

유산 완충용액의 pH 및 포화도 변화에 따른 법랑질 내 수산화인회석 결정 형태의 변화

전영의 · 정일영 · 노병덕 · 이찬영*

연세대학교 대학원 치의학과 치과보존학교실

ABSTRACT

THE CHANGE OF THE CONFIGURATION OF HYDROXYAPATITE CRYSTALS IN ENAMEL BY CHANGES OF PH AND DEGREE OF SATURATION OF LACTIC ACID BUFFER SOLUTION

Young-Eui Chon, Il-Young Jung, Bung-Duk Roh, Chan-Young Lee*

Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Yonsei University

Since it was reported that incipient enamel caries can be recovered, previous studies have quantitatively evaluated that enamel artificial caries have been remineralized with fluoride, showing simultaneously the increase of width of surface layer and the decrease of width of the body of lesion. There is, however, little report which showed that remineralization could occur without fluoride. In addition, the observations on the change of hydroxyapatite crystals also have been scarcely seen.

In this study, enamel caries in intact premolars or molars was induced by using lactic acidulated buffering solutions over 2 days. Then decalcified specimens were remineralized by seven groups of solutions using different degree of saturation (0.212, 0.239, 0.301, 0.355) and different pH (5.0, 5.5, 6.0) over 10 days. A qualitative comparison to changes of hydroxyapatite crystals after fracturing teeth was made under SEM (scanning electron microscopy) and AFM (atomic force microscopy).

The results were as follows :

1. The size of hydroxyapatite crystals in demineralized area was smaller than the normal ones. While the space among crystals was expanded, it was observed that crystals are arranged irregularly.
2. In remineralized enamel area, the enlarged crystals with various shape were observed when the crystals were fused and new small crystals in intercrystalline spaces were deposited.
3. Group 3 and 4 with higher degree of saturation at same pH showed the formation of large clusters by aggregation of small crystals from the surface layer to the lesion body than group 1 and 2 with relatively low degree of saturation at same pH did. Especially group 4 showed complete remineralization to the body of lesions. Group 5 and 6 with lower pH at similar degree of saturation showed remineralization to the body of lesions while group 7 didn't show it. Unlike in Group 3 and 4, Group 5 and 6 showed that each particle was densely distributed with clear appearance rather than crystals form clusters together. [J Kor Acad Cons Dent 32(6):498-513, 2007]

* Corresponding Author: **Chan-Young Lee**

Department of Conservative Dentistry,
College of Dentistry, Yonsei University
134 Shinchon-Dong, Seodaemun-Ku, Seoul, 120-752, Korea
Tel: 82-2-2228-8700 Fax: 82-2-313-7575
E-mail: chanyoungl@yumc.yonsei.ac.kr

Key words: Enamel, Remineralization, pH,
Degree of saturation, Atomic force
microscopy, Scanning electron
microscopy

- Received 2007.9.18., revised 2007.10.3.,
accepted 2007.10.10.-

I. 서 론

치아우식은 전 세계 모든 나라와 민족에 보편적으로 존재하는 만성 질환으로 숙주저항, 식이습관, 구강위생, 구강내 상주균의 구성 등의 영향을 받게되고 이러한 다양한 요인들의 복합적인 반응에 의하여 야기된다고 알려져 있다^{1,13)}. 치아우식의 발병기전에 대해서 Margolis 등²⁸⁾은 치아우식의 과정은 단순한 탈회 과정이 아니고 치태에서 만들어진 유기산이 법랑질의 소공을 통하여 확산되는 과정에서 표면층의 용해와 무기질 침착이 동시에 일어나 국소적인 평형관계가 유지되면 유기산이 thermodynamic driving force에 의하여 내부로 더욱 확산되어 하부 법랑질이 용해되고, 이 용해 산물이 다시 역확산되어 표층부에 무기질 침전을 일으키는 복잡한 현상이라고 설명하였다. Margolis 등^{28,29)}과 Moreno 등³²⁾에 의하면 치아우식에 영향을 미치는 인자로 pH 이외에 용액의 포화도가 중요한 요소가 되는데, 치아가 담긴 완충용액이 저포화 상태일 경우 치아에서 무기질이 빠져나가서 탈회가 일어나게 되고 빠져나간 용액의 칼슘, 인 이온이 dicalcium phosphate dihydrate(DCPD)의 형태로 침착이 일어나 표면하층을 형성한다고 하였다.

초기 법랑질 우식의 임상적인 특징인 백색반점은 조직병리학적으로는 탈회된 표층하병소 위에 비교적 건전한 표면층으로 이루어져 있다는 것이 밝혀졌으며 특히 Silverstone³⁷⁾은 편광현미경을 사용하여 초기 법랑질 우식을 표면층, 병소본체, 암층, 투명층 4가지 층으로 구분하였고, 표면층과 암층은 재광화의 결과로, 병소본체와 투명층은 탈회의 결과로 형성된다고 보고하였다.

법랑질은 고도로 광화된 조직으로 96% 무기질, 1% 유기질, 3% 수분으로 구성되어 있으며 무기질은 칼슘과 인을 주성분으로 하는 수산화인회석 (Hydroxyapatite), DCPD, tricalcium phosphate, octacalcium phosphate 등 여러 가지 복합체로 구성되어 있는데, 이중 가장 안정되고 산에 대해 저항성이 큰 것은 수산화인회석 형태이다. 수산화인회석 c축의 횡단면에서 수산화인회석 결정은 중앙 부위에 검은 선을 가지면서 늘어진 육각형의 외형을 갖으며, 8.17 Å 간격으로 존재하는 격자무늬의 세 세트는 60° 각도로 교차함으로써 $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ 로 구성된 수산화인회석 결정은 마름모 형태로 쌓이는 구조를 띤다. 원자 수준에서 수산화인회석 결정의 구조는 calcium triangle channels 안에 OH가 위치하기 때문에 매우 특이하며 이들 channel은 OH⁻, F⁻, Cl⁻, HCO₃⁻가 쉽게 확산할 수 있는 통로를 제공한다. 우식이 발생할 경우 칼슘과 인의 결합이 깨어지게 되어 입자의 변화가 나타나게 되는데, Holmen 등²²⁾은 인공우식 초기에 수산화인회석 결정에 부분적인 용해가 일어나고 그 결과 입자 사이의 공간이 증가하며 이 공간을 통해 무기질 이온이 이동할 수 있다고 보고하였다. Hayashi²⁰⁾는

고해상도 투과전자현미경을 이용한 연구에서 우식 발생 시 입자 변연부가 소실되고, 동시에 수산화인회석 입자의 중앙에서 용해가 일어나 중앙부 천공이 일어나게 된다고 주장하였다.

재광화는 부분적으로 용해된 결정에 칼슘과 인 이온 등이 부착되어 성장하는 과정으로 무기질 소실과 획득에 균형을 유지하기 위한 중요한 자연적인 치유 현상으로 인지되고 있다. Head²¹⁾에 의해 산부식된 법랑질의 재광화 현상이 최초로 보고되었는데 타액 내에 담가둔 치아가 더 단단해졌으며 이는 타액내의 성분인 carbon dioxide 때문이라고 제시하였다. 이후 1965년 Backer⁶⁾은 8세 아동에서 백색반점이 타액의 재광화 능력으로 1년 후 50% 정도 사라짐을 관찰하여 처음으로 임상적인 재광화의 증거를 제시하였다.

Takaaki 등^{43,44)}은 투과전자현미경을 이용하여 법랑질 인공우식에서 법랑질 결정의 재광화는 세 가지 형태 중의 하나로 일어난다고 보고하였다. 첫째는 부분적으로 용해된 결정들이 회복되거나, 둘째는 주로 표층하병소의 확장된 intercrystalline space에서 발견되는 새로 형성된 결정, 셋째는 남아있는 결정들의 성장이다.

법랑질 인공우식을 재광화시키는데 불소를 첨가하면 재광화가 증진되고 기간도 단축된다는 보고는 있으나 불소의 유무 및 정확한 농도에 대해서는 아직까지 논란중이며 불소를 이용한 재광화의 난점은 불소의 확산이 표면에 제한적이라는 데 있다. 병소 외부에서 국소적으로 불소의 농도가 높아지면 불화인회석의 직접적인 침착이 일어나게 되어 결과적으로 깊은 부위에서 불소가 침투하지 못하여 농도가 감소되면서 불화인회석의 침착이 감소하게 되며 또한 수산화인회석의 전구체 형성도 느려지게 되어 완전한 재광화가 어렵게 되는 것이다.

법랑질 인공우식을 유발하고 불소를 첨가한 상태에서 재광화를 유도하였던 이전의 실험^{52,58)}들은 편광현미경을 사용하여 표면층 폭의 증가와 함께 병소본체 폭의 감소가 동시에 일어났다는 정량적인 평가는 많이 하였으나 불소를 첨가하지 않은 상태에서는 재광화가 일어났다는 연구는 부족하였고, 표면층과 병소본체에서 결정들이 어떻게 변화하는지에 대한 연구는 거의 없었다. 또한 상아질에 인공우식을 유발하고 재광화를 유도한 이전의 실험^{53,56,59)}들은 수산화인회석 결정의 변화를 주사전자현미경이나 원자현미경을 사용하여 관찰한 바 있으나 법랑질의 수산화인회석 결정의 변화에 대해서는 원자현미경을 이용한 입자 변화에 대한 관찰이 미비하였다.

