

## pH 순환 모델에서 과포화 용액의 초기 우식 법랑질에 대한 재광화 효과

김소라 · 홍석진\* · 노병덕 · 이찬영 · 금기연

연세대학교 치과대학 치과보존학교실, 전남대학교 치과대학 예방치과학교실\*

### ABSTRACT

#### THE REMINERALIZING EFFECTS OF EARLY ENAMEL CARIOUS LESION BY SUPERSATURATED BUFFER SOLUTION UNDER PH CYCLING MODEL

So-Ra Kim, Suk-Jin Hong\*, Byung-Duk Roh, Chan-Young Lee, Kee-Yeon Kum

*Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Yonsei University,*

*Department of Preventive Dentistry, College of Dentistry, Chonnam National University\**

Dental caries is the most common oral disease. There are many factors contributing to its development, but complete understanding and prevention are not fully known. However, it is possible to remineralize the early enamel carious lesion by fluoride containing remineralization solution. Recently the pH-cycling model has been used to examine the effect of fluoride solution on remineralization of artificial caries in vitro as it can closely simulate the conditions encountered in vivo within a carefully controlled environment.

The aim of this study was to evaluate the remineralizing effects of supersaturated buffer solutions under pH-cycling model. The specimen with 3mm-diameter was made using mature bovine incisors which has no caries and has sound enamel surface. Early carious lesions were produced by suspending each specimens into demineralization solution at pH 5.0 for 33 hours and the specimen whose surface hardness value ranged from 25 to 45 VHN were used. The pH cycling treatment regimen consisted of 5 min soaks of three treatment solutions four times per days for 15 days and the continuous cycling of demineralization and remineralization were carried out for 15 days. Following the pH-cycling treatment regimen, the specimens' surface microhardness were measured by the Vickers hardness test (VHN) and analyzed by ANOVA and Duncan's multiple-range test.

1. The surface microhardness value of supersaturated solution, Sensitime, and Gagline groups were increased after pH cycling, and that of supersaturated solution was significantly increased compared to saline group( $P < 0.05$ ).
2. The surface remineralization effect of fluoride containing solutions was accelerated by saliva under pH-cycling mode
3. The pH cycling model was considered appropriate to mimic the intra-oral pH changes when evaluating demineralization and remineralization in vitro.

Under the results of above study, salivary remineralization effect can be improved by fluoride containing remineralization solution. The pH-cycling model was considered appropriate to mimic the intra-oral pH changes when evaluating demineralization and remineralization in vitro.

**Key words** : Microhardness, Remineralization, Supersaturated solution, pH cycling model, Degree of saturation.

\* 이 논문은 한국과학재단 특정기초연구비(과제번호:98-0403-14-01-3)의 지원을 받아 이루어진 논문임.

## I. 서 론

치아 우식은 섭취된 음식물에 존재하는 탄수화물이 치태 내의 세균에 의해 발효되어 유기산이 형성되고, 생성된 유기산이 치아 경조직의 무기질을 탈회하여 발생하는 질환으로서 숙주저항, 식이 습관, 구강위생, 치열상태, 구강 내 상주균의 구성 등에 의해 영향을 받게 되고 이러한 다양한 요인들의 복합적인 반응에 의해 야기된다고 알려져 있다.

Moore 등<sup>1)</sup>은 치태의 우식원성을 측정하는 기준으로 pH를 사용하였고, Theuns 등<sup>2,3)</sup>은 완충용액을 이용하여 인공 우식 형성을 형성할 때 포화도가 중요하며, 탈회 속도는 완충용액의 포화도 및 pH, 유기산의 비이온화된 형태의 농도에 따라 영향을 받는다고 하였다. Margolis와 Moreno 등<sup>4)</sup>은 법랑질의 탈회율은 무기질인 calcium, phosphate의 용해도와 완충액의 포화도에 의해 결정되며 포화도는 산의 농도, 초기 pH, 칼슘과 인의 농도 등에 의해 영향을 받을 수 있다고 하였다. 이처럼 치아 우식 과정은 단순한 탈회의 과정이 아니고 치태에서 만들어진 유기산이 법랑질의 소공을 통해 확산되는 과정에서 표면층의 초기 용해과 광물상의 침착이 동시에 일어나고 이렇게 표면층의 국소적인 평형관계가 유지되면 유기산의 열역학적 driving force에 의해 내부로 더욱 확산되어 하부 법랑질이 용해되고 이 용해 산물이 다시 역확산되어 표층부의 광물질의 침전을 일으키는 복잡한 현상이라고 알려져 있다<sup>5)</sup>.

형태적인 면에서 법랑질 초기 우식은 표층은 비교적 광물질 소실이 적어 건전하지만 우식 표면 하층에서는 광물질 소실이 일어나서 파괴되는 특징적인 형태를 갖는데, 치아 표면에 부착된 치태를 관리하고, 치질의 내산성을 증가시키거나, 세균의 성장을 억제하는 방법 등에 의해서 병소 진행을 억제 할 수 있다. 법랑질 초기 우식이 재석회화 될 수 있다는 것은 실험적으로나 임상적으로 이미 증명되고 있으며, 초기에 우식을 재석회화 하여 진행을 방지함으로써 예방할 수 있는 방법이 연구되어 왔다.

Head<sup>6)</sup>에 의해 산부식된 법랑질의 재광화 현상이 최초로 보고되었는데, 타액 내에 담가둔 치아가 더 단단해 졌으며 이것은 타액내의 성분인 carbon dioxide 때문이라고 하였다. Anderson<sup>7)</sup>도 법랑질 초기 우식 병소가 재석회화 될 수 있음을 보고하였고 이 후 Backer Dirks<sup>8)</sup>는 처음으로 임상적 재광화의 증거를 제시하였는데, 초기 우식 병소인 white-spot이 수 년 후 같은 기준에서 재 검진 시 사라졌음을 관찰하고 이는 맹출 후 구강 내 환경의 변화에 따른 재광화 또는 재결정화 과정 때문이라고 하였다. 그 후 초기 우식 병소가 재광화 될 수 있다는 임상적인 증거를 토대로 다수의 재광화 실험이 행해졌다. Ten Cate 등<sup>9)</sup>은 우식병소의 재광화는 수산화인화석의 침착에 의해 이루어지는데, 초기에 표층근처에서 시작하다가 점차 안쪽으로 진행되면서 결

국 암층에 침진된다고 설명하였다. Koulourides<sup>10)</sup>는 타액이나 타액과 비슷한 조성을 가진 재광화 용액과 접촉한 법랑질이 본래 경도를 되찾는 것을 보고하면서 재광화 용액에 불소침가 시 광물질 침착 속도가 증가했다고 하였다. 그 후 법랑질의 재광화 기전을 포함한 화학적 연구가 활발히 진행되었는데, Silverstone<sup>11)</sup>은 재광화 후 병소의 조직 형태 분석 연구를 통해서 병소의 가장 내측과 표면층의 결정은 건전 법랑질의 결정보다 더 크며 이 곳이 재광화가 잘 일어나는 부위이기 때문이라고 설명하였다.

