

Mutans streptococci에 대한 polyphosphate의 항균효과

강계숙 · 최영철

경희대학교 치과대학 소아치과학교실

국문초록

치아우식증의 원인균인 *S. mutans* GS5와 *S. sobrinus* 6715에 대한 polyP의 효과를 관찰하여 보다 안전하고 효과적인 치아우식증 예방을 위한 임상적용의 가능성을 고찰하고자 첫째, 다양한 사슬길이의 polyP를 첨가한 후 흡광도를 측정하여 MIC를 결정하고, 둘째, 실험균주를 흡광도 0.3~0.5까지 증식시킨 후 MIC 농도의 polyP를 첨가하여 흡광도의 변화를 측정함으로써 균주증식 후 성장 억제효과를 관찰하였으며, 셋째, 생균수 측정으로 polyP의 항균효과를 평가하였고, 넷째, 핵산유리의 정도로 polyP의 킬레이션 작용여부를 관찰하였으며, 다섯째, polyP의 비수용성 글루칸 합성능력을 관찰하였으며, 여섯째, 투과전자현미경으로 세포막과 세포질 내의 구조적 변화를 관찰하였다. 이상의 연구를 통하여, polyP의 살균작용이 *S. mutans*와 *S. sobrinus*에 대한 성장을 억제시키는 효과가 있는 것으로 가늠된다. 이와 같은 성장 억제효과는 polyP의 킬레이션에 의한 것이라기보다는 균주 세포의 구조적, 형태적 변화가 주된 요인이었던 것으로 판단된다.

주요어 : 항균효과, Polyphosphate, *S. mutans*, *S. sobrinus*

I. 서 론

치아우식증은 구강 내에서 발생하는 가장 흔한 감염질환 중의 하나로, 특히 어린이에서 치아상실을 초래하는 주요 원인이 되고 있다. 치아우식증은 세균의 대사과정에서 생산된 유기산에 의해 치아의 경조직이 손상되는 범발성 질환으로, 숙주인 치아, 치태 내 세균, 탄수화물의 섭취정도 및 시간 등의 4대 요소간의 불균형에 의하여 유발된다^{1,2)}. 어린이에서는 올바른 잇솔질이나 식이 조절이 어렵고 또 구강위생의 유지를 위한 자발적인 의지의 부족으로 치아우식증의 예방에 어려움이 있어, 보다 간편한 예방법의 개발이 절실히 요구되고 있다.

치아우식증의 주 원인균은 mutans streptococci이며, 그 중에서도 인간의 우식부위에서 주로 발견되는 세균은 *Streptococcus mutans*와 *Streptococcus sobrinus*로 알려져 있다^{3,4)}. 치태세균을 억제하여 치아우식증을 예방하기 위한 방법으로 불소함유제⁵⁻⁸⁾, chlorhexidine⁷⁻¹⁰⁾, 인산칼슘¹¹⁻¹³⁾, 항생제¹⁴⁾ 등의 도포, 양치 및 복용 그리고 치아우식 예방백신¹⁵⁾, 치태의 형성을 억제하는 구강내 세균의 이용법¹⁶⁻¹⁸⁾ 등에 대한 많은 연구가 있었다. 그러나 특히 불소가 전신투여 또는 국소도포 등으로 치질의 산에 대한 저항성을 효과적으로 증가시킬 수는 있지만, 고농도 또는 과다투여는 치아 및 전신적 부작용의 문제점 등이 있다¹⁹⁾. 또한 chlorhexidine 역시 우수한 항균효과를 지니고 있으나, 혀나 치아를 착색시키는 문제점 또는 불쾌한 맛 등의 문제점²⁰⁾

들이 어린이에서의 사용을 어렵게 한다. 한편 예방백신의 사용이나 치태형성 억제세균의 이용방법 등도 임상적 안정성 등의 문제점들이 좀 더 개선되어야 할 필요가 있어, 치아우식증의 예방을 위한 보다 안전하고 효과적인 방법에 관한 많은 연구가 필요하다.

무기 polyphosphate(이하 polyP)는 수십 또는 수백의 orthophosphate(Pi)가 고에너지의 phosphoanhydride 결합으로 연결된 선상의 중합체로서 세균, 곰팡이, 원생동물, 식물 및 포유동물 등 거의 모든 생명체의 세포에서 발견된다^{21,22)}. 미생물 내에서 발견되는 polyP는 무기인산의 저장고로 ATP합성을 위한 에너지원으로 사용되거나, 알칼리 이온을 중화시킴으로써 세포질 내의 수소이온 농도를 일정하게 유지시키는 역할을 한다. 또한 환경적 스트레스에 대한 미생물의 내성과 발육에 관여하며, 세포벽의 구성요소인 양이온과의 킬레이션 반응으로 세균의 독성을 감소시키고 세균의 기능에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다^{21,23)}. PolyP는 미국 농무성으로부터 사용이 허가된 인체에 무해한 식품첨가제로서²⁴⁾, 음식물을 연화시키거나 육류의 수분 및 신선도 유지, 산화에 의한 악취 및 변색의 방지, 훈제 시 색조의 유지 등과 같은 목적으로 이용되고 있다^{21,25)}.

그러나 외부로부터 미생물의 주위환경에 polyP가 투입되면 일부의 미생물에 대해 직접 또는 간접으로 항균효과를 발휘하는 것으로 보고되고 있다²⁵⁾. 이에 관하여 Jen과 Shelef²⁶⁾는 polyP가 *S. aureus*의 세포막 투과장벽(permeability barrier)

의 유지에 중요한 역할을 하는 양이온을 킬레이션 시킴으로써 대사작용 및 성장을 억제한다고 보고한 바 있다. Lee 등²⁷⁾도 *S. aureus*에 대한 항균효과 실험에서 세포생장에 필수적인 Mg^{2+} 와 polyP가 킬레이션을 형성하여 대사기능을 억제하고 살균효과 및 세균 용해효과를 나타낸다고 하였다. 최근 공 등²⁸⁾, 최 등²⁹⁾ 그리고 최 등³⁰⁾ 등은 각각 *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas endodontalis* 및 *Porphyromonas gingivalis* 등에 대한 polyP의 항균효과를 보고한 바 있어, polyP에 대한 치의학 분야의 관심도 점차 높아지고 있다. 또한 Shibata와 Morioka³¹⁾는 hamster에 *S. mutans*의 접종과 함께 자당(sucrose)의 공급으로 치아우식증을 유발시킨 후 치태에 polyP를 첨가하여 배양한 실험에서, 치태 감소 및 세균활성의 저하는 polyP의 항균효과에 의한 것이라 보고한 바 있으나, polyP의 항균효과에 관한 다각적인 비교, 검토에 어려움이 있다.

이 연구에서는 다양한 사슬길이를 지닌 polyP를 이용하여 인간의 우식원인균 중 *S. mutans* GS5와 *S. sobrinus* 6715에 대한 항균효과를 액체배지 배양법을 이용하여 관찰함으로써, 보다 더 안전하고 효과적인 치아우식증의 예방을 위한 임상적용의 가능성을 고찰하고자 하였다. 이를 위하여 실험균주에 대한 polyP의 최소성장 억제농도(MIC: minimum inhibitory concentration)를 결정한 후, 증식된 균주에 대한 polyP의 성장 억제효과와 관찰과 함께 생균수의 측정으로 항균효과를 평가하였다. 또한 polyP의 세포막 양이온에 대한 킬레이션 여부 및 비수용성 글루칸(glucan) 합성능력을 평가하였고, 투과전자현미경으로 세포의 형태를 관찰하여 다소의 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 균주 및 배양 조건

실험 균주로 *S. mutans* GS5와 *S. sobrinus* 6715를 이용하였으며, 실험에 사용된 polyP는 여과처리(0.45 μ m)된 orthophosphate(이하 Pi: Na_2HPO_4 , Sigma, U.S.A.), pyrophosphate(이하 PPI: $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$, Sigma, U.S.A.), 사슬길이 3, 5, 15, 25, 35, 45, 65 및 75의 polyP(sodium phosphate, glassy: Sigma, U.S.A.), 그리고 사슬길이 13과 18의 혼합물인 Calgon(sodium phosphate, glassy: Sigma, U.S.A.)이었다. 실험배지로는 BHI(brain heart infusion: Difco, U.S.A.) 액체배지를 사용하였으며, 실험 균주를 접종한 후 24시간동안 혐기적으로(N_2 : 85%, H_2 : 10%, CO_2 : 5%, 37 $^{\circ}C$) 배양하였다.

