을 내놓을 수 밖에 없었던 것으로 추측이 된다. 이번 실험에서는 ultramicrotomy 법을 이용하지 않고 인공우식 법랑질 분말을 메쉬 그리드를 이용하여 채집하는 방법을 사용하였기 때문에 수산화인회석 결정의 c - axis 에 평행한 lateral plane 을 비교적 잘 보여주고 있고 이전 실험에 비해 결정모양에 관한 더 많은 양의 정보를 보여주고 있다.

이번 실험의 투과전자현미경 상에서 longitudinal 한 긴 막대모양의 수산화인회석 단결정의 내부는 텅 빈 것이 대부분이어서 Voegel 등이 central core 가 먼저 파괴된다고 하는 것과는 일치한다 (Voegel and Frank, 1977). 그러나 central

core 가 파괴되는 시작이 반드시 monocystal 의 말단이라고 하는 것은 정확하게 나타나지 않았고 central core 가 완전히 일어난 이후 lateral defect 가 진행된다는 것도 일치하지 않았다. 이번 실험의 수산화인회석 단결정의 이미지는 내부가 비어있는 긴 튜브 모양이며 lateral defect 의 모양도 Voegel 등이 기술한 것과 같은 일정한 패턴에 국한되지 않았고 다양하게 나타나고 있었다. 그리고 또 한가지 의문을 가질 수 있는 것은 법랑질내의 수산화인회석 단결정이 c - axis 를 따라서 이를 수 있는 말단을 가지는가 하는 것이다. 이에 대한 의문은 Dalcusi 등의 연구에서도 제기되었다 (Dalcusi et al., 1984). 만약 수산화인회석 결정이 분절되지 않고 연속적인 긴 형태의 결정이라면 central core 의 파괴는 말단에서 시작되는 것이 아니라 lateral defect 가 먼저 시작되고 그것에 의해 노출된 central core 에서부터 먼저 용해되는 것이 아닌가 추측을 할 수 있다. 이는 주사전자현미경으로 확인된 소견인 탈회가 진행되면 수산화인회석 입자 자체의 용해가 완전히 일어나기 전에 입자 사이에 공간이 형성되면서 이온의 이동이 일어난다고 기술한 Haikel의 주장에서도 그와 같이 추측을 할 수 있다 (Haikel et al., 1983). 이번 실험에서도 내부 용해의 시작은 말단에서 시작되지 않았고, 중간에서 시작되는 부분이 관찰되었으며, 수산화인회석 외벽의 용해와 인접하여 형성되는 것이 관찰되었다 (Fig. 4, Fig. 5). 결론적으로 이번 실험에서는 Voegel 등과 Yanagisawa 등의 해석과는 다르게 결정 외부에서 먼저 용해가 시작되어 내부 용해가 시작되는 것으로 관찰되었다. 그러나 내부 용해의 진행 속도가 외부 용해의 진행 속도보다 훨씬 빠르게 진행되는 것은 Voegel 등의 소견과 부분적으로 일치하는 것이라고 할 수 있다 (Fig. 6, Fig. 7).

수산화인회석 결정이 내부에서부터 우선적으로 용해되는 것에 대해서는 Johnson의 경우 중앙 부위는 처음에 형성된 carbonate-rich domain 에 해당되어 탈회가 일어나는 동안 수소 이온의 공격에 취약하기 때문에 중앙 부위가 먼저 녹는 것이라고 설명하였다. 그러나 Nelson 등은 합성된 carbonated apatite crystal 에서 [100] plane 과 평행한 defect 를 관찰하였고 이 defect 가 apatite matrix 에 포함된 이차원적인 octacalcium phosphate 의 함입과 일치하는 것을 관찰하였다 (Nelson and Barry, 1989). 수산화인회석 결정에서 central dark line 이 관찰되는 이유는 이 구조가 octacalcium phosphate 와 유사한 구조를 가지기 때문인 것으로 추정하고 있다. Octacalcium phosphate 는 수산화인회석의 전구형태이며 수산화인회석의

결정단위 구조보다 산에 의한 파괴에 더 취약한 것으로 알려져 있다. 내부구조가 산에 취약한 구조이기 때문에 산이 침투했을 때 외부에 비해 급속하게 파괴되는 것으로 추정할 수 있다. 그러나 이후의 고해상도 투과전자현미경 연구에 의하면 중앙부 검은 선은 산에 의해 저항성이 있어 잘 파괴되지 않고 오히려 중앙부 검은 선에서 약간 떨어진 unit cell 에서 산에 의한 용해가 일어나는 것으로 보여지고 있다 (Tohda et al., 1987).