이에 본 연구에서는 유산 완충용액의 pH 및 포화도를 달리하여 법랑질 탈회 및 재광화 시 수산화인회석 결정의 변화를 원자현미경 (AFM, Atomic force microscopy)과 주사전자현미경 (SEM, Scanning electron microscopy)을 이용하여 비교 관찰하고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 시편제작

발치 후 30일 이내의 백색반점이나 법랑질 결손이 없는 건전한 소구치와 대구치를 선택하여 치면에 부착된 연조직과 치석을 periodontal curette으로 제거하고 불소가 포함되지 않은 pumice로 치면을 연마한 다음 초음파 세척기로 10분간 세정하고 증류수로 세척, 건조하였다.

건조된 치아는 5 ml용 시린지를 이용하여 높이 1 cm, 직경 1 cm의 tube를 만들고 치과용 아크릴 레진을 이용하여 치근 부위만 매몰하고 경화 후 저속 diamond wheel saw (Minitom, Struers, Denmark)를 사용하여 치관과 치근 부위가 2 mm가 노출되는 상태로 치아를 절단하였다. 치관 가운데 협설측 부위에 손상이나 균열이 없는 가로 5 mm, 세로 3 mm 정도의 window를 형성하고 나머지 부위는 내산성의 nail varnish를 2회 도포하였다.

2. Stock 용액의 제조

30% 유산용액 (Sigma Co., 분자량 90.09, 밀도 1.080)을 이용하여 1M의 유산용액을 제조하였고, 염화칼슘분말 (Sigma Co., St. Louis., U.S.A. 분자량 147.0)을 이용하여 0.3M의 용액을 제조하였다. 그리고 인산칼륨분말 (Sigma Co., St. Louis., U.S.A. 분자량 136.1)을 이용하여 0.9M의 용액을 제조한 다음 각각의 용액을 정량분석한 결과 1.075M, 0.282M, 0.911M 임을 확인하였다.

3. 탈회 완충용액의 제조

Stock 용액을 이용하여 탈회용액을 제조한 후 3.08 mm NaN_3 를 첨가한 다음 8N 수산화칼륨 표준용액으로 pH meter (Model 920A, Orion Research Inc., U.S.A.) 계측하에 pH 4.3이 되도록 조절하였다. 위의 용액을 ion

chromatography (790 Personal Ion Chromatography, Metrohm, Switzerland)를 이용하여 다시 정량 분석하여 이를 시편의 탈회 용액으로 사용하였다 (Table 1).

4. 재광화 완충용액의 제조

stock용액을 이용하여 pH와 포화도가 다른 총 7개의 재광화 용액을 제조한 후 3.08 mm NaN_3 를 첨가한 다음 8N 수산화칼륨 표준용액으로 pH meter 계측하에, pH 4.3, 5.0, 5.5, 6.0이 되도록 조절하였다. 위의 용액을 ion chromatography로 정량 분석한 다음 재광화 용액으로 이용하였다 (Table 2).

5. 법랑질 인공우식의 형성

50 cc 플라스틱 통에 30 cc가 되도록 Table 1의 탈회 완충용액을 채우고 용액에 시편이 잠기도록 설치한 후 25℃ 항온조에 2일간 유지시켰다. 2일 경과 후 완충용액에서 꺼낸 치아를 증류수에 세척 후 건조 보관 후 표면에 백색반점이 일어난 것 중 탈회 상태를 관찰할 것은 window의 중앙을 치아 장축에 평행하게 저속 diamond wheel saw를 사용하여 indentation을 준 후 osteotome과 mallet을 이용하여 파절시켰다.

6. 법랑질 인공우식의 재광화

파절시키고 남은 치관에서 파절된 면을 nail varnish를 2회 도포한 후 각 군당 10개의 시편을 50cc 플라스틱 통에 Table 2의 재광화 완충용액을 30cc 채우고 우식이 형성된 시편을 용액에 잠기도록 설치한 후 25℃ 항온조에 10일 간 유지시켰다. 이때 용액은 2일 간격으로 교체하였다. 10일 후 재광화를 관찰하기 위해서 window의 중앙을 치아 장축에 평행하게 저속 diamond wheel saw를 사용하여

Table 1. Initial composition of the demineralization solution

| Composition | Concentration |
|------------------------|---------------|
| Lactic acid (M) | 0.1 |
| Ca^{2+} (M) | 0.0142 |
| PO_4^{3-} (M) | 0.0092 |
| NaN_3 (M) | 0.00308 |
| pH | 4.3 |
| Degree of saturation | 0.150 |

Table 2. Initial composition of the remineralization solution

| Composition | Group | | | | | | |
|-----------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Lactic acid (M) | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| Ca ²⁺ (M) | 0.0275 | 0.0295 | 0.0395 | 0.0473 | 0.0093 | 0.0033 | 0.001 |
| PO ₄ ³⁻ (M) | 0.0093 | 0.0120 | 0.0166 | 0.0199 | 0.0036 | 0.0017 | 0.0008 |
| NaN ₃ (M) | 0.00308 | 0.00308 | 0.00308 | 0.00308 | 0.00308 | 0.00308 | 0.00308 |
| pH | 4.3 | 4.3 | 4.3 | 4.3 | 5.0 | 5.5 | 6.0 |
| D. S.* | 0.212 | 0.239 | 0.301 | 0.355 | 0.288 | 0.304 | 0.289 |

* : Degree of saturation

indentation을 준 후 osteotome과 mallet을 이용하여 파절시켰다. 2개의 파절 시편에서 하나는 주사전자현미경 관찰을 위해, 나머지 시편은 원자현미경 관찰을 위하여 아래의 과정을 시행하였다.

7. 주사전자현미경 관찰

재광화 시키고 파절시킨 시편을 초음파 세척기로 세척하고 24시간 건조시켜 정상 법랑질 시편, 탈회시편, 재광화 시편을 aluminum stubs에 고정시킨 후 진공상태에서 도금처리하여 주사전자현미경 (Hitachi, S-800, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

8. 원자현미경 관찰

파절된 탈회 및 재광화 시편을 1 cm × 1 cm tube에 파절된 면이 위로 노출되도록 아크릴 레진을 이용하여 매몰하고 경화시킨 후 절단된 면을 #1000, #1500, #2000 사포를 이용하여 연마하고, 1 μm, 0.5 μm, 0.3 μm, 0.1 μm의 lapping film (3M)으로 각각 3분씩 순서대로 연마 후 초음파 세척기로 세척하고 건조하였다. 준비된 시편을 원자현미경 (Autoprobe CP-Research, Veeco, U.S.A.)에 고정하고 여기에 연결된 5 μm piezoelectric scanner를 이용하여 정상조직과 탈회조직 그리고 재광화 층을 구별하여 각각의 상을 스캐닝하였다.

III. 실험결과

1. 주사전자현미경 관찰

1) 정상 법랑질 소견

수산화인회석 결정의 크기는 대개 30 - 60 nm 정도이며 90 nm 이상인 것도 관찰되었고 결정들이 서로 뭉쳐 있었다.

개개의 결정 모양은 정육각형과 늘어진 육각형을 띠고 있었다 (Figure 1).

2) 법랑질 인공우식 소견

표면층에서 수산화인회석 결정은 공간 없이 치밀하게 배열되어 있으나 병소본체에서는 입자의 크기가 20 - 40 nm 정도로 정상적인 크기에 비해 다소 작았으며 무기질이 용해되어 형성된 작은 틈새가 표면에서부터 20 μm 지점부터 보이기 시작하여 30 μm 지점에서는 입자 사이의 공간이 더 증가된 양상을 보였다(Figure 2B의 화살표). 50 μm 지점에서 결정은 다시 정상적인 입자의 크기로 관찰되었으며 전체 결정 모양은 정상 결정의 모양과 유사하였다 (Figure 2).

3) 각 실험군의 재광화 소견

① 1군

표면층에서의 결정은 크기가 작고 치밀하였으며 병소본체 상부 (표면에서부터 10 - 20 μm 지점)에서는 입자 덩어리 사이에 틈새가 관찰되었으며 (Figure 3A) 30 μm 이후로는 공간이 줄어드는 양상과 10 - 20 nm 크기의 작은 결정들이 군데군데 융합된 더 커진 입자로 관찰되었다 (Figure 3B의 화살표).

② 2군

표면층과 병소본체에서의 재광화 양상은 전체적으로 1군과 유사하나 30 μm 지점에서는 일부 시편에서 중앙 천공된 입자가 관찰되기도 하며 (Figure 4B의 화살표), 또한 결정 사이의 틈새가 채워지지 않고 빈 공간으로 보이며 또 일부 결정이 합쳐져서 뭉쳐있는 결정들도 관찰되었다 (Figure 4).