2. 실험 방법

각각의 실험 균주에 다양한 농도의 polyP를 첨가하여 배양한 후 540nm 파장의 분광광도계(spectrophotometer: Ultrospec

2000, Pharmacia Biotech Co., Cambridge, England)에서 흡광도를 측정하여 polyP의 최소성장 억제농도를 결정하였다. 실험 균주를 초기 대수증식기(540nm 파장에서 흡광도 0.3~0.5)까지 배양한 후, 사슬길이 15인 polyP(이하 polyP 15)를 MIC 실험에서 결정된 농도로 첨가하여 추가 배양하였다. 여기서 채취한 세균을 이용하여 균주증식 후 성장억제, 생균수 측정, 핵산 유리 및 비수용성 글루칸 합성능력을 관찰하였으며, 투과전자현미경을 통해 세포형태의 변화를 관찰하였다.

1) MIC 결정 실험

각각의 실험 균주에 대한 polyP의 MIC를 결정하기 위해 Pi, PPI, 사슬길이 3~75의 polyP(이하 polyP 3~75) 및 Calgon을 *S. mutans* GS5에 0.05~0.08%씩, *S. sobrinus* 6715에 0.14~0.17%씩 첨가하여 48시간 동안 배양한 후 분광광도계에서 흡광도를 측정하였다.

2) 균주 증식 후 성장억제 실험

S. mutans GS5와 *S. sobrinus* 6715를 각각 초기 대수증식기까지 균주수를 증가시킨 다음, polyP 15를 MIC(각각 0.08% 및 0.17%)로 첨가하여 6, 12 및 18시간 후 이들 균주의 흡광도 변화를 관찰하였다.

3) 생균수 측정(viable cell count) 실험

성장억제 실험과 동일한 방법으로 초기 대수증식기에 polyP 15를 첨가하여 배양한 균주로부터 채취한 각각의 실험 균주를 인산완충 생리식염수(PBS: phosphate buffered saline, pH 7.0)로 단계희석(serial dilution)한 후, 희석균액 100 μ 를 혈액 한천배지에 도말하였다. 배지상에서 집락이 육안으로 확인될 때까지 배양한 후 집락수를 세어 생균수를 측정하였다.

4) PolyP에 의한 핵산유리 실험

S. mutans GS5를 초기 대수증식기까지 증식시킨 다음 pH 8.0으로 조정된 3.4mM EGTA용액, pH 6.0과 8.0으로 조정된 3.4mM EDTA용액, 그리고 polyP 15를 MIC 0.08%로 용해시킨 생리식염수에 부유시켜 일정시간 동안 배양한 다음 10,000 \times g로 원심침전한 후 상청액의 흡광도를 260nm에서 측정하였다²⁶⁾. PolyP 15용액에 0.4M 및 0.6M NaCl과 10mM Ca^{2+} ($CaCl_2$) 및 10mM Mg^{2+} ($MgCl_2$)를 첨가한 후 유리된 핵산량의 차이를 관찰하였다.

S. sobrinus 6715에서 역시 동일한 방법으로 EGTA용액, EDTA용액 및 polyP 15를 MIC 0.17%로 용해시킨 생리식염수에 부유시켜 유리된 핵산량을 비교하였다. 또한 0.4M 및 0.6M NaCl과 10mM Ca^{2+} ($CaCl_2$) 및 10mM Mg^{2+} ($MgCl_2$)를 첨가한 상태에서 핵산의 유리 정도를 관찰하였다.

5) 비수용성 글루칸 합성능력 실험

초기 대수증식기에 polyP 15를 첨가하여 배양한 균주로부터

각각의 균액을 1ml씩 채취하여 인산완충용액(PB: phosphate buffer, pH 7.0)으로 2회 세정한 후, 100mM 자당이 첨가된 인산완충용액 1ml에서 5시간 배양하였다. 그 후 소형 원심분리기로 원심침전시킨 다음 침전균체를 증류수 1ml에 부유시켜 페놀-황산 비색법으로 490nm에서 글루칸 농도를 측정하였다³²⁾.

6) 투과전자현미경 관찰

초기 대수증식기에 polyP 15를 첨가하여 배양한 균주로부터 각각의 균액을 채취하여 세정한 다음 2% sodium tetroxide로 고정하고, 표본을 ethanol로 탈수시킨 후 포매하였다. 이를 초박질편으로 제작하여 uranyl acetate와 lead citrate로 염색한 후, 투과전자현미경(JEM- 1010: Jeol, Japan)으로 관찰하였다³⁰⁾.

III. 연구결과

1. MIC 결정 실험

S. mutans GS5: 배양 초기에 polyP 3~75와 Calgon의 첨가시 polyP의 농도 0.05%에서는 대조군과 비교하여 흡광도에 큰 차이가 없었으나, 0.06%에서부터 감소하기 시작하여 0.08%에서 성장이 완전히 억제되어 최초 접종시 측정된 흡광도 수준으로 세균의 성장이 억제되었다. 이에 따라 *S. mutans* GS5에 대한 polyP의 MIC를 0.08%로 결정하였다. 반면 Pi나 P₂는 흡광도의 감소가 미미하여 성장억제효과가 없는 것으로 나타났

다(Fig. 1).

S. sobrinus 6715: PolyP의 농도 0.15%에서 감소하기 시작하여 0.17%에서 성장이 완전히 억제되어 MIC를 0.17%로 결정하였다. Pi나 P₂의 흡광도 감소는 미미하였다(Fig. 2).

PolyP 15가 다른 polyP들에 비하여 MIC를 비롯한 모든 농도에서 두 균주에 대해 우수한 항균효과를 보여, 이후의 실험에서는 polyP 15를 사용하였다.

2. 균주증식 후 성장억제 실험

S. mutans GS5: 흡광도 0.5까지 증식시킨 후 polyP 15를 MIC 0.08%로 첨가하여 6, 12 및 18시간 배양한 후 흡광도를 관찰한 결과, 대조군은 시간의 경과에 따라 흡광도가 증가하여 6시간 후 1.20으로, 12시간 후에는 1.28로 증가한 반면, 실험군은 시간의 경과에 따라 점차 흡광도가 감소하여 12시간 후에는 0.45로, 18시간 후에는 0.41로 감소하였다(Fig. 3).

S. sobrinus 6715: 흡광도 0.35까지 증식시킨 후 polyP 15를 MIC 0.17%로 첨가한 후 6, 12 및 18시간 배양한 후 흡광도를 관찰한 결과, 대조군은 시간의 경과에 따라 흡광도가 증가하여, 6시간 후 0.88로, 12시간 후 1.07로 증가하였다가 18시간 후에는 1.00으로 감소되는 양상을 보였으나, 실험군은 시간의 경과에 따라 점차 흡광도가 감소하여 6시간 후 0.30, 12시간 후 0.13까지 감소하였다가 18시간 후 0.18로 다소 증가하였다(Fig. 4).

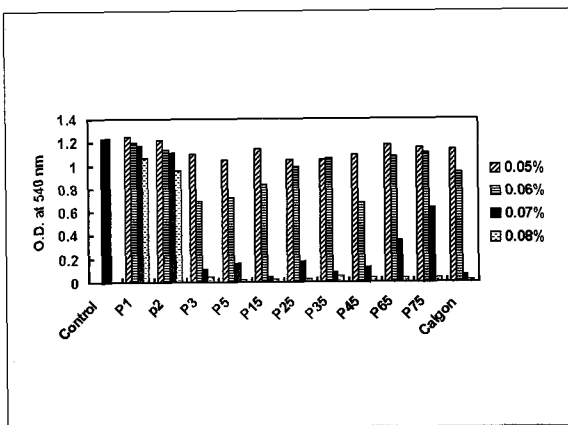


Fig. 1. Inhibitory effect of polyP with various chain lengths(3~75) on the growth of *S. mutans* GS5. PolyP at the concentrations of 0.05, 0.06, 0.07 and 0.08% were added to an inoculum of *S. mutans* GS5 in BHI at the very beginning of culture and incubated for 48h anaerobically. The optical density of the grown cells was determined at 540nm. Pi, orthophosphate; P₂, pyrophosphate; Calgon, practical grade of polyP with chain lengths of 13 and 18. The result shown is the representative of 4~5 experiments.

