

치아우식감수성과 타액내 Lysozyme, Lactoferrin 및 Streptococcus mutans에 대한 secretory IgA 수준과의 상관관계에 관한 연구

서울대학교 치과대학 치과보존학교실

유현미 · 권혁춘

목 차

- I. 서 론
- II. 실험재료 및 방법
- III. 실험 성적
- IV. 총괄 및 고안
- V. 결 론
- VI. 참고 문헌
영문 초록

I. 서 론

치아우식증은 치아의 경조직을 용해하고 파괴하는 감염성 질환이다. 치아우식증을 일으키는 원인은 여러 요인들이 복합적으로 작용하지만, 구강내 환경을 이루는 요소중의 하나인 타액도 중요한 연구대상이 된다.

일반적으로 타액은 구강내의 수분을 의미하며, 이러한 수분은 각각의 타액분비선에서 나온 분비액에 음식물의 잔사와 미생물, 구강내 상피탈락세포등이 혼합된 상태이다. 타액에 대한 좀 더 엄밀한 정의는 이하선, 악하선, 설하선의 3대 타액선과 구개, 볼 그리고 입술등의 점막에 분포하는 소타액선에서 분비되는 분비액을 의미한다¹⁾. 각 분비선에서 형성되어 분비된 타액은 구강내에서 혼합되며 이러한 타액을 혼합타액 또는 전타액이라한

다. 전타액은 무색이고 유백광을 나타내며 약간의 거품과 점도를 지니는 액체이다. 이하선 타액은 묽고 맑으며, 악하선, 설하선, 소타액선의 타액은 탁하고 점도가 높다. 전타액의 점도는 여러 타액선에서 타액이 분비되는 비율에 따라 다르게 된다. Schneyer²⁾는 3대 타액선에서 분비되는 타액의 상대 점도는 이하선타액 1.5, 악하선타액 3.4, 설하선타액 13.4정도라고 하였으며 타액내의 미생물 조성은 혀에서 발견되는 것들과 유사하고, 그람 양성 facultative cocci가 주종을 이루고있다. 타액내에 존재하는 주된 세균은 주로 혀에서 나오며 치은연하 및 치은연상 치면세균막에서도 어느 정도 나온다. 타액내에서 분리되는 균들중 반 정도가 streptococci이며 그중 Streptococcus salivarius의 비율이 높은 편이다. 이 외에도 Peptostreptococcus, Veillonella, Neisseria, Corynebacterium, Actinomyces, Fusobacterium과 Bacteroides 등이 관찰된다. 타액의 여러 구성성분은 구강상주세균이 치면에 초기 부착하는 것과 치면세균막의 형성에 있어서 세균의 축적에 중요한 역할을 한다.

사람의 전타액 속에 들어있는 항균물질로는 선천성 요소(innate factor)인 non-immunoglobulin과 획득성 요소(acquired factor)인 immunoglobulin등이 있다. 선천성 요소는 lysozyme, lactoferrin, salivary peroxidase system, myeloperoxidase system, agglutinin, histidine-rich polypeptide, anionic antimicrobial protein 그리고 phagocytic cell 등이다³⁾.

* 본 연구는 1993년 서울대학교병원 지정연구비에 의하여 이루어진 것임.

Lysozyme은 대부분의 체액에 존재하며, 가장 중요한 항균효소로서 특히 타액과 눈물 그리고 비강과 기관지 분비물에서 고농도로 존재하며, 이 항균효소는 그람 양성세균 세포벽의 peptidoglycan 내에 존재하는 N-acetyl muramic acid와 N-acetyl glucosamine 사이의 $\beta(1-4)$ 결합을 파괴시킨다. 구강내에서도 세균 세포 특히 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)를 용해시킨다^{4, 5, 6}.

Lactoferrin은 선상피세포와 neutrophil에서 합성되는 철과 결합하는 단백질이다. 생체외에서 lactoferrin은 세균과 곰팡이의 성장을 지연시키는 항균물질로써 이 lactoferrin은 국소적인 점막 감염에 저항하는 기능을 가지고 있다. Arnold 등⁷, Tabak 등⁸, Spik 등⁹은 혈청내의 transferrin과 외분비선의 transferrin에 해당하는 lactoferrin이 미생물의 필수 영양소인 철과 결합하여 대사 과정에서 철을 필요로 하는 세균을 약화시킨다고 보고하였고, Arnold 등¹⁰은 lactoferrin이 *S. mutans* 같은 미생물에 대한 직접적인 살균 효과가 있다고 말하였다.

타액내의 획득성 요소로는 secretory IgA (SIgA)와 IgG, IgM등이 있다¹¹. 이 중 SIgA가 타액내 immunoglobulin 중에 가장 중요한 요소로써, 사람의 외분비물질 즉 모유, 타액, 눈물, 위액, 장액등과 비뇨기분비물에서 항체작용을 갖는 중요한 물질이다¹². SIgA는 보통 monomer로 존재하는 IgA와는 달리 J chain과 secretory component를 포함하는 dimer의 형태로 존재한다. Secretory component의 기능은 불명확하나 immunoglobulin이 상피세포를 통과하는 것을 촉진시킨다고 알려져 있다. 또 SIgA는 IgA보다 단백질분해효소에 더 저항성이 크며 이는 secretory component의 역할이라 하겠다. 외분비액에서의 SIgA의 기능은 toxin, enzyme, virus같이 생체면역학적으로 활동성인 항원을 중화시키고, 유입된 항원이 표면에 흡착되지 않게하며, 세균과 곰팡이에 부착하여 액상에서의 응집을 유도하고, complement-mediated killing도 유도한다.

이제까지 많은 연구자들이 타액내의 lysozyme이나 lactoferrin, *S. mutans*에 대한 SIgA 자연항체 수준이 치아우식 경험과 어떠한 상관관계가 있는지에 대해 많은 보고를 하였다.