Dalcusi 등은 법랑질 단결정의 길이는 보통 알려진 것과 달리 매우 길며 그의 실험에서도 100 μm 이상의 길이를 가지는 결정이 관찰되었다 (Daculsi et al., 1984). Dalcusi 등은 법랑질 수산화인회석 결정은 상아법랑질 경계(dentino enamel junction)에서 법랑질 표면까지 연속적인 매우 긴 구조를 가지고 있을 것으로 추측하였다. 이번 실험에서는 법랑질을 분말로 만드는 시편제작법을 사용하였기 때문에 기존에 볼 수 있었던 a - axis 와 b - axis 를 위주로 하는 육각형 모양의 결정이 관찰되기 보다는 c - axis 에 평행한 longitudinal 한 형태의 결정들이 관찰되었다. 이번 실험에서도 파절된 결정의 형태에 따라서 다양한 길이의 수산화인회석 단 결정이 관찰되었고, 비록 파절이 되어 그 길이의 정확한 끝을 알 수는 없었지만 내부 결정을 관찰하게 되면 끝이 분절되지 않은 연속적인 형태의 긴 결정의 모양을 쉽게 추측할 수 있었다. 이것으로 보아 이번 실험의 결과도 법랑질 수산화인회석 결정이 진정한 말단을 가지지 않는 연속적인 긴 구조라는 것을 유추할 수 있었다.

불소는 여러 가지 다양한 기전을 통하여 치아의 탈회를 지연시키고 결정의 재광화를 촉진한다. 불소는 법랑질 광화과정에서 중요한 regulator 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 불소는 수산화인회석의 산성 전구체의 가수분해와(Tung et al., 1992) apatite crystal 의 침전 역학(precipitation kinetics)을 촉진시켜 법랑질 결정의 안정성을 증가시키는 역할(Varughese and Moreno, 1981)을 하는 것으로 알려져 있다. 이번 실험에서도 불소 농도가 1 ppm 에서 10 ppm 으로 증가함에 따라 탈회 깊이가 감소하는 결과를 보였고, 이로 인해 불소가 낮은 농도에서도 탈회를 지연시킴을 확인하였다. 이번 실험의 편광현미경 실험에서는 불소의 재광화 효과를 직접 확인할 수는 없었으나 법랑질의 우식은 탈회와 재광화가 동시에 일어나면서 그

흐름이 탈회 쪽으로 기우는 것이기 때문에 탈회의 지연은 재광화의 증가의 효과라고 볼 수 있다.

재광화의 양상은 크게 두 가지로 구분되어 관찰된다고 하였다. 대부분의 연구에서는 우식 병소 전체에 무기질이 침착하여 탈회가 적게 일어났던 병소의 가장자리부터 재광화의 양상이 관찰된다고 하였다. 이러한 재광화는 용액상태로 유리된 불소이온이 법랑질 내부로 침투하여 법랑질의 탈회를 억제하고 무기질의 침착을 유도하기 때문이라고 생각된다 (Silverstone, 1977). 이러한 무기질의 침착에 따라 양성 복굴절로 보이던 병소가 isotropic zone 으로 변하고 계속해서 고유의 음성 복굴절로 회복됨이 관찰되었다. 나머지 하나는 우식 표면층의 지속적인 증가이다. 이러한 우식 표면 층의 증가는 법랑질 표면에 dicalcium phosphate dihydrate 와 불화인회석(fluoroapatite)의 침착에 의해 우식 표면층이 증가하는 현상으로 Mellberg 등은 불소가 치질에 m 강하게 결합하여 불화인회석을 형성하여 산에 의한 용해가 감소한다는 주장을 하였지만 이러한 우식 표면 층의 증가는 지속적인 불소이온의 병소 내부로의 이동을 억제하여 전체 병소의 재광화에는 오히려 방해요소로 작용한다고 하였다 (Mellberg and Chomicki, 1983).

이번 실험에서는 유산용액의 농도를 낮추고 칼슘과 인의 농도를 높여 degree of saturation 을 높인 재광화 용액을 따로 사용한 것이 아니라, degree of saturation 이 낮은 탈회 용액 내에서 불소의 영향을 평가하는 것이어서 후자처럼 건전 표층 폭의 증가가 일어날 정도로 재광화가 일어나지는 않았다, 그러나 10 ppm 의 불소이온을 적용한 군에서는 특징적으로 isotropic zone 의 발현 빈도가 매우 높았다. 조직학적으로 건전 표층은 1-5%, 표층하 병소의 가장자리는 5%, 병소자체는 25% 정도의 세공의 공간을 차지하는데, 무기질이 침착 됨에 따라 세공이 차지하는 비율이 적은 가장자리부터 먼저 세공이 감소하면서 변화를 보이고, 표층하 병소에서도 세공의 공간이 작았던 부위부터 무기질이 침착하면서 세공의 부피가 감소하여 isotropic zone 이 증가하는 양상을 보인다. Isotropic zone 은 Darling 등에 의해서도 보고되었는데 물을 용매로 편광현미경 하에서 관찰 시 5%보다 적은 공간 존재 시에는 음성 복굴절 또는 고유 복굴절로 관찰되고, 5%의 공간이 존재하는 경우 isotropic zone 으로, 5%보다 많은 공간이 있는 경우는 양성 복굴절로 관찰된다고 하였다 (Darling, 1956). Silverstone 등도 이러한 isotropic zone 이 재광화가