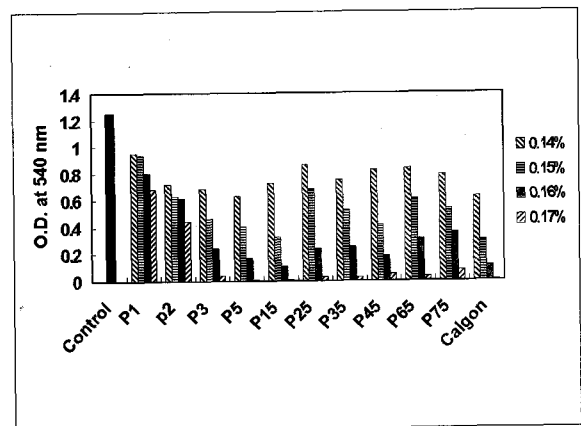


Fig. 2. Inhibitory effect of polyP with various chain lengths (3~75) on the growth of *S. sobrinus* 6715. PolyP at the concentrations of 0.14, 0.15, 0.16, and 0.17% were added to an inoculum of *S. sobrinus* 6715 in BHI at the very beginning of culture and incubated for 48h anaerobically. The optical density of the grown cells was determined at 540nm. Pi, orthophosphate; P₂, pyrophosphate; Calgon, practical grade of polyP with chain lengths of 13 and 18. The result shown is the representative of 4~5 experiments.

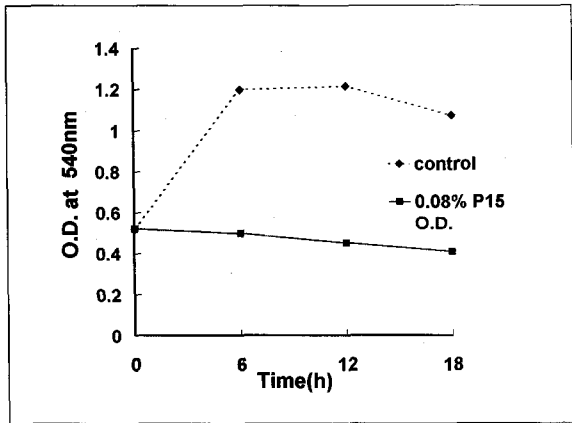


Fig. 3. A change in the growth of *S. mutans* GS5 with or without polyP 15 added in the early exponential phase. PolyP 15 (0.08%) was added to the culture of *S. mutans* GS5 when the culture reached its optical density of 0.5 at 540nm. The culture was subjected to the further incubation for 6, 12 and 18h and its optical density was measured at 540nm. The result shown is the representative of 4~5 experiments.

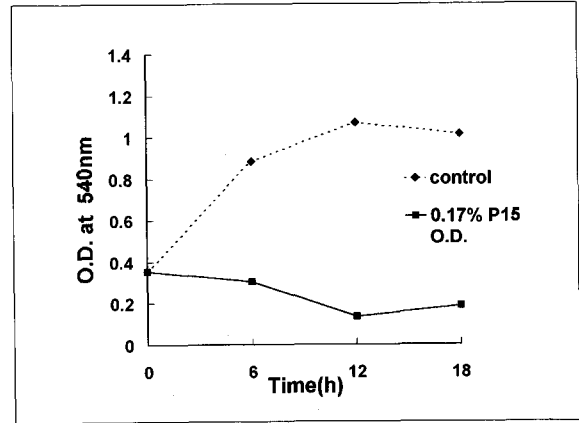


Fig. 4. A change in the growth of *S. sobrinus* 6715 with or without polyP 15 added in the early exponential phase. PolyP 15 (0.17%) was added to the culture of *S. sobrinus* 6715 when the culture reached its optical density of 0.35 at 540nm. The culture was subjected to the further incubation for 6, 12 and 18h and its optical density was measured at 540nm. The result shown is the representative of 4~5 experiments.

3. 생균수 측정 실험

S. mutans GS5: 흡광도 0.3~0.5까지 증식시킨 후 polyP 15를 MIC 0.08%로 첨가하여 6, 12 및 18시간 배양한 후 생균수를 측정된 결과, 대조군은 6, 12 및 18시간 후에 각각 350%, 420% 및 412%로 현저히 증가하였으나, 이에 비해 실험군은 6, 12 및 18시간 후에 각각 78%, 32%, 15%로 감소하여, 결과적으로 18시간 후에는 85%가 사멸한 것으로 나타났다 (Fig. 5).

S. sobrinus 6715: 흡광도 0.3~0.5까지 증식시킨 후 polyP 15를 MIC 0.17%로 첨가하여 6, 12 및 18시간 배양한 후 생균수를 측정된 결과, 대조군은 6시간 후 278%까지 증가하였다가 12시간과 18시간 후 235% 및 205%로 다소 감소하였으나, 이에 비해 실험군은 6, 12 및 18시간 후 각각 47%, 1.2% 및 0.09%로 현저히 감소하여, 결과적으로 18시간 후에는 99.9%가 사멸한 것으로 나타났다 (Fig. 6).

4. PolyP에 의한 핵산유리 실험

S. mutans GS5: PolyP 15와 함께 5시간 배양한 후 유리된 핵산은 260nm에서 0.258로 측정되어, 대조군의 0.112에 비해 130.4% 증가하였고, EGTA나 EDTA에 배양한 경우보다도 높게 나타났다. PolyP 15와 함께 0.4M NaCl을 첨가하여 배양한 실험군은 polyP 15 단독 배양시보다 23.3% 감소한 반면, 0.6M NaCl과 함께 첨가했을 때는 6.6% 증가하였다. CaCl₂과 MgCl₂를 polyP 15와 함께 배양했을 때, polyP 15 단독으로 배양했을 때에 비해 각각 1.6% 및 14% 감소하였다 (Table 1).

S. sobrinus 6715: 유리된 핵산은 *S. mutans* GS5에 비해 전반적으로 높게 나타났다. PolyP 15와 함께 5시간 배양한 후 *S. sobrinus* 6715로부터 유리된 핵산은 260nm에서 0.360으로 측정되어, 대조군의 0.285에 비해 26.3% 증가된 것으로 나타나 polyP 15에 의한 핵산유리의 증가폭은 *S. mutans* GS5보다 적었다. PolyP 15와 함께 0.4M NaCl을 첨가했을 때 polyP 15 단독 배양시보다 5.8% 증가하였고, 0.6M NaCl과 함께 배양했을 때는 14.4% 증가하였다. 한편 CaCl₂과 MgCl₂를 polyP 15와 함께 배양했을 때, polyP 15 단독으로 배양했을 때에 비해 각각 16.4% 및 3.7% 감소하였다 (Table 2).

5. 비수용성 글루칸 합성능력 실험

S. mutans GS5: 대조군은 시간이 경과함에 따라 비수용성 글루칸 합성능력이 전반적으로 감소하였다. 배양 6시간 대조군의 비수용성 글루칸 합성능력을 100%로 하였을 때 12시간 대조군의 합성능력은 170.5%로 증가한 반면, 배양 6시간 polyP 15는 83.7%로 감소하였다. 배양 12시간 polyP 15는 81.1%였으며, 18시간 대조군은 145.7%였고, 18시간 polyP 15는 82.0%의 합성능력을 보였다 (Table 3).

S. sobrinus 6715: 대조군은 시간이 경과함에 따라 비수용성 글루칸 합성능력이 전반적으로 감소하였다. 배양 12시간 대조군의 비수용성 글루칸 합성능력이 81.8%로 감소하였고, 배양 6시간 polyP 15는 509.1%로 증가하였다. 12시간 PolyP 15는 130.0%로 감소하였으며, 18시간 대조군은 87.2%로 나타났다 (Table 3).

