

법랑질 인공 우식 병소의 재석회화

부산대학교 치과대학 보존학교실*
부산대학교 치과대학 소아치과학교실**
허 복* · 김 신**

Abstract

REMINERALIZATION OF ARTIFICIAL ENAMEL CARIOUS LESIONS

Bock Hur*, Shin Kim**

* *Department of Conservative dentistry, College of dentistry, Pusan National University*

** *Department of Pediatric dentistry, College of dentistry, Pusan National University*

In order to investigate the effects of continuous and pH cyclic remineralization, artificial enamel carious lesions were produced on sections of about 2mm thickness of bovine incisor. 0.1M lactic acid solution adjusted to a pH of 4.3 and saturation of 2.98×10^{-8} was used as demineralizing solution.

The lesions were remineralized with the solution of pH 7.0 containing 1.5mM $CaCl_2$, 0.9 mM KH_2PO_4 , and 20mM HEPES. In continuous remineralization procedure, the specimens were immersed in remineralizing solution continuously for 72 hours. In pH cyclic remineralization procedure, the sections were immersed in remineralizing solution for 6 hours and in demineralizing solution for 20 minutes alternately during 72 hours. The effect of remineralization was determined by polarizing microscopy and electron microprobe analysis.

The obtained results were as follows.

1. In case of continuous remineralization, the lesion depth was reduced partially or unchanged.
2. In pH cyclic condition, the thickness of surface layer and the lesion depth were increased simultaneously.
3. The mineral content of lesion was recovered to the level of sound enamel by remineralization.

I. 서 론

구강내에서 법랑질은 조건에 따라 무기질의 소실과 침착이 반복되는 환경에 놓여있다. 이러한 환경하에서 무기질의 소실이 우세하면 우식병소가 형성되지만 구강내에서 일방적인 탈회과정만 진행되는 것은

아니다. 따라서 적합한 조건하에서는 무기질의 침착이 가능하며 이러한 예로서 미성숙 영구치 법랑질의 성숙화와 초기법랑질 우식병소의 재석회화를 들 수 있다^{1,2)}. 초기 법랑질 우식병소를 조기에 발견하여 이를 재석회화 시킬 수 있다면 우식발생에 대처할 수 있는 효과적인 방법이 될 수 있기 때문에

* 이 논문은 1992년도 부산대학교연구소 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

이에 관하여 많은 연구가 진행되어 왔다. 그 내용을 살펴보면 재석회화가 가능한 조건들, 즉 재석회화 용액의 조성, pH, 온도 및 시간에 관한 것들이 대부분을 차지하고 있다.

한편 재석회화 실험은 생체내와 생체외에서 모두 가능하며 이 중에서 생체내의 조건이 그대로 이용될 수 있는 방법이 효과적일 수도 있다. 그러나 우식 병소의 형성과 함께 재석회화도 물리화학적인 반응이기 때문에 이에 관여하는 요소들을 평가하기 위해서는 생체외에서 시행하는 것이 효과적이다.

또한 구강내에서의 환경을 재현하기 위하여 재석회화 과정과 함께 탈회의 과정도 순환적으로 일어나도록 하는 방법이 근래에 많이 시행되고 있다. 이와 함께 인간의 치아를 이용할 경우에는 건전한 치아를 수집하는 데에 한계가 있으므로 이를 대체하기 위하여 bovine tooth의 법랑질을 사용하는 방법^{3,4)}도 사용되고 있다.

이러한 내용을 토대로 bovine tooth의 법랑질에 초기 인공우식 병소를 형성하고 구강내와 유사한 조건하에서 재석회화를 시도하여 그 효과를 편광현미경 관찰과 electron microprobe analysis에 의해 파악하고자 하였다.