일어나면서 우식 병소의 가장자리에서 법랑질 표면 쪽으로 급격히 증가함을 보고하였는데, 양성 복굴절의 우식 병소가 이러한 isotropic zone 을 거쳐 음성 복굴절의 정상 법랑질로 재광화 됨을 의미한다고 하였다 (Silverstone et al., 1981). 이번 실험에서도 불소 10 ppm 에서 탈회와 함께 그에 저항하는 재광화가 활발히 일어났다고 볼 수 있다.

Margolis 등은 1 ppm 의 불소가 포함된 탈회용액과 중성용액에 노출된 법랑질을 biopsy 한 후 관찰하였을 때, 탈회 용액 처리시에는 총 광물질의 손실이 관찰되지 않고 법랑질 불소 함유량이 증가한대 반해 중성용액처리 시 전혀 불소의 유입이 관찰되지 않음을 보고하였다 (Margolis et al., 1986). 이는 재광화에 있어 산성용액이 중성용액보다 효과가 있음을 의미하는 것이다. 또한 치태내의 pH 는 5.69 로 타액이나 혈액의 6.7, 7.35 보다 낮았으며(Moreno and Margolis, 1988) 치아 우식 유발 미생물 중 가장 큰 역할을 차지하는 *S. mutans* 에 의해 sucrose 가 분해되어 lactic acid 가 형성되면 이러한 산에 의하여 pH 가 4.3 까지 떨어진다 (Nikiforuk, 1985). 이러한 연구 결과를 통하여 본 연구에서는 pH 4.3 의 유산완충용액을 실험용액으로 사용하였다.

Margolis 등은 치아 우식의 과정이 단순한 탈회의 과정이 아니고 치태에서 만들어진 유기산이 법랑질의 소공을 통해 확산되는 과정에서 표면 층의 초기용해와 무기질의 침착이 동시에 일어나는 탈회와 재광화가 반복되는 현상이라고 설명하였다 (Margolis and Moreno, 1985). 편광현미경상에서는 불소의 영향이 확실하게 나타났으나 투과전자현미경상에서는 그 효과가 명확하게 나타나지는 않았다. 이는 Margolis 등의 가설처럼 탈회용액에서 탈회를 진행시키더라도 탈회현상이 우세하기는 하나 탈회 현상만 관찰되는 것이 아니고 부분적으로 재광화 현상도 동시에 일어나기 때문에 미세한 결정을 관찰하는 투과전자현미경상에서는 그 차이가 명확하게 나타나지 않을 수 있기 때문이다. 하지만 저해상도 투과전자현미경상으로 관찰하게 되면, 불소를 처리한 경우가 불소를 처리하지 않은 경우에 비하여 수산화인회석 결정의 용해속도가 훨씬 느리고 결정과 결정 사이의 배열을 잘 유지하고 있는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 11).

Daculsi 등은 2% sodium fluoride 용액을 처리 한 후, 대조 군과 비교하였을 때 결정의 모양이 더 커지고 rounded 되는 것을 투과전자현미경으로 관찰하였다

(Daculsi et al., 1981). 이번 실험에서도 불소를 처치하지 않은 경우에 비해 불소를 처치한 경우에서 결정이 훨씬 더 크고 rounded 되는 유사한 소견을 확인하였다 (Fig. 12, Fig. 13). 이번 실험에서는 Daculsi 등의 실험과 다르게 실제 치아 우식이 일어나는 상황과 더 유사하게 탈회 용액 속에 불소의 효과를 확인하였고, 불소의 농도도 Daculsi 등이 사용한 것보다 훨씬 저농도의 불소에서도 이와 같은 효과가 있음을 확인하였다. 이러한 수산화인회석 결정의 크기와 모양의 변화는 무기질의 침착에 의한 것으로 추정할 수 있다. 이번 실험에서는 이렇게 여러 연구에서 추정했던 결정의 무기질의 침착을 투과전자현미경을 이용하여 직접 관찰할 수 있었다. 이러한 무기질은 수산화인회석과 비슷한 밀도와 형태를 가지는 것에서부터 수산화인회석이 아닌 다른 형태의 무기질로 추정되는 일정한 형태가 없는 것들이 다양하게 관찰되었다. 이러한 무기질은 결정의 형태만 변화시키는 것이 아니라 결정과 결정 사이가 분리되지 않도록 하는 기계적인 역할도 하는 것으로 관찰되었다 (Fig. 14).

