

Monoclonal Antibody를 이용한 *Streptococcus mutans* 검출 방법의 임상적 적용에 관한 연구

홍희정 · 김종수 · 김용기

단국대학교 치과대학 소아치과학교실

국문초록

Monoclonal antibody를 이용한 Saliva-check™ Mutans 키트의 타액 *Streptococcus mutans* 검출방법으로서의 활용도와 임상적 우식지수 및 기존의 세균배양방법과의 상관관계를 알아보기 위해 2008년 2월에서 5월 중 평촌키즈웰치과에 내원한 만 2세에서 만 8세 사이의 92명의 아동을 대상으로 *Streptococcus mutans* 검출검사를 실시하였으며 또한 우식에 영향을 미치는 다른 요인인 치면세균막 pH와 타액완충능력검사를 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Saliva-check™ Mutans 검사결과 양성을 나타낸 아동은 27명으로 29.3%이었고, 음성을 나타낸 아동은 65명으로 70.65%이었다. 우식경험유치면들은 음성 아동 13.89%, 양성 아동 25.23% 으로 나타났다.
2. Monoclonal antibody를 이용한 검사방법인 Saliva-check™ Mutans와 기존의 세균 배양방법인 Dentocult®-SM은 각각 상이한 검사방법을 이용함에도 불구하고 검사결과 높은 상관관계를 보였다(p<0.01).
3. Saliva-check™ Mutans 검사와 치면세균막 pH 검사와는 역상관관계를 나타내었으나(p<0.01), 타액완충능 검사와는 상관관계가 나타나지 않았다(p>0.05).

이상의 결과로 보았을 때 Monoclonal antibody를 이용한 검사방법인 Saliva-check™ Mutans는 구강 내 *Streptococcus mutans*를 측정하는 방법으로 적당하며 또한 검사에 필요한 시간을 대폭 줄일 수 있고 사용방법도 매우 간편하게 개발되어 환자들에게 적용함에 있어 효과적이라고 사료되었다.

주요어 : Monoclonal antibody, 우식 지수, 완충능력, *Streptococcus mutans*

I. 서 론

1890년대에 Miller¹⁾가 치아우식증의 원인으로 화학세균설을 발표한 이래 Orland 등²⁾은 무균 동물을 이용하여 치아우식발생에 있어서 미생물의 존재가 필수적임을 밝혔고, Fitzgerald 등³⁾은 무균 동물을 연쇄상구균의 단일균종으로 감염시켜 치아우식이 발생하였음을 보고하였다. Fitzgerald와 Keyes⁴⁾, Keyes⁵⁾는 햄스터를 이용한 동물실험에서 세균에 의하여 치아우식이 다른 실험동물로 전파될 수 있음을 증명하였으며, Clark⁶⁾은 1924년 *Streptococcus mutans*(*S. mutans*)를 처음 발견하였다.

구강 내 연쇄구균의 수치와 치아우식 발생률과 높은 상관관계가 있다는 것은 여러 연구에서 밝혀진 바 있고^{7,8)}, 특히 Krasse⁹⁾는 우식 환자들에 대한 진단과 관리에 있어서 미생물학

적방법을 언급하였으며 그 중요성을 강조하였다.

치아우식증의 중요 원인균으로 *S. mutans*가 밝혀진 이래로 이와 관련된 많은 연구가 진행되어 왔다. 특히 사람의 타액으로부터 *S. mutans*를 선택적으로 분리하기 위한 여러가지 시도들이 있었는데 그 중에서 mitis salivarius agar에 bacitracin을 첨가한 MSB(mitis salivarius sucrose-bacitracin)배지가 가장 일반적으로 사용되어 왔다. 이밖에도 DNA probe법¹⁰⁾, monoclonal antibody를 이용하는 방법¹¹⁾, 중 특이 primer를 이용한 중합효소연쇄반응등이 개발되어 사용되어 왔다¹²⁾. 이러한 새로운 방법들은 기존의 단순 배양방법보다는 정확성이나 신뢰도면에서 많은 장점이 있으나 필요한 장비나 전문 인력 등의 문제 때문에 광범위하게 사용하는 데는 제한이 있었다.

최근에 타액 내 *S. mutans*를 보다 신속히 알아볼 수 있는 방법이 개발되었다. 이 방법은 monoclonal antibody를 이용하여

교신저자 : 김종수

충남 천안시 안서동 산 29 / 단국대학교 치과대학 소아치과학교실 / 041-550-1935 / jskim@dku.edu

원고접수일: 2009년 09월 16일 / 원고최종수정일: 2009년 10월 22일 / 원고채택일: 2009년 11월 12일

*S. mutans*를 검출하며 세균배양기간이 필요하지 않기 때문에 결과를 보다 신속히 알 수 있으며 사용방법도 매우 간편하게 개발되어 환자들에게 적용함에 있어 많은 장점이 있다.

저자는 monoclonal antibody를 이용한 방법과 현재 광범위하게 쓰이는 검출방법 중 하나인 dip slide 방법을 비교하기 위하여 환자의 타액내 *S. mutans*를 검출하고 각각의 검사결과를 비교하였으며, 구강검사를 통하여 치아우식 경험도를 분석하여 상관관계를 구하였다. 또한 미생물학적 요인 외에도 우식에 관여하는 인자로 알려진 환자의 타액완충능력과 치면세균막 산생성능력을 검사하여 상호간의 상관관계를 조사하여 우식활성검사로써의 타당성과 임상적 적용에 관한 효용성을 측정하여 보았다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 연구대상

2008년 2월에서 5월 중, 본원에 내원한 만 2세에서 8세 사이의 환자 92명을 대상으로 하였다. 검사 개시 전 1시간 이내에 음식섭취와 양치질을 한 경우, 혹은 검사 당일엔 살균제가 배합된 구강 세정액을 사용한 경우에는 검사 대상에서 제외하였다.