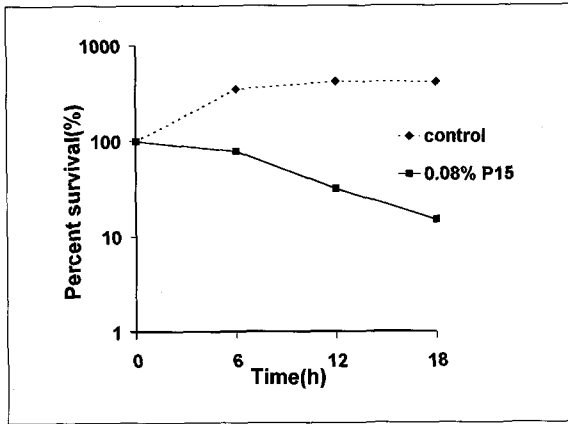


Fig. 5. Survival of *S. mutans* GS5 with or without polyP 15 as measured at different incubation times. PolyP 15 (0.08%) was added to the culture of *S. mutans* GS5 when the optical density of the culture was 0.3~0.5 at 540nm. The *S. mutans* GS5 cell was further incubated for 6, 12 and 18h and the viable cell counts were determined. The result shown is the representative of 3~4 experiments.

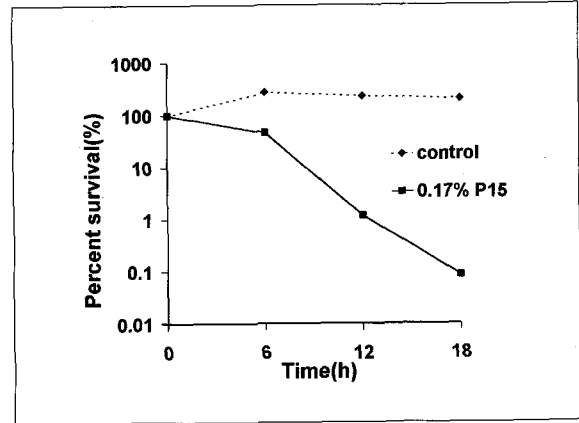


Fig. 6. Survival of *S. sobrinus* 6715 with or without polyP 15 as measured at different incubation times. PolyP 15 (0.17%) was added to the culture of *S. sobrinus* 6715 when the optical density of the culture was 0.3~0.5 at 540nm. The *S. sobrinus* 6715 cell was further incubated for 6, 12 and 18h and the viable cell counts were determined. The result shown is the representative of 3~4 experiments.

Table 1. Leakage of intracellular nucleotide from *S. mutans* GS5 in present of polyP 15

Hours	None	0.08% polyP 15 with							
		3.4mM EGTA pH 8.0	3.4mM EDTA pH 6.0	3.4mM EDTA pH 8.0	None	0.4M NaCl	0.6M NaCl	10mM CaCl ₂	10mM MgCl ₂
1	0.051	0.072	0.112	0.118	0.078	0.115	0.107	0.135	0.126
2	0.089	0.090	0.126	0.139	0.092	0.132	0.175	0.167	0.154
3	0.095	0.111	0.150	0.172	0.123	0.168	0.193	0.184	0.191
4	0.108	0.127	0.169	0.181	0.186	0.197	0.237	0.220	0.204
5	0.112	0.138	0.176	0.211	0.258	0.198	0.275	0.254	0.222

Table 2. Leakage of intracellular nucleotide from *S. sobrinus* 6715 in present of polyP 15

Hours	None	0.17% polyP 15 with							
		3.4mM EGTA pH 8.0	3.4mM EDTA pH 6.0	3.4mM EDTA pH 8.0	None	0.4M NaCl	0.6M NaCl	10mM CaCl ₂	10mM MgCl ₂
1	0.089	0.122	0.163	0.190	0.141	0.153	0.166	0.115	0.135
2	0.123	0.145	0.192	0.233	0.186	0.203	0.227	0.166	0.179
3	0.181	0.211	0.223	0.269	0.248	0.257	0.268	0.193	0.204
4	0.232	0.241	0.272	0.311	0.309	0.314	0.325	0.253	0.261
5	0.285	0.305	0.336	0.364	0.360	0.381	0.412	0.301	0.325

6. 투과전자현미경 관찰

S. mutans GS5: 6시간 배양한 대조군(Fig. 7A)에서는 뚜렷한 세포막과 작은 구형의 전자밀도가 큰 물질이 세포질 내에 균일하게 나타난 반면, polyP 15와 함께 6시간 배양한 실험군(Fig. 7B)에서는 전자밀도가 큰 물질이 세포질의 한쪽으로 편중되어 나타났다. 12시간 및 18시간 배양한 대조군(Fig. 7C, E)은 6시간 대조군보다 전자밀도가 큰 물질이 더 많고 강하게 나타났으며, 균일하게 분포되었다. 반면에 polyP 15와 함께 12

시간 및 18시간 배양한 실험군(Fig. 7D, F)은 전반적으로 세균의 모양이 비전형적으로 변하였고 세포질내 전자밀도가 큰 물질이 더 진하고 뚜렷하게 나타났다.

S. sobrinus 6715: 6시간 배양한 대조군(Fig. 8A)에서는 균일한 세포막과 세포질내 물질이 균일하게 염색되어 나타났으나, polyP 15와 함께 6시간 배양한 실험군(Fig. 8B)에서는 세포막에 불규칙한 파동형태가 관찰되었다. PolyP 15없이 12시간 및 18시간 배양한 대조군(Fig. 8C, E)에서는 세포표면이 매끄럽고 전자밀도가 큰 물질이 균일하게 나타났고, 일부 세균

Table 3. Relative production of insoluble glucan with or without polyP 15 as measured at different incubation times

Strains		Relative production(%)	Strains		Relative production(%)
<i>S. mutans</i> GS5	6hr Control	100.0	<i>S. sobrinus</i> 6715	6hr Control	100.0
	6hr polyP	83.7		6hr polyP	509.1
	12hr Control	170.5		12hr Control	81.8
	12hr polyP	81.1		12hr polyP	130.0
	18hr Control	145.7		18hr Control	87.2
	18hr polyP	82.0		18hr polyP	100.0

PolyP 15 at the concentrations of 0.08% and 0.17% was added to the culture of *S. mutans* GS5 and of *S. sobrinus* 6715, when the optical density of the culture was 0.3~0.5 at 540nm. The *S. mutans* GS5 and the *S. sobrinus* 6715 cell were further incubated for 6, 12 and 18h and the relative production of insoluble glucan was measured. The result shown is the representative of 3~4 experiments.

에서는 배양시간의 경과에 따라 세포질내 공포가 관찰되었다. 반면 polyP 15와 함께 12시간 및 18시간 배양한 실험군(Fig. 8D, F)은 시간의 경과에 따라 비전형적인 세포모양을 보이면서, 세포질내 전자밀도가 큰 물질이 더 뚜렷하고 편중되어 나타났고 세포질 내용물이 빠져나간 ghost cell의 수가 증가하는 것이 관찰되었다.

IV. 총괄 및 고찰

치아우식증의 주 원인균인 mutans streptococci는 과거 *S. mutans*의 유전적, 혈청학적인 변이종들을 모두 합쳐 통칭하는 이름으로 유전적, 혈청학적인 성상에 따라 7가지 종으로 구별된다. 특히 인간에서 가장 많이 나타나는 mutans streptococci는 *S. mutans*와 *S. sobrinus*로 보고되어 있다^{3,4)}. Mutans streptococci의 우식원성은 이 세균이 분비하는 효소가 자당을 분해하여 만든 비수용성 글루칸에 의해 치태세균의 집락화가 이루어지며, 구강내 당이 쉽게 치태 내로 침투하여 다량의 유기산이 생산됨으로써 치아우식증이 유발된다^{33,34)}.

치아우식증을 예방하기 위해 불소⁵⁻⁸⁾, chlorhexidine⁷⁻¹⁰⁾, 항생제¹⁴⁾ 등을 이용한 방법 및 치아우식 예방백신¹⁵⁾, 치태형성을 억제하는 구강내 세균¹⁶⁻¹⁸⁾ 등에 관한 많은 연구가 있었으나, 부작용 및 임상적용의 어려움으로 보다 더 안전하고 효과적인 치아우식증 예방을 위한 연구가 절실히 요구된다.