II. 연구방법

1) 법랑질 절편의 준비

우식이나 형성과정의 부진, 파절 등 치질의 결손이 없는 건전한 bovine incisor tooth 30개를 선택하여 절편의 제작이 용이하도록 각 치아의 치근을 acrylic resin block에 매몰하였다. 연마지를 이용하여 순면의 요철을 제거한 후 diamond disk로 치아의 장축에 평행하게 순설방향으로 절단하여 각 치관당 약 2mm두께의 절편을 3개씩 제작하였다. 제작된 절편의 순면법랑질 중앙부에서 약 2mm×4mm 정도의 부위를 제외하고 나머지 표면에 nail varnish를 도포하여 window를 형성하였다.

2) 인공우식의 유발

초기 법랑질 우식병소인 표층하병소를 형성하기 위해서 pH 4.3, 법랑질에 대한 포화도가 2.98×10^{-6} 인 0.1M의 lactic acid 용액을 사용하였다. pH는 5% NaOH로, 포화도는 13.04mM의 CaCl₂와 7.49mM의

KH₂PO₄로 조절하였다. 이와 같이 제조된 우식유발 용액 10ml당 절편 1개씩 침적시킨 후 32시간 동안 25°C의 항온기에 보관하여 병소를 형성하였다.

3) 우식병소의 재석회화

우식이 유발된 절편들을 초음파로 세정한 후 건조시켜서 재석회화 과정에 사용하였다. 이때 3가지 실험조건마다 동일 치관에서 제작한 절편 3개중의 1개씩을 사용하여 가급적 시편간의 오차가 없도록 하였다. 한편, 동일 절편상에서 병소와 재석회화가 진행된 부위를 동시에 관찰할 수 있도록 하기 위하여 병소가 형성된 2mm×4mm의 window중 절편을 재석회화에 사용하였다. 즉, 절단면쪽 2mm×2mm부위에 재차 nail varnish를 도포하여 기 형성된 병소 부위가 재석회화 용액에 접촉되지 않도록 하였다.

포화도는 1.5mM의 CaCl₂와 0.9mM의 KH₂PO₄로, pH는 10M의 KOH로 조절하였으며 용액내에서의 침전을 방지하기 위해 20mM의 HEPES를 첨가한 용액을 재석회화에 사용하였다.

가. 대조군

10개의 절편을 탈이온 증류수에 침적시켜 37°C로 72시간동안 보관하였다.

나. 지속적 재석회화

10개의 절편을 재석회화 용액에 침적시켜 37°C로 72시간동안 보관하였으며 용액은 24시간마다 교체하였다.

다. 탈회와 재석회화의 순환적용

10개의 절편을 6시간동안 재석회화 용액에, 그후 20분간은 우식유발 용액에 침적시키는 과정을 72시간동안 순환적용 하였다. 이때 각 과정의 종료후에는 탈이온 증류수로 충분히 세척하였다.

4) 비탈회 박절연마표본의 제작

회수된 절편들을 epoxy resin 접착제로 slide glass에 부착시킨 후, 연마와 활택과정을 거쳐 약 40μm두께의 표본을 제작하였다.

5) 우식병소와 재석회화의 평가

가. 편광현미경 관찰

+90° 교차편광하에서 Gypsum plate red I을 삽입하고 병소와 재석회화 부위를 공기와 물에 침윤된 상태로 125배의 배율로 관찰하였다.

나. Electron microprobe analysis

accelerating voltage는 15KV, current는 1.5×10^{-8} A, beam diameter 5 μ m의 조건하에서 법랑질의 표면으로부터 내부의 방향으로 건진한 법랑질, 병소 부위 및 재석회화 부위를 측정하였다. 이때 표준결정으로서 CaO : 55.81wt%, P₂O₅ : 42.52wt%, H₂O : 1.8wt%인 apatite를 이용하였다.

III. 연구결과

1) 편광현미경 소견

우식병소의 양상을 관찰한 결과 전형적인 초기 법랑질 우식병소인 표층하 병소가 형성된 것을 관찰할 수 있었으며 시편에 따라서는 표층이 부분적으로 형성된 경우도 있었다. 이때 표층은 부분적인 황색으로, 병소본체에 해당하는 부위는 짙은 갈색으로 나타났다. 한편 대조군의 양상은 우식병소와 별다른 차이가 없었다.