Lysozyme에 대한 연구로는 Bruce 등¹³이 치아

우식 저항성균과 치아우식 감수성균에 있어서 이하선타액과 악,설하선타액의 lysozyme의 양을 측정한 결과 일반적으로 이하선타액의 lysozyme의 양이 악,설하선타액의 lysozyme의 양보다 적었고, 치아우식 저항성균과 감수성균간의 lysozyme 농도의 차이는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않는다고 보고하였다. 또한 Bowen 등¹⁴, Cole 등¹⁵, Stuchell과 Mandel¹⁶, Gråhn 등¹⁷, Tenovuo 등¹⁸도 lysozyme 수준과 치아우식증 간에 통계적으로 유의한 상관관계가 없다고 하였으며, 반면에 Twetman 등¹⁹은 lysozyme의 양과 치아우식증 간에는 역비례의 상관관계가 있다고 보고하였다.

타액내의 lactoferrin과 치아우식 경험과의 상관관계의 연구를 살펴보면 non-competitive avidin-biotin enzyme immunoassay²⁰의 방법으로 Gråhn 등¹⁷은 치아우식경험이 적은 사람의 타액에 lactoferrin이 많으며 특히 진행성 치아우식과 깊은 관련이 있다고 보고하였다. 그러나 Tenovuo 등¹⁸은 타액내의 lactoferrin의 양과 치아우식증간에는 통계적으로 유의한 상관관계가 없다고 하였다.

Bratthall과 Kohler²¹, Loesche 등^{22, 23}, Kim 등²⁴은 *S. mutans*는 사람에 있어서 치아우식증을 유발시키는데 중요한 역할을 하며, *S. mutans*의 양이 치아우식증의 존재여부와 진행상태와 관련이 있다고 하였다. Bratthall 등²⁵은 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 이용하여 성인의 이하선타액에서 *S. mutans*의 각 혈청형에 대한 IgA를 검출하는 방법을 보고하였으며, Gråhn 등¹⁷은 성인 남자의 타액에서 치아우식증과 타액내 SIgA의 관계를 연구한 결과 이들간에는 유의한 관련성이 없다고 보고하였다. 또한 Shkclair 등²⁶, Twetman 등¹⁹, Zengo 등²⁷, Riviere와 Papagiannoulis²⁸, 이²⁹ 등도 치아우식 저항성균과 감수성균간에 타액내 SIgA의 양이 통계적으로 유의한 차이가 없다고 보고한 반면, Bolton 과 Hlava³⁰는 우식치아가 없는 어린이의 타액내에 *S. mutans*에 대한 SIgA가 우식치아가 많은 어린이의 타액에서 보다 많이 존재한다고 하였다. Olli-Pekka 등³¹은 ELISA를 이용하여 혈청과 자극타액에서의 치아우식 저항성균과 감수성균간의 *S. mutans* KIR과 *S. mutans* 10449에 대한 IgA, IgG를 측정한 결과 혈청에서는 군간에 항체 수준의 유의한 차이는 없었고, 타액에서는 치

아우식 저항성군에서 *S. mutans*에 대해 IgA와 IgG 수준이 치아우식 감수성군에서 보다 높게 나타났다고 보고하였다. 또한 Camling과 Köehler²⁰⁾은 우식경험이 없는 어린이 타액에서 우식경험이 있는 어린이의 타액보다 *S. mutans*에 대한 IgA의 수준이 유의하게 높다고 보고하였고, Gregory 등³⁰⁾은 치아우식 저항성군과 감수성군의 혈청항체와 이하선타액의 자연항체를 검사한 결과 역시 치아우식 저항성군에서 IgA의 수준이 높았다고 보고하였다. 이외에 Everhart 등³¹⁾, Orstavik와 Brandtzaeg³²⁾, Aaltonen 등³³⁾, Tenovuo 등³⁴⁾도 치아우식 저항성군과 감수성군간에 SIgA의 수준에 차이가 있다고 보고하였다.

이상에서 살펴본 바와 같이 사람의 전타액 속에 들어있는 중요 항균물질인 lysozyme과 lactoferrin, *S. mutans*에 대한 SIgA의 치아우식증과의 상관관계를 밝히려는 노력은 계속되어 왔으나 그 결과가 다양하였다. 이에 저자는 lysozyme, lactoferrin 및 *S. mutans*에 대한 SIgA 수준과 치아우식 경험정도와의 상관관계를 실험하여 비교 분석한 결과 다소의 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 연구대상

서울대학교 치과대학에 재학중인 학생 (20-23세)을 대상으로 치과용 거울과 탐침으로 구강상태를 파악하여, 각 학생의 우식경험 영구치지수(DMFT index)를 산출하고, 산출된 우식경험 영구치지수를 기초로 치아우식 저항성군과 중등도 치아우식 감수성군, 고도 치아우식 감수성군으로 분류하였다. 이때 치주상태가 불량한 사람은 실험대상에서 제외하였다.

- 1) 치아우식 저항성군 (18명)
DMFT index = 0 인 학생
- 2) 중등도 치아우식 감수성군 (15명)
DMFT index = 5 인 학생
- 3) 고도 치아우식 감수성군 (18명)
DMFT index ≥ 10 이고 진행성의 충치가 있는 학생

2. 타액의 준비

타액은 채취하기전 1시간동안 음식과 음료의 섭취를 금한 뒤 채취하였다. 전타액은 파라핀으로 자극하여 분비를 유도하였으며, 분비된 40ml의 타액을 냉각된 용기에 채취하였다. 채취한 타액을 1/2씩 구분하여 일부는 lysozyme과 lactoferrin을 측정하기 위하여 원심분리(10,000×g, 10min, 4°C)한 후 상청액을 취하였다. 다른 일부는 자가분해효소를 불활성화하기 위하여 60°C에서 30분 동안 가열하고 원심분리한 후 상청액을 취하여 SIgA 측정에 사용하였다. 이 상청액에 미생물의 증식을 억제하기 위하여 sodium azide (0.1%, w/v)를 첨가한 후, -20°C에 냉동실에 보관하며 사용하였다.

3. 세균과 배양

실험에 사용한 *S. mutans* 10449(혈청형 c)는 실험실의 표준균주로써, 이 세균들의 배양은 냉동보관(-70°C)중인 균주를 녹여 Todd-Hewitt(Difco)액체배지에 식균하여 혐기성 배양기에서 통상 16-18시간동안 배양하였다.