PolyP는 인의 저장소인 동시에 공급처로서 역할하며, 세균, 곰팡이, 원생동물, 식물 및 포유동물 등 거의 모든 생명체의 세포에서 발견된다^{21,22)}. 미생물에서는 polyP가 대사의 과정에 중요할 뿐 아니라 미생물의 내성과 생존, 그리고 병원성과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되고 있어 polyP에 대한 다양한 연구들이 이루어지고 있다³⁵⁻³⁹⁾.

이 연구에서는 인체에 무해한 미생물 억제물질로서의 임상적용에 대한 관심이 높아지고 있는 polyP를 이용하여 mutans streptococci 중 *S. mutans*와 *S. sobrinus*에 대한 항균효과를 관찰하고자 하였고, 한천배지 확산법에 의한 실험결과와 액체

배지를 이용한 연구들을 단순하게 비교하기는 어려울 것으로 판단되는 바, 이 연구에서는 액체배지 배양법으로 보다 다양한 사슬길이의 polyP를 사용하여 항균효과를 비교, 관찰하고자 하였다.

S. mutans GS5는 배양초기에 polyP를 첨가시 0.08%에서 성장이 완전히 억제되어, 최초 접종시 측정된 흡광도 수준까지 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 1). 반면 *S. sobrinus* 6715는 0.15%에서 감소하기 시작하여 0.17%에서 성장이 완전히 억제되는 것으로 나타나, *S. mutans* GS5는 *S. sobrinus*보다 polyP에 대해 감수적인 것으로 관찰되었다(Fig. 2). 실험에 사용한 농도범위에서 polyP의 항균효과는 사슬길이와 큰 연관성이 없는 것으로 나타났으나 polyP 15가 두 균주에 대해 비교적 더 우수한 항균효과를 발휘하는 것으로 나타났다(Fig. 1, 2).

S. mutans GS5와 *S. sobrinus* 6715를 일정시간 배양하여 균주를 증식시킨 다음, polyP 15를 MIC로 첨가하여도 배양초기에 polyP 15를 첨가하였을 때만큼 강한 성장억제효과를 보여(Fig. 3, 4) 감염 초기 뿐 아니라 이미 진행된 감염에서도 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 가능된다.

S. mutans GS5는 polyP 15의 첨가후 생균수가 점차 감소하여 18시간후 85%가 사멸하는 것으로 나타났고(Fig. 5), *S. sobrinus* 6715는 18시간후 99.9%가 사멸하는 것으로 나타났(Fig. 6). 이 결과는 polyP가 살균효과를 갖고 있음을 시사하는 것으로, Shibata와 Morioka³¹⁾가 *S. mutans* K1-R에 대한 polyP의 항균효과는 정균작용에 의한 것이라고 보고한 결과와는 상이한 것으로 여겨지나, 실험에 사용된 균주에 따라 polyP의 항균효과에도 차이가 있을 가능성도 배제할 수 없을 것으로 가능된다.

PolyP의 항균효과 기전에 관하여는 아직 명확히 밝혀진 바 없으나, Jen과 Shelef²⁶⁾ 그리고 Lee 등²⁷⁾은 *S. aureus*와 같은 Gram 양성균에서는 polyP가 세포막 안정에 필수 구성요소인 양이온과 킬레이션 함으로써 세균의 대사기능을 억제하여 살균작용 및 용해작용을 나타낸다고 보고한 바 있다. 이에 비해 Shibata와 Morioka³¹⁾는 *S. mutans* K1-R에서는 polyP의 킬

레이션에 의한 항균효과가 발휘되기는 하지만, 살균작용은 보이지 않는다고 보고한 바 있다. 이 실험에서는 polyP 15가 첨가되었을 때 *S. mutans* GS5의 핵산유리가 polyP 15 없이 배양했을 때 보다 증가한 것으로 미루어, polyP 15에 의한 *S. mutans* GS5의 용해현상이 일부의 세포에서 나타난 것으로 추측되나, 투과전자현미경에서 관찰된 용해된 세포수는 일부에 불과한 바 용해현상이 주 항균기전은 아닐 것으로 가능된다.

10mM CaCl₂나 MgCl₂의 첨가로 핵산유리가 다소 억제되기는 하였으나 대조군 수준까지 감소되지 않는 것으로 미루어, *S. mutans* GS5의 용해가 polyP의 킬레이션 작용에 의한 것이 아닌 것으로 판단된다(Table 1). *S. sobrinus* 6715는 polyP 15 첨가에 의한 핵산 유리가 대조군에 비해 26.3%의 증가에 그쳤으나 *S. mutans* GS5보다 핵산 유리가 전반적으로 높게 나타났으며, 투과전자현미경 관찰에서도 *S. mutans* GS5에서 보다 용해된 세포가 많이 나타나는 것을 확인할 수 있었다. *S. mutans* GS5에서와 마찬가지로 CaCl₂나 MgCl₂에 의해 핵산 유리가 다소 억제되기는 하였으나 대조군 수준까지 감소하지는 않았다(Table 2). 따라서 polyP의 항균효과는 킬레이션이 주된 요인은 아닌 것으로 판단되나, 균주에 따라서는 CaCl₂나 MgCl₂에 대한 항균효과가 다르게 나타날 가능성도 고려해야 할 것으로 가능된다. 또한 최근 공 등²⁸⁾, 최 등²⁹⁾ 그리고 최 등³⁰⁾의 연구에서도 *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *P. endodontalis*에 대한 polyP의 항균효과는 킬레이션과 관련이 없는 것으로 보고된 바 있다²⁸⁻³⁰⁾.

두 실험 균주 모두 NaCl이 polyP 15와 함께 첨가되었을 때 polyP 15 단독 첨가시보다 전반적으로 핵산 유리가 증가하였고, 0.4M보다는 0.6M NaCl 첨가 시에 핵산의 유리가 더욱 증가하는 것으로 관찰되어(Table 1, 2), 최 등³⁰⁾의 *P. gingivalis*에 대한 연구와 동일한 결과를 나타낸 것으로 가능된다. 그러나 Lee 등²⁷⁾의 *S. aureus*에 대한 연구에서는 0.6M NaCl 첨가 시 핵산 유리가 감소하는 것으로 보고된 바 있다. 따라서 NaCl은 세균의 종에 따라 핵산의 유리정도가 달라지기 때문에 polyP를 항균제로 사용할 때 NaCl의 농도 및 존재여부를 고려해야 할 것으로 여겨진다.

이 연구에서는 polyP 15에 의한 세포막과 세포질내 구조의 변화를 관찰하기 위하여 *S. mutans* GS5와 *S. sobrinus* 6715에 polyP 15를 MIC로 첨가한 다음 투과전자현미경으로 형태 변화를 관찰한 바, *S. mutans* GS5에서 polyP 15와 함께 배양한 실험군의 세포에서는 전반적인 형태가 비전형적이었고 세포질 내에 전자밀도가 높은 물질이 더욱 진하고 뚜렷하게 나타났다(Fig. 7B, D, F). *S. sobrinus* 6715에서도 polyP 15와 함께 배양한 실험군에서는 시간의 경과에 따라 세포막의 불규칙적인 파동형 변화와 함께 비전형적인 세포의 출현도 빈번해지고 ghost cell의 수도 증가하였다(Fig. 8B, D, F). 이와 같이 세포질 내에 전자밀도가 높은 물질의 출현은 Gram 음성세균에서의 관찰²⁸⁻³⁰⁾과도 일치하며, Rodriguez⁴⁰⁾ 역시 polyP가 세포질 내의 DNA와 결합할 수 있다고 보고한 바 있어, 전자밀도가

높은 과립의 출현은 polyP의 축적에 의한 것으로 판단된다. 이 연구에서도 polyP로 가능되는 전자밀도가 높은 물질이 DNA 응집부위에서 뚜렷하게 관찰되는 것으로 미루어 DNA와의 결합 가능성을 의미하는 것으로 판단된다. 즉, polyP가 DNA와의 결합으로 복제가 방해되어 단백질의 합성억제 및 세균의 증식억제로 항균효과가 발휘된 것으로 추정된다. 그러나 DNA 결합에 의한 항균효과의 가능성은 보다 심도 있는 연구를 통해 밝혀져야 할 것이다.