2. 연구재료

(1) Monoclonal antibody를 이용한 타액 내 *S. mutans*의 검출

Monoclonal antibody를 이용한 타액 내 *S. mutans*의 검출은 Saliva-check™ Mutans (GC, Tokyo, Japan, 이하 Salivacheck-SM)를 사용하였다. 제품구성은 타액을 모으는 혼합용기와 타액의 점도를 완화하고 타액 내 *S. mutans*의 반응성을 향상시키기 위한 처리액 #1(Tris-NaOH: 투명한 액, 알칼리성)과 처리액 #2(Tris-citrate: 황색 액, 산성), 그리고 *S. mutans*에 대한 항원이 포함되어 있어서 적하된 타액 내 *S. mutans* 수준을 판별해주는 test device로 이루어져 있으며 이 밖에도 타액 분비용 검이 포함되어 있다.

(2) Dip slide방식을 이용한 타액 내 *S. mutans*의 검출

Dip slide방식을 이용한 타액 내 *S. mutans*의 검출은 Dentocult®-SM(Orion diagnostica, Espoo, Finland, 이하 Dentocult-SM)을 사용하였다. 제품 구성은 타액의 채취를 위한 screening strip과 액상배지가 담긴 시험관(mitis salivarius broth) 그리고 bacitracin disk로 이루어져 있다.

(3) 치면세균막 산생성능력 검사

치면세균막 산생성능력 검사를 위해서는 Plaque-check™ pH(GC, Tokyo, Japan)을 사용하였다. 제품은 plaque check 용액, plaque check plate, plaque check stick, plaque check brush, plaque check gel 등으로 구성되어 있다.

(4) 타액완충능력 측정 검사

타액완충능력 측정 검사를 위해서는 Saliva-check™ buffer(GC, Tokyo, Japan)를 사용하였다. 제품은 buffer test strip, 타액 분비용 검, 스포이드, 컬러 차트로 구성되어 있다.

3. 연구방법

(1) 구강검사

치과용 진료의사에서 치경과 구강탐침을 이용하여 구강검사를 실시하였으며, 세계 보건기구가 권장하는 조사법에 의거하여 치아 및 치면별 우식 경험 유치와 충진 경험 유치들을 검사하였다.

(2) Monoclonal antibody를 이용한 *S. mutans* 검출

① 타액의 채취

파라핀 왁스를 5 분간 씹은 뒤 분비된 타액 250 µl을 혼합용기에 채취하였다.

② 타액의 처리

처리액 #1 50 µl을 혼합하고 혼합용기의 입구를 2번 접어서 타액이 흘러나오지 않도록 단단히 손으로 누른 후 혼합용기를 손가락으로 잡고 10초 동안 15차례 이상 강하게 용기를 두드리서 타액과 처리액을 충분히 혼합하였다. 처리액 #2 100 µl를 첨가하여 중화시킨 후 수초 간 흔들어 처리액과 타액을 혼합하였다.

③ 타액의 적용

혼합용기에서 처리된 타액을 부속품인 피펫으로 100 µl를 채취하여 test device의 sample 창에 전량 떨어뜨리고 실온에서 15분 간 방치하였다.

④ 결과의 확인

15분간 실온에 방치한 후, control 창에 굵고 빨간 선이 표시되었는지를 확인하였다. Test 창에 가는 빨간 선이 보이면 양성으로 판독하였으며, 빨간 선이 나타나지 않으면 음성으로 판독하였다.

(3) Dip slide 방식을 이용한 *S. mutans* 검출

키트 내의 screening strip을 아동들 구강 내의 혀 위에 올려 타액을 묻혔다. 타액을 충분히 적신 plastic strip을 6 µl의 선택배양액이 들어있는 시험관에 옮기고 뚜껑을 느슨하게 잠갔다. 이 배양액은 사용 20분 전에 bacitracin disk를 미리 넣어서 활성화시켜두었다. 시험관을 37℃ 항온 배양기에서 48시간 배양하였다. 배양 후 판정은 제작회사의 판정표를 이용하여 각 시료들을 0, 1, 2, 3 단계로 나누어 판정하였다.

Table 1. Dentocult-SM level and colony density

Dentocult-SM level	Colony Forming Unit(CFU)
0	<1 × 10 ⁴
1	1 × 10 ⁴ < <1 × 10 ⁵
2	1 × 10 ⁵ < <1 × 10 ⁶
3	>1 × 10 ⁶

(4) 타액의 완충능력 측정

파라핀 왁스를 5분간 씹어서 분비된 타액을 채취하여 시험지의 3곳에 1방울씩 점적하였다. 5분 후 시험지의 색변화를 관찰하여 제조사의 판정표를 참고하여 색을 판독하고 점수로 환산하고 3곳의 점수를 합산하여 최종 결과를 산출하였다.

(5) 치면세균막 산생성능력의 측정

Plaque Check stick을 이용하여 환자의 구강에서 치태를 채취한 뒤 plaque check 용액에 약 1초간 침적시킨 후 5분 후에 색변화를 관찰하여 제조사의 판정표를 참조하여 결과를 판정하였다.

4. 통계분석

대상 아동들의 우식지수와 Salivacheck-SM, Dentocult-SM의 결과와의 상관관계, Salivacheck-SM, Dentocult-SM 검사 간의 일치성, 그리고 추가적으로 실시한 치면세균막 산생성능력 검사와 타액완충능력 검사결과와 타액 내 *S. mutans* 수치간의 관계를 SPSS 15.0 프로그램을 이용하여 상관관계를 분석하였다.

III. 연구 성적

대상 아동들의 구강검사결과는 Table 2와 같다. 우식경험유치율(dft rate)은 전체 39.90%였으며, 2세에서는 27.40%, 3세 37.14%, 4세 42.67%, 5세 49.43%, 6세 30.00%, 7세 58.02%, 8세 아동은 37.50%로 나타났다. 우식경험유치면율(dfs rate)은 전체 17.25%였으며, 2세 10.79%, 3세 13.72%, 4세 17.35%, 5세 23.11%, 6세 15.70%, 7세 25.00%, 8세 아동은 17.61%로 나타났다. 우식경험유치지수(dft index)는 전체적으로 7.33 개의 우식경험유치가 조사되었으며, 2세 5.12개, 3세 7.42개, 4세 8.53개, 5세 9.77개, 6세 5.25개, 7세 7.83개, 8세 아동은 일인당 5.10개의 우식경험유치를 보유하고 있는 것으로 나타났다. 우식경험유치면지수(dfs index)는 전체적으로 14.02면의 우식경험유치면을 보유하고 있는 것으로 나타났으며 2세에서는 8.82면, 3세에서는 12.07면, 4세 15.27면, 5세 19.40면, 6세 12.25개, 7세 16.50면, 8세 아동은 11.80면의 우식경험유치면지수를 나타내었다.