4. 세균항원의 준비

배양된 세균은 원침(12,000×g, 20min, 4°C)하여 수집한 후, 0.85% 생리적 식염수로 3회 세척하였다. 그후 1%(v/v) formalin-saline으로 24시간 동안 상온에 두어 고정시켰다. 고정된 세균을 원침하여 수집후, 생리적 식염수로 3회 세척하고, 남아 있는 알데하이드기를 blocking하기 위하여 1%(w/v) bovine serum albumin(BSA, Sigma Chemical Co.)으로 37°C 배양기에서 1시간 동안 배양하였다.

5. 타액에 존재하는 lysozyme, lactoferrin, *S. mutans*에 대한 SIgA 양의 측정

1) Lysozyme level

Lyophilized human urine lysozyme을 reference로 이용하여 *Micrococcus* diffusion plate (Lysozyme

kit, Sanofi diagnostic pasteur)로 측정하였다. plate의 첫번째 well에 1번 reference urine 5 μ l를 넣고, 두번째 well에는 2번 reference urine을, 세번째 well에는 3번 reference urine을, 4번째 well에는 control인 saline을 각각 5 μ l씩 넣고, 5번째 well부터는 실험군의 타액을 5 μ l씩 넣었다. plate를 밀봉하여 37 °C 배양기에서 6시간 배양한 후, 명확히 형성된 clear zone을 관찰, 그 zone의 직경을 측정하였다. 그후 3개의 reference로 standard calibration curve를 그리고, 이를 이용하여 실험군내의 lysozyme 농도를 측정하였다.

2) Lactoferrin level

Plate를 첫번째 항체(anti-lactoferrin)로 coating하고 37 °C 배양기에서 24시간 배양한 후 세척액(Skatron Microwash II automated plate washer)으로 3회 세척하였다. 37 °C의 diluent buffer(PBS-BSA)로 standard, 타액표본 및 blank를 만들었다. 타액표본은 예비실험을 통해 적정희석배수를 1/10,000으로 결정하였다. plate의 각 well에 standard, 타액표본 및 blank를 넣고 37 °C 배양기에서 2시간 배양하고 세척액으로 3회 세척한 후, 이 plate에 두번째 항체(biotinylated anti-lactoferrin)를 첨가하고 37 °C 배양기에서 2시간 배양한 후 세척액으로 3회 세척하였다. 다시 이 plate의 각 well에 1/2,000으로 희석된 avidin alkaline phosphate conjugate를 첨가하고 37 °C 배양기에서 2시간 배양한후 세척액으로 3회 세척하고, 각 well에 p-nitrophenyl phosphate substrate (Type 104, Sigma Chemical Co.)를 첨가하고 상온에서 30-40분간 정치하였다. 각 well에 1 N NaOH를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 ELISA reader colorimeter (Molecular Device Co.)로 405nm 흡광도에서 측정하였다.

3) *S. mutans*에 대한 SIgA level

1972년에 Engvall과 Perlmann이 개발한 미세측정 흡착법²⁷⁾으로 일회용 flat bottom polystyrene microtiter plate (Dynatech lab. Inc, Alexandria, Va, U.S.A.)를 사용하여 실험하였다. 순수분리한 *S. mutans* 10449를 원심분리하여 formalin으로 고정하고 증성 완충용액 (pH 7.4)으로 세척한 후

spectrophotometer로 580nm에서 0.3 O.D. (optical density)가 되도록 0.1M Na₂CO₃용액으로 세균을 희석시키고 이 용액을 200 μ l씩 각 well에 넣어 37 °C 배양기에서 2시간 배양시킨 후 2%(w/v) BSA (bovine serum albumin) 100 μ l씩을 다시 각 well에 첨가하여 4 °C 냉장고에 사용시까지 보관하였다. 보관된 plate를 세척액(Skatron Microwash II automated plate washer)으로 3회 세척한 후, 이 well에 적정농도로 희석된 타액을 넣어 37 °C 배양기에서 2시간 배양시켜 항원과 항체 반응을 유도하고 plate를 세척액으로 세척하였다. 이때 사용된 타액의 농도는 원액, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16로 희석하였으며, 항체 희석 완충용액은 PBS-0.05% Tween 20, 0.5% BSA-0.02% Na₂S₂O₃였다. 또한 각 well에 conjugate 희석용액(PBS-0.05% Tween 20, 0.5% BSA-0.02% Na₂S₂O₃)으로 1,000배 희석한 alkaline phosphate conjugate anti-human SIgA 200 μ l를 넣고 37 °C 배양기에서 1시간 배양한 후 세척하였다. 다시 이 well에 p-nitrophenyl phosphate substrate (Type 104: Sigma chemical Co.) 적정량을 넣어 37 °C 배양기에서 1시간 반응시키고 1N NaOH를 넣어 효소반응을 정지시켰다. 반응이 끝난 각 well은 ELISA reader colorimeter (Molecular Device Co.)를 사용하여, 400nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

III. 실험성적

1. Lysozyme

Lysozyme kit내에 들어있는 3개의 reference urine의 zone diameter와 알고있는 lysozyme의 양과의 관계를 구한 바 그림 1의 결과를 얻었다.

Standard calibration curve에서 얻은 회귀직선의 방정식을 이용하여 well당 존재하는 lysozyme의 양을 측정하여 그림 2의 결과를 얻었다.

이 결과는 치아우식 저항성균의 타액내 lysozyme의 양의 평균은 8,565 μ g/ml(표준편차 2,294)이고 중등도 치아우식 감수성균의 평균은 7,461 μ g/ml(표준편차 2,738), 그리고 고도 치아우식 감수성균의 평균은 7,469 μ g/ml(표준편차

3.860)이었다. 본 실험성적을 군간의 비교로 t-test를 시행한 결과 lysozyme 양은 각 군간에 통계적 유의성은 보이지 않았다. 즉 타액내의 lysozyme이 독자적으로는 치아우식 경험정도에 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다.