동일 시편상에 형성된 우식병소와 재석회화가 진행된 부위를 비교한 결과는 다음과 같다.

가. 지속적 재석회화

병소부위는 표층의 형성이 다소 분명하지 않으나 표층하 병소의 양상을 보였다. 그리고 재석회화 부위에서는 선명한 황색의 표층과 함께 병소본체의 범위가 축소된 양상이 관찰되었으며 병소의 전방에 해당되는 부분이 황색으로 변화된 것을 볼 수 있었다(그림 1-A, B).

또한 병소폭의 변화는 없이 재석회화 부위에서 표층의 형성만 더욱 뚜렷해진 경우도 있었다(그림 2-A, B).

나. 탈회와 재석회화의 순환적용

병소부위에 비해 표층은 더 뚜렷하나 병소폭의 변화는 없었고 병소본체 부위에서는 탈회가 더 진행된 양상이었다(그림 3-A, B).

한편 지속적으로 재석회화를 시도한 경우보다 표층이 더 두껍게 형성되었으나 동시에 병소전체의 폭이 증가한 경우도 관찰되었다(그림 4-A, B).

2) Electron microprobe analysis 결과

가. 정상 법랑질

표면하 10 μ m깊이에서 20 μ m간격으로 190 μ m깊이까지 Ca와 P의 함량을 측정한 결과, Ca인 경우 30

μ m부위, P인 경우에는 10 μ m부위를 제외하고 깊이 관계없이 비교적 균일한 것으로 나타났다(그림 5).

나. 지속적 재석회화

병소부위는 표면에서 약 60 μ m깊이까지 정상법랑질에 비해 무기질의 함량이 낮았으며 재석회화 부위는 Ca의 함량이 정상법랑질의 수준으로 회복되었으나 P의 함량은 10 μ m부터 85 μ m 사이가 정상보다 낮았다(그림 6, 7).

또한 병소부위의 무기질 소실량이 많지 않으며 재석회화 후에는 표면에서 약 50 μ m깊이까지 특히 Ca의 함량이 정상법랑질의 수준 이상으로 회복된 경우도 있었다(그림 8, 9).

다. 탈회와 재석회화의 순환적용

60 μ m깊이에서 재석회화 부위의 Ca 함량이 병소부위보다 약간 낮은 것을 제외하고 병소부위와 재석회화 부위가 별다른 차이를 보이지 않았다. 그리고 재석회화 부위에서 Ca는 90 μ m깊이까지, P는 50 μ m깊이까지의 부위가 정상법랑질에 비해 낮았다(그림 10, 11).

한편 병소부위와 재석회화 부위를 비교하였을 때 표면에서 25 μ m깊이까지에서 병소부위의 무기질함량이 약간 낮았으나 그외의 부분에서는 차이가 없었으며 정상법랑질 수준의 무기질함량을 나타내는 경우도 있었다.

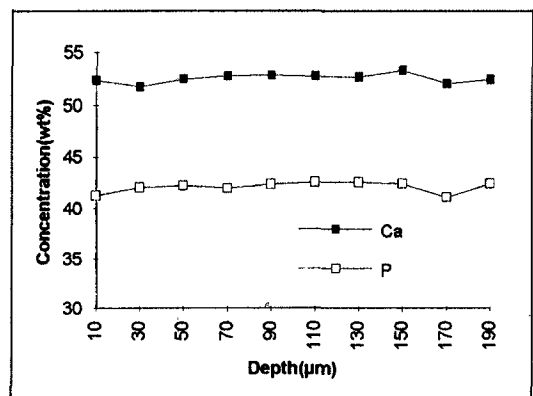


Fig. 5. Ca and P concentrations of sound enamel.