Salivacheck-SM 결과는 Table 3과 같다. 검사결과 양성을 나타낸 아동은 27명이었으며 전체 조사대상 아동 92명 중 29.30%이었고 음성을 나타낸 아동은 65명으로 70.65%였다. 양성으로 나타난 아동들의 우식지수를 보면 우식경험유치율은 양성 아동은 54.83%, 음성 아동은 33.86%였으며 우식경험유치면율은 양성 아동 25.23%, 음성 아동 13.89%, 우식경험유치지수는 양성 아동 9.89개, 음성 아동은 6.26개 이었고, 우식경험유치면지수는 양성 아동 20.70면, 음성 아동은 11.24면으로 나타났다. 모든 우식지수에서 양성 아동과 음성 아동의 차이가 뚜렷이 나타났다.

Table 4는 Dentocult-SM 검사결과를 나타내었다. 0단계로 나타난 아동은 25명, 1단계로 나타난 아동은 21명, 2단계는 16명, 3단계는 30명의 아동으로 나타났으며 검사결과와 단계가 0단계에서 3단계로 증가할수록 우식경험유치율, 우식경험유치면율, 우식경험유치지수, 우식경험유치면지수 모두 증가하였다.

Salivacheck-SM의 결과와 Dentocult-SM의 결과를 비교한 결과는 Fig. 1과 같다. Salivacheck SM에서 음성으로 나타난 아동 중 38.46%가 Dentocult-SM의 0단계로 나타났고 1단계는 29.23%, 2단계는 18.46%, 3단계는 13.85%로 나타났다. Salivacheck-SM에서 양성으로 나타난 아동 중 Dentocult-SM의 0단계로 나타난 아동은 없었으며 1단계는 7.41%, 2단계는 14.81%, 3단계는 77.78%로 나타났다.

Table 2. Caries status of children by age

	total (n=92)	2 yrs. (17)	3 yrs. (14)	4 yrs. (15)	5 yrs. (22)	6 yrs. (8)	7 yrs. (6)	8 yrs. (10)
dft rate	39.9	27.4	37.14	42.67	49.43	30	58.02	37.5
dfs rate	17.25	10.79	13.72	17.35	23.11	15.7	25	17.61
dft index	7.33	5.12	7.42	8.53	9.77	5.25	7.83	5.1
dfs index	14.02	8.82	12.07	15.27	19.4	12.25	16.5	11.8

n : number of children

Table 3. Caries status and result of Salivacheck-SM

	Salivacheck-SM	
	Negative (n=65)	Positive (n=27)
dft rate	33.86±23.3	54.83±23.1
dfs rate	13.89±11.9	25.23±11.9
dft index	6.26±4.2	9.89±4.6
dfs index	11.24±9.5	20.70±11.4

Table 4. Caries status and result of Dentocult-SM

	Dentocult-SM			
	0(n=25)	1(n=21)	2(n=16)	3(n=30)
dft rate	24.35±20.4	33.59±20.5	40.75±19.9	57.00±23.8
dfs rate	8.73±9.9	12.86±11.0	18.50±9.6	26.59±14.7
dft index	4.48±3.5	6.24±3.8	7.44±3.8	10.40±4.6
dfs index	6.92±6.8	10.71±9.0	14.94±7.9	21.77±11.6

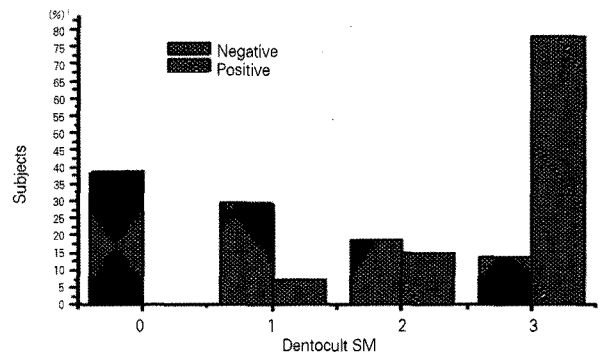


Fig. 1. Bar graph of comparison between Salivacheck-SM and Dentocult-SM by percentage of subjects.

Salivacheck-SM에서 음성으로 나온 아동 중 68%가 Dentocult-SM에서는 1단계 이하로 나타난 반면 양성을 보인 아동은 92% 이상이 Dentocult-SM에서 2단계 이상으로 나타났다.

Salivacheck-SM에서 양성과 음성으로 나타난 아동들의 우식경험치면율, 치면세균막 pH, 타액완충능력의 종합적인 비교는 Table 5와 같다. 우식경험치면율은 음성 아동은 14.0% 이었으며 양성 아동은 25.24% 로 뚜렷한 차이를 보이고 있다. 치면세균막 산생성능력 검사에서 음성 아동은 평균 pH 6.34로 나타났으며, 양성 아동은 pH 5.75로 나타나 양성 아동들 치면세균막이 음성 아동들에 비해 산생성능력이 높은 것으로 조사되었다. 타액완충능력 검사에서는 음성 아동은 6.94점, 양성 아동은 6.51 점으로 나타나 양성 아동들의 타액완충능력이 음성 아동들에 비해 약간 낮은 것으로 나타났으나 유치우식 경험도나 치면세균막 산생성능력검사에 비해서는 유의할만한 차이는 아니었다.

Table 6은 각각의 검사결과의 상관관계를 나타낸 표이다. Salivacheck-SM과 Dentocult-SM과 우식경험치면율과의 상관계수가 각각 0.378(p<0.05)과 0.527(p<0.01)으로 나타났으며 모두 통계적으로 유의성이 있었다. Salivacheck-SM과 Dentocult-SM과의 상관계수는 0.617(p<0.01)로 나타나 높은 상관관계를 나타내고 있다. 치면세균막 pH는 우식경험치면율과는 -0.242 (p<0.05), Salivacheck-SM과는 -0.486 (p<0.01)의 상관관계를 나타내어 각각의 수치와 역상관관계를 갖는 것으로 나타났다. 그러나 타액완충능력 검사와 우식경험치면율, 타 검사들 간에는 유의할만한 상관관계가 나타나지 않았다(p>0.05).