2. Lactoferrin

예비실험을 통해 405nm의 파장에서 적절한 흡광도를 지니는 타액의 적정희석배수를 1/10,000으로 정하여 ELISA를 시행하였다. well당 존재하는

standard lactoferrin의 양과 파장 405nm에서의 흡광도와와의 관계를 구한바, 그림 3과 같은 결과를 얻었다.

여기서 얻은 회귀직선의 방정식을 이용하여, ELISA를 시행하여 얻은 흡광도를 well당 존재하는 lactoferrin의 양으로 환산하고, 희석배수를 곱하여 타액내의 lactoferrin의 양을 구하여 그림 4의 결과를 얻었다.

치아우식 저항성군, 중등도 치아우식 감수성군, 고도 치아우식 감수성군의 타액내 lactoferrin의 양은 치아우식 저항성군에서 평균 2,490 µg/ml(표준

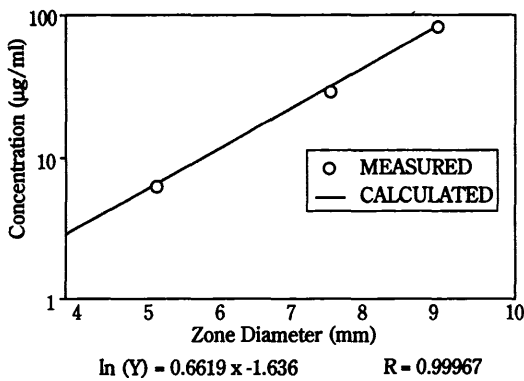


Fig 1. Standard calibration curve of lysozyme.

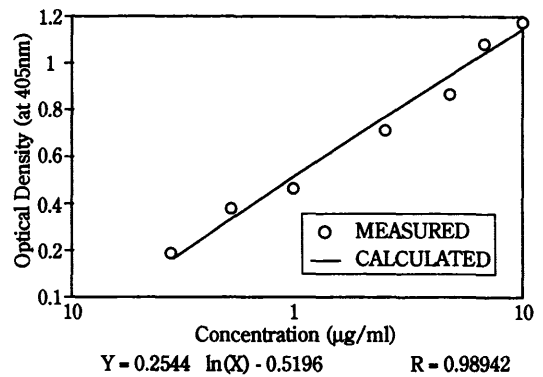


Fig 3. Standard calibration curve of lactoferrin.

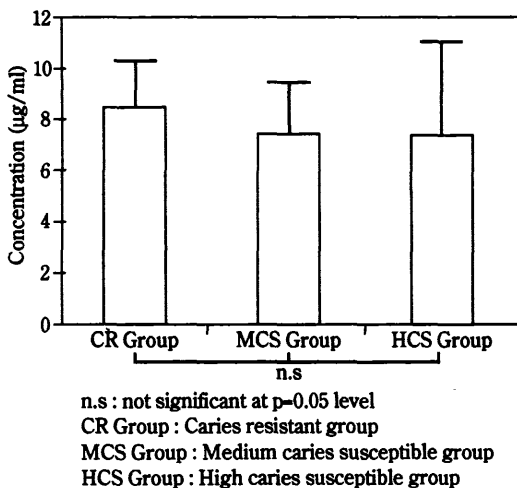


Fig 2. Lysozyme levels (mean±S.D.) in whole saliva samples.

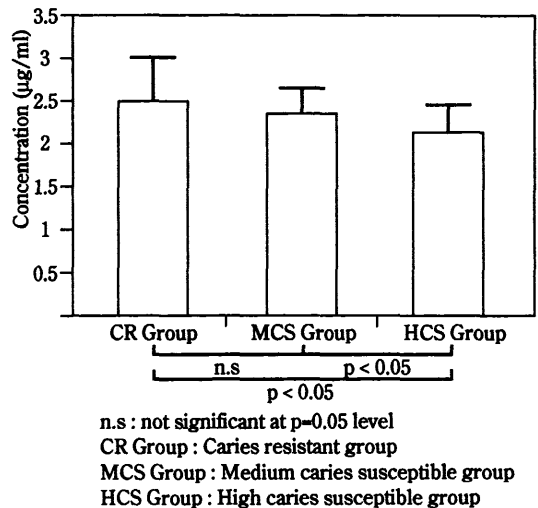


Fig 4. Lactoferrin levels (mean±S.D.) in whole saliva samples.

편차 0.599), 중등도 치아우식 감수성군에서 평균 2,304 $\mu\text{g/ml}$ (표준편차 0.230), 고도 치아우식 감수성군에서 평균 2,135 $\mu\text{g/ml}$ (표준편차 0.257)이었다. 이 실험성적을 군간의 비교로 t-test를 시행한 결과 치아우식 저항성군과 중등도 치아우식 감수성군의 타액에서 고도 치아우식 감수성군의 타액보다 통계적으로 유의하게 lactoferrin의 양이 많게 존재하였고 ($p<0.05$), 치아우식 저항성군과 중등도 치아우식 감수성군간에는 치아우식 저항성군에서 중등도 치아우식 감수성군보다 lactoferrin의 양이 다소 많았으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다 (표 1). 이 결과는 치아우식 경험도와 타액내 lactoferrin의 양이 서로 역상관관계임을 나타냈다.

3. Secretory IgA to *S. mutans*

치아우식 저항성군과 중등도 치아우식 감수성군, 고도 치아우식 감수성군에서의 *S. mutans*에 대한 타액내 SIgA의 양을 측정하여 그림 5의 결과를 얻었다.

치아우식 저항성군과 중등도 치아우식 감수성군, 고도 치아우식 감수성군의 타액내에 존재하는 *S. mutans*에 대한 SIgA의 양은 치아우식 저항성

군에서 평균 106,643 Eu(표준편차 50,102), 중등도 치아우식 감수성군에서 평균 106,731 Eu(표준편차 42,703), 고도 치아우식 감수성군에서 평균 86,372 Eu(표준편차 43,286)이었다. 이를 군간의 비교로 t-test를 시행한 결과 *S. mutans*에 대한 타액내 SIgA의 수준은 치아우식 저항성군과 중등도 치아우식 감수성군에서 고도 치아우식 감수성군보다 다소 많게 나타났으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 즉 타액내의 *S. mutans*에 대한 SIgA 수준이 단독으로는 치아우식의 경험정도에 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다.