③ 3군

1군, 2군의 관찰 결과와 매우 다른 양상을 보이는데 표면층에서부터 10 - 30 nm 크기의 아주 작은 결정들이 모여 병소본체까지 큰 cluster를 형성하고 있었으며 (Figure 5A의

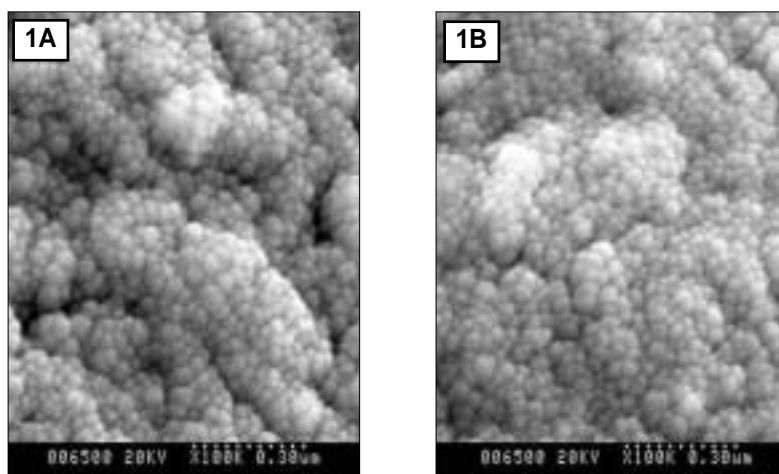


Figure 1. SEM micrograph of normal enamel.

A and B are shown at 10 μm and 30 μm area from the surface layer, respectively ($\times 100,000$).

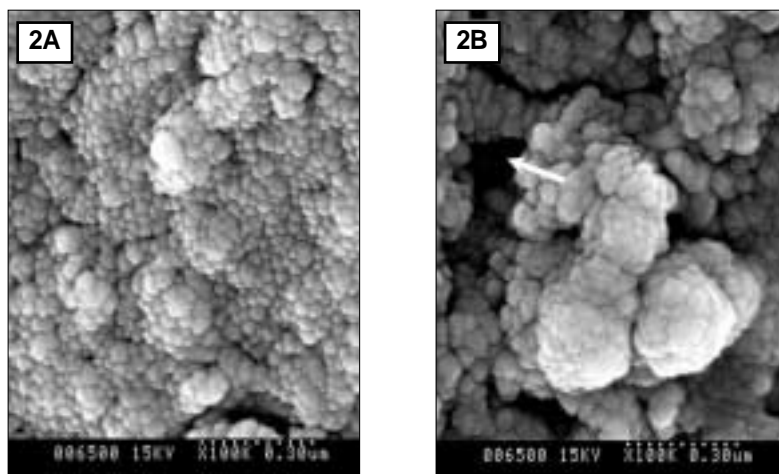


Figure 2. SEM micrograph of demineralized enamel.

A and B are shown at 10 μm and 30 μm area from the surface layer, respectively ($\times 100,000$).

The white arrow indicates intercrystalline spaces dissolved by demineralization process.

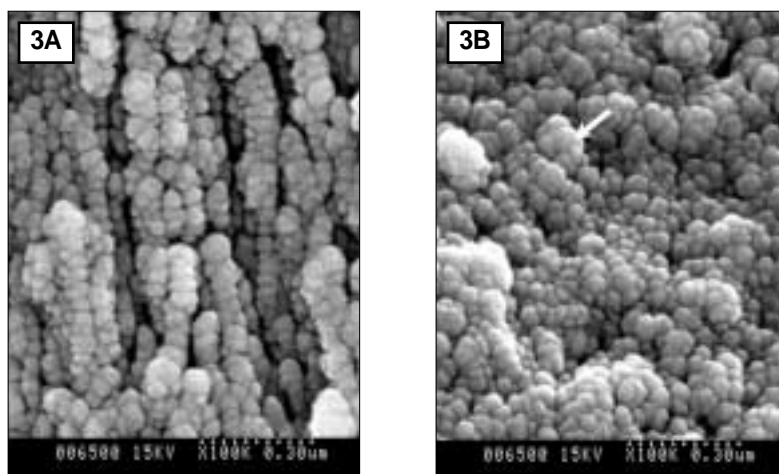


Figure 3. SEM micrograph of remineralized enamel of group 1.

A and B are shown at 10 μm and 30 μm area from the surface layer, respectively ($\times 100,000$).

The white arrow indicates the combined crystals.

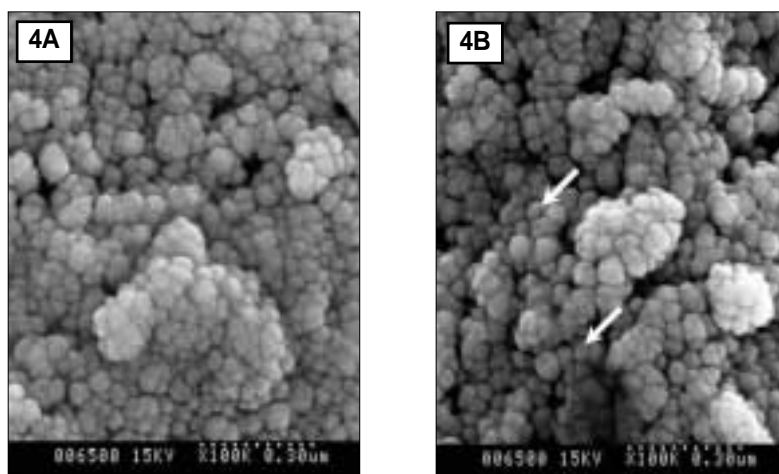


Figure 4. SEM micrograph of remineralized enamel of group 2.

A and B are shown at 10 μm and 30 μm area from the surface layer, respectively ($\times 100,000$).
The white arrow indicates crystals with central defects.

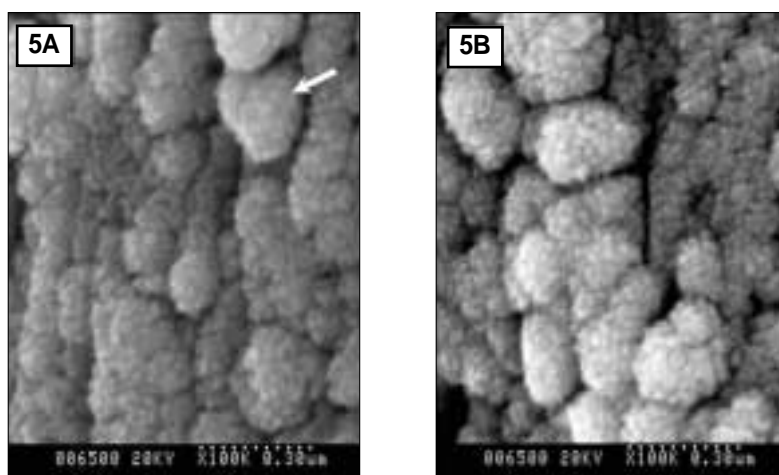


Figure 5. SEM micrograph of remineralized enamel of group 3.

A and B are shown at 10 μm and 30 μm area from the surface layer, respectively ($\times 100,000$).
The white arrow indicates a large cluster built as a result of the growth of newly formed crystals.

화살표), 표면층에서는 이것이 치밀한 반면 병소본체에서는 cluster와 cluster 사이로 빈 공간이 관찰되었다. cluster의 외형은 비교적 명확하며 이에 반해 cluster를 구성하고 있는 개개의 결정들은 불분명한 윤곽을 가지고 있었다 (Figure 5).

④ 4군

표면층에서부터 병소본체까지 입자들이 모여 cluster를 이루고 있는 것은 3군의 재광화 소견과 유사하나 cluster를 구성하고 있는 결정들은 3군보다는 30 - 45 nm의 큰 입자

들로 구성되어 있었으며 병소본체 하부까지 cluster들이 치밀하게 분포되어 있었다 (Figure 6).

⑤ 5군 및 6군

표면층에서는 15 - 30 nm 크기의 작은 결정들이 빼곡하게 분포되어 있었고, 병소본체에서는 이보다 큰 40 - 50 nm 크기의 입자들이 전반적으로 치밀하게 분포되어 있었으나 3군, 4군과는 달리 입자들이 뭉쳐서 큰 cluster를 형성하기 보다는 개개의 결정들이 뚜렷한 외형을 가지며 펼쳐져 있는 양상으로 관찰되었다 (Figure 7 & 8).