치태세균의 비수용성 글루칸 생산능력은 치태세균의 집락화에 직접적으로 작용하여 우식발생에 영향을 미치므로, 세균의 우식원성은 점착성의 비수용성 글루칸 생산능력과 깊은 관련이 있는 것으로 알려져 있다^{33,34)}. 그러나 이 연구의 비수용성 글루칸 합성능력의 결과에서 보듯이(Table 3), *S. mutans* GS5는 polyP 15에 의하여 글루칸 합성능력이 크게 억제되었으나 *S. sobrinus* 6715는 초기에 높은 글루칸 합성능력을 보인 후 시간의 경과에 따라 점차 감소하는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과로 미루어 polyP의 항균작용은 비수용성 글루칸 합성능력의 변화와는 직접적으로 연관성이 없는 것으로 판단된다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, polyP의 *S. mutans* 및 *S. sobrinus*에 대한 항균효과를 확인할 수 있었으며, 특히 polyP 15는 우식예방을 위한 임상적용이 가능할 것으로 여겨진다. 그러나 polyP의 근본적인 항균기전, DNA와의 결합 여부, 킬레이션 작용 및 NaCl의 농도 등에 관한 심도 있는 연구와 함께 임상적용을 위한 약품조제의 방법 및 상업적 가능성에 관한 폭 넓은 연구가 뒤따라야 할 것으로 가능된다.

V. 결 론

치아우식증의 원인균인 *S. mutans* GS5와 *S. sobrinus* 6715에 대한 polyP의 효과를 관찰하여 보다 안전하고 효과적인 치아우식증 예방을 위한 임상적용의 가능성을 고찰하고자 첫째, 다양한 사슬길이의 polyP를 첨가한 후 흡광도를 측정하여 MIC를 결정하고, 둘째, 실험균주를 흡광도 0.3~0.5까지 증식시킨 후 MIC 농도의 polyP를 첨가하여 흡광도의 변화를 측정함으로써 균주증식 후 성장 억제효과를 관찰하였으며, 셋째, 생균수 측정으로 polyP의 항균효과를 평가하였고, 넷째, 핵산유리의 정도로 polyP의 킬레이션 작용여부를 관찰하였으며, 다섯째, polyP의 비수용성 글루칸 합성능력을 관찰하였으며, 여섯째, 투과전자현미경으로 세포막과 세포질 내의 구조적 변화를 관찰하였다. 이상의 연구를 통하여 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

1. PolyP는 *S. mutans* GS5와 *S. sobrinus* 6715의 성장을 억제하는 항균작용이 있으며, 이들 실험 균주에 대한 polyP의 MIC는 각각 0.08%와 0.17%였다.
2. PolyP의 항균효과는 사슬길이에 따라 달라지며, 이중 polyP 15의 항균효과가 가장 우수한 것으로 나타났다.
3. PolyP 15는 초기 대수증식기에 있는 *S. mutans* GS5와 *S.*

- sobrinus* 6715의 성장을 크게 억제시켰다.
4. 생균수 측정결과 MIC에서 polyP 15에 의한 *S. mutans* GS5와 *S. sobrinus* 6715의 생균수는 18시간 후 각각 85.0% 및 99.9% 감소되었다.
 5. PolyP 15와 함께 5시간 배양한 후, *S. mutans* GS5의 핵산유리는 130.4% 증가되었고 *S. sobrinus* 6715의 핵산유리는 26.3% 증가되었다. 핵산유리는 2가 양이온 첨가에 의해 억제되지 않았다.
 6. PolyP 15에 의한 비수용성 글루칸 합성능력이 *S. mutans* GS5에서는 감소하였고 *S. sobrinus* 6715에서는 초기의 증가 후 점차 감소하였다.
 7. 투과전자현미경적으로, polyP 15에 의해 *S. mutans* GS5와 *S. sobrinus* 6715의 세포형태가 비전형적으로 변화였으며 ghost cell의 수가 증가되었고, 세포질 내에 전자밀도가 높은 물질이 편중되어 있는 것으로 관찰되었다. 이상의 결과로 미루어, polyP의 살균작용이 *S. mutans*와 *S. sobrinus*에 대한 성장을 억제시키는 효과가 있는 것으로 가늠된다. 이와 같은 성장 억제효과는 polyP의 킬레이션에 의한 것이라기보다는 균주 세포의 구조적, 형태적 변화가 주된 요인이었던 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Keyes PH : The infections and transmissible nature of experimental dental caries. Arch Oral Biol, 14:304-320, 1969.
2. 백병주 : 치아우식 아동과 그의 모친의 치태에서 분리한 *Streptococcus mutans*의 혈청형분포 및 약제내성에 관한 연구. 대한소아치과학회지, 11:75-89, 1984.
3. 이진용, 최유진, 하윤문 : 치아우식증환자와 치아정상인의 치태에서 분리한 *Streptococcus mutans*의 혈청형 분포에 관한 조사연구. 대한미생물학회지, 18:23-29, 1983.
4. Gibbons RJ, Hay DI : Adsorbed salivary acidic proline-rich proteins contribute to the adhesion of *Streptococcus mutans* JBP to apatitic surfaces. J Dent Res, 68:1303-1307, 1989.
5. Marsh PD : Antimicrobial strategies in the prevention of dental caries. Caries Res, 27(suppl.):72-76, 1993.
6. Tinanoff N, Zameck R : Alteration in salivary and plaque *Streptococcus mutans* in adults brushing with 0.4% SnF₂ gel once or twice a day. Pediatr Dent, 7:180-184, 1985.
7. Tenuvo J, Hakkinen P, Paunio P, et al. : Effect of chlorhexidine-fluoride gel treatments in mothers on the establishment of mutans streptococci in primary teeth and the development of dental caries in chil-

- dren. Caries Res, 26:275-280, 1992.
8. Ullsfooss BN, Ogaard B, Arends J, et al. : Effect of a combined chlorhexidine and NaF mouthrinse: an in vivo human caries model study. Scand J Dent Res, 102:109-112, 1994.
9. 이은영, 최영철 : 아크릴릭 레진상을 이용한 클로르헥시딘의 방출에 관한 연구. 대한소아치과학회지, 25(4):797-810, 1998.
10. 전현철, 김종철 : 우유병 우식증 아동에서 불소와 chlorhexidine 양치액의 *S. mutans*와 *Lactobacillus* 억제 효과에 관한 실험적 연구. 대한소아치과학회지, 22(1):15-26, 1995.
11. 남영희, 김광철, 이궁호 : 타액내의 *Streptococcus mutans*와 칼슘의 농도가 치아우식발생빈도에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. 대한소아치과학회지, 17(1):55-64, 1990.
12. 정동균, 정태영, 이효재, 등 : 한국인의 치아우식 조절에 관한 연구 III. 백서우식치 이환률에 미치는 수종 희유원소, 쌀 및 각종 양념의 영향. 대한구강생물학회지, 3:19-29, 1979.
13. Craig CG : The use of a calcium sucrose phosphates and calcium orthophosphate complex as a cariostatic agent. Brit Dent J, 138:25-28, 1975.
14. Svinhufvud LB, Heimdahl EN, Nord CE : Effect of topical administration of vancomycin versus chlorhexidine on α -hemolytic streptococci in the oral cavity. Oral Surg Oral Pathol, 66:304-309, 1988.
15. Moisset A, Schatz N, Lepoiver Y, et al. : Conservation of salivary glycoprotein-interacting and human immunoglobulin G-cross-reactive domains of antigen I/II in oral streptococci. Infect Immun, 62:184-193, 1994.
16. 김용남, 양규호, 오종석, 등 : 구강에 분리한 *E. durans*의 *S. mutans*와 *S. oralis*에 대한 작용. 대한소아치과학회지, 27(2):361-369, 2000.
17. 김선미, 양규호, 정성수, 등 : *Streptococcus oralis*의 인공치태 억제효과에 대한 연구. 대한소아치과학회지, 26(1):77-87, 1999.
18. 송도원, 양규호, 정진, 등 : *Streptomyces exfoliatus*가 생성하는 mutanase에 의한 인공치태 억제작용. 대한소아치과학회지, 24(2):449-459, 1997.
19. Murray JJ, Rugg-Gunn AJ, Jenkins GN : Fluorides in caries prevention. Butterworth-Heinemann Ltd, Jordan Hill, Oxford. 1991.
20. Greenstein G, Berman C, Jaffin R : Chlorhexidine an adjunct to periodontal therapy. J Periodontol, 57:370-377, 1986.