Ten Cate와 Arends 등<sup>12)</sup>은 타액 같은 재광화 용액이 산부식된 법랑질과 법랑질 병소에 광물질을 침착시켜 만들어진 재광화된 조직에서는 crystallite의 방향이 건전 법랑질과 달랐으며 결정의 방향도 일정하지 않았고 광물질의 밀도도 건전 법랑질과 달라서 arrested lesion에서는 세공이 존재함을 보고하면서 구강 내에 자연적인 재광화 과정이 존재하며 그 기전을 이해하면 효과적인 치아 우식에 관한 예방이 가능하게 된다고 생각하게 되었다.

이전의 많은 연구 결과 법랑질에서 광물질의 침착 속도는 불소 1ppm에 의해 2~3배 증가된다고 알려졌으며<sup>13-15)</sup>, 이런 결과는 Koulourides 등<sup>16)</sup>의 실험에서 부분 틀니에 인공적으로 만들어진 우식 병소가 구강 내에서 재광화됨을 확인하였다. 그러나 Backer Dirks<sup>8)</sup>는 종적 연구 조사결과 불소는 완전 병소의 재광화는 방해한다고 하였는데 이것은 표층에 fluoroapatite(FAP)가 침착하여 표층 세공을 막고 병소로의 확산을 방해하기 때문에 본래의 법랑질보다 우식 저항성은 가지지만 탈회의 형태를 유지하기 때문이라고 설명하였다.

반면 Ten Cate<sup>9)</sup>는 재광화 용액 내 1ppm의 불소의 영향을 관찰한 결과 완전한 병소 회복이 가능하며 고농도의 처리보다 효과가 크다고 하였다.

현재 대부분 선진국에서는 치아 우식증의 유행율은 감소되는 추세이며, 세계보건기구에서는 불소 국소 도포 및 불소함유치약 등 다양한 불소의 사용이 치아 우식증의 발생을 감소시킬 수 있다고 보고하였고, 여러 임상연구를 통해 불화물의 치아 우식증의 예방효과와 안전성이 알려지게 됨에 따라 다양한 방법으로 불화물이 사용되고 있다.

이에 따라 초기 우식증을 효과적으로 재광화 시키기 위해 불화물의 작용기전을 규명함과 아울러 치아 우식 예방효과가 우수한 불화물에 관한 연구가 수행되었으며, 불화물의 효과를 증진시키고 간편하게 이용할 수 있는 방법에 대해 다각적으로 연구되어 왔다.

이제까지 많은 *in vivo*와 *in vitro* 연구를 통해 불소를 포함한 불화물에 대한 연구가 진행되었으며 특히 구강내의 환경조건을 재현하여 그 우식 효과를 이해하기 위해서 동역학적인 환경하의 연구가 필요하게 되었다. 이에 실험실에서 구강의 조건을 재현하려는 시도로 pH 순환 모델을 개발하

게 되었다.

따라서 본 연구는 초기 법랑질 우식을 재광화하려는 시도로 동역학적인 기전에 입각하여 *in vitro* 상에서 이루어진 여러 축적된 data<sup>59-62)</sup>를 이용하여 재광화에 최적인 완충용액을 제조하고 pH 순환 모델 하에서 초기 법랑질 우식병소의 재광화에 미치는 영향을 비교 평가하고자 하였다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 연구재료

10배의 배율에서 관찰하여 우식증이 없고, 건전한 법랑질 표면을 갖는 소의 영구절치와 실험용액으로 인위적으로 제조한 supersaturated solution, 구강세척제인 Senstime® (Ildong Co. Seoul, Korea), Gagline® (Dong-A Co. Seoul, Korea) 및 음성 대조군으로 생리식염수를 연구재료로 사용하였다.

### 2. 연구방법

#### 가. 시편제작

소의 영구 절치로부터 직경 3mm의 원통형 법랑질 시편을 취한 후 아크릴 봉에 포매하고, 시편을 600번 연마지와 감마 산화알루미나( $\gamma$ -alumina oxide)를 사용하여 법랑질 표면이 아크릴 봉이 장축에 대해 직각이 되게 연마하였다.

#### 나. 탈회용액 제조 및 초기 우식 병소 형성

시편에 초기 인공 우식병소를 형성하기 위한 탈회용액 제조와 초기 우식병소는 홍 등<sup>63)</sup>의 연구방법에 따라 제조하였다.

(1) 1.0mol 젖산(lactic acid, Sigma, USA)을 90℃로 8시간 가열한 후에 사용하였다.

(2) 1% carbopol stock solution을 다음 과정에 의해 준비하였다.

900ml의 증류수에 10g의 Carbopol 907 (BFGoodrich Co. New York, USA)을 넣고 용해시켰다. Carbopol이 용해됨에 따라 pH가 2~3으로 되었다. 수산화나트륨(NaOH, Sigma, USA)를 사용하여 pH를 7.0으로 조절한다. 최종용액을 1000ml가 되게 하였다.

(3) 과포화된 수화 아파타이트(hydroxyapatite ; HAP/0.1mol lactic acid)용액을 다음 과정에 의해 준비하였다. 먼저 100ml의 1M lactic acid 를 1000ml 용적 플라스크(volumetric flask)에 넣고 증류수를 1000ml가 되게 채웠다. 이 용액을 2000ml 비이커에 넣고 50% NaOH 를 사용하여 pH가 5.0이 되게 조절하였다. 3g의 HAP를 넣고 pH를 5.0으로 유지하면서 30분간 용해시켰다. 여분의 HAP는 Whatman 42 여과지를 이용하여 여과하였다. 여과용액에 100ml의 1M lactic acid, 400ml 1% carbopol 과 450ml의 증류수를 첨가하면서 용액의 pH를 5.0으로 다시 조절하였으며 최종용액의 양이 2000ml가 되게 증류수를 첨가하면서 pH를 5.0을 유지하였다. 초기 우식 병소는 제조된 탈회용액에 시편을 33시간 처리하여 형성하였다.

표면경도계(Matsuzawa, Japan)를 이용하여 200g의 하중으로 법랑질 표면의 상, 하, 좌, 우측의 4부위에서 Vickers 경도(VHN)를 측정하여 평균 VHN이 25~45범위를 갖는 초기 우식 법랑질의 표면경도를 갖는 시편만을 실험에 사용하였다. 시편은 습도를 유지하여 냉장보관 하였다. 각 군의 시편은 12개로 하였다.