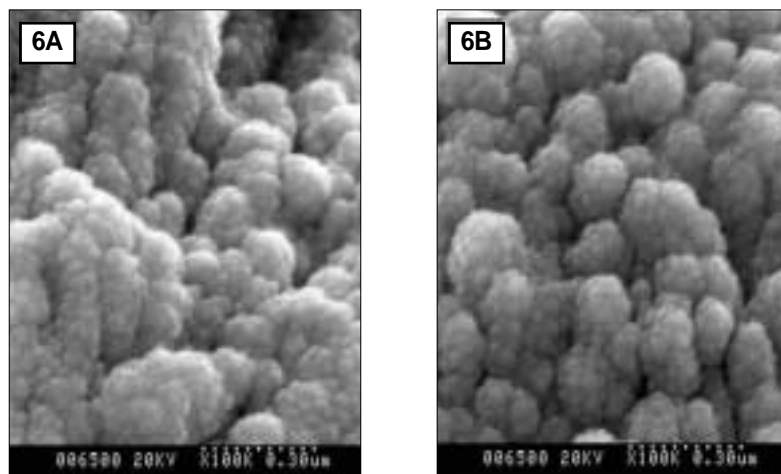


Figure 6. SEM micrograph of remineralized enamel of group 4.
A and B are shown 10 μm and 30 μm area from the surface layer respectively ($\times 100,000$).

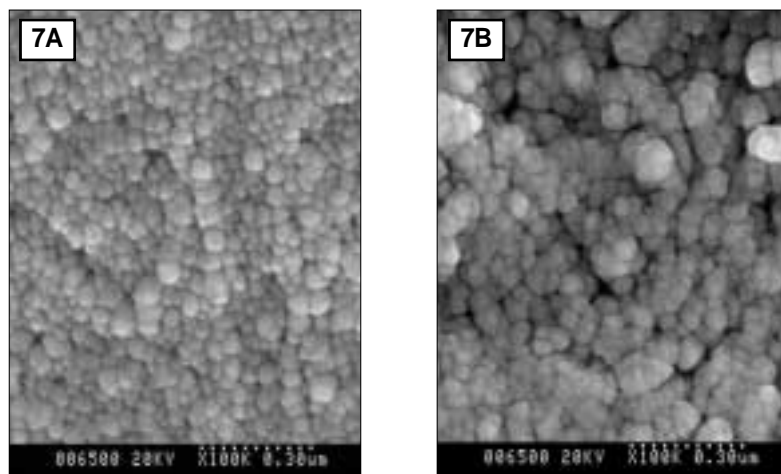


Figure 7. SEM micrograph of remineralized enamel of group 5.
A and B are shown at 10 μm and 30 μm area from the surface layer, respectively ($\times 100,000$).

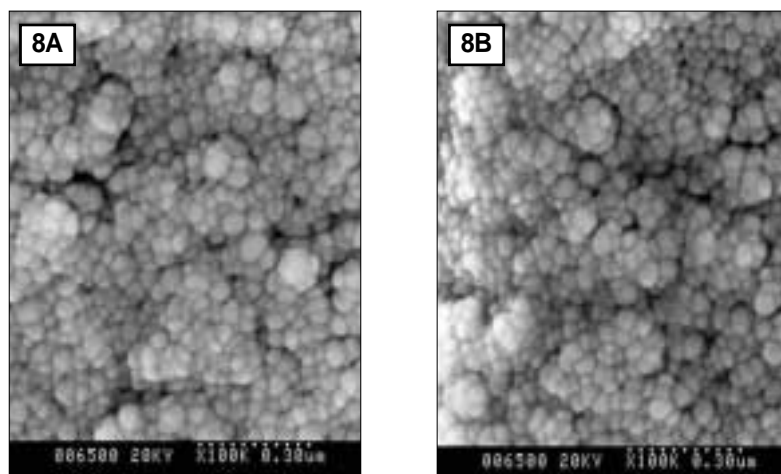


Figure 8. SEM micrograph of remineralized enamel of group 6.
A and B are shown 10 μm and 30 μm area from the surface layer, respectively ($\times 100,000$).

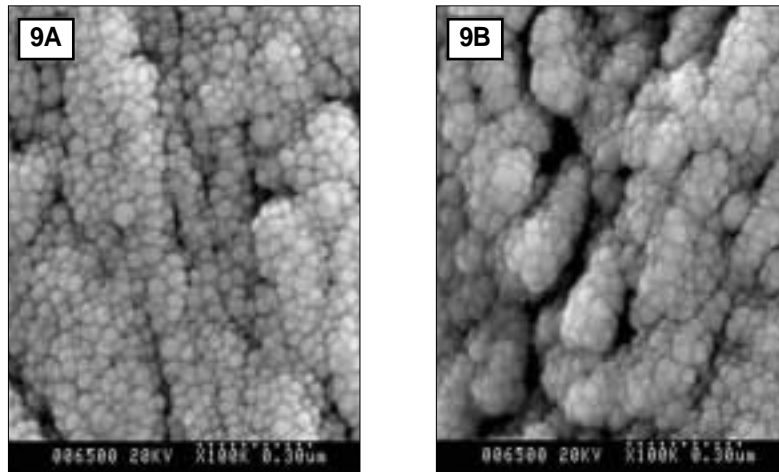


Figure 9. SEM micrograph of remineralized enamel of group 7.
A and B are shown 10 μm and 30 μm area from the surface layer, respectively ($\times 100,000$).

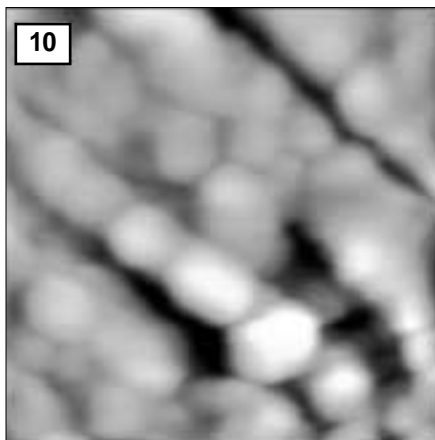


Figure 10. AFM image of hydroxyapatite crystals of normal enamel (1.0 $\mu\text{m} \times 1.0 \mu\text{m}$).

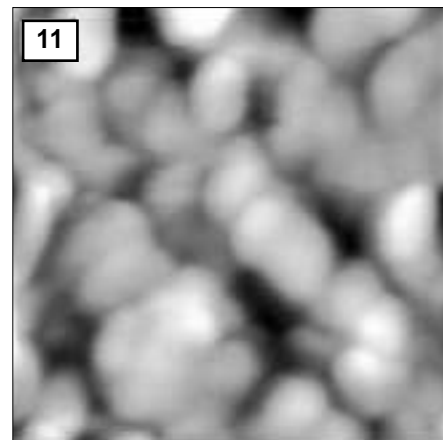


Figure 11. AFM image of hydroxyapatite crystals of demineralized enamel (1.0 $\mu\text{m} \times 1.0 \mu\text{m}$).

⑥ 7군

표면층에서는 입자들이 모여 3, 4군과 비슷하게 cluster를 형성하였으나 그 정도는 작았으며 cluster와 cluster 사이는 빈 공간 없이 배열되었고 병소본체에서는 50 μm 지점까지는 cluster 사이의 공간이 회복되지 않았다. 표면층에 비하여 심부로 갈수록 수산화인회석 크기는 거의 정상에 가까웠다.

2. 원자현미경 관찰

1) 정상 법랑질 소견

정상 법랑질에서의 수산화인회석 결정은 결정 사이의 공

간이 거의 없고 입자들이 치밀하게 열을 이루며 배열되었고 입자 사이의 경계는 명확하였다. 결정의 모양은 육각형과 둥근 모서리를 갖는 육각형의 모습으로 관찰되었다 (Figure 10).

2) 법랑질 인공우식 소견

수산화인회석 결정 입자 간의 경계가 불명확하고 정상적인 수산화인회석 결정보다 크기가 작았으며 결정 사이의 공간이 증가하는 양상으로 관찰되었다. 결정의 모양은 정상에 비하여 둥근 각을 갖는 육각형 및 타원형을 띠고 있었다 (Figure 11).

3) 재광화 소견

재광화 양상은 결정들이 융합하여 정상보다 큰 결정이 형성된 것이 보이며 그 주위로 새로 만들어진 작은 결정들이 침착되어 있었다. 융합하여 커진 결정들은 둥근 모서리를 갖는 육각형에서부터 무정형의 경계가 모호한 불규칙한 결정들까지 다양하게 나타났다. 새로 형성된 결정들은 법랑질 우식 부위 전체에 걸쳐 보이며 주로 탈회된 표층하병소의 intercrystalline space에서 보이고 원래의 결정 크기보다 항상 작고 모양은 오각형에서 다소 둥근 결정과 함께 다소 둥근 모양의 작은 결정들이 intercrystalline space에 침착되어 있으며 새로 형성된 일부 작은 결정들은 큰 결정 표면에 붙어 있는 것도 관찰되었다 (Figure 13).

4군의 일부 시편에서는 경계가 명확하지 않은 불규칙한 모양의 큰 결정들과 탈회 시 형성된 빈 공간에 일부 작은 결정들이 새로 형성되어 있는 것이 보였으며 이 작은 결정들은 큰 결정 표면에 붙어있기도 하였으며 일부는 작은 결정끼리 붙어 있는 것도 확인되었다 (Figure 14).