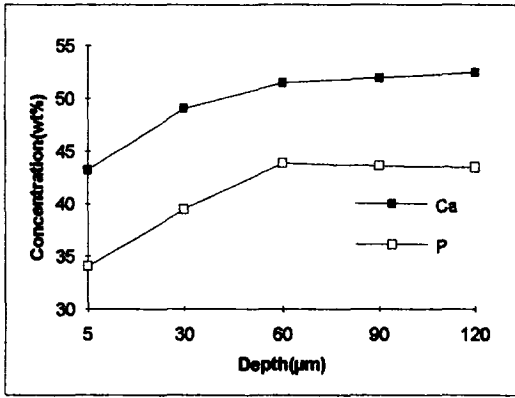


Fig. 6. Ca and P concentrations of polarized view 1-A specimen.

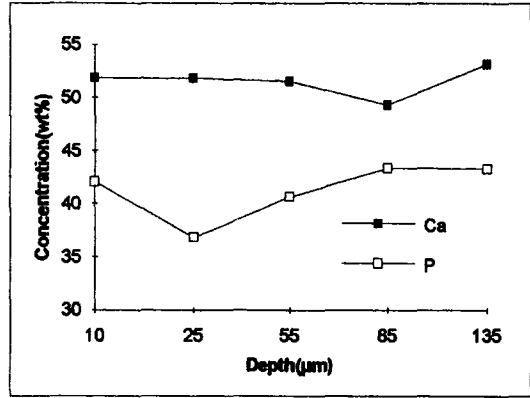


Fig. 7. Ca and P concentrations of polarized view 1-B specimen.

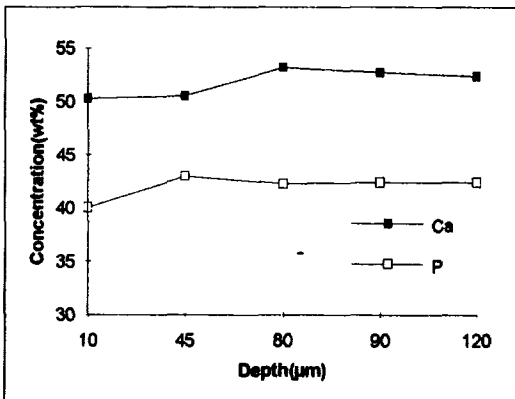


Fig. 8. Ca and P concentrations of polarized view 2-A specimen.

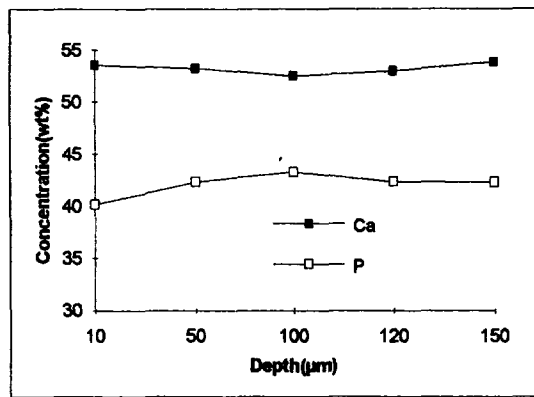


Fig. 9. Ca and P concentrations of polarized view 2-B specimen.

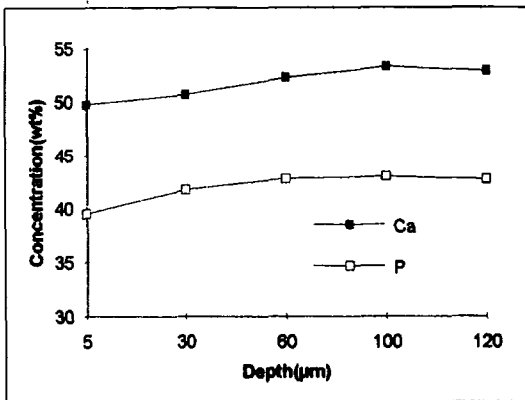


Fig.10. Ca and P concentrations of polarized view 3-A specimen.