Table 5. Summary of the Salivacheck-SM results

	dfs rate	pH	buffer
Salivacheck SM	- (65) 14.0±11.9%	6.34±0.5	6.94±1.9
	+ (27) 25.4±14.6%	5.75±0.3	6.51±2.1

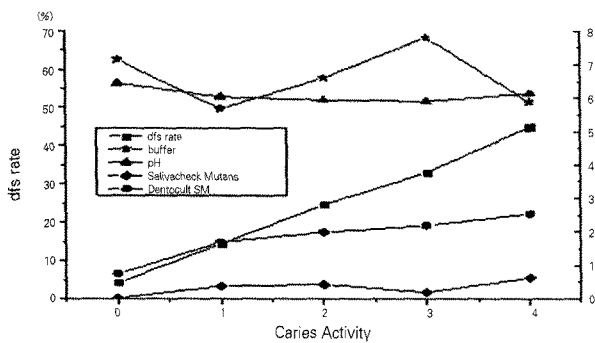


Fig. 2. Graph of correlation among results.

Fig. 2는 각 검사간 상관관계를 그래프로 나타낸 것이다. Dentocult-SM의 우식활성도(caries activity)결과는 우식경험치면율과 비례관계를 보이고 있으며 치면세균막 pH는 역비례관계를 보이고 있으나 타액완충능력은 변이를 보이고 있어 어떠한 상관관계를 보이고있지 않다. Salivacheck-SM은 미약하게 우식경험치면율과 비례관계를 보이고있다.

Fig. 3은 Dentocult SM과 Salivacheck-SM의 상관관계를 우식경험치면율을 이용하여 나타낸 것이다. 두 검사는 서로 상이한 검사방법을 사용함에도 불구하고 높은 일치성을 보이고 있다.

IV. 총괄 및 고찰

치태에 존재하는 300개 이상의 세균에서 특히 내산성 세균종인 *S. mutans*와 *Lactobacillus*가 우식증의 이환에 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다¹³⁾. 치아우식증의 발생 원인균으로 이전에는 *Lactobacillus*를 중요시해서 초기의 세균학적 우식활성검사는 구강 내 *Lactobacillus*의 검출에 관한 검사가 대부분이었다¹⁴⁾. *Lactobacillus*가 우식 유발 가능성 세균으로 여겨지게 된 것은, 법랑질을 침범하는 대부분의 우식환부에서 다량으로 검출된다는 점, pH 5 이하에서의 생존능력 및 젖산을 생산하는 능력, 설탕으로부터 세포외 및 세포내 다당류를 모두 합성할 수 있는 능력 등 때문이었다¹⁵⁾. 그러나 스스로 치면에 부착하는 능력이 없기 때문에 초기 우식증에서는 잘 발견되지 않고, 우식이 생기기 이전의 치태에서는 거의 검출되지도 않는 경우가 많으며 *S. mutans*에 비해 감염정도가 낮아서 인구집단의 약 50%에서는 아주 낮은 정도로만 발견되고 있다¹⁶⁾. 우식과정

Table 6. Correlation between results

	Dentocult SM	pH	Buffer	Salivacheck SM
dfs rate	0.527 (p<0.01)	-0.242 (p<0.05)	-0.109	0.378 (p<0.05)
Dentocult SM		-0.368	-0.246	0.617 (p<0.01)
pH			0.114	-0.486 (p<0.01)
Buffer				-0.076

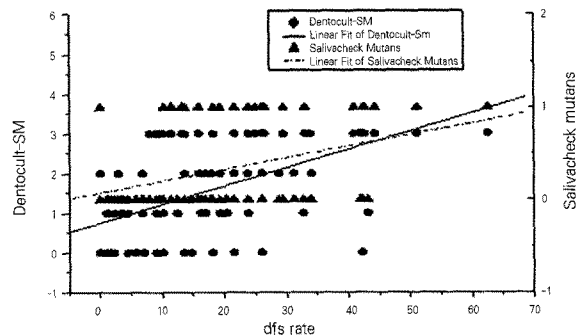


Fig. 3. Graph of relationship between Salivacheck-SM and Dentocult-SM.

에서 *Lactobacillus*의 역할은 정확히 설명되고 있지 않지만 다만, 깊은 우식환부에서 많이 검출되는 것을 고려할 때 우식의 진행에 더 많이 관여하며 2차적 침입자로 이미 확립된 병소를 진전시키는 역할을 한다고 간주되고 있다¹⁶⁾. *S. mutans*는 *Lactobacillus*처럼 매우 강한 산을 생성하고 치면에 대한 부착력이 대단히 높다. 또한 산에 저항성이 강하고 pathogenic biofilm을 생성하여 대부분 치아우식증의 시작과 진행에 관여한다¹⁵⁾. *S. mutans*는 설탕을 대사하여 글루칸을 만들어 내는데, 이 세포외 다당류는 점도가 높아 세균간 및 세균과 치아표면과의 부착을 가능하게 한다¹⁷⁾. 다른 몇몇 구강 내 세균 즉, *streptococcus sanguis*나 *streptococcus salivarius*도 이러한 다당류를 생성할 수 있는 능력이 있다. 그러나 오직 *S. mutans*만이 일반적으로 sucrose를 이용하여 치면에 초기 부착을 하고 초기 부착한 균에 또 다른 균이 부착하여 집합체를 이루기 때문에 이러한 *S. mutans*의 부착능력은 치아우식증과 관련된 독성요인 중의 하나로 받아들여지고 있다¹⁷⁾. 또한 에너지 저장고로서 세포내 다당류를 생성하는데, 이 다당류 때문에 외부로부터 탄수화물의 공급이 없을 때에도 타 세균들에 비해 오래 생존할 수 있다¹⁹⁾. *S. mutans*의 산생성능력과 내산성능력 또한 치아우식증과 관련된 중요한 요소이다. *S. mutans*는 낮은 pH에서 증식을 시작하고 그 수를 유지하면서 산 생산을 지속시킬 수 있는 능력이 있을 뿐 아니라, 다양한 종류의 당을 발효시킬 수 있고 자당을 다른 구강내 세균보다 빠르게 유산(lactic acid)으로 대사할 수 있는 능력이 있으며 다른 일반적인 치태세균에 비해 법랑질의 탈회에 필요한 임계 pH에 더 빨리 도달 할 수 있다¹⁵⁾.