6군에서 입자들의 모양은 둥근 모습보다는 명확한 모서리를 갖는 육각형을 나타내고 있었으며 정상적인 결정의 크기와 함께 작은 결정들이 빈 공간을 채우고 있는 것이 관찰되

었고 40 μm 지점으로 갈수록 이 결정들이 열을 이루는 성향이 강하였다 (Figure 15).

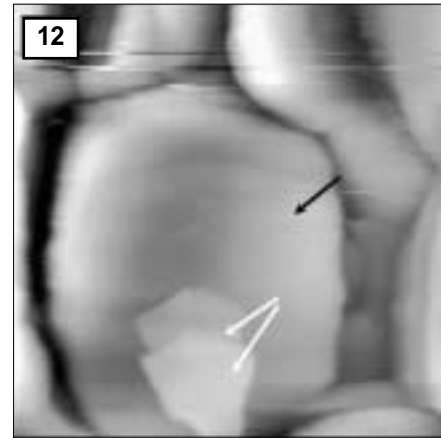


Figure 12. AFM image of hydroxyapatite crystals of the remineralized enamel of group 1 at 30 μm area from the surface layer (1.0 μm \times 1.0 μm). The black arrow indicates a large crystal formed as a result of the growth of pre-existing or newly formed crystals. The white arrow indicates newly formed small crystals.

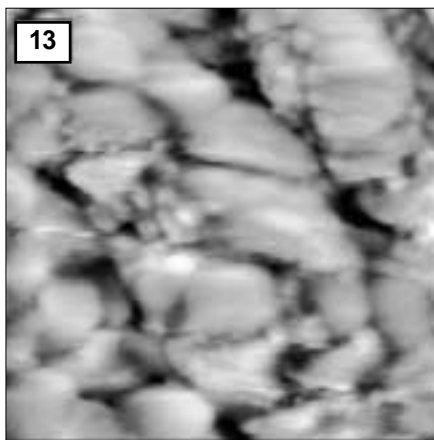


Figure 13. AFM image of hydroxyapatite crystals of remineralized enamel of group 2 at 30 μm area from the surface layer (0.5 μm \times 0.5 μm).

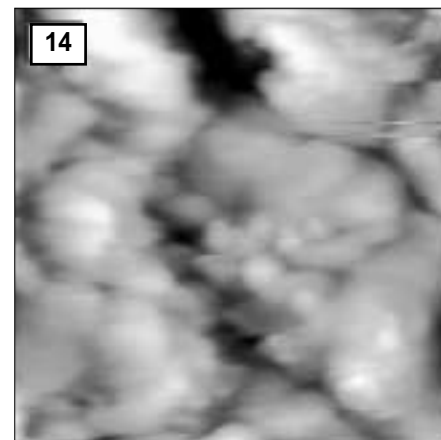


Figure 14. AFM image of hydroxyapatite crystals of remineralized enamel of group 4 at 30 μm area from the surface layer (1.0 μm \times 1.0 μm).

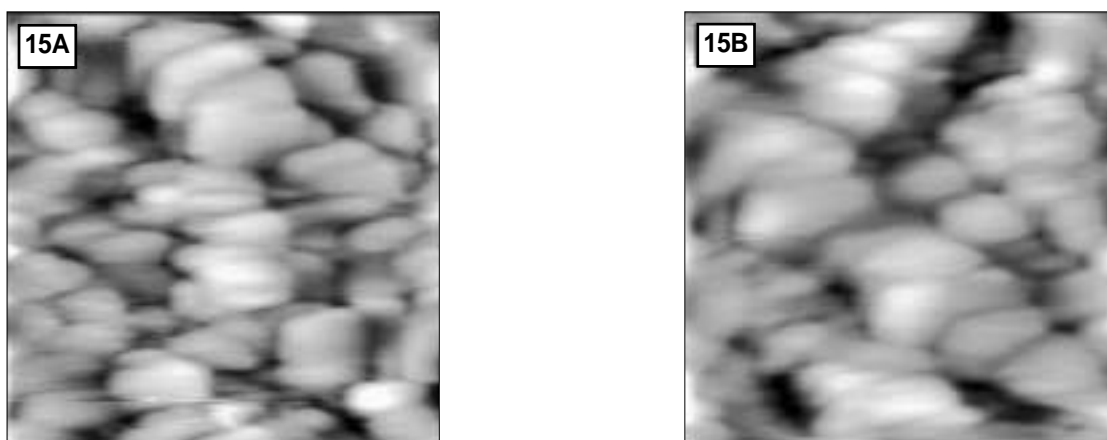


Figure 15. AFM image of hydroxyapatite crystals of remineralized enamel of group 6. A and B are 30 μm and 40 μm area from the surface layer, respectively (1.0 $\mu\text{m} \times 1.0 \mu\text{m}$).

IV. 총괄 및 고찰

초기 법랑질 우식이 회복될 수 있다는 것이 많은 연구에서 밝혀진 이후로 임상적으로 눈에 보이지 않거나 감지할 수 없는 우식이라도 탈회 한 방향으로 일어나는 과정이라기보다는 탈회와 재광화가 수없이 반복되는 과정으로 인식되고 있다. 초기 법랑질 우식의 재광화에 대한 연구는 주로 재광화 기전을 밝히는데 지난 20 - 30년간 행하여져 왔고 구강 내에서 치아-피막-치태-타액의 계면에서 일어나는 탈회와 재광화의 동적인 측면 또한 많이 보고되었다.

구강내에서 재광화를 유도했을 때 법랑질 결정이 유기물 질로 둘러 싸여 반응할 수 있는 표면적이 적고, 외부의 용액으로부터 이온 확산의 속도가 느려 재광화가 제한되고, 법랑질 결정이 수산화인회석 이외에 서로 다른 조성의 인회석으로 구성되어 Ca/P의 물비가 다양하며, 치태 세균과 같은 침전 방해인자가 존재하기 때문에 인공우식병소의 재광화 실험보다 복잡하고, 오래 걸리는 단점이 있다. 반면에 실험실에서의 재광화 연구는 병소를 비교적 규격화하여 재현함으로써 변이를 최소화할 수 있고 어느 정도 넓은 병소를 형성할 수 있어 여러 가지 실험조건을 얻을 수 있다는 장점이 있어 본 연구에서는 Moreno 등³²⁾이 제안하고 이⁵⁷⁾가 사용한 acid buffer system을 적용하여 법랑질 인공우식을 유발하고 재광화를 유도하였다.

본 연구에서는 이⁵⁷⁾, 박⁵⁴⁾ 등의 실험을 참고하여 인공 우식 부위에서 와동 (cavitation)의 형성 없이 법랑질에서 표면하층이 관찰되면서 우식이 가장 잘 일어날 수 있는 pH 4.3을 선택하여 2일 동안 탈회를 유도한 후 법랑질 표면에서부터 50 μm 지점까지 결정 변화를 관찰하였는데 이는 금등⁵¹⁾의 실험에서 1일 탈회 시는 22 μm , 2일 탈회 시는 평균적으로 40 μm 까지 탈회가 일어났다는 결과를 기초로 시행

하였다.

또한 표면층의 두께에 대해서 이전 연구^{51,54)}에서 8 - 10 μm 로 보고된 바, 본 연구에서는 표면층 두께를 10 μm 로 설정하고 표면층과 병소본체에서의 수산화인회석 결정의 변화를 관찰하고자 하였다.

표면층이 생기는 이유를 설명하는 몇 가지 가설^{2,5,19)}이 있으나 Shellis³⁵⁾는 치아의 solubility behavior가 부위에 따라 다른 것을 주목하여 설명하기도 하였는데, 외부 법랑질의 solubility product는 10-58이며, 내부 법랑질은 10-56, prismatic junction은 10-55이어서 내부 법랑질과 prismatic junction 부위가 더 잘 용해된다고 하였다.

법랑질 인공우식 병소에 대한 원자현미경과 주사전자현미경 관찰에서 수산화인회석 결정은 정상보다 그 크기가 감소하고 입자들이 무질서하게 배열되어 있으며 결정 사이에 빈 공간이 관찰되는 소견을 확인할 수 있었다. 이 빈 공간에 대하여 Arends 등⁴⁾은 초기 우식 병소의 표면을 주사전자현미경으로 관찰하였을 때 저배율에서는 탈회시킨 군과 정상 결정 구조에 큰 차이가 없다고 하였으나, 고배율에서 표면에 porosity가 보인다고 하였다. Frank¹⁵⁾도 주사전자현미경을 사용하여 초기 법랑질 우식을 관찰한 결과 법랑질 표면에서부터 표층하병소까지 확장된 prism sheath 및 prism junction이 관찰된다고 보고하였으며, 또한 투과전자현미경으로 관찰 시에는 초기 무기질 용해는 prism과 interprismatic substance의 계면을 따라 일어난다고 하였다. 탈회가 진행되면 수산화인회석 입자 자체의 용해가 완전히 일어나기 전에 입자 사이에 공간이 형성되면서 이온의 이동이 일어나고 이 공간이 법랑질 표면에서부터 병소본체까지 연결되어 우식 표면하층 형성의 통로로 이용된다고 하였던 이전의 Haikel¹⁸⁾의 주장을 다시 확인할 수 있었다.