21. Kornberg A : Inorganic polyphosphate : toward making a forgotten polymer unforgettable. J Bacteriol, 177(3):491-496, 1995.
22. Kulaev IS : Biochemistry of inorganic polyphosphates. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 73:131-158, 1975.
23. Wood HG, Clark JE : Biological aspects of inorganic polyphosphates. Ann Rev Biochem, 57:235-260, 1988.
24. United States Department of Agriculture : Meat and poultry products: phosphates and sodium hydroxide. Fed Register-Rule Reg, 47:10779, 1982.
25. Knabel SJ, Walker HW, Hartman PA : Inhibition of *Aspergillus flavus* and selected gram-positive bacteria by chelation of essential metal cations by polyphosphates. J Food Prot, 54:5:360-365, 1991.
26. Jen CMC, Shelef LA : Factors affecting sensitivity of *Staphylococcus aureus* 196E to polyphosphates. Appl Environ Microbiol, 52:842-846, 1986.
27. Lee RM, Hartman PA, Stahr HM, et al. : Antibacterial mechanism of long chain phosphates in *Staphylococcus aureus*. J Food Prot, 57:289-294, 1994.
28. 공희정, 최호영, 이진용, 등 : 구강세균 *Prevotella intermedia*의 성장에 따른 polyphosphate의 영향에 관한 연구. 대한치과보존학회지, 23(2):550-560, 1998.
29. 최성백, 최호영, 이진용, 등 : *Porphyromonas endodontalis*에 대한 polyphosphate의 항균기전에 관한 연구. 대한치과보존학회지, 23:175-182, 1998.
30. 최인식, 박병래, 최영철, 등 : *Porphyromonas gingivalis*에 대한 polyphosphate의 항균효과. 대한미생물학회지, 34(3):285-301, 1999.
31. Shibata H, Morioka T : Antibacterial action of condensed phosphates on the bacterium *Streptococcus mutans* and experimental caries in hamster. Archs oral Biol, 27:809-816, 1982.
32. 이진용, 신제원, 임호남, 등 : 각종 당류가 치아우식원성 세균 *mutans streptococci*의 대사에 미치는 영향. 대한구강보존학회지, 19(4):507-524, 1995.
33. Abo H, Matsumura T, Kodama T, et al. : Peptide sequences for sucrose splitting and glucan binding within *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferase (water insoluble glucan synthetase). J Bacteriol, 173:989-996, 1991.
34. Tanzer JM : Microbiology of dental caries. In: Slots J, Banting DW (ed.), Contemporary of Oral Microbiology and Immunology, pp 377-424. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis, 1992.
35. Bode G, Mauch F, Ditschuneit H, et al. : Identification of structures containing polyphosphate in *Helicobacter pylori*. J Gen Microbiol, 139:3029-3033, 1993.
36. Kornberg A : Inorganic polyphosphate: a molecular fossil come to life. In: Torriani-Gorini A, Yagil E, Silver S (ed.), Phosphate in Microorganisms, pp 204-208. American Society for Microbiology Press, Washington D.C., 1994.
37. Post FJ, Krishnamurty GB, Flanagan MD : Influence of sodium hexametaphosphate on selected bacteria. Appl Microbiol, 11:430-435, 1963.
38. Rajkowski KT, Calderone SM, Jones E : Effect of polyphosphate and sodium chloride on the growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in ultra-high temperature milk. J Dairy Sci, 77:1503-1508, 1994.
39. Zaika LL, Kim AH : Effect of sodium polyphosphates on growth of *Listeria monocytogenes*. J Food Prot, 56:577-580, 1993.
40. Rodriguez RJ : Polyphosphate present in DNA preparations from filamentous fungal species of *Colletorichum* inhibits restriction endonucleases and other enzymes. Anal Biochem, 209:291-297, 1993.

Reprint request to:

Kye-Sook Kang, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Kyung Hee University

1, Hoegi-Dong, Dongdaemoon-Gu, Seoul, 130-872, Korea

E-mail : khupedo@mdhouse.com

사진부도 ①

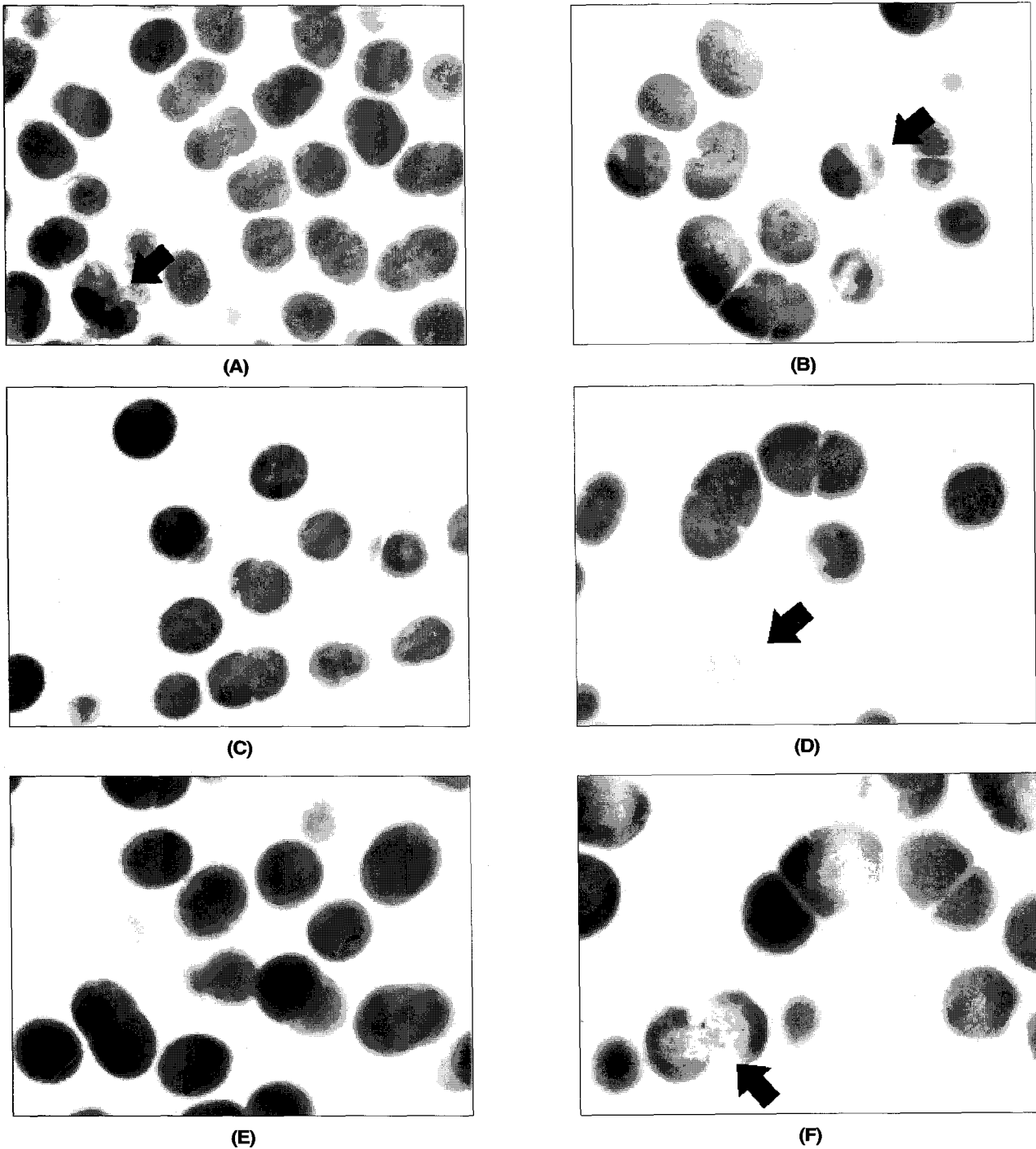


Fig. 7. Electron micrographs of *S. mutans* GS5 with or without polyP 15. The bacterium was grown up to its optical density of 0.3~0.5 at 540nm and subjected to an additional 6-h incubation in the absence (A) and the presence (B) of 0.08% polyP 15, after an additional 12-h incubation in the absence (C) and the presence (D) of polyP 15 and after an additional 18-h incubation in the absence (E) and the presence (F) of polyP 15(25,000 X magnification). PolyP 15 was added to the culture when the growth of the culture reached its optical density of 0.3~0.5 at 540nm. The cells were ultrathin-sectioned and stained with uranyl acetate and lead citrate. Note that electron-dense materials(arrow) are mainly located close to the membrane (A). Morphologically atypical cells(arrow) appear in the cells (B). The electron-dense materials are more prominent than those in the cells grown for additional 6-h without polyP 15 and evenly distributed in the cells (C) and (E). In contrast, degeneration(arrow) of the cells grown with polyP 15 becomes evident in the cells (D) and (F).