우식에 있어서 *S. mutans*의 역할에 대해서는 방대한 문헌이 있다. 1924년 Clark⁶⁾의 보고 이후 많은 연구자들이 우식병소에서 *S. mutans*를 발견하였고 *S. mutans*와 치아우식과의 연관성을 연구하였다. 1960년대 Fitzgerald 등³⁾, Fitzgerald와 Keyes⁴⁾는 동물 실험을 통해 *S. mutans*와 치아우식과의 관련성을 연구하였는데, 동물 실험 군에게 지속적으로 설탕이 함유된 사료를 공급하고 다량의 *S. mutans*에 노출시켰을 때, 설탕이 함유된 똑같은 사료를 먹었지만 *S. mutans*의 수치가 낮았던 대조군에 비해 시간이 지날수록 높은 우식발생율을 보였다고 보고하였다. 인간의 우식과 *S. mutans*간의 관계는 윤리적, 방법적인 문제 때문에 주로 역학적인 방법을 이용하여 연구되어 왔다. Littleton 등¹⁸⁾은 환자들의 구강 내 우식병소에서 *S. mutans*가 다른 구강내 상주 세균 중에서 가장 빈번하게, 그리고 다량으로 검출되었다고 보고하였다. Zickert 등¹⁹⁾은 *S. mutans*와 인간의 치아우식 사이에 강한 상관관계가 있다고 주장했으며, 18세 이상 19세 미만의 스웨덴 성인을 대상으로 한 연구에서 우식발생율과 타액 내 *S. mutans* 수치간에 비례적인 관계가 있음을 보고하였다. 아동들의 치아우식과 *S. mutans*의 정량적 관계에 대한 연구도 활발히 진행되어 왔다. Russell 등²⁰⁾은 12세에서 14세 사이의 어린이들을 대상으로 한 연구결과에서 아동들의 치아우식과 아동들의 구강 내에서 채취한 *S. mutans*의 수치에서 명확한 비례관계가 보인다고 보고하였다.

그리고 Beighton 등²¹⁾은 12세에서 13세 사이의 아동들을 대상으로 한 연구에서 우식이 많은 아동들은 그렇지 않은 아동에 비해서 *S. mutans*의 수치가 높았다고 밝혔으며 이 등²²⁾은 6세에서 11세 사이의 혼합치열기 아동들을 대상으로 한 연구에서 *S. mutans*와 치아우식증 사이에 약간의 관련성이 있는 것으로 나타났다 하였고. 또한 신 등²³⁾은 아동들의 치면세균막 내의 *S. mutans* 집락수는 아동들의 우식활성이 높아질수록 통계적으로 유의하게 수적인 증가를 나타낸다고 발표하였다.

초기 우식증과 *S. mutans*의 관계에 관한 연구도 있었다. Losche 등²⁴⁾은 수 년에 걸친 연구결과 실제 우식이 나타나기 6개월에서 24개월 전부터 *S. mutans*의 수치가 현저히 증가한다고 발표하였으며, Van 등²⁵⁾은 초기 백색우식병소에서 채취한 치태는 우식이 없는 부위의 치태보다 높은 *S. mutans*의 비율을 보인다고 하였다.

우식과 *S. mutans*의 관계가 밝혀질수록 연구자들은 *S. mutans*를 보다 효과적으로 검출할 수 있는 방법에 주목하게 되었고 이에 관한 많은 연구가 진행되어 왔다. Carlsson²⁶⁾은 *S. mutans*가 sulphadiazine에 비교적 강하다는 점을 이용 sulphadiazine이 포함된 배지를 개발하였다. Ikeda와 Snadham²⁷⁾은 40퍼센트의 sucrose를 함유한 mitis-salivarius agar에 관한 연구를 보고하였다. *S. mutans*만이 증식할 수 있는 방법을 찾던 연구자들은 bacitracin에 눈을 돌리게 되었으며, bacitracin이 *S. mutans*를 제외한 다른 구강세균의 억제에 대단히 효과적이라는 것을 발견하게 되었다²⁸⁾. Westergren과 Krasse²⁹⁾는 반자동 pipetting device를 이용하여 작은 양의 타액을 채취 회석하여 배지 표면에 발라서 배양하여 배지 표면에 점으로 나타나는 것을 관찰하여 정량할 수 있는 방법을 개발하였고, Kohler 과 Bratthall³⁰⁾은 타액으로 적신 나무 spatula를 배지에 눌러서 배양하여 *S. mutans*를 정량하는 방법을 발표했다. *S. mutans*의 선택배양방법은 dip slide 방법 등으로 발전되었다. Dip slide 방법으로는 Dentocult[®] SM, Cariescreen SM[®](Apo Diagnostica, Toronto, Canada)방법 등이 있으며 본 연구에서는 전자의 방법으로 사용되었다. MSB agar 방법이 실험실에서 개개 환자마다 복잡한 실험실 과정을 거치는데 비하여 dip slide방법은 간편하게 사용할 수 있는 장점이 있고 Gomez³¹⁾, El-Nadeef과 Bratthall³²⁾에 의하여 우식활성시험을 하는데 충분하고도 타당한 방법임이 입증되어 치과 병원에서 간편하게 사용되어 왔다. 이 방법은 *S. mutans*가 20%의 sucrose의 설탕을 배합한 mitis salivarius broth가 담긴 시험관 벽에 달라붙어 자라는 능력이 있음을 응용한 방법이다. 개발이 진행될수록 검사방법은 보다 간편해졌으나 세균을 배양하는 방법들은 기본적으로 2일이라는 배양기간이 필요하기 때문에 검사결과를 바로 알 수 없다는 한계가 있었다.