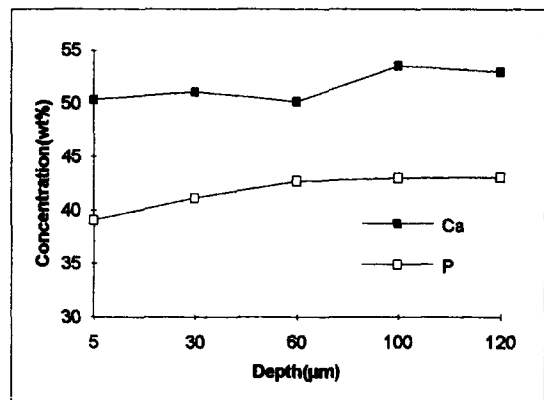


Fig.11. Ca and P concentrations of polarized view 3-B specimen.

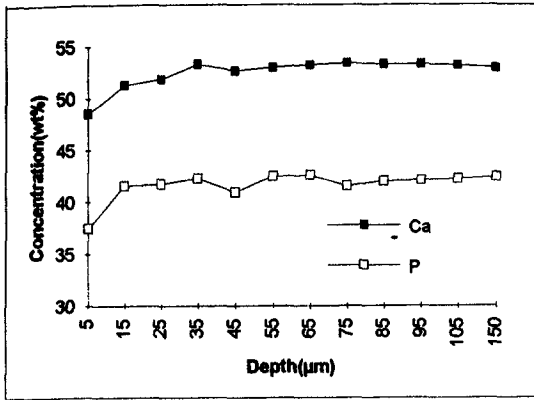


Fig.12. Ca and P concentrations of polarized view 4-A specimen.

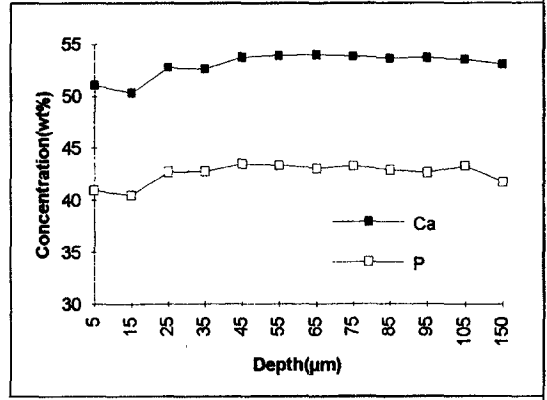


Fig.13. Ca and P concentrations of polarized view 4-B specimen.

IV. 고 찰

법랑질은 맹출후에도 지속적으로 prism과 prism 사이에 존재하는 pore를 통해서 무기질의 이동이 일어나며 이때 무기질의 침착이 진행되면 성숙화되지만 무기질의 소실이 우세하면 우식병소가 형성된다. 법랑질의 성숙화는 재석회화의 전형적인 예이며 성숙화된 법랑질은 산에 대한 용해도가 낮아서 우식발생이 저지된다⁵⁾.

초기 법랑질 우식병소의 특징인 표층하 탈회 는 우식이 시작되면서 초기에는 무기질이 소실되는 과정이 표층부에서 내부로 일어나지만 병소의 형성과정이 진행되면서 석회화도가 높은 표층이 형성되고 표층하부에 탈회부위가 나타나는 매우 흥미로운 현상이다. 따라서 표층이 형성되는 기전에 관하여 다수의 이론이 소개되어 있으나 일반적으로 내부에서 용해된 무기질이 농도의 차이에 의해 외부로 확산되는 과정에서 물리화학적 기전에 의해 재침착이 일어난다는 견해가 지배적이다^{6,7)}.

법랑질 초기 우식 병소의 재석회화에 관여하는 요소로는 재석회화 용액의 무기질 농도, pH, 온도, 불소의 첨가유무 및 재석회화에 소요된 시간 등을 열거할 수 있다.

일반적으로 무기질의 농도가 높으면 표층부에 국한해서 무기질의 침착이 일어나기 때문에 1mM 전후의 농도가 적당한 것으로 알려져 있다^{8,9)}. 또한 재석회화 용액내의 무기질 농도가 항상 일정하게

유지되도록 하기 위하여 감소된 농도만큼 보충해주는 constant composition 방법^{10,11)}도 이용되고 있다.