Warshawsky 등⁵⁰⁾은 수산화인회석 결정의 투과전자현미

경 상에서 나타나는 중앙부가 천공된 상은 시편의 절단과정 중 절단면이 중앙에 함몰된 부위를 지나가서 얻게 되는 결과라고 주장하였다. 하지만 Hayashi²⁰⁾는 투과전자현미경으로 탈회가 일어난 부위에서 수산화인회석 결정을 관찰하였을 때 표층에는 주로 변연부 소실이 일어나고 표층하병소에서는 결정의 종단면에서 중앙부위가 먼저 용해되어 중앙 천공이 일어난다고 보고하였다.

본 연구에서도 Hayashi 등이 관찰하였던 것과 유사한 형태로 병소본체에서 중앙 부위의 결함이 있는 수산화인회석 결정을 관찰할 수 있었는데 Johnson²⁴⁾에 의하면 중앙 부위는 처음에 형성된 carbonate-rich domain에 해당되어 탈회가 일어나는 동안 수소 이온의 공격에 취약하기 때문에 중앙 부위가 먼저 녹는 것이라 설명하였다.

Silverstone³⁷⁾은 편광현미경을 사용하여 초기 법랑질 우식을 표면층, 병소본체, 암층, 투명층 4가지 층으로 구분하였고, 표면층과 암층은 재광화의 결과로, 병소본체와 투명층은 탈회의 결과로 형성된다고 여겼으며 인공적으로 유도한 초기 법랑질 우식 병소를 주사전자현미경으로 관찰 시 정상적인 수산화인회석 결정의 직경은 40 nm이며 표면층에서는 40 - 80 nm, 병소본체에서는 10 - 30 nm, 암층에서는 50 - 100 nm이며 100 nm를 초과하는 결정도 보인다고 하였다. 또한 암층에 존재하는 결정이 더 둥글고 넓은 반면에 투명층의 결정은 길고 얇으며 병소본체의 결정은 투명층에 발견되는 결정과 유사하나 크기가 10 - 30 nm로 더 작다고 보고하였다. 본 연구에서 측정된 병소본체에서 입자의 직경은 20 - 40 nm으로 Silverstone 등이 측정된 값과 비슷하나 표면층에서의 입자 직경은 Silverstone 등이 관찰한 것에 비해서 30 - 40 nm으로 다소 차이가 발생하였다. 결정의 모양은 표면층에서부터 병소본체까지 약간 둥글면서 육각형내지는 늘어진 육각형을 나타내었는데 Silverstone이 보고한 길고 얇은 모양과는 차이가 났다.

본 실험은 법랑질 인공우식의 재광화에 미치는 여러 요인 중 유산의 농도를 0.1 M로 일정하게 하고 동일한 pH에서 포화도를 달리한 경우와 비슷한 포화도에서 pH를 달리하여 pH와 포화도의 영향을 평가하고자 하였다. 탈회에 대한 pH의 역할에 대해서는 일반적인 동의가 있으나 재광화에 있어서는 많은 논란의 여지가 있다. Gerdin¹⁷⁾과 Koch²⁵⁾ 등은 250 ppm의 불소를 포함하는 pH 5.5의 산성 치약이 1000 ppm의 불소를 포함하는 중성 치약에 비해 상대적으로 효과가 있음을 보고하였고, Lammers 등²⁷⁾은 법랑질의 재광화에 있어서 산성 용액보다는 낮은 농도 (0.03 ppm)의 불소를 포함한 중성 용액의 효과가 크며, 다소 높은 불소 (0.3, 1.0 ppm)를 포함한 완충용액에서 pH 효과는 차이가 없다고 보고하였다. Featherstone 등¹⁴⁾은 재광화에 있어 적당한 pH는 무기질 침착이 가능하며 법랑질의 용해가 일어나지 않는 pH 6 - 8이 적당하다고 하였고, Feagin 등¹²⁾

에 의하면 재광화 완충용액의 pH 증가와 재광화 사이에는 비례적 상관관계가 있다고 보고하였다. 따라서 위의 보고와 김 등⁵²⁾의 실험에서 중성에 가까운 pH에서 재광화를 유발하였을 때는 무기질 침착이 표층부위에 국한되어 일어났기 때문에 본 연구에서는 재광화 완충용액의 pH를 4.3, 5.0, 5.5, 6.0으로 설정하였다.

이전의 박 등⁵⁵⁾의 실험에서는 pH를 4.3으로 일정하게 하고 용액의 포화도를 0.268에서 0.390으로 달리하여 법랑질 재광화를 유도하였을 때 침착되는 무기질의 양을 micro-radiograph으로 분석한 결과 포화도가 증가함에 따라 침착되는 무기질의 양은 증가하나 통계적 유의차는 없으며 포화도가 가장 높은 군에서는 표층 가까운 쪽에 침착된다고 보고하였다. Margolis와 Moreno 등²⁹⁾은 동역학적인 기전에 근거하여 완충용액의 포화도를 thermodynamic solubility product constant에 대한 calcium phosphate의 ionic activity의 비로 정의하였으며 따라서 법랑질에 대한 포화도는 $[Ca^{2+}]^5[OH^-][PO_4^{3-}]^3/KE$ 이고 KE는 법랑질의 solubility product constant로서 5.5×10^{-55} 이라고 하였다. 또 Brown 등⁷⁾과 Varughese 등⁴⁹⁾은 calcium apatite의 용해와 결정 성장에 대한 *in vitro* 실험에서 탈회 혹은 재광화를 유발하는 driving force는 pH보다는 용액의 포화도라 하였으며 법랑질 탈회율을 결정하는데 있어 pH보다는 탈회 용액의 포화도가 더 중요하다고 보고한 Gao 등¹⁶⁾의 결과와도 일치한다고 하였다.

본 연구는 정량적인 연구는 아니어서 침착되는 무기질 양을 평가하지는 않았으나 입자의 변화로 추정한 결과 박 등⁵⁵⁾의 실험 결과가 본 연구에서도 일부 확인되었다. 재광화 후 주사전자현미경 관찰에서 1군과 2군은 건전한 표면층을 가지며 표면층에서부터 병소본체 심부에서도 새로운 결정이 형성되고 결정들이 치밀하게 분포되어 있는 모습과 일부는 약간 뭉쳐있는 모습이 확인되었다. 그러나 2군의 일부 시편에서는 중앙 천공된 입자가 완전히 치유되지 않은 모습도 관찰되었다. 이에 반해 3군과 4군은 표면층에서부터 병소본체까지 새로운 작은 입자들이 형성되어 큰 cluster를 이루고 있으며 표면층에서는 이것이 매우 밀집되어 분포되어 있었다. 3군과 4군의 재광화 양상의 차이는 3군의 병소본체 하방에서는 이 cluster 사이에 빈 공간이 존재하는 것이 관찰되나 4군에서는 cluster와 cluster 사이에 빈 공간이 없이 병소본체 하방까지 밀도 있는 모습이 관찰되었다. 동일한 pH에서 포화도가 더 높은 3군, 4군이 1군, 2군에 비하여 표면층에서 작은 결정들이 침착되어 뚜렷하게 성장한 모습을 보이나 3군에서는 표면층에 침착된 무기질이 심부로 무기질 침투를 방해하여 심부까지 완전한 재광화가 일어나지 않았다고 유추할 수 있으며 4군은 본 실험군에서 포화도가 가장 높는데 pH의 효과가 더 크게 작용하여 심부까지 재광화가 일어난 것으로 생각된다.

5군과 6군은 비슷한 재광화 양상을 보이는데 표면층은 15 - 30 mm 크기의 작은 결정들이, 병소본체에서는 이보다 큰 40 - 50 mm 크기의 입자들이 전반적으로 치밀하게 분포되어 있고 3군, 4군과는 다르게 입자들이 뭉쳐서 큰 cluster를 형성하는 정도는 훨씬 미약하며 결정들이 뚜렷한 외형을 가지며 매우 밀집되어 있었다. 7군은 5군, 6군에 비하여 cluster를 형성하는 정도가 컸으며 표면층에서는 입자들이 빈 공간 없이 배열되어 있으나 병소본체에서는 탈회에 의하여 형성된 입자 사이 공간이 회복되지 않고 일부 존재하는 것으로 확인되었다. 비슷한 포화도에서는 pH가 낮은 5군, 6군이 7군에 비하여 병소본체 심부까지 재광화가 더 일어난 것은 7군은 pH가 6.0으로 본 실험에서 가장 높으나 포화도 또한 높아서 표층에 침착된 무기질이 심부의 무기질 침투를 방해하여 심부까지 완전한 재광화가 일어나지 않았다고 추론할 수 있다. 이는 재광화 완충용액의 driving force가 너무 높으면 표면에 빨리 침착되어 표면부 pore를 막아 병소본체의 치유가 불완전해진다고 보고한 Pearce 등³⁴⁾의 결과와도 일치한다.