#### 다. 재광화 완충용액의 제조

농도 100ppm 염화불소 표준용액(100ppm NaF standard solution Orion Research Inc. USA)을 이용하여 불소농도 2ppm인 포화도가 각각 다른 용액을 제조하기 위하여 stock 용액을 이용하여 다음 구성에 따라 제조하고 이를 자동 분석기(747 Automatic Analyzer, Hitachi, Japan)로 정량분석한 다음 재광화 용액으로 이용하였다.

**Table 1.** The composition of initial remineralization solution

	Supersaturated solution
Lactic acid (mM)	10
Calcium (mM)	20.2
phosphate(mM)	10
Sodium azide(mM)	3.08
Fluoride(ppm)	2
pH	4.3
Degree of saturation	0.268

**Table 2.** The treatment protocol to be used for pH cycling (15 days)

a. 9:00 - 9:05 a.m	Experimental solution
b. 9:05 - 10:00 a.m	Saliva treatment
c. 10:00 - 10:05 a.m	Experimental solution
d. 10:05 - 11:00 a.m	Saliva treatment
e. 11:00 a.m - 12:00 p.m	Acid challenge
f. 12:00 - 1:00 p.m	Saliva treatment
g. 1:00 - 1:05 p.m	Experimental solution
h. 1:05 - 2:00 p.m	Saliva treatment
i. 2:00 - 2:05 p.m	Experimental solution
j. 2:05 p.m - 9:00 a.m	Saliva treatment

본 연구에 사용된 실험 용액은 과포화 용액과 대조군으로 구강 세척제인 Senstime<sup>®</sup>과 Gagline<sup>®</sup>을 사용하였으며 음성 대조군으로 생리식염수를 사용하였다.

라. 시편처리

pH 순환 모델 상에서 시편을 1시간 동안 탈회용액에 담가 탈회시키고 각 실험 용액에 일일 5분 동안 4회 처리하였으며 이 이외의 시간동안은 50% 사람타액과 50%의 인공 타액 - gastric mucin(0.22%), NaCl(0.038%), CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O(0.0213%), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(0.0738%) KCl(0.1114%) -으로 만든 타액 내에 보관하였다 (Table 2). 시편의 처리는 Table 2의 pH-cycling protocol 에 따라 15일간 진행하였다.

마. pH cycling 후 시편의 평가

시편 처리 전 VHN 측정부의 인접 부위에서 재차 VHN을 측정하여, 15일 동안 pH 순환 처리된 시편에 대해 처리 전후의 법랑질 표면의 경도변화를 비교하였다. 각 군의 평균과 표준편차를 계산하였고 각 군간의 차이를 ANOVA와 Duncan의 다중비교에 의해 검정하였다.

Ⅲ. 연구결과

과포화 용액의 재광화 효과를 알아보기 위해 초기 우식을 가지는 법랑질 시편을 pH 순환 모델에서 15일간 처리한 후 법랑질의 표면경도의 변화는 Table 3에 기록하였다.

pH 순환모델 처리 후 법랑질 표면경도의 증가량은 연구자가 제조한 supersaturated solution 이 가장 컸으나 Gagline<sup>®</sup>이나 Senstime<sup>®</sup>군과는 유의한 차이가 없었고 (p>0.05), supersaturated solution으로 처리한 군의 표면 경도만이 식염수 군과 비교하여 통계적으로 유의성 있게 증가한 것으로 나타났다(p<0.05).

Ⅳ. 고 찰

치아 우식은 세균에 의해 분해된 유기산에 의해 치아 경조직의 무기질이 용해되면서 나타나는 현상으로, 유기산의 종류, 유기산의 농도, pH, 치아의 무기질 및 유기질의 조성, 불소의 농도 그리고 구강 내 타액 성분 등 다양한 요인에 의해 영향을 받는다.

초기 법랑질 우식의 경우 특징적인 형태를 가지는데 표층에서는 광물질 소실이 적어 건전하나 표층하에서 광물질 소실이 주로 일어나게 된다. 이런 법랑질 초기 우식의 형성 기전에 대해 Brudevold 등<sup>17,18)</sup>은 표층 법랑질이 불소, 아연 등의 원소가 풍부하고 수분이나 탄산염이 적게 함유되어 있어 이 부위가 내부 법랑질 보다 우식에 저항성을 갖게 되기 때문이라 하였고, Christofferson과 Arends<sup>19)</sup>는 구강환경과 법랑질 자체 내에서 기인한 불소나 diphosphate 같은 억제인자가 우식 병소의 진행동안 법랑질로 확산되고, 치태 대사 과정에서 생긴 유기산들이 보호 표층층을 통하여 확산되어 표층하 법랑질만 용해시킨다고 하였으며, Sperber와 Bunocore<sup>20)</sup>는 비록 자연적으로 형성되는 억제인자와 법랑질 표층의 특이한 특성이 표층하 병소에 중요하지만 표층 법랑질을 제거한 부분에서도 표층하 병소가 생기는 것으로 보아 다른 설명이 필요하다고 하였다. Aoba 등<sup>21)</sup>은 compressed hydroxyapatite pellets를 이용하여 표층하 병소와 유사한 형태를 얻음으로써 억제 인자와 표층 법랑질의 화학적 특성이 표층하 병소의 형성에 필수적이지 않음을 밝혔다.

Margolis와 Moreno<sup>4,22,23)</sup> 등에 의하면 우식은 법랑질의 광물질과 접촉한 탈회용액의 화학적 반응의 결과라고 하였다. 우식 과정은 탈회 용액의 포화도에 의해 영향을 받게 되는데, 치아가 담긴 용액이 저포화일 때 치아에서 무기질이 빠져나가서 탈회가 일어나게 되고 빠져나간 용액의 칼슘, 인 이온이 dicalcium phosphate dihydrate(DCPD)의 형태로 침착이 일어나 표면하층을 형성한다고 하였다.

이 때 표층하 병소가 생기기 위해서는 이온이 확산되어 용

**Table 3.** The saliva-mediated effects of experimental solutions on surface hardness under pH cycling (VHN±S.D)

Treatment solution	Before treatment	After treatment	Surface hardening	Duncan grouping
Super. solution*	34.81±4.15	113.96±38.79	99.16±38.37	A
Gagline <sup>®</sup>	34.65±4.10	117.44±32.26	82.79±30.76	A B
Senstime <sup>®</sup>	34.75±3.98	110.02±28.44	75.26±27.24	A B
Saline	34.77±4.00	97.95±25.63	63.18±26.69	B

n=12, Means with the same letter are not significantly different

\* Supersaturated solution

해되는 속도가 침전되는 비율을 초과해서는 안되며, 법랑질 내의 상태가 침전이 일어날 수 있는 조건을 가지고 있어야 한다고 하였다. 즉 탈회용액이 역학적으로 dicalcium phosphate dihydrate(DCPD)를 형성할 수 있는 조건을 만족시켜야 표층하 병소가 형성될 수 있다고 하였으며 법랑질 표면에서의 수송 속도는 법랑질과 탈회용액 계면에서의 점도, pellicle의 존재, agitation에 의한 침투방해, 법랑질에 대한 탈회용액의 포화도에 의해 영향을 받는다고 하였다.

