

교정환자의 브라켓과 치아 경계부에 존재하는 치면세균막내 mutans streptococci 종 및 생물형의 식별

김미애^a · 유소영^b · 김화숙^c · 국중기^d · 임성훈^e · 윤영주^f · 김광원^g

본 연구는 교정환자의 브라켓과 치아 경계부 및 브라켓으로부터 2 mm 이상 떨어진 치아 평활면의 치면세균막에 존재하는 mutans streptococci의 종 및 생물형에 차이가 있는지를 알아보고자 시행되었다. 조선대학교 치과병원에 내원한 13세 이상 35세 미만의 환자 28명으로부터 브라켓을 장착하고 있는 61개 치아에서 치면세균막을 채취하여 mutans streptococci를 MSB 배지에서 선택적으로 분리한 다음, 이들의 지놈 DNA를 추출하여 dextranase 유전자를 표적으로 하는 중합효소연쇄반응법을 시행하고, 그 증폭물을 Hae III로 소화하고, 이를 전기영동하여 제한 효소절편길이에 따라 그 종을 식별하였다. 또한 생물형을 조사하기 위하여 생화학적 검사를 실시하였다. 그 결과 브라켓과 치아 경계부 및 브라켓으로부터 2 mm 이상 떨어진 평활면의 치면세균막에 존재하는 mutans streptococci 종은 서로 비슷한 검출 빈도를 보이나, 두 곳에 존재하는 mutans streptococci 생물형은 서로 차이가 있는 것으로 나타났다. 향후 브라켓과 치아 경계부 및 치아 평활면의 치면세균막의 mutans streptococci 생물형의 차이와 브라켓 주위의 법랑질 탈회 및 치아우식증 발병과의 상관관계에 대한 연구가 필요하다.

(주요 단어 : 뮤탄스 연쇄상구균, 브라켓, 생물형, 종)

서 론

치아우식증은 치주질환과 더불어 구강 내에서 발생하는 양대 구강병의 하나로 알려져 있다. 치아우식증의 발생에 있어서 미생물의 존재가 필수적임이 무균

동물을 이용한 실험¹에서 밝혀진 이후, 여러 실험 결과 치면세균막 (dental plaque) 내의 세균 중 *Streptococcus mutans*,^{2,3} *Lactobacillus spp.*,^{4,5} *Actinomyces spp.*⁶가 관여하는 것으로 알려져 왔다. 초기 연구 결과에 의하면, 이러한 세균들 중 *Streptococcus mutans*는 초기 평활치면, *Lactobacillus* 종들은 치아의 치면열구 및 치근부위, *Actinomyces* 종들은 치근면 치아우식증 병소에 특히 연관성이 크다고 보고되었다. 그러나, 최근 연구에 의하면 *Lactobacillus* 종들이 초기 치아우식증보다는 진행된 치아우식증 병소에 더욱 연관성이 많고, 치근면 치아우식증을 포함한 모든 치면의 치아우식증에는 *Streptococcus mutans*가 주요한 원인 세균으로 알려져 있다.^{7,8}

브라켓 등을 이용한 고정성 교정장치로 치료받는 환자의 경우, 교정장치 직하방에 위치한 치면의 치면

^a 대학원생, ^b 조교수, ^c 부교수, ^d 교수, 조선대학교 치과대학 교정학교실.
^e 전임연구원, ^f 대학원생, ^g 조교수, 조선대학교 치과대학 구강생화학 교실.

교신저자: 임성훈

광주광역시 동구 서석동 375번지

조선대학교 치과대학 교정학교실 / 062-220-3875

shlim@chosun.ac.kr

원고접수일: 2004년 4월 23일 / 원고최종수정일: 2004년 6월 16일

/ 원고채택일: 2004년 7월 8일

*이 논문은 2004년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음

세균막을 효과적으로 제거하기가 힘들다. 따라서, 고정성 교정장치 주위에 치면세균막의 침착이 용이해지고, 그 결과 법랑질 탈회를 초래하는 위험요인의 증가로 인해 고정장치 주변에 치아우식증이 쉽게 발생된다.^{9,10} 또한 고정성 교정장치에 의한 국소적 환경 변화는 치면세균막내 세균들의 조성 등의 변화를 야기할 수 있는 것으로 알려져 있다.