이상에서 살펴본 타액내의 lysozyme, lactoferrin, *S. mutans*에 대한 SIgA의 수준을 요약하면 표 2와 같다.

IV. 총괄 및 고안

많은 연구자들이 치아우식증의 발생과 관계된 여러가지 요인들을 규명하기 위한 연구를 진행해왔고 그중 타액도 치아우식증의 발생과 관계가 있다고 보고하였다. 치아우식증과 관련된 타액의 성질로는 분비율, 점조도, 완충능 등이 거론되어왔으

Table 1. Statistic analysis of salivary lactoferrin levels.

	Caries resistant group	Medium caries susceptible group	High caries susceptible group
CR Group		N.S	$p<0.05$
MCS Group	N.S		$p<0.05$
HCS Group	$p<0.05$	$p<0.05$	

N,S ; not significant at $p=0.05$ level (grouped t-test)

Table 2. Lysozyme, lactoferrin, SIgA to *S. mutans* levels in whole saliva. (mean \pm S.D.)

	Lysozyme($\mu\text{g/ml}$)	Lactoferrin($\mu\text{g/ml}$)	SIgA (Eu)
CR Group	8,565 \pm 2,294	2,490 \pm 0,599	106,643 \pm 50,012
MCS Group	7,461 \pm 2,738	2,304 \pm 0,230	106,731 \pm 42,703
HCS Group	7,469 \pm 3,860	2,135 \pm 0,257	86,372 \pm 43,286

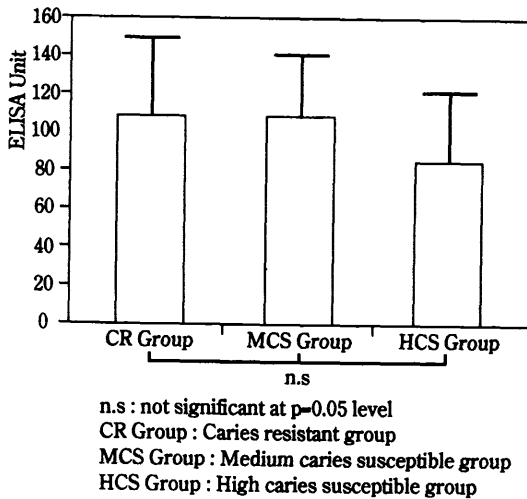


Fig 5. SIgA levels to *S. mutans* (mean±S.D.) in whole saliva samples.

나 타액내의 항균물질들도 치아우식과 관련이 있다고 하였다. 그리하여 타액에 존재하는 많은 항균물질들이 어떠한 기전으로, 또한 얼마만큼의 영향을 미치는가를 알아보기 위해 많은 연구가 진행되었다.

타액속에 들어있는 대표적인 항균물질인 lysozyme은 분자량이 작고 산성 pH와 고온에서 안정되고 알칼리 pH에서 약한 단백질로써 *Micrococcus lysodeikticus*를 용해시킬 수 있는 성질을 갖고있다. 본 실험에 사용한 *Micrococcus* diffusion plate도 lysozyme의 이러한 특성을 이용하여 만든 것이다. 이 plate는 buffered agarose-*Micrococcus lysodeikticus* mixture로 구성되어 있으며 각 plate에는 0.5% *Micrococcus lysodeikticus* bacteria가 들어있다. 최근에 plate를 이용하여 lysozyme의 정량분석을 하는 이유는 0.09 µg/ml 정도의 lysozyme도 측정할 수 있을 정도로 민감하고, 재현성이 있으며, lysozyme reference가 정확하다는 점 등이다. Gråne 등¹⁷⁾은 19-21세 남자의 전타액을 채취하여 이 plate를 이용하여 치아우식 경험정도와 타액내 lysozyme 양의 상관관계를 연구하여 lysozyme의 양이 치아우식 경험정도와 특별한 상관관계를 보이지 않는다고 보고하였다.

Tenovuo 등¹⁸⁾도 22-32세 성인의 전타액을 실험하여 충치가 있는군과 없는군 사이에는 lysozyme의 양에 큰 차이가 없다고 보고한 바 본 실험의 결과와 비슷하며 이는 치아우식증의 발생에 lysozyme이 관계는 있으나 독자적인 영향력을 미치지 못하는 것이라고 사료된다. 그러나 Twetman 등¹⁹⁾은 미취학 아동의 전타액내의 lysozyme의 양을 측정된 결과 치아우식 저항성군내의 lysozyme의 양이 치아우식 감수성군에 비해 통계적으로 유의하게 많았으며 lysozyme이 어린이의 치아우식 저항성에 독자적인 역할을 담당한다고 하였다. 이런 상반된 결과는 실험대상군의 차이로 여겨지며 어린이에서는 성인보다 치아우식증과 타액내 lysozyme의 양이 좀더 밀접한 상관관계를 갖는 것으로 추정된다.

Lactoferrin은 분자량이 78,000 dalton 정도인 단백질로 neutrophil 세포과립의 중요한 요소로써, 철과 결합하는 특성으로 체성 방어기전(cellular defense mechanism)의 기능을 갖고 있다. Lactoferrin은 사람에게 있어서 대부분의 외분비 물질에 존재하며 타액에도 상당량 존재하고 있다. 타액내의 lactoferrin과 치아우식증과의 상관관계에 대한 연구가 미진한 상태였으나, 최근에 non-competitive avidin-biotin enzyme immunoassay²⁰⁾로 타액내의 lactoferrin을 정량분석하는 연구가 보고되었다. 이 방법은 avidin과 biotin의 강한 친화력을 면역화적인 연구에 사용하는 방법으로 그 장점은 biotin이 대부분의 생물학적 화합물의 면역화적 활성화에 영향을 미치지않고 강하게 부착하며, 분자량이 매우 작아서 (244 dalton) 표지된 단백질의 크기를 많이 증가시키지 않고, 여분의 biotin을 쉽게 제거할수 있다는 점, 또한 단백질을 표지하는데 있어서 빠르고 재현성이 있으며 간단한 방법이며, biotin conjugate는 매우 안정성이 있고 avidin과 biotin의 반응이 매우 신속하게 일어난다는 점이다. Gråne 등¹⁷⁾은 19-21세 남자의 전타액을 채취하여 non-competitive avidin-biotin enzyme immunoassay로 치아우식 경험정도와 타액내 lactoferrin의 양을 비교 관찰한 결과, 치아우식 경험정도, 특히 진행중의 치아우식증과 타액내의 lactoferrin이 통계적으로 유의한 역비례의 상관관계가 있다고 보고하였다. 반면에 Tenovuo 등¹⁸⁾은 22-32세 성인의 전타액을 채취하여 non-