일반적으로 구강 내 환경에서의 재광화는 법랑질 결정이 유기물질로 부분적으로 둘러싸여 반응할 수 있는 표면적이 작고 외부용액으로의 이온의 확산속도가 느려 재광화를 제한하고, 법랑질 인회석 또한 서로 다른 조성의 인회석으로 구성되어 Ca/P비가 다양하며, 타액 단백질, 치태 세균과 같은 침전 방해 인자가 존재하기 때문에 인공 우식의 재광화보다 복잡하고 시간이 오래 걸린다<sup>24)</sup>. 이에 인공 우식을 이용함으로써 병소를 비교적 규격화하고 실험상 변이를 최소화 할 수 있으며 어느 정도 넓은 병소를 얻어 여러 가지 실험 조건을 적용시키고자 하였다.

현재 알려져 있는 화학적 인공 우식 형성방법은 gelatine system<sup>25)</sup>이나 hydroxyethylcellulose system<sup>26)</sup>, methylcellulose system<sup>26)</sup>을 이용한 표면층 보호 화합물을 이용하는 방법, diphosphonate(MHDP), polyphosphate 나 phytate같은 알려진 표면층 보호화합물을 이용하는 방법<sup>27)</sup>, 알려진 화학 조성과 hydroxyapatite에 대한 정의된 포화도를 가지는 buffer system<sup>22)</sup>이 있다.

이 중 gel을 이용하는 방법은 gel의 점도를 변형시킴으로써 병소 형성율을 느리게 조절하여 자연 우식과 유사한 형태의 초기 우식 소견인 암층이나 투명층의 형성을 유도할 수 있다는 장점이 있는 반면, 병소 형성기간이 너무 길고 실험결과에 영향을 주는 분석이 어려운 화학적 제재가 gel에 포함되어 있다는 단점이 있다. 반면에 acid-buffer system을 이용하는 방법은 동역학적인 기전에 의한 우식 형성법으로 다른 방법에 비하여 빠른 우식 진행을 보이는 것으로, 병소의 진행 속도가 빨라서 자연 우식과 달리 암층의 형성이 어려운 단점이 있으나 용액의 영향이 빠른 시간 안에 나타나 결과를 빨리 관찰할 수 있으며 다양한 조건을 손쉽게 변화시킬 수 있는 장점이 있어 우식 병소의 재광화나 우식 억제 물질의 연구, 결정구조의 성장 및 치아수복물의 우식 저항성에 관한 연구들을 할 수 있고, 병소 형성에 관계되는 여러 인자를 정확히 분리 평가 할 수 있다.

이번 실험에서는 인공 우식을 형성하기 위해 화학적 성분과 물리적 성질이 균일한 소의 영구 절치를 이용하였으며 젯산을 이용한 탈회 완충 용액을 제조하고 33시간 동안 처리하여 표면경도가 25~45VHN 범위를 갖는 초기 우식 병소를 얻은 후 불소가 포함된 과포화용액의 치아 우식 예방

효과를 검증하기 위해 pH 순환 모델을 이용하였다.

불소도포의 우식 저항 효과는 주로 타액의 재광화 증진과 법랑질의 산에 의한 탈회 방지의 효과에 의해 얻어진다. 이는 많은 *in vivo*와 *in vitro* 연구를 통해 주로 불소의 유입, 병소의 광물질 침착과 감소, 법랑질 표면 경화나 연화, 표본의 조직조건 및 세공의 변화 등의 변수에 대해 연구가 진행되어 왔다. 그러나 많은 초기의 연구는 불소 도포에 의한 하나의 병소 형태, 고정된 환경에서 주로 연구가 이루어져 불소 도포의 우식 저항효과의 기전을 이해하기 위해서는 동역학적인 환경 하에서 다양한 병소의 단계에서의 불소 반응에 대한 연구가 필요하게 되었다. 따라서 본 연구는 비교적 구강 내와 비슷한 pH 순환 모델과 인공 타액을 이용하여 초기 인공 우식에 대한 불화물의 효과를 알아보려고 하였다.

pH 순환 모델은 1980년 Koulourides<sup>28)</sup>가 처음으로 순환의 의미를 갖는 모델을 고안하였고 그 후 ten Cate와 Duijsters<sup>29)</sup>는 구강내와 유사한 현대적 의미의 pH 순환 모델을 고안하였으며, White<sup>30,31)</sup>, White와 Faller<sup>32)</sup>, White와 Featherstone<sup>33)</sup>, Featherstone 등<sup>34)</sup>에 의해 구강 내 환경과 유사한 모델로의 발전이 계속되어 왔다. pH 순환모델은 일관된 결과의 도출이 가능하고 우식 병소의 유발요인들의 조절이 가능하며, 비교적 간단한 방법으로서, 조건이 다른 상황에서 실험해도 같은 조직학적 특성을 재현할 수 있다는 장점이 있다. 그러나 미생물이 매개되지 않으며 타액과 치면 세균막과 같은 생물학적인 면과 구강 내에서 계속 변하는 타액의 양, 성분을 재현하기 어려우며, 탈회와 재광화의 시간 분배 등 실험조건과 기질 선택에 의한 인위적인 오류가 나타날 수 있다는 단점이 있다<sup>35)</sup>.

그래서 pH 순환 모델 사용 시에는 탈회와 재광화의 주기와 하루동안 pH 변화의 횟수를 조절해야 한다. 전체적인 탈회시간은 세균이 탄수화물을 발효한 후 법랑질 표면의 치태 내에서 일어나는 pH 감소시간의 합을 고려해야 한다. Moreno와 Zahradnik<sup>22)</sup>에 의하면 *in vivo*에서는 치태 내 산은 제거되거나 중화된 후 어느 정도의 시간동안 법랑질 내에서 낮은 pH가 유지된다고 하였다. 게다가 실질적으로 하루에 구강 내에서 변하는 주기는 각자 개인의 식이 습관에 따라 다르다. Ten Cate와 Duijsters<sup>29)</sup>는 탈회기간을 0, 3, 8시간에서 비교하였는데 사람의 우식 민감도에 따라 탈회기간을 달리 할 수 있다고 하였다. 우식 민감도가 높은 사람은 탈회기간이 길다고 할 수 있다. 이제까지의 재광화 기간은 구강 내에서 탄수화물을 소모하는 시간이 낮에는 1~4시간, 밤에는 8~12시간으로 한정되기 때문에 단기간 동안 측정해 왔으나, Ten Cate와 Arends<sup>36)</sup>는 장기간의 재광화 용액 처리에 대한 효과를 본 실험에서 저농도의 불소를 장기간 적용하는 것이 1회 고농도의 불소 처리보다 효과가 우수하였는데 이는 고농도의 불소를 처리한 경우는 표면층의 세공에 비용해성 침전물이 침전되어 병소의 완전한 회복

을 방해하기 때문이라고 설명하였다.