현재 치아우식증 유발에 관여한다고 알려져 있는 연쇄상구균을 총칭하여 mutans streptococci라고 하고, 사람에서 주로 분리되는 *Streptococcus mutans* 및 *S. sobrinus* 종과 동물에서 주로 분리되는 *S. downei*, *S. rattus*, 그리고 *S. cricetus* 등이 알려져 있다.¹¹ 최근 이러한 7종의 mutans streptococci를 dextranase 유전자 핵산염기서열을 바탕으로 중합효소연쇄반응 프라이머를 설계하여 이들을 식별하는 방법이 개발되었다.¹²

브라켓을 장착한 교정환자에서 브라켓과 치아 경계부의 법랑질 탈회 또는 치아우식증이 빈번히 나타난다. 이러한 현상의 원인이 브라켓과 치아 경계부에 존재하는 치면세균막의 제거가 힘들기 때문인지 아니면, 브라켓에 의해 조성된 새로운 환경에 좀더 치아우식증 활성능이 높은 mutans streptococci가 서식해서 인지는 알 수 없다. 따라서 본 연구에서는 브라켓을 장착한 교정환자에서 브라켓과 치아 경계부에 존재하는 치면세균막과 브라켓에서 최소 2 mm 이상 떨어진 치아 평활면 치면세균막에 존재하는 mutans streptococci 종을 분자생물학적 기법과 생화학적 방법으로 식별하여, 이 두 부위간의 mutans streptococci 종 및 생물형의 차이를 밝히고자 하였다.

연구재료 및 방법

조사 대상 및 치면세균막 채취

조선대학교 치과병원 교정과에 내원한 환자 중 브라켓을 부착하여 교정치료를 받고 있는 환자 65명을 조사 대상으로 하였다. 이때 브라켓을 장착한 환자의 상, 하악, 전치부와 구치부에서 각각 한 개씩 총 네개의 치아를 선택하여 각 치아의 브라켓과 치아경계부, 그리고 브라켓에서 치은측으로 최소 2 mm 떨어진 부위의 치아 평활면에서 멸균한 이쑤시개를 이용하여 치면세균막을 채취하였다. 각 전치부와 구치부에서 치면세균막을 채취할 치아를 선정하는 기준으로는 교정용 밴드가 아니라 광중합 레진에 의해 브라켓이 부착된 치아이고, 브라켓에서 치은측으로 2 mm 떨어

진 치면이 치은연 상방에 위치하는 치아들 중 치면세균막이 가장 많은 치아로 하였다. 채취한 치면세균막은 500 μ l의 1 × PBS가 넣어진 Eppendorff tube에 담아 실험실로 옮겨 다음의 실험에 사용하였다.

세균 배양

본 실험에 대조군으로 사용한 mutans streptococci는 *Streptococcus mutans* KCTC 3065, *S. sobrinus* KCTC 3088, *S. downei* KCTC 3634, *S. rattus* KCTC 3655 및 *S. cricetus* KCTC 3640이었으며, 이들은 한국 유전자은행 (KCTC, Daejeon, Korea) 에서 구입하여 사용하였다. 위에서 채취한 치면세균막 샘플은 수 차례 vortexing한 후 멸균된 면봉을 이용하여 *S. cricetus*를 제외한 모든 mutans streptococci를 선택적으로 배양할 수 있는 mitis salivarius bacitracin (MSB; bacitracin 농도는 0.5 μ g/ml) 한천배지에서 도말하고, 이를 상온의 공기 중에서 24시간 배양한 다음, 다시 37 °C의 Candle jar에서 48시간 배양하였다. 이때 성장한 세균 군락 중 그 형태가 다른 것을 다른 종으로 생각하고 각각에서 대표적으로 1개씩을 선별하여 3% 과산화수소를 분해할 수 있는지를 검사하여 음성인 것만을 Todd Hewitt broth (TH broth, Difco, Lab., Detroit, MI, USA)에 접종하여 37°C CO₂ 세균 배양기에서 키운 다음 15%가 되도록 glycerol을 넣고 -70°C에서 보관하여 다음의 실험에 사용하였다.