competitive avidin-biotin enzyme immunoassay로 진행성의 충치가 있는군과 없는군 사이에 타액내의 lactoferrin의 양을 정량분석한 결과 두군간에 통계적으로 유의한 차이가 없다고 보고하였다. 그러나 진행성의 충치가 없는군의 lactoferrin의 양이 진행성의 충치가 있는군 보다는 평균치가 높게 나타났다. 본 실험에서도 치아우식 저항성군과 중등도 치아우식 감수성군이 고도 치아우식 감수성군보다 타액내 lactoferrin의 양이 통계적으로 유의하게 높았다. 이는 고도 치아우식 감수성군이 진행성의 충치를 지닌군으로, lactoferrin의 양이 치아우식증의 발생을 억제하는 효과가 있다고 사료된다. 그러나 타액내의 lactoferrin과 치아우식증과의 상관관계에 관한 연구가 아직 많이 발표되고 있지 않기 때문에, 앞으로 보다 많은 연구가 필요하다고 생각하며 lysozyme과 lactoferrin 두가지 항균물질이 neutrophil 세포과립의 구성성분으로써, 상호작용을 할수있다고 추정되기때문에 lysozyme과 lactoferrin의 양 사이에 어떠한 상관관계가 존재하는가에 대한 연구도 병행하여야 한다고 사료된다. Baggiolini 등³⁰은 토끼를 실험대상으로 neutrophil 내의 lactoferrin을 관찰한 바, specific lysosomal granule내에서 lactoferrin의 60%가 lysozyme activity와 연관되었다고 보고하였다. Leffell과 Spitznagel³⁹은 원심분리한 사람의 lactoferrin을 침강시켜 얻은 granule의 띠를 관찰한 결과 그중 50%가 lysozyme의 활성을 갖는 과립이라고 하였다. 본 실험에서도 lysozyme의 양과 lactoferrin의 양 사이의 상관관계를 조사한 바 다소의 상관관계가 있는것으로 나타났으나 이에 대해서는 좀더 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

타액내 *S. mutans*에 대한 SIgA와 치아우식증과의 상관관계에 대한 많은 논문이 발표되어 왔다. *S. mutans*는 치아우식증의 주된 원인균으로, 이균에 대한 자연항체수준이 치아우식증의 발생과 어떠한 관련성을 갖는가를 밝히려는 노력도 계속되어 왔다. 현재 많이 사용되는 연구방법은 면역측정법으로 이는 항원과 항체의 양을 측정하며, 항원의 구조를 연구하는 방법이다⁴⁰. 면역측정법에는 항원과 항체에 표지하는 물질에 따라 면역형광법(immunofluorescent method), 방사성 동위원소를 이용하는 RIA(radioimmunoassay)⁴¹, 효소결합

면역흡착 측정법(ELISA)등이있으며 그중 Engvall과 Perlmann³⁷이 고안한 ELISA가 가장 많이 사용되고 있다. 이 방법의 장점은 고체상의 multiwell micro-titer plate를 사용함으로써 다루기가 편하며, 자동화로 다량의 검체를 신속하게 측정할 수 있고, RIA 만큼 민감하면서도 방사성 동위원소를 필요로 하지않는다는 점이다⁴². Riviere와 Papagiannoulis²⁸는 치아우식 경험군과 치아우식 비경험군에 있어서 타액내에 존재하는 *S. mutans*에 대한 어떠한 항체도 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않는다고 하였고 Twetman 등¹⁹도 미취학 아동의 전타액내의 *S. mutans*에 대한 SIgA수준을 측정된 결과 치아우식 저항성군과 감수성군 사이에 통계적으로 유의한 차이가 없다고 보고하였다. 또한 Gråne 등¹⁷도 19-21세 남자의 전타액을 채취하여 타액내에 존재하는 *S. mutans*에 대한 IgA와 IgG 수준을 측정된 결과 이들 항체수준과 치아우식 경험간에는 통계적으로 유의한 상관관계가 없다고 하였다. 이는 본 실험의 결과와 유사하였으며, 치아우식의 방에 있어서, 타액내의 자연항체가 단독으로는 중요한 역할을 하지못한다는것을 간접적으로 시사한다고 하겠다. 반면 Tenovuo 등¹⁸, Olli-Pekka 등³¹, Gregory 등³³은 이와는 상반된 보고를 하였다. 그 원인은 실험대상의 선정기준의 차이로 생각하며, 앞으로 실험대상을 좀 더 확대하고 세분화한 광범위한 연구를 계속해야 할 것으로 사료된다.

이상에서 살펴본 바와 같이 타액내의 여러 항균요소들은 독자적으로 혹은 다른 요소들과 상호작용을 통해, 치아우식증의 발생과 진행에 직접, 간접으로 관여하고 있다. 아직 그 기전은 명확히 밝혀져 있지 않으므로 이를 밝히기 위한 좀 더 많은 연구가 진행되어야 할 것이다.