본 실험에서는 과포화 용액의 효과를 검증하기 위해 Ten Cate<sup>29)</sup>와 White<sup>30)</sup>의 pH 순환모델을 변형하여 임의로 탈회 시간을 1시간으로 정하였다. pH 순환 모델에서의 탈회 및 재광화 시간을 변화시킴으로써 적절한 우식을 만들어 내고 실험조건을 달리 함으로써 실험 결과는 달라 질 수 있다. Moreno와 Margolis<sup>23)</sup>에 의하면 완충용액의 범랑질에 대한 칼슘, 인 등의 포화도에 의해 우식 표면하층 생성 여부가 결정되며 탈회시간이 길수록 병소의 깊이가 증가한다고 했다. Arends와 Christoffersen<sup>37)</sup>은 탈회 시간에 따라 병소의 깊이와 광물질 소실은 비례관계가 있다고 하였는데, *in vitro*에서는 탈회 반응이 치태나 타액, 범랑질에서 기원한 불소나 단백질 같은 억제인자에 의해 조절되므로 탈회속도가 억제 인자에 의한 용해과정에 의해 결정된다고 하였다. 본 실험에 사용된 시편은 소의 영구 절치로써 Featherstone과 Mellberg<sup>38)</sup>의 연구에 의하면 동일한 조건에서 탈회 시 사람의 영구치보다 병소의 폭이 1.7배 많이 형성된다고 보고하여 인간의 영구치를 이용했던 실험보다 탈회 시간을 줄여 실험을 진행하였다.

그러나 본 연구에서 정한 탈회시간 및 재광화 용액의 적용 시간을 결정함에 있어 구강 내 환경을 완전 재현하는 데는 한계가 있다. 따라서 차후에는 pH 순환 모델 사용 시 pH 변화 주기 및 구강 내 환경 재현을 위한 추가적인 연구가 필요하리라 사료된다.

범랑질에서의 광물질의 변화를 측정하는 방법에는 범랑질 표면의 미세경도 측정법<sup>39)</sup>, 범랑질 단면의 미세경도 측정법<sup>40)</sup>, 편광 현미경<sup>41)</sup>, microradiography<sup>42)</sup>, iodine absorptiometry<sup>43)</sup>, light scattering<sup>44)</sup> 등이 있다. 이 중 본 실험에서 사용된 범랑질 표면 미세경도 측정법은 보통 일정하게 가해진 하중에 대한 표면의 압입에 대한 표면적의 변화를 표시하는 방법으로서 Arends 등<sup>39)</sup>은 병소의 깊이는 미세경도 측정기의 압흔의 대각선 길이에 비례한다고 보고하여 이번 실험에서 Vickers 경도 측정법을 사용하였다.

그러나 Arend와 Gelhard<sup>45)</sup>는 깊은 우식 병소에서는 재광화 과정을 평가 할 때 표면경도의 측정만으로 양적인 평가를 할 수 없다고 주장하였는데, 이는 경도의 평가는 성분이 일정한 재료에서 가능한 반면, 우식의 표면하 탈회 및 재광화 과정은 광물질 소실과 침착이 이질적이기 때문이라고 설명하였다. 표면 경도와 병소의 광물질 조성간 관계는 50  $\mu\text{m}$ 이하의 얇은 깊이의 초기 우식에 제한적이라 볼 수 있다. 그러나 표면 경도 방법으로 측정된 재광화는 방사선 상으로 비교해 볼 때 1:1의 관계는 아니더라도 병소 내 재광화 과정 측정에 민감하며 특히 범랑질 외층의 탈회와 재광화는 표면 미세경도에 영향을 미칠 수 있다. 그러나 깊은 표면하 병소에서는 microradiography나 longitudinal microhardness analysis 등의 방법이 병행되어야 할 것으로 사

료된다<sup>46)</sup>.

구강세정제나 치약 같은 불소제제의 우식 저항 효과는 2 가지 기전으로 설명된다. 재광화를 통해 범랑질 우식 병소의 회복속도를 증가시키거나 이차적 산 공격에 재광화된 부위의 저항성을 증가시키는 것이다. 불소가 재광화를 증진시키는 것은 이미 여러 연구에서 정립되었으나 최근 몇몇 연구에서 이차적 산 저항이 훨씬 중요하다고 보고되었다. Ten Cate와 Duijster<sup>29)</sup>은 *in vitro* pH 순환 모델을 이용하여 불소가 탈회속도를 감소시키는 작용이 재광화 속도 증가 효과보다 좀 더 초기에 더 많은 효과를 보인다고 하였다. 재광화 속도의 증가는 탈회와 재광화에 관련된 확산과정을 복잡하게 하는 불소화된 광물질이 표면 세공에 침착하기 때문이다. Koulouride<sup>28)</sup>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.

Ten Cate와 Duijsters<sup>29)</sup>는 pH 순환 모델에서 탈회와 재광화에 미치는 불소처리의 시간에 대한 효과를 알아보는 실험에서 재광화 후보다 재광화 전 불소 처리가 약간의 장점을 가진다고 하였다. 불소는 초기 탈회로 표면층이 약간 연화된 병소에서도 불소가 침착되어 crystal 성장을 증진시키고 이후의 산에 대해서 탈회를 방지한다고 알려져 있다.

본 연구는 인위적으로 유발시킨 인공 우식을 재광화 하기 위해 supersaturated solution을 제조하였는데, Feagin와 Jeansonne<sup>47)</sup>은 탈회된 범랑질의 재광화 연구에서 적절한 불소 농도가 약 1~5ppm이라고 하였고, Ten Cate와 Arends<sup>14)</sup>는 불소가 없는 용액에 비해 1ppm의 불소가 일정하게 유지되면 병소의 회복 속도가 두 배가 된다고 하였다. Silverstone<sup>48)</sup>은 광학 현미경 상에서 1~10ppm의 불소가 석회화를 증대시키고 짧은 기간에 최대 변화를 유도한다고 하였다. 본 실험에서는 한 등<sup>60)</sup>의 실험에서 불소 농도에 따른 재광화 효과는 2ppm에서 심부까지 불소가 침착되어 재광화가 잘 일어나고 있다고 보고된 바 재광화 용액의 불소 농도는 2ppm으로 정하였다.