Mutans streptococci의 지놈 DNA 추출

세균의 dextranase 유전자 핵산염기서열을 바탕으로 중합효소연쇄반응법에 이용할 주형 지놈 DNA를 추출하고자 위에서 분리한 mutans streptococci를 TH broth에서 배양하고 G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit (iNtRON Inc., Seoul, Korea)로 추출하였다. 이를 간략히 설명하자면 다음과 같다. 세균 배양액 1.5 ml를 Eppendorff tube에 넣고, 1분간 원심분리 (12,000 × g) 하여 세균의 압착결정을 얻었다. 여기에 50 μ l의 Pre-buffer와 3 μ l의 lysozyme 용액을 넣고 혼합한 다음 37°C 항온기에 1시간 동안 방치한 후 250 μ l의 G-buffer를 넣어 잘 섞은 후 65°C에서 15분간 배양하였다. 여기에 250 μ l의 binding solution을 넣고 잘 섞은 후 spin column에 옮기고, 1분간 원심분리 (12,000 × g) 하여 column에 통과한 용액은 버리고 500 μ l의 Washing buffer A를 넣고

실온에서 동일한 조건에서 원심분리하였다. Column에 통과된 용액은 버리고 500 μ l의 washing buffer B를 넣어 1분간 원심분리 (12,000 \times g) 하였다. 그 후 column을 새로운 Eppendorff tube에 옮기고 100 μ l의 elution buffer를 넣고 실온에서 1분간 원심분리(12,000 \times g) 하여 그 여과액을 보관하여 중합효소연쇄반응에 사용하였다.

중합효소연쇄반응

중합효소연쇄반응에 사용된 프라이머는 Takeshi 등¹²⁾이 고안한 MSSD1467F (5'-TGT CGG WGC YRA YAT GAA AG-3') 와 MSSD2000R (5'-AAT ARR TTG GTT TGC TCR TC-3') 이었으며, 이는 바이오니아사 (Bioneer corp, Seoul, Korea) 에 주문하여 제작하였다. 중합효소연쇄반응은 AccuPowerTM PCR Premix (Bioneer corp.) 를 이용하였다. 이를 간단히 설명하면 다음과 같다. 앞에서 추출한 100 ng의 세균 지놈 DNA, 10 pmol 씩의 MSSD1467F 및 MSSD 2000R 프라이머를 넣고 최종 반응 부피가 20 μ l가 되도록 가압멸균하고, 0.22 μ m membrane filter로 여과한 증류수를 넣고 PTC-100TM Programmable Thermal Controller (Model PTC-100, MJ Research Inc. Watertown, MA, USA) 를 이용하여 중합효소연쇄반응을 시행하였다. 이때 중합효소연쇄반응 조건은 다음과 같다. 94 $^{\circ}$ C에서 2분간 초기 변성을 실시한 다음 94 $^{\circ}$ C에서 1분간 변성, 55 $^{\circ}$ C에서 1분간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 extension하는 과정을 27회 반복하여 증폭한 다음 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 extension하였다. 최종 반응물을 2 μ l씩 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 증폭물 (530 bp) 의 존재 여부를 확인하였다.

중합효소연쇄반응물의 Hae III 제한효소 처리

위에서 얻어진 중합효소연쇄반응 산물을 HaeIII (Bioneer Corp.) 제한효소로 절단하여 그 결과를 4% NuSieve 3:1 agarose gel 상에서 확인하였으며, 이때 그 제한효소절편 길이 다양성에 따라 mutans streptococci를 식별하였다. 즉, 412와 122 bp가 나오면 *S. mutans*로 351과 174 bp가 나오면 *S. sobrinus*로, 210, 174 및 141 bp가 나오면 *S. downei*로, 325와 209 bp가 나오면 *S. rattus*로 210, 141, 109 및 65 bp가 나오면 *S. cricetus*로 판정하였다.

생화학 검사

Mutans streptococci의 생물형을 결정하기 위하여 다음의 생화학 검사를 시행하였다. 생물형의 판정 기준은 Shakair와 Keen의¹³⁾ 방법에 따랐다.