이러한 결정 위에 침착 되거나 결정과 결정 사이를 이어주고 있는 무기질이 정확하게 어떤 종류의 무기질인지에 대하여 의문이 생길 수 있다. Margolis 와 Moreno 는 solubility diagram 을 통하여 법랑질과 DCPD 의 용해를 나타내고 이들이 만나는 점을 singular point 라고 하였으며, 이 상부에서 법랑질이 DCPD 로 바뀌면서 법랑질의 표면에 침착 한다고 하였다 (Margolis and Moreno, 1985). LeGeros 는 생리적으로 관찰되는 calcium phosphate 의 형태로서 amorphous calcium phosphate, brushite (dicalciumphosphate dihydrate), monetite (dicalcium phosphate anhydrous), octacalcium phosphate, whitelockite (tricalcium phosphate), calcium hydroxyapatite 등이 있다고 하였으며, 서로 다른 형태로의 변성도 가능하다고 하였다 (LeGeros, 1991). 수산화인회석은 산성인 환경에서 dicalcium phosphate dihydrate 나 amorphous calcium phosphate 로 변성 될 수 있으며 Mg 이온이 존재 하에 tricalcium phosphate 등으로 변성할 수 있다고 하였다. 또한 우식의 과정에서 치아 내에 불소 이온이 존재하면 산성이나 중성에서 CaF_2 , 불화인회석 등을 형성하며, 불소 이온이 존재하지 않을 때에는 octacalcium phosphate, dicalcium phosphate dihydrate, 탄소의 함량이 적은 apatite 등을 형성한다고 하였다. 오 등과 권 등은 결정성장 초기에 octacalcium phosphate precursor 가 먼저 생성되었다가 불소이온의

작용으로 octacalcium phosphate 의 가수분해가 촉진되면서 apatite 결정이 성장한다고 하였다 (권중원 et al., 1999; 오승연 et al., 1997). 법랑질 소결정체의 형성과정으로 인하여 그 전구체인 octacalcium phosphate 를 내부구조로 포함할 가능성이 제기되고 있으나 (Nelson and Barry, 1989), 실제 법랑질 광화과정에서 octacalcium phosphate 가 형성된다는 확실한 증거는 아직 확보되지 않은 상태이다 (Rey et al., 1990). 본 연구 만으로 결정 사이에 존재하는 무기질이 정확하게 어떤 것인지를 확인할 수는 없었다. 하지만 신체 내에서 나타나는 calcium phosphate 의 형태가 다양하고, 환경이 변화함에 따라 쉽게 변화할 가능성이 있는 것으로 보아서 이번 실험에서 관찰되는 무기질이 DCPD 나 octacalcium phosphate 등의 형태로 존재할 가능성은 충분하다고 할 수 있다. 이러한 무기질은 수산화인회석 결정이 분해되는 과정 중에 관찰되는 결과일 가능성도 있고, 수산화인회석으로 결정이 형성되기 전의 전구체로 존재하는 과정 중에 관찰되었을 가능성도 있다. 본 실험에서 침착 된 calcium phosphate 결정의 특성을 보다 정확히 분석하기 위해서는 X-ray diffraction, FTIR 등의 평가방법이 이후의 실험에서는 추가되어야 할 것이다.

법랑질 인공우식 투과전자현미경 시편에서 관찰되는 무기질의 종류를 구분하는 방법중의 하나는 결정내의 격자간 거리를 측정하는 것이다. Yanagisawa 등에 의하면 일반 수산화인회석의 결정 내의 격자간 거리는 8.17 Å이고 불화인회석의 격자간 거리는 8.12 Å이라 하였고, 이를 통하여 두 결정을 구분하였다 (Yanagisawa and Miake, 2003). 이번 실험에서도 격자간 거리를 측정하려는 시도를 하였으나 실제 측정과정에서 격자간 거리가 일정하게 나오지 않았고 측정된 값도 서로 일치하지 않았다. 이는 시편을 형성하는 법이 법랑질 분말을 통한 방법이기 때문에 결정들이 일정한 평면으로 잘린 것이 아니라 입체적인 모양의 형태가 그대로 전자 빔을 투과했기 때문으로 추정된다. 이는 ultramicrotomy 법을 이용하여 결정에서 일정한 평면으로 절단이 되고 그 균일한 두께와 일정한 평면에서 격자간 거리를 측정하여야 격자간의 거리를 측정할 수 있을 것으로 추정된다.