최근에 개발된 monoclonal antibody를 이용한 *S. mutans* 검출방법은 이러한 한계를 넘어서고 있다. 본 연구에서는 기존의 dip slide 방법을 대체 가능한지 알아보기 위하여

Salivacheck-SM을 사용하였다. 이 방법은 면역 chromatography를 응용하여 타액중의 *S. mutans*를 검출하게 되는데 *S. mutans*만을 생화학적으로 염색하여 그 양을 바로 눈으로 확인할 수 있다. 타액을 test device에 적용하기 전 두 가지 용액을 첨가하여 처리하는 과정을 거친다. 타액은 점착성분을 많이 포함하는 액체이며, test device에 잘 염색되기가 어렵다. 그리고 *S. mutans*는 glucan에 둘러싸여 있을 경우가 있어 항체와의 결합을 저해하는 경우가 있다. 처리액 #1(Tris-NaOH: 투명한 액, 알칼리성) 과 처리액 #2(Tris-citrate: 황색 액, 산성)에 의해서 타액을 처리함으로써 이러한 저해요인을 제거하게 된다. 이렇게 처리된 타액이 Test device에 적용되면 membrane을 따라 확산되게 된다. 타액 내 *S. mutans*는 test device에 침전되어 있는 detector antibody(anti-*S. mutans* antibody)와 결합하게 된다. Detector antibody에는 colloidal gold가 표식으로 붙어있기 때문에 이 antibody와 결합한 후에는 *S. mutans*의 표면에 colloidal gold 입자가 부착되게 된다. 이 균체가 test device에서 타액과 함께 흐르고, test line에 도포되어 있는 또 다른 anti *S. mutans* antibody capture antibody에 포착되어, test 창에 붉은 선을 나타내게 된다. 반응하지 않았던 detector antibody(anti-*S. mutans* antibody)는 control 창에 도포되어 있는 anti-Mouse Ig G antibody에 포착되어 붉은 선이 나타나게 되고 이 선이 나타나는 것은 검사 system이 정상적으로 이루어졌다는 것을 의미한다. Test 창에 가는 빨간 선이 보이면 양성이며 타액 1ml 당 *S. mutans*의 수가 5×10^5 CFU/ml 이상이라는 것을 의미한다.

Axelsson³³⁾은 타액 중 *S. mutans*의 수가 5×10^5 CFU/ml 이상인 경우 우식발생위험성이 높다고 주장하였는데 Salivacheck-SM은 타액 중의 *S. mutans*의 수가 5×10^5 CFU/ml 이상인지 미만인지를 판정할 수 있다. 선이 보이지 않으면 음성으로 *S. mutans*가 5×10^5 CFU/ml 미만인데, 증감액 (enhancing reagent, Silver Enhancer, KPL, Gaithersburg, Md., USA)을 사용하면 더 세분하여 level을 나눌 수 있다. Test device에 증감액을 떨어뜨리고 다시 15분을 기다리는데 test 창에 붉은 선이 나타나면 level 2, 나타나지 않으면 level 1로 분류할 수 있다. 그러나 아쉽게도 현재 이 증감액이 제조국인 일본 외부로는 수출되고 있지 않기 때문에 이번 연구에서는 사용을 할 수 없었다. 따라서 타액 내 *S. mutans*가 5×10^5 CFU/ml 이상인지 아닌지 여부만 확인이 가능하였다.

본 연구는 병원에 치과치료를 위해 내원한 아동들을 대상으로 이루어졌기 때문에 아동들의 우식실태가 대단히 높았다. 우식경험자율은 95%가 넘었으며, 우식경험유치율은 39.90%, 우식경험유치면율은 17.25%, 우식경험유치지수는 7.33개, 우식경험유치면지수는 14.02면으로 나타났다. Salivacheck-SM을 이용한 검사에서 양성을 나타낸 환자는 92명 중 27명으로 30%에 육박하였는데 이러한 검사결과는 양성으로 나타난 환자가 10%내외였다는 일본에서 발표된 연구결과와 비교할 때³⁴⁾,

상당히 높은 수치인 것으로 보인다. Salivacheck-SM에서 양성으로 나타난 아동들의 우식경험치면율은 25.4%로 음성아동들의 14.0%에 비해 매우 높은 수치를 보였다. Salivacheck-SM의 결과와 Dentocult-SM 결과와 비교했을 때 높은 상관관계를 나타내었다. Salivacheck-SM 검사결과 음성을 나타낸 아동들의 70% 이상은 Dentocult-SM에서 1단계 이하의 결과를 나타냈고, 양성을 나타낸 아동들의 70% 이상이 Dentocult-SM에서 가장 높은 단계인 3단계를 나타냈으며 양성 아동들의 90% 이상이 Dentocult-SM에서 2단계 이상을 나타냈다. Dentocult-SM 검사에서 2단계는 타액 1 ml당 1×10^4 CFU 이상 1×10^6 CFU 미만이고 3단계는 타액 1 ml당 1×10^6 CFU 이상을 의미한다. Saliva-check SM에서 양성인 타액 1 ml당 *S. mutans*가 5×10^5 CFU 이상인 것을 고려할 때 두 검사 간 긴밀한 상관관계가 있음을 알 수 있다. 또한 Dentocult-SM에서 3단계로 나타난 아동들의 우식경험유치면율이 26.6%이었는데 이러한 결과는 Salivacheck-SM에서 양성으로 나타난 환자들의 우식경험유치면율인 25.23%와 비교해서 상당히 부합되는 결과라 할 수 있겠다. 치면세균막 pH와 Salivacheck-SM검사간에도 유의할만한 상관관계가 발견되었다.

Salivacheck-SM에서 양성을 보인 아동들의 90% 이상이 pH 6.0이하를 나타냈고 50% 이상은 pH 5.5로 나타났다. 반면 음성 아동들은 60% 이상이 pH 6.5 이상이었다. 타액 완충 능력은 Salivacheck-SM 양성인 아동과 음성인 아동에서 커다란 차이는 발견되지 않았다. 양성인 아동들의 평균 타액완충능력이 음성인 아동보다는 떨어지는 것으로 나왔으나 그 차이가 대단히 근소하였으며 전체적인 비율을 보았을 때 음성 아동과 양성 아동 모두 80% 이상이 중간에 분포하고 있었다.