Catalase test

MSB 배지에 자라나는 staphylococci를 제외시키기 위해 catalase test를 시행하였다. 대부분의 Staphylococci는 본 검사에 양성 반응을 보이지만, mutans streptococci는 음성이다. MSB 배지에서 72시간 배양한 세균 균락을 멸균된 백금으로 떼어낸 다음, 이를 3% 과산화수소수 (H_2O_2) 에 넣어 산소가 발생할 경우 양성 (+), 그렇지 않을 경우 음성 (-) 으로 판정하였다

당 (mannitol, sorbitol, raffinose, melibiose 및 inulin) 분해능 실험

이는 세균이 배지 내에 포함되어 있는 특이 당질을 발효시킬 수 있는 능력을 알아보는 실험이다. Phenol red broth (Difco, Lab.) 에 mannitol, sorbitol, raffinose, melibiose 및 inulin이 각각 1% 포함되도록 넣고, 이를 가압멸균한 다음 200 μ l씩 96-well plate에 넣은 다음 24시간 동안 TH broth에서 배양한 20 μ l의 세균 배양액을 각각의 well에 접종하고 이를 48시간 동안 10% CO_2 가 공급되는 37 $^{\circ}$ C 세균 배양기에서 배양하였다. 이때 노란색일 경우 양성 (+), 약한 붉은 색을 띠는 경우 음성 (-) 으로 판정하였다.

Arginine의 가수분해능

이는 arginine dihydrolase의 생성여부를 알아보는 실험이다. 먼저 TH broth에서 24시간 mutans streptococci를 배양하고, 이들 세균배양액 20 μ l를 0.5% yeast extract, 0.5% tryptone, 0.2% K_2HPO_4 , 0.05% dextrose, 0.3% L-arginine hydrochloride가 혼합된 배지 200 μ l에 접종하여 48시간동안 10% CO_2 가 공급되는 37 $^{\circ}$ C 세균 배양기에서 배양하였다. 여기에 20 μ l의 Nessler solution (5% KI, 2% $HgCl_2$, 1N NaOH) 을 떨어뜨려 짙은 갈색을 띄면 양성 (+), 그렇지 않으면 음성 (-) 으로 판정하였다.

Esculin 가수분해능

이 실험은 esculin을 가수분해할 수 있는 세균의 능력을 알아보기 위한 실험이다. 먼저 TH broth에서 24

Table 1. Species and biotypes of mutans streptococci isolated from the interface between orthodontic bracket and tooth surface and from smooth tooth surface

Patient's No.	Age	Tooth	Bracket		Smooth surface	
			Species	Biotype	Species	Biotype
1	19	11	M	I	S	IV
		46	S	IV	S	IV
		25	M	I	S	IV
2	26	11	M	I	M	I
3	28	21	M	I	M	I
4	30	14	M	I	M	I
5	14	46	M	II	M	II
9	14	11	M	II	M	I
		41	M	II	M	I
		45	M	II	M	II
		26	M	II	M	V
10	21	34	M	II	M	II
16	20	35	M	I	M	I
20	15	11	M	I	M	I
		35	M	I	M	II
		15	M	I	M	II
21	15	41	M	II	M	I
27	16	17	M	I	M	I
		35	M	I	M	I
31	21	45	M	I	M	I
33	24	25	M	I	M	I
		41	M	I	M	I
		45	M	I	M	I
		11	M	I	M	II
36	21	11	M	I	M	II
38	15	35	M	I	M	I
40	20	11	S	IV	D	I
		41	M	I	M	I
		25	S	IV	S	IV
		45	M	I	S	IV
41	22	11	M	I	M	I
		41	M	I	M	I
		15	M	I	M	I
		35	M	I	M	I

M, Streptococcus mutans; S, Streptococcus sobrinus; D, Streptococcus downei (continued on next page)

시간 mutans streptococci를 배양하고, 이들 세균배양액 20 μ l를 1% Trypticase soy broth (Difco, Lab.), 0.5% yeast extract, 0.05% ferric citrate, 0.5% sodium chloride 및 0.1% esculin이 혼합된 배지 200 μ l에

접종하여 48시간 동안 10% CO₂가 공급되는 37°C 세균 배양기에서 배양하여 색깔의 변화를 관찰하였다. 이때 검정색에 가까운 짙은 갈색을 띄면 양성 (+)으로 판정하였다.