법랑질 우식 병소의 재광화에 필요한 적절한 불소 농도에 대해서도 많은 논란이 있어왔다. 불소첨가 시 불화인회석의 형성에 의해 유기산에 대해 용해저항성이 증가된다는 사실에는 견해가 일치하나 ten Cate 등은 1 ppm 의 불소첨가 시 불화인회석 침착에 의해 불소가 없는 경우보다 2 배 이상 재광화가 일어났다고

보고한 반면 (Cate and Arends, 1977), Lammers 등은 2 ppm 의 불소 첨가 시 불화인회석의 표면 침착에 의해 무기질의 심부 이동이 차단되어 불소가 없는 경우보다 재석회화가 억제됨을 보고하였다 (Lammers et al., 1990). 그러나, 한 등은 법랑질의 재광화에 불소 농도가 미치는 영향을 평가한 실험에서 1, 2, 4 ppm 중 2 ppm 에서 심부까지 불소가 침착 되어 재광화가 잘 일어난 것을 보고하였다 (한원섭 et al., 1996). 이러한 결과는 각각의 실험 조건이 모두 다르기 때문에 직접적으로 비교할 수는 없다. ten Cate 등은 1 ppm 불소 사용시 효과가 있음을 보고하였고 (ten Cate, 1990), Varughese 등은 0.1 - 2 ppm 불소농도에서 부분적으로 불화된 수산화인회석 결정성장이 촉진된다고 하였으나 (Varughese and Moreno, 1981), Amjad 등은 0.1 - 1 ppm 의 불소수준에서는 재광화가 방해된다고 보고하였다 (Amjad and Nancollas, 1979). 이번 실험에서는 재광화용액이 아니라 탈회 용액 내에 불소가 첨가되어 탈회 작용이 우세하게 진행되었기 때문에 건전 표층이 형성되는 것이 적었고 무기질의 심부이동이 차단될 정도로 많은 양의 불화인회석이 형성되지는 않은 것으로 추측이 된다. 그래서 불소와 무기질의 심부이동이 원활하여 비교적 전층에서 재광화의 효과를 가질 수 있었고 1 ppm 에서 10 ppm 까지 비례적으로 불소의 효과가 나타난 것으로 보인다.

STEM 은 대물렌즈로 시편에 쏘여지는 전자빔을 더욱 집광시키고 좁은 영역으로 퍼지는 투과빔을 검출하여 영상화 시키는 방법이다. 시편의 diffraction pattern 의 차이가 contrast 의 차이로 나타나며 이러한 contrast 의 차이를 이용하여 원소의 위치와 분포를 알 수 있게 된다. 이번 실험에서는 수산화인회석 결정내의 불소의 분포를 측정하기 위하여 STEM 으로 관찰하여 칼슘, 인, 불소가 mapping 된 상을 얻었다(Fig. 15). 이번 실험에서는 불소가 첨가된 군에서 불소가 검출되었지만, 불소가 첨가되지 않은 군에서도 불소가 검출되었다. 이는 불소가 첨가되지 않았더라도 치아에 원래부터 존재하는 불화인회석이 파괴되면서 방출된 불소 이온이 다시 결정형성에 참가하기 때문으로 추측할 수 있다. 그리고 재광화 용액이 아닌 탈회 용액 내에 불소이온이 함유되어 있어 불화인회석의 형성이 STEM 으로 구별될 수 있을 만큼 많이 일어나지 않았음을 의미할 수 있다.

Silverstone 등은 인공우식 형성 시 편광현미경으로 관찰되는 4 개의 zone 을 분리하여 주사전자현미경으로 관찰하여 수산화인회석의 형태와 크기의 차이를

관찰하였다 (Silverstone et al., 1988). 이번 실험의 투과전자현미경 시편형성방법은 법랑질을 분말로 만들어 시편을 제작하였기 때문에 인공우식에서 형성되는 zone 을 정확히 구분하여 관찰할 수 없었다. 본 실험에서는 편광현미경상의 결과로 보아 형성된 대부분의 층이 때문에 결정의 파괴양상이 비슷하지 않았을까 추측이 된다. 이러한 점을 극복하기 위해서는 ultramicrotomy 법을 이용하여 4 가지 층을 정확히 구별할 수 있는 시편을 만들 수 있는 방법을 발전시켜야 한다고 생각한다. 또한 이번 실험에서는 결정파괴의 다양한 단계를 보이는 여러 결정들을 배열하여, 결정 파괴 단계를 추정하였다. 더 정확한 결정 단계 확인을 위하여 한 개의 동일한 시편을 시간을 달리하면서 연속적으로 수산화인회석 결정을 관찰할 수 있는 실험방법의 개발이 필요하다.