각 검사들 간의 상관관계를 보았을 때 Salivacheck-SM과 Dentocult-SM과는 대단히 밀접한 상관관계가 있었으며 조사 대상 아동들의 우식실태와 Salivacheck-SM의 결과와도 높은 상관관계가 있었다. 치아우식에 영향을 미칠 수 있는 치면세균막 pH 검사와 타액완충능 검사결과와 비교했을 때에는 치면세균막 pH 검사와는 유의할만한 역상관관계가 나타났으나 타액완충능과는 유의성 있는 관계를 찾기가 어려웠다.

이상의 연구결과로 볼 때, monoclonal antibody를 이용한 Salivacheck-SM은 *S. mutans*의 검출방법으로서 많은 장점이 있는 것으로 판단된다. 본 실험결과에 따르면 환자들의 우식경험도와 비교분석 하였을 때 높은 상관관계를 보이고 있으며 상이한 검출방식에도 불구하고 기존의 세균배양방법 중 dip slide 방식인 Dentocult-SM과도 대단히 높은 검사의 일치성을 보여주었다. Salivacheck-SM은 기존의 방법과 달리 세균을 배양할 필요가 없기 때문에 병원체의 증식으로 인한 진료실 내의 오염을 방지 할 수 있고 추가적으로 필요한 배양기 등의 부가물이 없기 때문에 필요한 노동력과 시간을 줄여줄 수 있으며 치과뿐만 아니라 치과나 실험실 밖에서도 간편하게 사용할 수 있다. 특히 학교 구강검진시 다수를 대상으로 하는 우식활성도의 조사시 현장에서 바로 검사결과를 확인할 수 있고, *S. mu-*

tans의 수가 매우 높은 아동들을 가장 신속히 또한 대단히 정확하게 분류해낼 수 있다는 점에서 매우 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다. 하지만 타액을 250 µl 이상 모아야 검사가 가능하기 때문에 침을 뱉을수 있는 연령 이상에서만 검사가 가능하였다. 또한 현재 증감액이 우리나라에 수입되지 않기 때문에 *S. mutans*의 보유수준이 5×10^5 CFU 인 경우만 판별이 가능하여 세분화된 세균의 보유수준을 확인하기는 어렵다. 또한 아동별 검사과정에서 검사의 조건을 일치시키지 못한 점이 연구 결과에 영향을 미쳤을 것으로 보인다. Monoclonal antibody를 이용한 새로운 *S. mutans* 검출방식의 우식활성검사로써 정확한 신뢰도와 예측도를 알아보기 위해서는 앞으로 더 넓은 범위의 검사대상자와 오랜 기간의 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

본원에 내원한 만 2세에서 8세 사이, 92명의 아동을 대상으로 구강검사를 실시하고 Salivacheck-SM, Dentocult-SM 검사 kit를 이용하여 구강내 *S. mutans*를 조사하였으며 치면세균막 pH, 타액완충능력 검사를 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 대상 아동들의 우식경험유치지수는 평균 7.33개였으며, 2세 5.12개, 3세 7.42개, 4세 8.53개, 5세 9.77개, 6세 5.25개, 7세 7.83개, 8세 아동은 일인당 5.10개의 우식경험유치를 보유하고 있는 것으로 나타났다. 우식경험유치면지수는 전체적으로 14.02면으로 나타났으며 2세에서는 8.82면, 3세에서는 12.07면, 4세 15.27면, 5세 19.40면, 6세 12.25면, 7세 16.50면, 8세 11.80면의 우식경험유치면지수를 나타내었다.
2. Salivacheck-SM 검사결과 양성을 나타낸 아동은 27명이었으며 전체 조사대상 아동 92명 중 29.30%였고, 음성을 나타낸 아동은 65명으로 70.65%였다. 아동들의 우식지수를 보면 우식경험유치율은 양성 아동은 54.83%, 음성 아동은 33.86%였으며 우식경험유치면율은 양성 아동 25.23%, 음성 아동 13.89%, 우식경험유치지수는 양성 아동 9.89개, 음성 아동은 6.26개 이었고, 우식경험유치면지수는 양성 아동 20.70면, 음성 아동은 11.24면으로 나타났다. 모든 우식 지수에서 양성 아동과 음성 아동의 차이가 뚜렷이 나타났다.
3. Monoclonal antibody를 이용한 검사방법인 Salivacheck-SM 와 세균 배양방법인 Dentocult-SM은 각각 상이한 검사방법을 이용함에도 불구하고 검사결과 0.617(p<0.01)의 높은 상관관계를 보였다.
4. Salivacheck-SM 검사와 치면세균막 pH검사와는 -0.486(p<0.01)의 역상관관계를 나타내었으나 타액완충능 검사와는 유의할만한 상관관계가 나타나지 않았다 (p>0.05).
이상의 결과로 보았을 때 monoclonal antibody를 이용한 검

사방법인 Salivacheck-SM은 구강내 *S. mutans*를 측정하는 방법으로 적당하며 또한 검사에 필요한 시간을 대폭 줄일 수 있고 사용방법도 편리하여 환자들에게 적용하기 용이한 것으로 사료된다.