Table 1. Extended

Patient's No.	Age	Tooth	Bracket		Smooth surface	
			Species	Biotype	Species	Biotype
42	26	36	<i>M</i>	I	<i>M</i>	I
44	15	11	<i>M</i>	II	<i>M</i>	I
		41	<i>M</i>	I	<i>M</i>	I
		45	<i>M</i>	I	<i>M</i>	I
45	21	11	<i>M</i>	I	<i>S</i>	IV
		41	<i>M</i>	I	<i>M</i>	I
		15	<i>M</i>	I	<i>S</i>	IV
		35	<i>M</i>	I	<i>S</i>	IV
47	13	41	<i>M</i>	I	<i>D</i>	IV
		27	<i>M</i>	I	<i>D</i>	IV
48	13	11	<i>M</i>	I	<i>M</i>	I
		41	<i>M</i>	I	<i>M</i>	I
		15	<i>M</i>	I	<i>M</i>	I
		35	<i>M</i>	I	<i>M</i>	I
57	16	11	<i>M</i>	I	<i>M</i>	I
		15	<i>S</i>	IV	<i>M</i>	I
		35	<i>S</i>	IV	<i>M</i>	I
58	14	21	<i>M</i>	I	<i>S</i>	IV
		41	<i>M</i>	I	<i>S</i>	IV
		46	<i>M</i>	I	<i>M</i>	I
		25	<i>S</i>	IV	<i>M</i>	I
59	13	42	<i>S</i>	IV	<i>S</i>	IV
		25	<i>S</i>	IV	<i>S</i>	IV
		36	<i>S</i>	IV	<i>S</i>	IV
61	16	45	<i>M</i>	I	<i>M</i>	I
62	18	35	<i>M</i>	I	<i>M</i>	I
63	16	17	<i>M</i>	II	<i>M</i>	I

연구결과

치면세균막의 채취 및 mutans streptococci의 분리

환자 65명 (13세 이상 35세 미만) 의 브라켓이 부착된 상, 하악의 전치부와 구치부에서 각각의 치아 1개씩을 선택하여 브라켓과 치아 경계부, 그리고 브라켓에서 최소 2 mm 떨어진 부위의 치면세균막을 채취하여 MSB 한천 배지에서 도말하여 배양한 후, dextranase 유전자를 표적으로 하여 중합효소연쇄반응법에 의해 약 530 bp의 중합효소연쇄반응 산물이 증폭되는 것을 mutans streptococci라 생각하였다. 실험결과, 브라켓과 치아 경계

부, 그리고 브라켓에서 최소 2 mm 떨어진 부위의 치면세균막에서 mutans streptococci가 모두 분리된 경우는 총 28명의 환자의 112개의 치아들 중에서 61개의 치아였다.

Mutans streptococci의 종 및 생물형 결정

각각의 샘플에서 증폭된 약 530 bp의 중합효소연쇄반응 산물을 *Hae*III 제한효소로 절단하여 아가로스 겔에 전기영동한 후 제한효소절편 길이의 다양성에 따라 mutans streptococci의 종을 식별하였고, 또한 생화학적 검사를 통해 mutans streptococci의 생물형을 결정하였으며, 그 결과는 Table 1과 같았다.

Table 2. Comparison of mutans streptococci species and biotypes between the interface of orthodontic bracket and tooth surface and smooth tooth surface

	Species No. (%)	Biotype No. (%)
Same	49 (80.3)	36 (59.0)
Different	12 (19.7)	25 (41.0)

No, Number of isolated bacteria; %, percentage of isolated bacteria

Table 3. Frequency of mutans streptococci species and biotypes isolated from the interface between orthodontic bracket and tooth surface

Species	Biotype				Total No. (%)
	I No. (%)	II No. (%)	IV No. (%)	V No. (%)	
<i>S. mutans</i> (52)	43 (70.5)	9 (14.8)	-	-	52 (85.2)
<i>S. sobrinus</i> (9)	-	-	9 (14.8)	-	9 (14.8)
Total (61)	43 (70.5)	9 (14.8)	9 (14.8)	-	61 (100)

No, Number of isolated bacteria; %, percentage of isolated bacteria

Table 4. Frequency of mutans streptococci species and biotypes isolated from smooth tooth surface

Species	Biotype				Total No. (%)
	I No. (%)	II No. (%)	IV No. (%)	V No. (%)	
<i>S. mutans</i>	37 (60.7)	7 (11.5)	-	1 (1.6)	45 (73.8)
<i>S. sobrinus</i>	-	-	13 (21.3)	-	13 (21.3)
<i>S. downei</i>	1 (1.6)	-	2 (3.3)	-	3 (4.9)
Total	38 (62.3)	7 (11.5)	15 (24.6)	1 (1.6)	61 (100)