그리고 재석회화에 적합한 pH는 무기질의 침착이 가능하며 법랑질의 용해가 일어나지 않는 pH 6-8이 적당하므로 대체로 pH 7.0의 용액을 이용하고 있다¹²⁾. 그러나 재석회화 용액내에서의 phosphate는 $H_2PO_4^-$, $H_2PO_4^-$, 또는 HPO_4^{2-} 의 형태를 취하고 있지만 법랑질내에서 재석회화가 진행되면 $10Ca^{++} + 3HPO_4^{2-} + 3H_2PO_4^- + 2H_2O \rightarrow 2Ca_5(PO_4)_3OH + 11H^+$ 가 되므로 apatite가 형성되면서 PO_4^{3-} 의 형태를 취하게 되며 이때 H^+ 이 유리되어 법랑질 내부에서는 pH가 낮아진다고 하였다¹³⁾. 본 실험에서는 법랑질 내부의 pH를 측정하지 않았으므로 이를 직접 확인하지 못하였지만 지속적 재석회화가 적용된 시편에서 표층과 재석회화된 병소의 전방과의 사이에 탈회가 더 진행된 양상을 보이는 것(그림 2-B)과 pH cycling에 의한 재석회화 실험에서 병소의 범위가 확대된 것(그림 4-B)으로 미루어 이러한 주장에 타당성이 있다고 생각된다.

한편 구강내에서의 환경과 유사하게 하기 위하여 pH의 cycling을 적용하는 방법이 근래에 많이 사용되고 있다. 그러나 재석회화 도중에 낮은 pH의 용액에 침적시키는 시간과 빈도는 학자에 따라 상이하다. pH cycling의 효과에 관하여 조사한 ten cate와 Duijsters¹⁴⁾에 의하면 지속적으로 재석회화 시킨 경우보다 pH의 변화를 부여한 경우에 미세경도를 측

정한 결과 더 낮다고 하였다. 생체내에서 plaque의 유기산이 제거되거나 중화된 후에도 법랑질 내부에서는 낮은 pH가 어느정도 지속된다는 견해¹⁵⁾와 Robinson등¹⁶⁾의 견해 및 Stephan curve에 의하면 10% glucose rinse후 20분 정도까지 가장 낮은 pH를 보인다¹⁷⁾는 주장을 기초로 하여 낮은 pH의 조건을 부여하기 위하여 병소형성에 사용한 용액에 24시간당 20분간씩 3회 침적시키는 방법을 사용하였다.

그리고 재석회화 조건들 중에서 가장 연구가 활발하고 논란이 많은 것이 불소의 첨가 유무이다. 이에 관해서는 불소의 첨가에 의해 재석회화의 효과가 증가된다는 주장¹⁸⁾과 fluoroapatite의 표면침착에 의해 무기질의 심부이동이 차단되기 때문에 오히려 병소전체의 재석회화에는 방해가 된다는 주장¹⁹⁾이 있다. 그러나 fluoroapatite의 형성에 의해 유기산에 대한 용해저항성이 증가된다는 사실에는 견해가 일치되고 있다.

또한 재석회화에 필요한 시간에 관하여서도 논란이 있다. Buskes등²⁰⁾은 bovine incisor인 경우에 360시간이 적당하다고 하였으나 Rooij와 Nancollas¹¹⁾는 Ca와 P의 흡수가 초기에는 급격히 일어나지만 10-15시간 후에는 정체된다고 하였으며 ten Cate와 Duijsters¹⁴⁾는 3일째부터 무기질 침착이 감소된다고 하였다. 그리고 장기간에 걸친 경우에는 용해도가 높고 결합이 있는 결정이 형성된다는 견해²¹⁾도 있다.