사진부도 ②

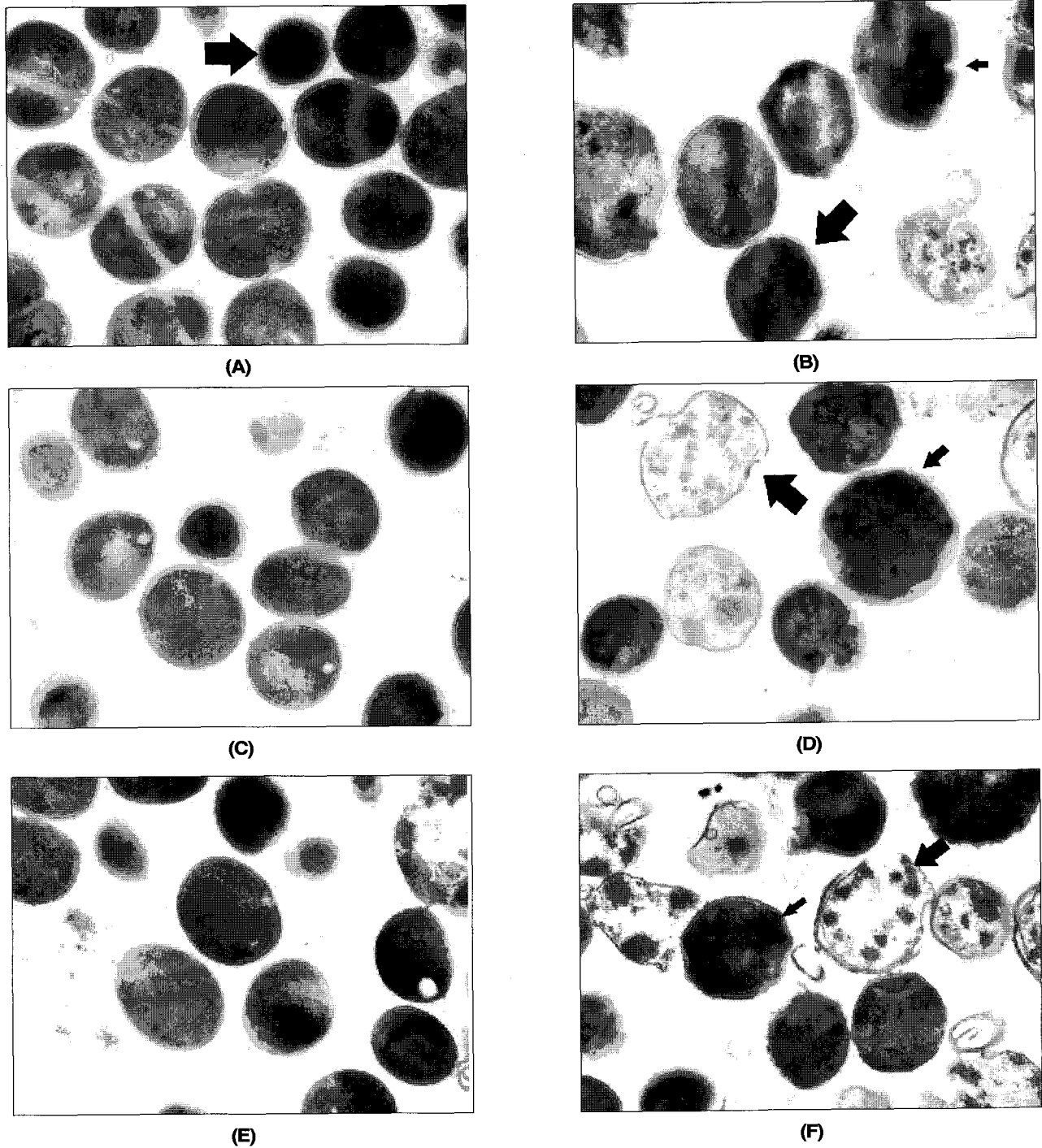


Fig. 8. Electron micrographs of *S. sobrinus* 6715 with or without polyP 15. The bacterium was grown up to its optical density of 0.3~0.5 at 540nm and subjected to an additional 6-h incubation in the absence (A) and the presence (B) of 0.17% polyP 15, after an additional 12-h incubation in the absence (C) and the presence (D) of polyP 15 and after an additional 18-h incubation in the absence (E) and the presence (F) of polyP 15(25,000 X magnification). PolyP 15 was added to the culture when the growth of the culture reached its optical density of 0.3~0.5 at 540nm. The cells were ultrathin-sectioned and stained with uranyl acetate and lead citrate. Note that electron-dense materials are mainly located close to the membrane (A). Morphologically atypical cells appear and finer electron-dense materials (arrow) are prominent and yet locally distributed in the cytoplasm. In the cells, highly electron-dense granules (arrow) and wave-like cell envelopes (small arrow) are also observed (B). The electron-dense materials are more prominent than those in the cells grown for additional 6-h without polyP 15 and evenly distributed in the cells (C) and (E). In contrast, degeneration of the cells grown with polyP 15 becomes evident and highly electron-dense granules (small arrow) and ghost cells (arrow) are more frequently observed in the cells (D) and (F).

Abstract

ANTIBACTERIAL EFFECT OF POLYPHOSPHATES ON MUTANS STREPTOCOCCI

Kye-Sook Kang, D.D.S., M.S.D., Yeong-Chul Choi, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

Dept of Pediatric Dent., School of Dent., Kyung Hee Univ.

Mutans streptococci, especially *S. mutans* and *S. sobrinus* strongly implicated in pathogenesis of dental caries, the major cause of tooth loss in children. Use of an antibacterial agent controlling dental caries has been rationalized. The present study was performed to observe the antibacterial effect of inorganic polyphosphates (polyP) on *S. mutans* and *S. sobrinus*. *S. mutans* GS5 and *S. sobrinus* 6715 were grown in brain-heart infusion broth with or without polyP. Minimal inhibitory concentration (MIC) of polyP for *S. mutans* GS5 was determined to be 0.08% and that for *S. sobrinus* 6715 was 0.17%. PolyP 15 added to the growing culture of *S. mutans* GS5 and *S. sobrinus* 6715 at their exponential phase was as effective in inhibiting the growth of *S. mutans* GS5 and *S. sobrinus* 6715 as polyP added at the very beginning of the culture. More than 85% of the cells lost their viability determined by viable cell count when polyP 15 was added to the culture of growing *S. mutans* GS5 at MIC, suggesting that polyP 15 has bacterial effect on the bacterium. And more than 99.9% of the cells lost their viability determined by viable cell count when polyP 15 was added to the culture of growing *S. sobrinus* 6715 at MIC, suggesting that polyP 15 has bacterial effect on the bacterium. Intracellular nucleotide release from *S. mutans* GS5 and *S. sobrinus* 6715 was increased in the presence of polyP 15 for 5h but was not really reversed by the addition of divalent cations like Ca^{++} and Mg^{++} . The majority of the cells appeared to be atypical in their shape, demonstrating accumulation of highly electron-dense granules and ghost cells. The overall results suggest that polyP have a strong bactericidal activity against *S. mutans* and *S. sobrinus* in which lysis in relation to chelation may not play the major role but unknown mechanism that possibly affects the viability of the bacterium may be involved. PolyP may be used as an agent for prevention of dental caries.

Key words : Antibacterial, Polyphosphate, *S. mutans*, *S. sobrinus*