참고 문헌

1. Ring ME: Dentistry: An illustrated history. Harry N Abrams Inc, New York, 21-22 1985.
2. Orland FJ, Blayney JR, Harrison RW, et al.: Use of germ-free animal technic in the study of experimental dental caries. Basic observations on rats reared free of all microorganisms. J Dent Res, 33:147-174, 1954.
3. Fitzgerald RJ, Jordan HV, Stanley HR: Experimental caries and gingival pathologic changes in the gnotobiotic rat. J Dent Res, 39:923-935, 1960.
4. Fitzgerald RJ, Keyes PH: Demonstration of the etiological role of streptococci in experimental caries in the hamster. J Am Dent Ass, 61:9-19, 1960.
5. Keyes PH: The infections and transmissible nature of experimental dental caries findings and implications. Arch Oral Biol, 1:304-320, 1960.
6. Clark JK: On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. Br J Exp Pathol, 5:141-147, 1924.
7. Jordan HV, Laraway R, Snirch R: A simplified Diagnostic System for Cultural Detection and Enumeration of *Streptococcus mutans*. J Dent Res, 66:57-61, 1987.
8. Zickert I, Emilson CG, Krasse B: Streptococcus mutans, Lactobacilli and Dental Health in 13-14-Year-Old Swedish Children. Community Dent Oral Epidemiol, 10:77-81, 1982.
9. Krasse B: Can Microbiological Knowledge be applied in Dental Practice for the Treatment and prevention of Dental Caries. J Can Dent Assoc, 50:221-223, 1984.
10. French CK, Savitt ED, Simon SL, et al.: DNA probe detection of periodontal pathogens. Oral Microbiol Immunol, 1: 58-62, 1986.
11. Fang GU, Renate Lux, Anderson MH, et al.: Analyses of *Streptococcus mutans* in Saliva with Species-specific Monoclonal Antibodies. Hybridoma and Hybridomics 21:225-232, 2002.
12. Ono T, Hirota K, Nemoto K, et al.: Detection of *Streptococcus mutans* by PCR amplification of spaP gene. J Med Microbiol, 41:231-235, 1994.

13. Tanzer JM: Changing the cariogenic chemistry of coronal plaque. *J Dent Res*, 68:1576-1587, 1989.
14. 이홍수, 이광희, 김수남: 세균학적 우식활성검사의 우식예측에 관한 연구. *대한구강보건학회지*, 16:336-359, 1992.
15. Samaranayake LP: *Essential Microbiology for dentistry 2*. Churchill livingstone, 87-92 2001.
16. Norman OH, Franklin GG: *Primary preventive dentistry 6*. Prentice Hall, 102-157 2003.
17. Newbrun E: *Cariology 3*. Quintessence, 3:76-90, 1989.
18. Littleton NW, Kakehashi S, Fitzgerald RJ: Recovery of Specific "Caries-inducing" Streptococci from Carious Lesions in the Teeth of Children. *Arch Oral Biol*, 15:461-463, 1970.
19. Zickert I, Emilson CG, Krasse B: Microbial conditions and caries increment 2years after discontinuation of controlled antimicrobial measures in Swedish teenagers. *Community Dent Oral Epidemiol*, 15:241-244, 1987.
20. Russell JI, Macfarlane TW, Aitchison TC, et al.: Caries prevalence and microbiological and salivary caries activity tests in Scottish adolescents. *Community Dent Oral Epidemiol*, 18:120-125, 1990.
21. Beighton D, Adamson A, Rugg-Gunn A: Associations between dietary intake, dental caries experience and salivary bacterial levels in 12-year-old English schoolchildren. *Arch Oral Biol* 41:271-280, 1996.
22. 이명성, 최성철, 박재홍 : 혼합치열기 어린이에서 *Streptococcus mutans*와 *Streptococcus sobrinus*의 분포도 조사. *대한소아치과학회지* 34:247-253, 2007.
23. 신두교, 김지영, 송근배 등 : 미취학 아동들의 유치우식경험도와 개량형 Dentocult-SM검사 및 치면세균막 세균활성과의 관련성. *대한소아치과학회지*, 30:254-261, 2003.
24. Losche WJ, Eklund S, Earnest R, et al.: Longitudinal investigation of bacteriology of human fissure decay: Epidemiological studies in molars shortly after eruption. *Infect Immun*, 46:765-772, 1984.
25. Van Houte J, Samsone C, Joshipura K, et al.: In vitro acidogenic potential and mutans streptococci on human smooth-surface plaque associated with initial caries lesions and sound enamel. *J Dent Res*, 70:497-502, 1991.
26. Carlsson J: A medium for isolation of *Streptococcus mutans*. *Archs Oral Biol*, 12:1657-1658, 1967.
27. Ikeda T, Snadham HJ: A high sucrose medium for the identification of *Streptococcus mutans*. *Archs oral Biol*, 17:781-783, 1972.
28. Olga G, Gold H, Jordan V, et al.: A Selective medium for *streptococcus mutans*. *Archs oral Biol*, 18:1357-1364, 1973.
29. Westergren G, Krasse B: Evaluation of micromethod for determination of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* Infection. *J Clin Microbiol*, 7:82-83, 1978.
30. Kohler B, Bratthall D: Practical method to facilitate estimation of *Streptococcus mutans* levels in Saliva. *J Clin Microbiol*, 9:584-588, 1979.
31. Gomez I: Sampling, count, identify and store the mutans streptococci. *Scand J Dent Res*, 98:106-110, 1989.
32. El-Nadeef MAI, Bratthall D: Intraindividual variations in counts of mutans streptococci measured by "strip mutans" method. *Scand J Dent Res*, 99:8-13, 1990.
33. Axelsson P: *Diagnosis and risk prediction of dental caries 2*. Quintessence publishing co. Illinois, 27-226, 2000.
34. Matsumoto Y, Sugihara N: A rapid and quantitative detection system for *Streptococcus mutans* in saliva using monoclonal antibodies. *Caries research*, 40:15-19, 2005.

Abstract

DETECTION SYSTEM OF *STREPTOCOCCUS MUTANS* IN SALIVA USING MONOCLONAL ANTIBODY

Hi-Jung Hong, Jong-Soo Kim, Yong-Kee Kim

Dankook University, School of Dentistry, Department of Pediatric Dentistry

The purpose of this study was to evaluate the clinical effectiveness of new streptococcus detection system which used monoclonal antibody against *Streptococcus mutans*.

92 children aged between 2 and 8 were involved in this experiment and their saliva samples were collected for testing. Streptococcus mutans were measured by both monoclonal antibody-based detecting system(Saliva-check™Mutans) and dip slide detecting system(Dentocult®-SM). The results showed that Saliva-check™ Mutans levels had a significant correlation with dfs rate of subjects and the two test kits, Saliva-check™ Mutans and Dentocult®-SM were shown to have a good correlation although they were based on different mechanism.

Key words : Monoclonal antibody, Caries index, Buffering capacity, *Streptococcus mutans*