V. 결 론

타액내의 항균물질과 치아우식 감수성과의 상관관계를 관찰하기 위해 20-23세 성인의 영구치 치아우식 경험정도에 따라 치아우식 저항성군, 중등도 치아우식 감수성군 및 고도 치아우식 감수성군으로 분류할 수 있는 51명을 대상으로, 파라핀 자극

하에서 전타액을 채취하고, 타액내의 여러 항균요소들중 lysozyme, lactoferrin, 그리고 *Streptococcus mutans*에 대한 secretory IgA의 수준을 측정하였다. 이때 lysozyme의 양은 *Micrococcus* diffusion plate를 이용하여 측정하였고 lactoferrin의 양은 non-competitive avidin-biotin enzyme immunoassay로 측정하였으며, *Streptococcus mutans*에 대한 secretory IgA의 수준은 ELISA를 시행하여 측정, 상호 비교한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 타액내의 lysozyme의 양은 치아우식 저항성군($8.565 \pm 2.294 \mu\text{g/ml}$)과 중등도 치아우식 감수성군($7.461 \pm 2.738 \mu\text{g/ml}$), 고도 치아우식 감수성군($7.469 \pm 3.860 \mu\text{g/ml}$)에서 통계적으로 유의한 차이는 없었다 ($p>0.05$).
2. 타액내의 lactoferrin의 양은 치아우식 저항성군($2.490 \pm 0.599 \mu\text{g/ml}$)과 중등도 치아우식 감수성군($2.304 \pm 0.230 \mu\text{g/ml}$)에서 고도 치아우식 감수성군($2.135 \pm 0.257 \mu\text{g/ml}$)보다 현저히 높게 나타났고 ($p<0.05$), 치아우식 저항성군과 중등도 치아우식 감수성군간에는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다 ($p>0.05$).
3. *Streptococcus mutans*에 대한 타액내의 secretory IgA의 양을 측정한 결과 치아우식 저항성군($106.643 \pm 50.102 \text{ Eu}$)과 중등도 치아우식 감수성군($106.731 \pm 42.703 \text{ Eu}$)이 고도 치아우식 감수성군($86.372 \pm 43.268 \text{ Eu}$)보다 다소 많은 면역항체를 지니고 있었으나 통계적 유의성은 없었다 ($p>0.05$).

VI. REFERENCES

1. Dawes C. and Wood C.M. : The contribution of oral minor mucous gland secretions to the volume of whole saliva in man. Arch Oral Biol 15:337-342, 1973.
2. Schneyer L.H. : Method for the collection of separate submaxillary and sublingual salivas in man. J Dent Res 34:257-261, 1955.
3. Mandel I.D. and Ellison S.A. : The biological significance of the non-immunoglobulin

defense factors. The lactoperoxidase system : chemistry and biological significance. New York Marcel Dekker, 1-15, 1985.

4. Raeste A.M. : Lysozyme (Muramidase) activity of leukocytes and exfoliated epithelial cells in the oral cavity. Scand J Dent Res 80:422-427, 1972.
5. Gibbons R.J., de Stoppelaar J.D., and Harder L. : Lysozyme insensitivity of bacteria indigenous to the oral cavity of man. J Dent Res 45:877-881, 1966.
6. Laible N.J. and Germaine G.R. : Adsorption of lysozyme from human whole saliva by *Streptococcus sanguis* 903 and other oral microorganisms. Infect Immun 36:148-159, 1982.
7. Arnold R.R., Russel J.E., Champion W.J., Brewer M., and Gauthier J.J. : Bactericidal activity of human lactoferrin : differentiation from stasis of iron deprivation. Infect Immun 35:792-799, 1982.
8. Tabak L., Mandel I., Karlan D., and Baumarsch H. : Alterations in lactoferrin in salivary gland disease. J Dent Res 57:43-47, 1978.
9. Spik G., Cheron A., Montreuil J., and Dolby J. : Bacteriostasis of milk sensitive strain of *Escherichia coli* by immunoglobulins and iron-binding proteins in association. Immunology 35:663-671, 1978.
10. Arnold R.R., Brewer M., and Gauthier J.J. : Bactericidal activity of human lactoferrin : sensitivity of a variety of microorganisms. Infect Immun 28:893-898, 1980.
11. Brandtzaeg P. : The oral secretory immune system with special emphasis on its relation to dental caries. Proc Finn Dent Soc 79:71-84, 1983.
12. Burns C.A., Ebersole J.L., and Allansmith M.R. : Immunoglobulin A antibody levels in human tears, saliva and serum. Infect Immun 36:1019-1022, 1982.

13. Bruce J.M., Hannah G., Donald C., Barbara I.G., and Vincent J. : Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for determinant of lysozyme in human parotid and submandibular-sublingual saliva. J Clin Microbiol 19:844-848, 1984.
14. Bowen W.H., Vales H., Aquirre M., Velasquez H., and Sierra L.I. : The microbiology and biochemistry of plaque, saliva and drinking water from two communities with contrasting levels of caries in colombia, S.A. J Dent Res 56:C32-C39, 1977.
15. Cole M.F., Bowden G.H., Sierra L., Espinal F., Aquirra M., Kingman A., Kemp L.J., Gomez I., Reilly J.A., Hsu D., Ciardi J.E., and Gillespie G. : Immunoglobulins and antibodies in plaque fluid and saliva levels of caries. Adv Exp Med Biol 107:383-392, 1978.
16. Stuchell R.N. and Mandel I.D. : A comparative study of salivary lysozyme in caries-resistant and caries-susceptible adult. J Dent Res 62:552-554, 1983.
17. Gråhn E., Tenovuo J., Lehtonen O.P., Eerola E., and Vilja P. : Antimicrobial systems of human whole saliva in relation to dental caries, cariogenic bacteria, and gingival inflammation in young adults. Acta Odontol Scand 46:67-74, 1988.
18. Tenovuo J., Tentsch H., Soukka T., and Karhuvaara L. : Antimicrobial factors of saliva in relation to dental caries and salivary levels of mutans streptococci. J Biol Buccale 20:85-90, 1992.
19. Twetman S., Lindner A., and Madoer T. : Lysozyme and salivary immunoglobulin A in caries-free and caries-susceptible pre-school children. Swed Dent J 5:9-14, 1981.
20. Vilja P., Krohn K., and Tuohimaa P. : A rapid and sensitive non-competitive avidin-biotin assay for lactoferrin. J Immunol Meth 76:73-83, 1985.
21. Bratthall D. and Kohler B. : *Streptococcus mutans* serotypes : some aspects of their identification, distribution, antigenic shifts, and relationship to caries. J Dent Res 55:C15-C21, 1976.
22. Loesche W.J., Rowan J., Straffon L.H., and Loos P.J. : Association of *Streptococcus mutans* with human dental decay. Infect Immun 11:1252-1260, 1975.
23. Loesche W.J., and Straffon L.H. : Longitudinal investigation of the role of *Streptococcus mutans* in human tissue decay. Infect Immun 26:498-507, 1979.
24. Kim K.K., Choe S.J., Lim C.Y., and Chang W.H. : Relationship between the caries experience of Korean school children and the distribution of *Streptococcus mutans* in dental plaque. J Korean Soc Microbiol 18:11-21, 1983.
25. Brathall D., Gahaberg L., and Krasse B. : Method for detecting IgA antibodies to *Streptococcus mutans* serotypes in parotid saliva. Arch Oral Biol 23:848-849, 1978.
26. Shklair I.L., Rovelstad G.H., and Lamberts B.L. : A study of some factors influencing phagocytosis of cariogenic streptococci by caries-free and caries-active individuals. J Dent Res 48:842-845, 1969.
27. Zengo A.N., Mandel I.D., Goldman R., and Khurana H.S. : Salivary studies in human caries resistance. Arch Oral Biol 16:557-560, 1971.
28. Riviere G.R. and Papagiannoulis L. : Antibodies to indigenous and laboratory strains of *Streptococcus mutans* in saliva from children with dental caries and from caries-free children. Pediatric Dentistry 9:216-220, 1987.
29. 이장희: *Streptococcus mutans*와 *Streptococcus sanguis*에 대한 사람의 자연면역항체와 치아 우식경험과의 관계에 대한 연구. Ph.D. thesis, Collage of Dentistry, SNU, 1991.
30. Bolton R.W. and Hlava G.L. : Evaluation of