재광화 용액의 pH에 대한 연구도 있었는데, Feagin 등<sup>49)</sup>에 의하면 재광화와 완충용액의 pH 증가 사이에는 명확한 비례관계가 존재한다고 하였고 Featherstone 등<sup>50)</sup>은 재석회화에 적당한 pH를 6~8이라고 보고하였고 Margolis 등<sup>51)</sup>은 산성용액이 중성용액보다 재광화에 더 효과적이라고 하였다. Nancollas와 Purdie<sup>52)</sup>는 solid-solution interface의 반응성은 용액의 pH의 변화에 영향을 받으며 불소이온의 첨가는 탈회-재광화 평형에 도달하기 위해 필요한 칼슘, 인, 수소이온의 농도를 낮춘다고 하였다. 또한 Moreno와 Margolis<sup>53)</sup>에 의하면 치태 내의 pH는 5.69로 타액이나 혈액의 6.7, 7.35보다 낮았으며, Nikiforuk<sup>54)</sup>는 치아 우식 유발 미생물 중 가장 큰 역할을 하는 *S. mutans*에 의해

sucrose가 분해되어 젖산을 형성하면 pH가 4.3까지 떨어진다고 하였다. 이전의 박, 오 등의 실험<sup>59,62)</sup>에서 중성에 가까운 pH에서 재광화 시 무기질의 침착이 표층부위에 국한되어 일어나지만, pH 4.3인 산성의 조건에서는 탈회 과정과 동시에 탈회된 병소의 심층부에서 무기질이 침착되는 효과를 보였다. 이러한 여러 연구 결과를 토대로 본 연구는 칼슘과 인이 과포화된 pH 4.3의 유산 완충용액을 실험용액으로 사용하였다.

이번 실험에서는 미세 정도 측정으로 병소의 표층에서의 평가만을 시행하였는데, 음성 대조군에 비해 supersaturated solution 군에서 미세 정도가 유의성 있게 증가되었음을 볼 수 있다. 이는 supersaturated solution에 의해 초기 우식의 표면에서 재광화 및 2차적 산에 의한 탈회가 억제되고 있음을 시사한다.

본 실험에서는 양성대조군으로 현재 구강양치액으로 시판되고 있는 Senstine<sup>®</sup> 및 Gagline<sup>®</sup>을 이용하였는데, Senstine<sup>®</sup>은 세틸베타인, 인크로민 옥시드를 포함한 불화 나트륨계재로서 불소농도가 90.48ppm이며, Gagline<sup>®</sup>은 염화 세칠 피리디늄과 자일리톨로 구성되어 있다. Senstine<sup>®</sup>은 실험 용액으로 제조된 과포화 용액에 비해 높은 불소농도를 가지지만 미세정도 변화량 측정시 재광화 효과가 비슷하게 나타났다.

따라서 고농도의 불소가 재광화에 효과적이라고 단정할 수 없으며, 저농도의 불소라 할지라도 포화도를 재광화에 적절한 조건으로 조절한다면 재광화 효과를 얻을 수 있다고 여겨진다.

재광화 용액의 평가를 위해 pH 순환 모델에서 타액을 사용한 Zahradnik<sup>55)</sup>의 연구에서 보듯이 타액의 pellicle이 우식 병소의 반응에 강한 영향을 미치기 때문이다. 본 연구에서도 탈회 및 재광화 시 타액의 영향을 알아보기 위해 pH 순환 모델에서 생리식염수로 실험을 시행한 결과 본 연구에서처럼 타액을 이용한 결과보다 표면경도의 증가량이 적었다. 이는 불소용액의 재광화 효과가 타액에 의해 증대됨을 시사하며, 타액 내의 완충효과와 타액 내의 단백질에 의한 법랑질의 보호작용이 복합되어 나타난 결과로 추측된다. 즉 타액은 구강 내에서 우식을 재광화하는 효과를 가지고 있음을 알 수 있다.

타액이 우식의 방어 역할을 하는 것은 다발성 우식이 있는 환자에게 주로 타액의 기능 저하가 있음을 통해 이미 알려져 있다. 타액은 우식으로 부터 치아를 보호하는 여러 요소를 포함한다. 항세균성 요소, 항체, 치태에 의한 기본 화합물 합성하는 urea, arginine peptide같은 nitrogenous substance같은 유기화합물과 탄수화물 및 치태 내 산을 희석하고 씻어내는 작용을 하는 물, 치태 내 산도를 조절하는 완충작용이 있는 bicarbonate, 타액의 포화도를 유지하는 칼슘과 인 이온 등의 무기화합물 등을 포함함으로써 치아

광물질은 그 형태를 유지한다. 특히 타액의 우식에 대한 방어기전은 무기 화합물에 의한 작용이 더 크다. 즉 타액을 자극하여 flow가 증가하면, 유기화합물의 농도는 증가하지 않지만 완충작용 및 포화도는 증가하여 우식 억제 효과가 증대된다. bicarbonate가 증가하면 완충력 뿐만 아니라 pH가 증가하고 HA를 포함한 칼슘과 인에 대한 과포화도가 증가한다<sup>56)</sup>. Nieuw Amerongen 등<sup>57)</sup>에 의하면 법랑질에 흡수된 mucin pellicle의 존재는 산 공격으로부터 치아를 보호한다고 하였다. van der Reiden 등<sup>58)</sup>은 타액의 대용품으로 polymer를 사용하면 *in vitro* 상 법랑질의 탈회를 감소할 수 있으며 그 정확한 기전은 모르나 법랑질 표면에 흡수된 polymer 층의 형성 때문이라고 하였고 낮은 농도(1ppm)의 불소가 억제효과를 가진다고 하였다.

pH 순환 모델에서 불소를 포함한 과포화용액에 의해 초기 우식 법랑질 표면경도는 증가하였으며 음성대조군으로 사용된 생리식염수에 비해 병소의 표면 경도의 증가가 유의성 있는 차이를 보여주었다. 이처럼 과포화 용액의 사용으로 법랑질 우식의 진행을 방해하고 이차적인 산에 대하여 저항할 수 있음을 알 수 있었으며 특히 재광화 효과는 타액에 의해 증대되었다.