재광화 용액의 무기질 농도도 법랑질 인공우식의 재광화에 영향을 미치는 요인이다. Exterkate 등¹¹⁾은 동일한 포화도에서 Ca 및 P 이온의 농도를 변화시켜 대조군인 1.5 mm Ca + 0.9 mm PO₄, 실험군인 0.3 mm Ca + 11 mm PO₄, 4 mm Ca + 0.25 mm PO₄의 서로 다른 3가지 재광화 용액을 사용하여 bovine 치아를 대상으로 탈회된 법랑질이 얼마나 재광화되는지를 integrated mineral loss를 측정하여 평가한 결과 재광화 1주일 후 대조군이 실험군보다 무기질 침착이 빨리 일어났으며, 칼슘이나 인의 농도가 낮은 경우 재광화가 천천히 일어난다고 보고하였다. 또한 Silverstone 등⁴¹⁾은 칼슘의 농도가 1 mm과 3 mm인 두 가지 재광화 용액을 사용하였을 때 병소본체의 면적 감소율은 3 mm 칼슘 용액에서는 20%이나 1 mm 칼슘 용액에서는 69%라고 하였으며 무기질 증가율은 3 mm 칼슘용액에서는 17%, 1 mm 칼슘용액에서는 40%여서 저농도의 칼슘 용액의 재광화 효과가 더 좋았으며 1 ppm의 불소 첨가시 재광화 효과는 더 증진된다고 보고하였다.

재광화에 있어 불소의 첨가 유무 및 적절한 농도에 대해서도 많은 논란이 있어왔다. 불소 첨가 시 fluoroapatite의 형성에 의하여 유기산에 대한 용해저항성이 증가된다는 사실에는 견해가 일치하나⁴⁶⁾ 법랑질 우식병소의 재광화에 필요한 적절한 불소 농도에 대해서도 여러 주장이 존재한다. 한 등⁵⁸⁾은 법랑질 재광화에 불소농도가 미치는 영향을 평가한 실험에서 1, 2, 4 ppm 중 2 ppm에서 심부까지 불소가 침착되어 재광화가 일어난 것을 보고하였고, Lammers 등²⁶⁾은 2 ppm 불소 첨가시 fluoroapatite의 표면 침착에 의해 무기질의 심부 이동이 차단되어 불소가 없는 경우보다 재석회화가 억제됨을 보고하였다. Varughese 등⁴⁹⁾은 0.1 - 2

ppm 불소농도에서 부분적으로 불화된 수산화인회석의 결정 성장이 촉진된다고 하였다. 최근에는 sub-ppm 수준의 불소에 대해서 많은 연구를 해오고 있으며 0 - 0.06 ppm의 불소가 존재하는 pH 순환 모델에 법랑질을 노출시키면 전반적으로 재광화가 일어나는 쪽으로 움직인다고 보고하였다^{23,47)}.

이에 본 연구에서는 불소의 효과를 배제한 상태에서 칼슘과 인 이온의 농도만을 달리하여 법랑질 인공우식병소의 재광화에 어떠한 영향을 미치는 지 관찰한 결과 불소가 없는 상황에서도 재광화가 일어난 것을 확인할 수 있었으나 10 일동안 재광화를 유도하였지만 일부 탈회된 소견이 보여 그 반응이 느리다는 것을 추론할 수 있다.

재광화에 소요되는 시간은 연구자마다 실험방법에 따라 많은 논란이 있다. Silverstone 등⁴¹⁾은 재광화 용액을 사용하여 법랑질 우식에 대하여 재광화 효과를 실험한 결과 처음 4일간 주된 변화가 일어나고 10일 이후에는 더 이상 일어나지 않음을 보고하였으며 Buskes 등⁸⁾은 bovine 치아에서 재광화에 소요되는 시간은 360 시간이 적당하다고 하였다. de Rooij와 Nancollas¹⁰⁾는 재광화 시 칼슘과 인의 흡수가 초기에는 급격히 일어나다가 10 - 15시간 이후에는 정체된다고 보고하였으며 불소를 함유한 이전의 실험 연구에서도 처음 4일간 재광화가 주로 일어나며 이후 느린 속도로 계속 진행되는 것을 관찰하여 본 실험에서는 재광화 기간을 10일로 설정하였고 충분한 용액의 공급을 위하여 용액을 2 일마다 교체하였다.

원자현미경 상에서 재광화 양상은 결정들이 융합하여 정상보다 큰 결정이 형성된 것이 보이며 그 주위로 새로 만들어진 작은 결정들이 침착되어 있었다. 융합하여 커진 결정들은 둥근 모서리를 갖는 육각형에서부터 무정형의 불규칙한 결정들로 다양하게 나타났다. Thoda⁴⁸⁾와 Takaaki⁴⁴⁾의 고해상도 투과전자현미경을 이용한 연구에서 결정들의 성장은 원래의 결정들이 융합하거나, 기존의 결정과 새로 형성된 결정들이 융합되거나, 새로 형성된 결정들끼리 융합되어 더 커진 결정을 이룬다고 보고하였으며 법랑질 우식에서 남아있는 결정은 건전한 법랑질 결정보다 더 두껍고 더 넓다고 보고하였다. 본 연구에서는 입자의 표면만을 관찰하였기에 입자의 크기는 측정할 수 있었으나 두께는 측정할 수 없었다.

새로 형성된 결정은 법랑질 우식부위 전체에 걸쳐 보이며 주로 탈회된 표층하 병소의 intercrystalline space에서 보이고 원래의 결정 크기보다 항상 작고 고해상도 투과전자현미경을 이용한 연구에서는 새로 형성된 작은 결정의 모양은 명확한 각을 갖는 정육각형 및 육각형을 띠는다고 보고한 것과는 다르게 모양은 오각형에서 다소 둥근 모양으로 큰 결정에 붙어 있거나, 홀로 존재하거나 일부 작은 결정끼리 붙어 있는 모습으로 전반적으로 빈 공간을 채워나가는 형태로

관찰되었다. 본 연구에서 사용된 유산 완충용액의 pH가 4.3, 5.0, 5.5, 6.0이어서 일반적으로 산성용액에서는 DCPD가 수산화인회석보다 더 안정적인 구조이며 중성용액에서는 octacalcium phosphate에 대하여 포화되어 있어 새로 형성된 결정은 DCPD 및 octacalcium phosphate으로 여겨지며 만약 불소가 존재하였다면 fluoroapatite 형성도 유추해 볼 수 있을 것이다. 새로 형성된 결정이 DCPD 및 octacalcium phosphate임을 확인하기 위해서는 추가적으로 electron-probe 분석 및 X-ray diffraction 분석을 통한 정성적인 분석이 필요하다고 여겨진다. 부분적으로 탈회된 결정들이 회복되는 소견은 원자현미경 관찰 및 주사전자현미경 관찰에서 확인할 수 없었고 앞으로 이 부분에 대한 연구가 더 필요하다고 여겨진다.

주사전자현미경은 한 개의 결정 수준에서 법랑질 용해 기전을 이해하는 데 크게 기여하며³⁶⁾ 병소가 형성되고 재광화가 이루어지는 동안 결정의 크기, 모양, 배열의 변화에 대한 정보를 제공한다. 그러나 Takuma 등⁴⁵⁾은 주사전자현미경은 결정의 형태에 있어서 pyrophosphate, 아연, 이산화탄소 같은 순수하지 않은 이온이 결정의 형태를 변화시키고 잘못된 해석을 하게 되므로 주의해야 한다고 보고하였다. 또한 Arends 등⁴⁾은 시료의 처리과정에서 인공결손부가 발생할 수 있으며 도말층의 제거를 위한 산 처리 과정에서 다공성이 증가할 수 있는 문제점이 있음을 보고하였다. 본 실험에서는 주사전자현미경으로 관찰을 할 경우는 연마시편의 문제점을 해결하기 위하여 osteotome과 mallet을 사용하여 치아를 파절시키고 초음파 세척을 함으로써 도말층이 형성되지 않도록 유의하였다.