No, Number of isolated bacteria; %, percentage of isolated bacteria

브라켓과 치아 경계부와 치면의 치면세균막에서 mutans streptococci의 종 및 생물형 차이

브라켓과 치아 경계부와 치아 평활면의 치면세균막에서 같은 종의 mutans streptococci가 검출되는 경우가 80.3% (49/61), 다른 종이 검출되는 경우가 19.7% (12/61) 이었다. 생물형의 경우 같은 경우가 59% (26/61) 이었으며 다른 경우는 41% (25/61) 로 나타났다 (Table 2).

브라켓과 치아 경계부에서 검출된 mutans streptococci의 70.5%가 생물형 I이었으며, 생물형 II 및 IV는 14.8%이었고, 생물형 III과 V는 나타나지 않았다

(Table 3). 반면에 치아 평활면에서 검출된 mutans streptococci는 생물형 I (62.3%) 이 가장 많았으며, 생물형 III (24.6%), 생물형 II (11.5%), 생물형 V (1.6%) 순으로 나타났다 (Table 4).

총괄 및 고안

브라켓이 치아 표면에 부착되면 브라켓 자체, 접착제 성질, 잔여 접착체로 인한 치아 표면의 거칠음 등으로 인해 국소적인 환경의 변화가 초래된 것과 같은 효과가 발생된다. 그러한 이유로 몇몇 연구자들은 브라켓 등의 고정성 교정장치나 가철식 교정장치 환

자의 치아세균막에서의 치아우식증과 관련된 세균 생태계의 변화에 대해 연구하였다.^{1,14} Batoni 등¹⁴은 가철식 교정장치를 장착한 소아 환자와 그렇지 않은 소아 환자의 치면세균막내 mutans streptococci의 혈청형의 차이는 없었다고 보고하였다. 본 연구에서는 브라켓과 치아표면의 경계부와 이로부터 2 mm 이상 떨어진 치아 평활면 치면세균막에 존재하는 mutans streptococci의 종 및 생물형에 차이가 있는지를 알아보았다. 그 결과 브라켓과 치아 경계부와 치아 평활면 치면세균막에 존재하는 종의 차이는 통계학적으로 유의한 차이는 없었다 (Table 2). 하지만 생물형에 있어서는 제I과 제II형은 치아 평활면에서 보다는 브라켓과 치면 사이에서 더 많이 검출되는 것을 볼 수 있었다 (Table 3, 4). 제I형과 제II형의 차이점은 arginine 가수분해능 유무에 있다. 제II형의 mutans streptococci는 arginine을 가수분해하여 암모니아를 만들 수 있는 능력이 있다. 이는 당질이 없더라도 아미노산을 이용하여 에너지원을 만들 수 있다는 것을 의미하며, 한편으로는 당질의 발효에 의해 산도 생성할 수 있지만, 아미노산의 가수분해에 의해 암모니아도 같이 생산할 수 있다는 의미가 된다. 이를 통해 치면세균막내의 수소이온 농도를 다소 낮출 수 있는 기전을 제공함으로써 치아우식증의 발생률을 낮추어 줄 수도 있을 것으로 생각된다. 이러한 가설은 mutans streptococci 생물형 제II형과 다른 생물형들을 arginine과 sucrose가 동시에 첨가된 배지에서 배양하고, 시간별로 배지의 수소이온 농도를 측정해 봄으로써 증명이 가능할 것이다.

브라켓 주위의 치면세균막에서 검출한 mutans streptococci 종에 있어서 *S. mutans*가 85.2% 검출되었고, 생물형에서도 제I형이 70.5% 검출되어 치아 평활면에서의 73.8% 및 62.3%에 비해 높은 수준으로 검출되었다. 이러한 결과를 종합할 때, 브라켓 주위의 법랑질 탈회나 치아우식증은 치면세균막내의 세균 종이나 생물형의 차이에 의한 것이기보다는 구강위 생관리 능력 정도, 식습관 등의 다른 요인에 의해 영향을 많이 받는다고 할 수 있다.