- salivary IgA antibodies to cariogenic microorganisms in children. Correlation with dental caries activity. *J Dent Res* 61:1225-1228, 1982.
31. Olli-Pekka J.L., Elik M.G., Tom H.S., and Lauri A.L. : Amount and avidity of salivary and serum antibodies against *Streptococcus mutans* in two groups of human subjects with different dental caries susceptibility. *Infect Immun* 43:308-313, 1984.
 32. Camling E. and Köehler B. : Infection with the bacterium *Streptococcus mutans* and salivary IgA antibodies in mothers and their children. *Arch Oral Biol* 32:817-823, 1987.
 33. Gregore R.L., Kindle J.C., Hobbs L.C., Filler S.J., and Malmstrom H.S. : Function of anti-*Streptococcus mutans* antibodies: Inhibition of virulence factors and enzyme neutralization. *Oral Microbiol Immunol* 5:181-188, 1990.
 34. Everhart D.L., Grisby W.R., and Carter W.H. : Evaluation of dental caries experience and salivary immunoglobulins in whole saliva. *J Dent Res* 51:1478-1491, 1972.
 35. Orstavik D. and Brandtzaeg P. : Secretion of parotid IgA in relation to gingival inflammation and dental caries experience in man. *Arch Oral Biol* 20:L701-704, 1975.
 36. Aaltonen A.S., Tenovuo J., Lehtonen O.P., Saksala R., and Meurman O. : Serum antibodies against oral *Streptococcus mutans* in young children in relation to dental caries and maternal close contacts. *Arch Oral Biol* 30:331-335, 1985.
 37. Engvall E. and Perlmann P. : Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. *J Immunol* 109:129-135, 1972.
 38. Barggiolini M., C. deDuve, Masson P.L., and Heremans J.F. : Association of lactoferrin with specific granules in rabbit heterophil leukocytes. *J Exp Med* 131:559-570, 1970.
 39. Leffell M.S. and Spitznagel J.K. : Association of lactoferrin with lysozyme in granules of human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 6:761-765, 1972.
 40. Kenemy D.M. and Chantler S. : An introduction to ELISA. In : *ELISA and other solid phase immunoassays - theoretical and practical aspects*, edited by Kennedy D.M., Challacombe S.J. :1-29, 1988.
 41. Czerkinsky C., Rees A.S., Bergmeier L.A., and Challacombe S.J. : The detection and specificity of class specific antibodies to whole bacterial cells using a solid phase radioimmunoassay. *Clin Exp Immunol* 53:192-200, 1983.
 42. Voller A., Bidwell D.E., Hultdt G., and Engvall E. : A microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay and its application to malaria. *Bull Wld Hlth Org* 51:209-214, 1974.

A study on the correlations between salivary levels of lysozyme, lactoferrin and secretory Immunoglobulin A to *Streptococcus mutans* and caries susceptibility

Hyeon-Mee Yoo, D. D. S., M. S. D., Hyuk-Choon Kwon, D. D. S., Ph. D.
Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Seoul National University

Saliva plays an important role in modulating the oral microbial ecology. And it is suggested to influence the initiation and progression of the dental caries. To evaluate the correlations between the salivary antimicrobial agents and the caries susceptibility, the 51 subjects were divided into 3 groups according to caries experience ; caries resistant group, medium caries susceptible group, and high caries susceptible group.

Stimulated whole saliva was collected, and the salivary levels were measured for lysozyme, lactoferrin, and secretory IgA to *Streptococcus mutans*. The lysozyme level was estimated using *Micrococcus* diffusion plate, lactoferrin level was determined with a non-competitive avidin-biotin enzyme immunoassay, and the titer of secretory IgA to *Streptococcus mutans* was assayed with ELISA.

The results were as follows :

1. Lysozyme levels of each group showed no significant difference statistically ($p>0.05$).
2. The caries resistant group and the medium caries susceptible group had significantly higher levels of lactoferrin than the high caries susceptible group ($p<0.05$). But no clear difference was observed between the caries resistant group and the medium caries susceptible group ($p>0.05$).
3. The caries resistant group and the medium caries susceptible group showed relatively higher levels of the secretory IgA to *Streptococcus mutans* than the high caries susceptible group, but no significant difference was observed statistically ($p>0.05$).

Keywords ; saliva, lysozyme, lactoferrin, secretory IgA, *Streptococcus mutans*, dental caries