편광현미경으로 관찰한 소견에서는 재석회화 부위의 표층이 뚜렷해지거나(그림 1-B, 2-B, 3-B) 혹은 두꺼워진 양상(그림 4-B)을 볼 수 있었으나 병소의 전방부위가 재석회화 되어(그림 4-B) 병소본체의 크기가 다소 축소되었을 뿐 병소전체가 재석회화된 양상은 볼 수 없었다. 이러한 결과는 재석회화 과정에서 표층에 침착된 결정의 크기가 커지고²²⁾ 결정 사이의 확산통로가 축소되어 내부로의 무기질 침투가 점차 차단되었기 때문인 것으로 추정된다. 한편 재석회화 시편을 편광현미경으로 관찰할 때 탈회가 진행된 것으로 볼 수 있는 부분의 무기질함량이 정상법랑질에 비해 큰 차이를 보이지 않는 것은 무정형 무기질의 침착이 일어난 때문인 것으로 추정된다. 또한 표층이 형성된 부분의 무기질함량이 정상법랑질보다 낮은 것은 ten Cate와 Rempt²³⁾의 결과와 같이 균일하게 표층이 형성되는 것이 아니고 부분적인 무기질의 재침착과 소실이 복합되어 나타났기 때문

이라고 생각된다.

따라서 본 실험에서 사용한 조건하에서는 병소 깊이의 감소와 표층 두께의 증가 그리고 무기질함량의 회복과 같은 결과에 의해 부분적으로만 재석회화의 효과를 확인할 수 있었을 뿐이었고 병소전체의 완전한 회복은 일어나지 않았으므로 재석회화 조건에 관한 계속적인 연구가 필요하다. 그리고 편광현미경 소견과 electron microprobe analysis결과의 차이를 규명하기 위해서는 x-선 회절법에 의한 결정학적 연구도 필요하다고 생각된다.

V. 결 론

Bovine incisor의 법랑질 절편에 초기 우식 병소를 형성한 후 지속적 재석회화법과 재석회화와 탈회의 순환적용법에 의한 재석회화를 시도한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 지속적으로 재석회화한 경우에는 병소의 깊이에 변동이 없거나 부분적으로 축소되었다.
2. 재석회화의 탈회를 순환적용한 경우에는 표층이 두껍게 형성되었으나 병소의 폭이 증가하였다.
3. 재석회화 과정에서 병소의 무기질의 함량이 정상법랑질과 유사한 수준으로 회복되었다.

참 고 문 헌

1. Dirks, O. B. : Post-eruptive changes in dental enamel. *J Dent Res* 45(supp. no.3) : 503, 1966.
2. Arends, J. and ten Bosch, J. J. : In vivo de- and remineralization of dental enamel. in *Factors relating to demineralisation and remineralisation of the teeth.*, p.1, IRL Press, 1986.
3. Featherstone, J. D. B. and Mellberg, J. R. : Relative rates and progress of artificial carious lesions in bovine, ovine and human enamel. *Caries Res* 15 : 109, 1981.
4. Arends, J. et al. : Influence of fluoride concentration on the progress of demineralization in bovine enamel at pH 4.5. *Caries Res* 17 : 455, 1983.
5. Koizumi, T. et al. : Maturation of enamel apatite. *Pediatric Dent J* 1 : 67, 1991.