제 5 장 결론

본 연구는 불소이온농도를 각각 0, 1, 5, 10 ppm 으로 달리 한 4 가지의 탈회 완충 용액을 이용하여 법랑질 시편을 탈회시키고 탈회된 법랑질 시편을 편광현미경과 디지털 카메라로 촬영한 후에 ImageJ 컴퓨터 프로그램을 통해 정량적으로 깊이를 측정하여 인공우식형성의 특징을 정량적으로 분석하였다. 그리고 탈회 완충 용액 내의 불소이온농도를 0 ppm 과 10 ppm 으로 달리하여 법랑질 시편을 탈회시킨 후, 인공우식부위만을 제거하여 법랑질 분말 시편을 제작하였다. 이를 고해상도 투과전자현미경으로 관찰한 후, 법랑질 수산화인회석 결정의 변화를 정성적으로 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 편광현미경으로 관찰하였을 때, 유산완충용액내의 불소이온농도가 1 ppm 에서 10 ppm 으로 증가할 수록 인공우식병소의 탈회 깊이는 감소하였다 ($p < 0.05$).
2. 유산완충용액으로 인공우식이 형성된 수산화인회석 결정을 투과전자현미경으로 관찰하였을 때, 결정 외벽의 용해가 먼저 일어나 내부파괴를 유발하며, 일단 내부용해가 시작되면 내부가 외부보다 빠른 속도로 진행되어 내부가 비어있는 튜브(hollow tube) 형태가 되는 것이 관찰되었다.
3. 투과전자현미경으로 관찰하였을 때, 수산화인회석 결정이 용해되는 현상이 주로 관찰되지만, 무기질이 새로 침착 되고 용해된 부위가 무기질로 회복되는 재광화 현상도 관찰되었다.
4. 투과전자현미경으로 관찰하였을 때, 불소를 적용한 군에서 수산화인회석 결정이 더 느린 속도로 용해가 일어나는 경향을 보였고, 결정의 크기가 더 크고 더 둥근 형태를 보였다.

참고 문헌

- 권중원, 금기연, 이승중, 정일영, 이찬영. 1999. "고농도의 불소를 포함하는 과포화용액이 apatitic crystal growth 에 미치는 영향". *대한치과보존학회지* 24(2): 330-336.
- 박정원, 허복, 이찬영. 2000. "유기산 완충용액의 포화도가 법랑질 및 상아질의 재광화에 미치는 영향과 수산화인회석의 AFM 관찰". *대한치과보존학회지* 25(3): 461-473.
- 송윤정, 이찬영: 법랑질 표면에서 초기 인공 우식 형성 시 완충용액의 diffusion pathway. 박사학위논문, 연세대학교, 2009.
- 오승연, 정일영, 금기연, 이찬영. 1997. "불소의 농도와 Seed Material 이 Crystal Growth 에 미치는 영향". *대한치과보존학회지* 22(2): 560-574.
- 이정용: 전자현미경 시편 제작. 2000, 명현문화사, 서울.
- 이찬영. 1992. "산 완충용액을 이용한 인공치아우식 형성". *연세치대논문집* 7: 34-40.
- 전영의, 정일영, 노병덕, 이찬영. 2007. "유산 완충용액의 pH 및 포화도 변화에 따른 법랑질 내 수산화인회석 결정 형태의 변화". *대한치과보존학회지* 32(6): 498-513.
- 한원섭, 금기연, 이찬영. 1996. "인공치아우식의 재광화에 미치는 불소의 영향". *대한치과보존학회지* 21(1): 161-173.
- Amjad, Z., Nancollas, G. H. 1979. "Effect of fluoride on the growth of hydroxyapatite and human dental enamel". *Caries Res* 13(5): 250-258.
- Cate, J. M., Arends, J. 1977. "Remineralization of artificial enamel lesions in vitro". *Caries Res* 11(5): 277-286.
- Cuisinier, F. J., Steuer, P., Senger, B., Voegel, J. C., Frank, R. M. 1992. "Human amelogenesis. I: High resolution electron microscopy study of ribbon-like crystals". *Calcif Tissue Int* 51(4): 259-268.
- Daculsi, G., Kerebel, L., Kerebel, B. 1981. "Effects of fluoride on human enamel and selachian enameloid in vitro: A high-resolution TEM and electron diffraction study". *Calcified Tissue International*.