이제까지 실험과는 달리 본 실험은 *in vivo*의 조건을 재현하려는 노력으로 pH 순환 모델을 이용하였는데 *in vitro* 실험의 한계를 보완하기 위해 탈회와 재광화를 주기적으로 적용하여 pH 변화를 구강 내와 비슷하게 재현하려고 노력하였으며 본 실험 결과 pH 순환 모델은 구강환경을 재현하는데 적절하다고 볼 수 있다. 그러나 추가적인 요소-타액에 의한 희석, 불소의 구강내의 유용성과 clearance 를 고려하지 못하여 실험자체의 오차를 피할 수 없는 한계가 있다.

본 실험에서 사용된 법랑질 표면경도 측정법은 법랑질 표본내의 광물질 조성을 나타내는 방법으로서 약간의 한계를 가지지만 재광화 및 병소의 진행을 평가하는데 간단하며 유용하게 사용할 수 있다. 그러나 표면층에 한정된 비교만이 가능하여 좀 더 깊은 우식이나 표면하층의 변화를 관찰하기 위해서는 추가적인 평가방법을 고려해야 한다.

결론적으로 이번 연구는 동역학적인 기전에 입각하여 제조된 supersaturated solution 의 초기 법랑질 우식에 대한 재광화 효과를 비교하기 위해 구강내의 환경과 유사하게 재현한 pH 순환 모델을 이용하였으나 앞으로는 정제된 supersaturated solution 의 재광화 및 항우식 효과를 환자의 구강 내에서 직접 평가하는 임상적인 연구가 추가되어야 할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

법랑질 초기 우식병소를 효과적으로 예방하기 위해 불소를 포함한 과포화용액을 제조하고, 그의 재광화 효과를 알

아보기 위해 구강 내와 비슷한 환경을 재현하는 pH 순환 모델 하에서 supersaturated solution, Sensitime, Gargle 용액에 15일간 처리한 후 타액에 시편을 보관하고 표면 경도 측정법을 이용하여 그 전후 표면 경도 변화를 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 법랑질 표면경도는 pH cycling 후 모든 군에서 증가하였으나 supersaturated solution 군만이 음성 대조군인 식염수에 비해 유의성 있는 증가를 보여주었다( $p < 0.05$ ).
2. 타액의 재광화 효과는 불소 용액에 의해 증대되는 것으로 나타났다.
3. pH cycling model 은 실험실에서 구강 내의 환경을 효과적으로 재현할 수 있었다.

결론적으로 pH 순환모델 하에서 초기 법랑질 우식은 불소가 포함된 용액에 의해 재광화가 가능하였고 실험실에서 구강 내의 환경과 유사하게 재현할 수 있어 재광화 효과를 평가할 수 있는 유용한 방법이 될 수 있을 것으로 사료된다.

#### 참고문헌

1. Moore BW, Carter WJ, Fosdick LS. The formation of lactic acid in dental plaque(1). *J Dent Res* 1956;35:778-785.
2. Theuns HM, van Dijk JWE, Driessens FCM, Groeneveld A. Effect of time, degree of saturation, pH and acid concentration of buffer solutions on the rate of in vitro demineralization of human enamel. *Archs oral Biol* 1985;30(1):37-42.
3. Theuns HM, van Dijk JWE, Driessens FCM, Groeneveld A. Effect of time and degree of saturation of buffer solutions on artificial carious lesion formation in human tooth enamel. *Caries Res* 1983;17:503-512.
4. Margolis HC, Moreno EC. Kinetic and thermodynamic aspects of enamel demineralization. *Caries Res* 1985;19:22-35.
5. Margolis HC, Moreno EC. Physicochemical perspectives on the cariostatic mechanisms of systemic and topical fluorides. *J Dent Res* 69(spec Iss) 1990;19:606-613.
6. Head JA. A study of saliva and its action on tooth enamel in reference to its hardening and softening. *J Am Med Assos* 1912;59:2118-2122.
7. Anderson BG. Clinical study of arresting dental caries. *J Dent Res* 1938;17:443-452.
8. Backer Dirks O. Post-eruptive changes in dental enamel. *J Dent Res Sup* 3 1966;45:503-511.
9. Ten Cate JM, Jongebloed WL, Arends J. Remineralization of artificial enamel lesions in vitro IV. Influence of fluorides and diphosphonates on short and long term remineralization. *Caries Res* 1981;15:60-69.
10. Koulourides T. Implication of remineralization in the treatment of dental caries in processing symposium on current topics in dental caries in commemoration of the decennial anniversary of Hihon university school of dentistry at Matsudo, Matsudo, Japan. 1982:198.
11. Silverstone LM. Remineralization and enamel caries new concepts. *Dent update*. 1983:10
12. Ten Cate JM, Arends J. Remineralization of artificial enamel lesions in vitro III. A study of the deposition mechanism. *Caries Res* 1980;14:351-358.
13. Feagin FF. Calcium, Phosphate and fluoride depositions on enamel surfaces. *Calcif Tissue Res* 1971;8:154-164.
14. Ten Cate JM, Arends J. Remineralization of artificial enamel lesions in vitro. *Caries Res* 1977;11:277-286.
15. Phantumvanit P, Feagin FF, Koulourides T. Strong and weak acid sampling for fluoride of enamel remineralized in sodium fluoride solutions. *Caries Res* 1977;11:52-62.
16. Koulourides T, Phantumvanit P, Munkgaard EC, Housch T. An intraoral model used for studies of fluoride incorporation in enamel. *J oral pathol* 1974;3:185-195.
17. Brudevold F, McCann HG, Gron P In Wolstenholm. *Caries resistant teeth as related to the chemistry of enamel*. p121 Churchill, London 1965.
18. Brudevold F, Steadman LT, Smith FA. Inorganic and organic components of tooth structure. *Ann N Y Acad Sci* 1960;85:110-132.
19. Christoffersen J, Arends J. Progress of artificial carious lesions in enamel. *Caries Res* 1982;16:433-439.
20. Sperber GH, Buonocore MG. Enamel surface in white spot formation. *J Dent Res* 1963;42:724-731.
21. Aoba T, Okazaki M., Takahashi T, Moriwaki Y. X-ray diffraction study on remineralization using synthetic hydroxyapatite pellets. *Caries Res* 1978;12:223-230.
22. Edgard C, Moreno EC, Zahradnik RT. Chemistry of enamel subsurface demineralization in vitro. *J Dent Res sup* 2 1974;53:226-235.
23. Margolis HC, Murphy BJ, Moreno EC. Development of carious-like lesions in partially saturated lactate buffers. *Caries Res* 1985;19:36-45.
24. Ten Cate JM. In vitro studies on the effects of fluoride on de- and remineralization. *J Dent Res* 69(Spec.Issu) 1990:614-619.
25. Bartheld von F. Decalcification in initial dental caries. *Ned. Tijdschr Tandheelk* 1958;65:76-89.
26. Gray JA, Francis MD. Physical chemistry of enamel dissolution: in sognaes, mechanisms of hard tissue destruction. 1963:213-260 American Association for the Advancement of science, Washington.
27. Featherstone JDB, Duncan JF, Cutress TW. A mechanism for dental caries based on chemical processes and diffusion phenomena during in vitro caries simulation on human tooth enamel. *Archs oral Biol* 1979;24:101-112.
28. Koulourides T. Increasing tooth resistance to caries through remineralization. *Foods Nutr. Dent Hlth* 1982;2:193-207.
29. Ten Cate JM, Duijsters PPE. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. *Caries Res* 1982;16:201-210.
30. White DJ. Reactivity of fluoride dentifrices with artificial caries I. Effects on early lesions : fluoride uptake, surface hardening and remineralization. *Caries Res*. 1987;21:126-140.
31. White DJ. Reactivity of fluoride dentifrices with artificial caries II. Effects on subsurface lesions : fluoride uptake, fluoride distribution, surface hardening and remineralization. *Caries Res*. 1988;22:27-36.
32. White DJ, Faller RV. Fluoride uptake from anticalculus dentifrices in vitro. *Caries Res* 1987;21:40-46.
33. White DJ, Featherstone JDB. A longitudinal microhardness analysis of fluoride dentifrice effects on lesion