6. Moreno, E. C. and Zahradnik, R. T. : Chemistry of enamel subsurface demineralization in vitro. *J Dent Res* 53(supp. no.2) : 226, 1974.
7. Arends, J. and Christoffersen, J. : The nature of early caries lesions in enamel. *J Dent Res* 65 : 2, 1986.
8. Zimmerman, B. et al. : The effect of calcium concentration on remineralization of enamel lesions. *J Dent Res* 57(special issue A) : 182, 1978.
9. Silverstone, L. M. et al. : Remineralization of natural and artificial lesions in human dental enamel in vitro. *Caries Res* 15 : 138, 1981.
10. Amjad, Z. et al. : The mineralization of enamel surfaces. A constant composition kinetics study. *J Dent Res* 60 : 1783, 1981.
11. de Rooij, J. F. and Nancollas, G. H. : The formation and remineralization of artificial white spot lesions : A constant composition approach. *J Dent Res* 63 : 864, 1984.
12. Featherstone, J. D. B., Rodgers, B. E. and Smith, M. W. : Physicochemical requirements for rapid remineralization of early carious lesions. *Caries Res* 15 : 221, 1981.
13. Larsen, M. J. and Fejerskov, O. : Chemical and structural challenges in remineralization of dental enamel lesions. *Scand J Dent Res* 97 : 285, 1989.
14. ten Cate, J. M. and Duijsters, P. P. E. : Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. *Caries Res* 16 : 201, 1982.
15. Briner, W. W., Gray, J. A. and Francis, M. D. : Significance of enamel remineralization. *J Dent Res* 53 : 226, 1974.
16. Robinson, C. et al. : A flexible and rapid pH cycling procedure for investigation into the remineralization and demineralization behaviour of human enamel. *Caries Res* 26 : 14, 1992.
17. Nikiforuk, G. : Understanding dental caries. p. 152, Karger, 1985.
18. ten Cate, J. M. and Arends, J. : Remineralization of artificial enamel lesions in vitro. *Caries Res* 11 : 277, 1977.
19. Lammers, P. C., Borggreven, J. M. P. M. and Driessens, F. C. M. : Influence of fluoride on in vitro remineralization of artificial subsurface lesions determined with a sandwich technique. *Caries Res* 24 : 81, 1990.
20. Buskes, J. A. K. M., Christoffersen, J. and Arends, J. : Lesion formation and lesion remineralization in enamel under constant composition conditions. *Caries Res* 19 : 490, 1985.
21. Pearce, E. I. F. and Moore, A. J. : Remineralization of softened bovine enamel following treatment of overlying plaque with a mineral-enriching solution. *J Dent Res* 64 : 416, 1985.
22. Okazaki, T. A., Takahasi, J. and Moriwaki, Y. : X-ray diffraction study on remineralization using synthetic hydroxyapatite pellets. *Caries Res* 12 : 223, 1978.
23. ten Cate, J. M. and Rempt, H. E. : Comparison of the in vivo effect of a 0 and 1,500ppmF MFP toothpaste on fluoride uptake, acid resistance and lesion remineralization. *Caries Res* 20 : 193, 1986.

사진부도



Fig. 1. Control lesion(A) and remineralized area(B) of specimen in the condition of continuous remineralization.

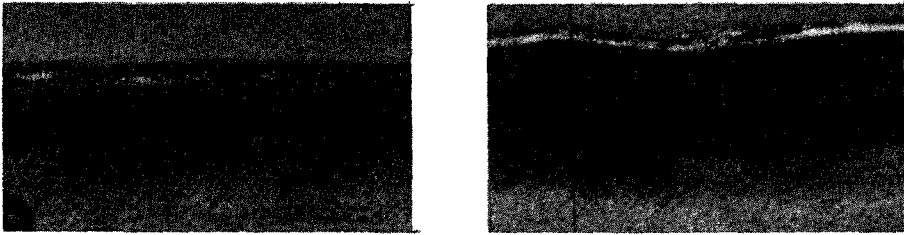


Fig. 2. Control lesion(A) and remineralized area(B) of specimen in the condition of continuous remineralization.

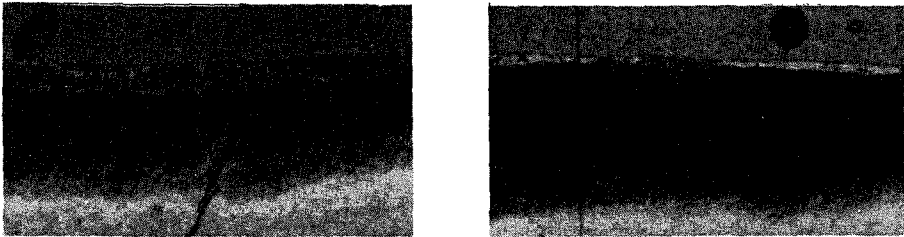


Fig. 3. Control lesion(A) and remineralized area(B) of specimen in the condition of cyclic remineralization.



Fig. 4. Control lesion(A) and remineralized area(B) of specimen in the condition of cyclic remineralization.