본 실험의 결과 브라켓과 치아 경계부와 치아 평활면에서 검출된 mutans streptococci 종이 같은 경우가 80.3%이었으며 생물형이 서로 같은 경우가 59%로 나타났다. 현재까지 mutans streptococci의 생물형의 종류에 따른 치아우식발생율의 변화에 대한 연구결과를 살펴보면, 통계학적으로 유의한 관련성은 밝혀지지 않았다.

본 실험에서 각각의 환자의 치아 네 개를 선정, 치면세균막을 채취하여 실험에 착수하였으나, 세균이 검출되지 않은 경우와 브라켓 주위나 치아 평활면 어느 한 곳에서만 세균이 검출된 경우는 제외하였다. 세균이 검출되지 않은 주된 이유는 환자가 내원시 잇솔질을 하고 오는 경우가 많았기 때문으로 생각된다. 이는 치아우식증 발생의 주요한 원인 인자인 세균을 제거할 수 있는 방법으로 잇솔질이 중요하다는 것을 간접적으로 시사해 준다고 할 수 있다.

결론

브라켓을 부착한 교정환자의 브라켓과 치아 경계부 및 브라켓으로부터 2mm 이상 떨어진 치아 평활면의 치면세균막에 존재하는 mutans streptococci의 종 및 생물형의 차이를 알아보기 위하여 조선대학교부속 치과병원에 내원하여 상하악 모두 브라켓을 부착한 65명 환자의 전치부 2곳과 구치부 2곳 모두 4부위에서 브라켓과 치아 경계부와 치아 평활면에 존재하는 치면세균막을 따로 채취하고, MSB 배지에서 선택적으로 mutans streptococci를 분리하고, 이들의 지놈 DNA를 추출하고, dextranase 유전자를 중합효소연쇄반응법으로 클로닝한 다음 *Hae* III로 소화하고, 이를 전기영동하여 제한효소절편 길이에 따라 그 종을 식별하고, 생화학적 검사를 통해 생물형을 결정한 다음 이들 두 곳에 존재하는 mutans streptococci의 종 및 생물형의 차이점을 알아본 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 브라켓과 치아 경계부, 그리고 브라켓에서 2 mm 이상 떨어진 평활면의 치면세균막에서 mutans streptococci가 모두 분리된 경우는 총 28명에서 61개 치아였다.
2. 브라켓과 치아 경계부와 브라켓에서 2 mm 이상 떨어진 평활면에서 같은 종의 mutans streptococci가 검출되는 경우가 80.3% (49/61), 다른 종이 검출되는 경우가 19.7% (12/61) 였다. 생물형의 경우 같은 경우가 59% (26/61) 인 반면, 다른 경우는 41% (25/61) 로 나타났다.
3. 브라켓과 치아 경계부에서 생물형 I이 가장 많이 나타났고 생물형 II와 IV는 같은 비율이었으며 생물형 V는 검출되지 않았다.
4. 브라켓에서 2 mm 이상 떨어진 평활면에서는 생물형 I, IV, II, V순으로 많이 검출되었으며, 그 백분

율은 각각 62.3%, 24.6%, 11.5%, 1.6%이었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 브라켓과 치아 경계부 및 치아 평활면 치면세균막에 존재하는 mutans streptococci 종은 서로 비슷한 검출 빈도를 보였지만 두 곳에 존재하는 mutans streptococci의 생물형은 서로 차이가 있는 것으로 조사되었다. 향후 브라켓과 치아 경계부에 존재하는 치면세균막과 치아 평활면의 치면세균막에 존재하는 mutans streptococci 생물형의 차이가 브라켓 주변의 법랑질 탈회 및 치아우식증 발병에 어떠한 영향을 미치는지에 관한 연구가 필요하다.