- Daculsi, G., Menanteau, J., Kerebel, L. M., Mitre, D. 1984. "Length and shape of enamel crystals". *Calcified Tissue International* 36(5): 550–555.
- Darling, A. I. 1956. "Studies of the Early Lesion of Enamel Caries with Transmitted Light, Polarised Light and Radiography". *Brit dent J* 101: 289–341.
- Dean, H. T. 1947. "Fluorine and dental caries". *Am J Orthod* 33(2): 49–67.
- Featherstone, J. D., Cussler, E. L. 1987. "Subsurface demineralization in porous apatite–gel suspensions". *Caries Res* 21(6): 494–501.
- Featherstone, J. D., ten Cate, J. M., Shariati, M., Arends, J. 1983. "Comparison of artificial caries–like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles". *Caries Res* 17(5): 385–391.
- Haikel, Y., Frank, R. M., Voegel, J. C. 1983. "Scanning electron microscopy of the human enamel surface layer of incipient carious lesions". *Caries Res* 17(1): 1–13.
- Hayashi, Y. 1995. "High resolution electron microscopy of enamel crystallites demineralized by initial dental caries". *Scanning Microsc* 9(1): 199–205; discussion 205–196.
- Holmen, L., Thylstrup, A., Featherstone, J. D., Fredebo, L., Shariati, M. 1985. "A scanning electron microscopic study of surface changes during development of artificial caries". *Caries Res* 19(1): 11–21.
- Koulourides, T. 1982. "Increasing tooth resistance to caries through remineralization". *Foods Nutr. Dent Hlth* 2.
- Lammers, P. C., Borggreven, J. M., Driessens, F. C. 1990. "Influence of fluoride on in vitro remineralization of artificial subsurface lesions determined with a sandwich technique". *Caries Res* 24(2): 81–85.
- LeGeros, R. J.: Calcium phosphates in oral biology and medicine. 1991, Karger.
- Margolis, H. C., Moreno, E. C. 1985. "Kinetic and thermodynamic aspects of enamel demineralization". *Caries Res* 19(1): 22–35.

- Margolis, H. C., Moreno, E. C., Murphy, B. J. 1986. "Effect of low levels of fluoride in solution on enamel demineralization in vitro". *J Dent Res* 65(1): 23–29.
- Marshall, A. F., Lawless, K. R. 1981. "TEM study of the central dark line in enamel crystallites". *J Dent Res* 60(10): 1773–1782.
- Mellberg, J. R., Chomiccki, W. G. 1983. "Fluoride uptake by artificial caries lesions from fluoride dentifrices in vivo". *J Dent Res* 62(5): 540–542.
- Moreno, E. C., Margolis, H. C. 1988. "Composition of human plaque fluid". *J Dent Res* 67(9): 1181–1189.
- Moreno, E. C., Zahradnik, R. T. 1974. "Chemistry of enamel subsurface demineralization in vitro". *J Dent Res* 53(2): 226–235.
- Nelson, D. G., Barry, J. C. 1989. "High resolution electron microscopy of nonstoichiometric apatite crystals". *Anat Rec* 224(2): 265–276.
- Nikiforuk, G.: Formation, structure, and metabolism of dental plaque, Understanding dental caries Vol.1 Etiology and Mechanism. 1985, Karger.
- Nylen, M. U., Eanes, E. D., Omnell, K. A. 1963. "Crystal growth in rat enamel". *J Cell Biol* 18: 109–123.
- Rey, C., Shimizu, M., Collins, B., Glimcher, M. J. 1990. "Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy study of the environment of phosphate ions in the early deposits of a solid phase of calcium-phosphate in bone and enamel, and their evolution with age. I: Investigations in the ν_4 PO₄ domain". *Calcif Tissue Int* 46(6): 384–394.
- Silverstone, L. M. 1967. "Observations on the dark zone in early enamel caries and artificial caries-like lesions". *Caries Res* 1(3): 260–274.
- Silverstone, L. M. 1977. "Remineralization phenomena". *Caries Res* 11 Suppl 1: 59–84.