- progression in vitro. *Caries Res* 1987;21:502-512.
34. Featherstone JDB, Shariati M, Brugler S, White DJ. Effect of an anticalculus dentifrice on lesion progression under pH cycling conditions in vitro. *Caries Res* 1988;22:337-341.
  35. White DJ. The application of in vitro models to research on demineralization and remineralization of the teeth. *Adv Dent Res* 1995;9:175-193
  36. ten Cate JM, Arends J. Remineralization of artificial enamel lesions in vitro. II. Determination of activation energy and reaction order. *Caries Res* 1978;12(4):213-222.
  37. Arends J, Christoffersen J, Christoffersen MR, Ogaard B, Dijkman AG, Jongebloed WL. Rate and mechanism of enamel demineralization in situ. *Caries Res* 1992;26:18-21.
  38. Featherstone JDB, Mellberg JR. Relative rates of progress of artificial carious lesions in bovine, ovine and human enamel. *Caries Res* 1981;15(1):109-114.
  39. Arends J, Schuthof J, Jongebloed WL. Lesion depth and microhardness indentations on artificial white spot lesions. *Caries Res* 1980;14:190-195.
  40. Davison CL, Hoekstra IJ, Arends J. Microhardness of sound, decalcified and etched enamel related to calcium content. *Caries Res* 1974;8:135-144.
  41. Silverstone LM. Structure of carious enamel, including the early lesion *Oral Sci Rev* 1973;3:100-160.
  42. Froeneveld A, Jongebloed WL, Arends J. The mineral content of decalcified surface enamel A combined microprobe-quantitative microradiography study. *Caries Res* 1979;8:267-274.
  43. Almquist H, Wefel JS, Lagerlof F, Ekstrand F, Hendrikson CO. In vitro root caries progression measured by <sup>125</sup>I absorptiometry : Comparison with chemical analysis. *J Dent Res* 1988;67:1217-1220.
  44. Ten Bosch JJ, Van der Mei HC, Borsboom PCF. Optical monitor of in vitro caries. *Caries Res* 1984;540-548.
  45. Arends J, Gelhard TBFM. In vivo remineralization of human enamel in leach, edgar de and remineralization of the teeth. 1-16 IRL Press Oxford 1983.
  46. Featherstone JDB, ten Cate JM, Shariati M, Arends J. Comparison of artificial caries like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. *Caries Res* 1983;17:385-391.
  47. Feagin FF, Jeansonne BG. Effective fluoride concentrations to promote apatite mineralization at the enamel surface. *Am. Libr J med Sci* 1973;10:107-114.
  48. Silverstone LM. The effect of fluoride ions on the remineralization of enamel lesions in vitro. *Caries Res* 1977;11:134.
  49. Feagin F, Patel PR, Koulourides T, Pigman W. Study of the effect of calcium, phosphate, fluoride and hydrogen ion concentration on the remineralization of partially demineralized human and bovine enamel surface. *Archs Oral Biol* 1971;16:535-548.
  50. Featherstone JDB, Rodgers BE, Smith MW. Physicochemical requirements for rapid remineralization of early caries lesions. *Caries Res* 1981;15:221-235.
  51. Margolis HC, Moreno EC, Murphy BJ. Effect of low levels of fluoride in solution on enamel demineralization. *J Dent Res* 1986;65(1):23-29.
  52. Nancollas GH, Purdie N. The kinetics of crystal growth. *Quart Rev.* 1964;18:1-20.
  53. Moreno EC, Margolis HC. Composition of human plaque fluid. *J Dent Res.* 1988;67(9):1181-1189.
  54. Nikiforuk G. Fluoride dentifrices and fluoride rinses. *Understanding dental caries Prevention* : Karger, Basel and New York, 1985:11:87-112.
  55. Zahradnik RT. Modification of salivary pellicles of in vitro enamel remineralization. *J Dent Res* 1979;58:2066-2073.
  56. Edgar WM, Higham SM, Manning RH. Saliva stimulation and caries prevention. *Adv Dent Res* 1994;8(2):239-245.
  57. Nieuw Amerogen AV, Oderkerk CH, Driessen AA. Role of mucins from human whole saliva in the protection of tooth enamel against demineralization in vitro. *Caries Res* 1987;21:297-309.
  58. Van der Reijden WA, Buijs MJ, Damen JJM, Veerman ECI, ten Cate JM, Nieuw Amerogen AV. Influence of polymers for use in saliva substitutes on de- and remineralization of enamel in vitro. *Caries Res* 1997;31:216-223.
  59. 박성호, 이찬영, 이정석. 유산 완충액을 이용한 인공 치아우식의 형성에 미치는 산의 농도와 pH에 관한 연구. *대한치과 보존학회지* 1993;18:277-290.
  60. 한원섭, 금기연, 이찬영. 인공치아 우식의 재광화에 미치는 불소의 영향. *대한 치과 보존학회지* 1996;21:161-173.
  61. 김민경, 금기연, 이찬영. 법랑질 인공 우식의 재광화에 미치는 pH의 영향에 관한 연구. *대한치과 보존학회지* 1997;22:193-208.
  62. 오현석, 금기연, 노병덕, 이찬영. 산 완충용액의 pH가 인공 치근우식의 형성에 미치는 영향. *대한치과 보존학회지* 1999;24:495-502.
  63. 홍석진, 박기철, Stookey GK. 인공우식 법랑질에 대한 불소함유 치약의 효과. *대한구강보건학회지* 1996;20:1-10.