참 고 문 헌

1. De Siate A, Milano V, Laforgia A. A bacteriological study of supragingival bacterial plaque in subjects undergoing orthodontic therapy. *Minerva Stomatologica* 1991;40:101-5.
2. Fitzgerald RJ, Keyes PH. Demonstration of the etologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. *Journal of American Dental Association* 1960;69-19.
3. Michalek SM, McGhee JR, Shiota T, Devenyus D. Virulence of *Streptococcus mutans*: Cariogenicity of *S. mutans* in adult gnotobiotic rats. *Infect. Immun* 1977;15:466-71.
4. De Stoppelaar JD, van Houte J, Backer Dirks O. The relationship between extracellular polysaccharide-producing streptococci and smooth surface caries in 13-year-old children. *Caries Res* 1969;3:190-9.
5. Krasse B. Relationship between caries activity and the number of lactobacilli in the oral cavity. *Acta Odont Scand* 1954;12:157-72.
6. Jordon HV, Keyes PH, Bellack S. Periodontal lesions in hamsters and gnotobiotic rats infected with actinomyces of human origin. *J Periodont Res* 1972;7:21-8.
7. Gibbons RJ, Nygaard M. Synthesis of insoluble dextran and its significance in the formation of gelatinous deposits by plaqueforming streptococci. *Arch Oral Biol* 1968;3:1249-62.
8. Loesche WJ. *Dental Caries. A treatable infection.* Charles C Thomas, Publisher, Springfield, 1982.
9. Artun J, Brobakken BO. Prevalence of carious white spots after orthodontic treatment with multibonded appliances. *Eur J Orthod* 1986; 8:229-34.
10. Gorelick L, Geiger AM, Gwinnett AJ. Incidence of white spot formation after bonding and banding. *Am J Orthod* 1982;81:93-8.
11. Whiley RA, Beighton D. Current classification of the oral streptococci. *Oral Microbiol Immunol* 1998;13:195-216.
12. Lgorasshi T, Lchikawa K, Yamamoto A, Goto N. Identification of mutans streptococcal species by the PCR products of the *dex* genes. *J Microbiol Methods* 2001;46:99-105.
13. Shklair IL, Keene HJ. A biochemical scheme for the separation of the five varieties of *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 1974;19:1079-81.
14. Batoni G, Pardini M, Giannotti A et. al. Effect of removable orthodontic appliances on oral colonisation by mutans streptococci in children. *Eur J of Oral Sci* 2001;109:388-92.

- ORIGINAL ARTICLE -

Identification of mutans streptococci isolated from dental plaque between the bracket and tooth surface in orthodontic patients

Mi-Ae Kim, DDS, MSD, PhD,^a So-Young Yoo, BSc, MS,^b Hwa-Sook Kim, MSD,^c
Joong-Ki Kook, DDS, MSD, PhD,^d Sung-Hoon Lim, DDS, MSD,^e
Young-Jooh Yoon, DDS, MSD, PhD,^f Kwang-Won Kim, DDS, MSD, PhD^g

The aim of this study was to compare the species and biotypes of mutans streptococci isolated from dental plaques sampled from the interfaces between the bracket and tooth surface and smooth tooth surfaces in orthodontic patients. Dental plaque was collected from the interfaces between brackets and teeth (test group), and from smooth tooth surfaces distant from brackets by more than 2 mm (control group). The dental plaque collected by a sterilized curette was transferred into a vial of 1 X PBS. The sample in the vial was vigorously vortexed for 1 min and plated on mitis-salivarius bacitracin (MSB) agar plate using cotton tips. The agar plates were incubated at 37°C in a candle jar for 2 days, and again incubated for 1 more day at an ambient temperature. Individual colonies were cultured in TH broth at 37°C CO₂ incubator. The PCR-RFLP based on dextranase gene was performed for the identification of mutans streptococci at the species-level. For biotyping of mutans streptococci, biochemical tests were performed. There was no significant difference of the species of mutans streptococci isolated from both test and control groups. However, the biotypes of the mutans streptococci isolated from test and control groups were different. These results may offer the basic data to verify the relationship between the mutans streptococci biotype and enamel decalcification or dental caries in orthodontic patients with fixed appliances.

Korean J Orthod 2005;35(1):51-9

※ **Key words:** Mutans streptococci, Bracket, Biotype, Species

^a Former Graduate Student, ^c Assistant Professor, ^f Associate Professor, ^g Professor, Department of Orthodontics, College of Dentistry, Chosun University

^b Fulltime researcher, ^e Graduate Student, ^d Assistant Professor, Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University

Reprint requests: **Sung-Hoon Lim**

Department of Orthodontics, College of Dentistry, Chosun University, 375, Sosok-Dong, Gwangju, 501-759, Korea
+82 62 220 3870

shlim@chosun.ac.kr

Received April 23, 2004; Last Revision June 16, 2004; Accepted July 8, 2004