- Silverstone, L. M., Hicks, M. J., Featherstone, M. J. 1988. "Dynamic factors affecting lesion initiation and progression in human dental enamel. Part I. The dynamic nature of enamel caries". *Quintessence Int* 19(10): 683–711.
- Silverstone, L. M., Wefel, J. S., Zimmerman, B. F., Clarkson, B. H., Featherstone, M. J. 1981. "Remineralization of natural and artificial lesions in human dental enamel in vitro. Effect of calcium concentration of the calcifying fluid". *Caries Res* 15(2): 138–157.
- ten Cate, J. M. 1990. "In vitro studies on the effects of fluoride on de- and remineralization". *J Dent Res* 69 Spec No: 614–619; discussion 634–616.
- ten Cate, J. M., Arends, J. 1980. "Remineralization of artificial enamel lesions in vitro: III. A study of the deposition mechanism". *Caries Res* 14(6): 351–358.
- ten Cate, J. M., Duijsters, P. P. 1982. "Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions". *Caries Res* 16(3): 201–210.
- Tohda, H., Fejerskov, O., Yanagisawa, T. 1996. "Transmission electron microscopy of cementum crystals correlated with Ca and F distribution in normal and carious human root surfaces". *Journal of Dental Research* 75(3): 949–954.
- Tohda, H., Takuma, S., Tanaka, N. 1987. "Intracrystalline structure of enamel crystals affected by caries". *J Dent Res* 66(11): 1647–1653.
- Tung, M. S., Tomazic, B., Brown, W. E. 1992. "The effects of magnesium and fluoride on the hydrolysis of octacalcium phosphate". *Arch Oral Biol* 37(7): 585–591.
- Varughese, K., Moreno, E. C. 1981. "Crystal growth of calcium apatites in dilute solutions containing fluoride". *Calcif Tissue Int* 33(4): 431–439.
- Voegel, J. C., Frank, R. M. 1977. "Stages in the dissolution of human enamel crystals in dental caries". *Calcif Tissue Res* 24(1): 19–27.

- Wang, L., Tang, R., Bonstein, T., Orme, C. A., Bush, P. J., Nancollas, G. H. 2005. "A new model for nanoscale enamel dissolution". *J Phys Chem B* 109(2): 999–1005.
- Warshawsky, H., Nanci, A. 1982. "Stereo electron microscopy of enamel crystallites". *J Dent Res Spec No*: 1504–1514.
- Yanagisawa, T., Miake, Y. 2003. "High-resolution electron microscopy of enamel-crystal demineralization and remineralization in carious lesions". *J Electron Microsc (Tokyo)* 52(6): 605–613.
- Yanagisawa, T., Takuma, S., Tohda, H., Fejerskov, O., Fearnhead, R. W. 1989. "High resolution electron microscopy of enamel crystals in cases of human dental fluorosis". *J Electron Microsc (Tokyo)* 38(6): 441–448.

Abstract

Artificial caries formation and change of configuration of hydroxyapatite crystals in dental enamel by fluoride ion in lactic acid buffer solution

Gu Yong Han, 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., D.D.S.C.)

The initial enamel caries lesion is a dynamic process in which both demineralization and remineralization occur simultaneously. Through a number of different mechanisms, fluoride promotes remineralization of the carious enamel to delay the initial carious lesions and contributes to the healing of lesion. It is important to understand the lesion formation process and the exact mechanism of action of fluoride for healing of early carious lesions. Especially it is of great interest to study the destruction process of the single crystal of hydroxyapatite and the fluoride effect on hydroxyapatite crystals.

In this study, thin enamel specimens were demineralized under acid buffer solutions having different concentrations of fluoride ions with 0, 1, 5, 10 ppm, respectively. Demineralized enamel specimens were observed with polarized light microscopy and photographed. The characteristics of artificial caries formation were analyzed quantitatively by measuring the demineralization depth using ImageJ computer software. Secondly, thin enamel specimens were demineralized under acid buffer solutions with or without 10 ppm of fluoride ion. The powdered enamel was obtained from demineralized enamel specimens and the changes of hydroxyapatite crystal shape were observed by HRTEM (high

resolution transmission electron microscope). The following results were obtained.

1. When examined by polarized light microscopy, the demineralization depth of artificial caries lesion was reduced by the fluoride ion dose-dependently in acid buffer solutions from 1 ppm to 10 ppm ($p < 0.05$).
2. When hydroxyapatite crystals in which artificial caries was formed under an acid buffered solution were observed by transmission electron microscopy, the dissolution of the outer wall of the crystals occurred before the internal dissolution, causing an internal destruction. Once internal dissolution started, it progressed faster than the outside and the shape of crystals changed into hollow tube.
3. When examined by transmission electron microscopy, mainly observed phenomenon was that hydroxyapatite crystals were destroyed, but new mineral deposits and mineral recovery of damaged parts were also observed as a remineralization process.
4. When observed by transmission electron microscopy, hydroxyapatite crystals to which fluoride was applied tend to be destroyed at a slower rate and their grain size was larger and more rounded shape.

From the above results, it was found that demineralization progression is slowed by fluoride's increasing mineral deposition on the surface of hydroxyapatite crystals and it was also observed that the dissolution of the outer wall of the crystals arose before the internal dissolution, causing an internal destruction. Once internal dissolution starts, it progressed faster than the outside.

key words : enamel, hydroxyapatite, transmission electron microscope, fluoride