원자현미경은 1986년에 개발되었고, 1982년에 개발된 주사탐침현미경 (SPM : Scanning Probe Microscopy)의 일종으로 원자는 그 크기 (0.1 - 0.5 nm)가 너무 작아서 어떠한 현미경으로도 볼 수 없다는 기존의 통념이 주사탐침현미경의 등장으로 바뀌게 되었으며, 그 배율은 수천만 배까지 가능하며 3D 입체영상도 가능하게 되었다. 액체 상태에서도 관찰 가능하며 시료의 전처리가 없는 큰 장점을 가지고 있으며, 또한 현미경의 역할만이 아닌 원자 및 분자의 특성 관찰, 유전자 조작, Nanoindent, Heating system 등의 개발로 원자현미경과 접목된 새로운 차원의 현미경 기능이 추가되어 수년 전부터 세계적으로 통칭하여 주사탐침현미경으로 불리운다. 원자현미경은 laser beam과 photo detector sensor가 부착된 microfabricated tip이 기계에 지렛대 (cantilever)식으로 고정되어 있으며, 이 탐침의 끝을 시료 표면에 근접시키면 시료 표면의 원자와 탐침 사이에 끌어당기는 힘 또는 밀어 내는 여러 가지 힘이 작용하는데 이 힘에 의해 지렛대의 휨이 발생하고 그 휨은 정도를 레이저 광의 굴절을 통해서 표면의 3차원 이미지를 얻는 초정밀 장치이다. 원하는 측정 영역을 지정하면 날카로운 탐침

이 시료의 표면에 10-8 N의 힘을 가하면서 표면을 레이저로 scanning하고 이 결과를 detector가 받아들여 상을 나타나게 된다. 일반적으로 측정할 수 있는 영역의 해상도는 탐침의 반지름에 해당하는 크기로 보통 10 nm이고 수직적으로는 0.1 nm까지 측정이 가능하다. 원자현미경에서 일반적으로 사용되는 측정방식으로는 contact mode, non-contact mode, tapping mode가 있으며, contact mode 기술은 해상도는 좋으나 연질의 시료에서는 시료 표면에 흠을 주는 문제점을 가지고 있다. Non contact 모드는 Van der Waals Forces의 인력을 이용하며 시료 표면에 대하여 비접촉 상태에서 탐침이 움직이는 것으로 시료 표면에 흠을 주지는 않으나 시료와 탐침의 간격이 너무 멀어서 선명한 이미지를 얻기 어렵다. Tapping mode는 이러한 contact mode와 non-contact mode의 단점을 보완한 방법으로서 탐침에 일정한 진동을 주어 시료를 손상시키지 않으면서 표면 높이 차가 큰 시료나 손상되기 쉬운 시료 등에서 contact mode와 같은 해상력을 주면서 시료에는 전혀 손상을 주지 않는 장점을 갖는다.

본 연구에서는 contact mode를 사용하여 이미지를 관찰하였는데 non contact mode에 비하여 선명한 상을 얻을 수 있었으나, 시편에 미세하게 튀어나온 것이 있을 경우 탐침이 급혀 선명한 상을 얻지 못하는 경우도 있었다. 이러한 점을 고려하면 앞으로 tapping mode를 사용하여 추가적인 연구가 필요하다고 여겨진다. 치아가 탈회되거나 재광화될 때 나타나는 미세구조의 변화를 주사전자현미경이나, 투과전자현미경을 이용하여 관찰하는 경우 이러한 방법들은 시편의 물리적, 화학적 처리과정과 diamond-cutting knife를 이용한 절단과정 등을 거쳐야 하는데 비해, 원자현미경을 이용하는 경우는 시편의 복잡한 처리과정을 거치지 않고서도 수산화인회석 입자의 미세구조를 관찰하는 것이 가능하다. 하지만 원자현미경에서는 매우 고배율로 상을 관찰하므로 동일한 영역을 다시 관찰하는 것이 매우 어려우며, 또한 곡면에서는 상이 흐려질 가능성이 높기 때문에 넓은 영역을 관찰할 시에는 한계점이 있으므로 이는 앞으로 해결하여야 할 문제로 보인다.

V. 결 론

탈회나 균열이 없는 소구치 및 대구치를 대상으로 탈회 완충용액을 이용하여 법랑질을 2일간 탈회시키고, pH와 포화도가 상이한 7가지 유산 완충용액으로 10일 동안 재광화를 유도한 후 치아를 파절시켜 수산화인회석 결정의 변화를 원자현미경과 주사전자현미경을 이용하여 비교 관찰하고 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 탈회된 부위의 수산화인회석 결정은 정상적인 수산화인회석 결정보다 크기가 작았으며 결정 사이의 공간이

증가하면서 결정들이 불규칙하게 존재하는 것이 관찰되었다.

2. 재광화된 부위는 탈회에 의하여 형성된 빈 공간에 작은 수산화인회석 결정이 새로 침착되는 양상과 결정들이 융합하여 다양한 모습을 갖는 더 커진 결정들을 관찰할 수 있었다.
3. 동일한 pH에서 포화도가 더 높은 3군, 4군은 1군, 2군에 비하여 표면층에서부터 병소본체까지 작은 결정들이 모여 큰 cluster를 형성하였으며 특히 4군에서는 병소본체까지 완전한 재광화가 일어났다. 비슷한 포화도에서는 pH가 더 낮은 5군, 6군은 7군에 비하여 병소본체까지 재광화가 일어났으며 3군, 4군처럼 결정들이 모여 cluster를 형성하기보다는 개개의 입자들이 뚜렷한 외형을 가지며 매우 치밀하게 분포되어 있었다.

참고문헌

1. Aoba T. Solubility properties of human tooth mineral and pathogenesis of dental caries. *Oral Diseases* 10:249-257, 2004.
2. Aoba T, Moriwaki Y, Doi Y, Okazaki M, Takahasi J, Yagi T. The intact surface layer in natural enamel caries and acid dissolved hydroxyapatite pellets. *J Oral Pathol* 10:32-39, 1981.
3. Applebaum E. Incipient dental caries. *J Dent Res* 12:619-627, 1932.
4. Arends J, Jongebloed W, Ogaard B, Rolla G. SEM and microradiographic investigation of initial enamel caries. *Scand J Dent Res* 95:193-201, 1987.
5. Arends J, Ten Cate JM. Tooth enamel remineralization. *J Crystal Growth* 53:135-147, 1981.
6. Backer D. Post-eruptive changes in dental enamel. *J Dent Res* 9:396-402, 1965.
7. Brown WE, Chow LC. Thermodynamics of apatite crystal growth and dissolution. *J Crystal Growth* 53:31-41, 1981.
8. Bruskes JA, Christoffersen J, Arends J. Lesion formation and lesion remineralization in enamel under constant composition condition. *Caries Res* 19:490-496, 1985.
9. Darling AI. Studies of the Early Lesion of Enamel Caries with Transmitted Light, Polarized Light and Microradiography. Its nature, mode of spread, points of entry and its relation to enamel structure. *Br Dent J* 105:119-135, 1958.
10. de Rooij JF, Nancollas GH. The formation and remineralization of artificial white spot lesions : a constant composition approach. *J Dent Res* 63(6):864-867, 1984.
11. Exterkate RAM, Damen JJM, Ten Cate JM. A single-section model for enamel de- and remineralization studies. 1. The effects of different Ca/P ratios in remineralization solutions. *J Dent Res* 72(12):1599-1603, 1993.
12. Feagin F, Patel PR, Koulourides T, Pigman W. Study of the effect of calcium, phosphate, fluoride and hydrogen ion concentrations on the remineralization of partially demineralized human and bovine enamel surfaces. *Arch Oral Biol* 16:535-548, 1971.
13. Featherstone JDB. The continuum of dental caries. - Evidence for a dynamic disease process. *J Dent Res* 83(Spec Iss C):C39-C42, 2004.
14. Featherstone JDB, Mellberg JR. Relative rates of progress of artificial carious lesion in bovine, ovine and human enamel. *Caries Res* 15:109-114, 1981.
15. Frank RM. Structural events in the caries process in enamel, cementum, and dentin. *J Dent Res* 69 (Spec Iss):559-566, 1990.
16. Gao XJ, Elliott JC, Anderson P. Scanning and contact microradiographic study of the effect of degree of saturation on the rate of enamel demineralization. *J Dent Res* 70:1332-1337, 1991.
17. Gerdin PO. Studies in dentifrice. Clinical testing of an acidulated, nongrinding dentifrice with reduced fluoride contents. *Sven Tandl Tidsskr* 67(5):283-297, 1974.
18. Haikel Y, Frank RM, Voegel LC. Scanning electron microscopy of the human enamel surface layer of incipient carious lesions. *Caries Res* 17:1-13, 1983.
19. Hallsworth AS, Weather JA, Robinson C. Loss of carbonate during the first stages of enamel caries. *Caries Res* 7:345-348, 1973.
20. Hayashi Y. High resolution electron microscopy of enamel crystallite demineralized by initial dental caries. *Scanning Microscopy* 9:199-206, 1995.
21. Head JA. A study of saliva and its action on tooth enamel in reference to its hardening and softening. *J Am Med Assoc* 59:2118-2122, 1912.
22. Holmen L, Thylstrup A, Featherstone JDB, Fredebo L, Shariati M. A scanning electron microscopic study of surface changes during development of artificial caries. *Caries Res* 19:11-21, 1985.
23. Jacobson APM, Strang R, Stephen KW. Effect of low fluoride levels in de/remineralising solutions of a pH-cycling model. *Caries Res* 25:230-231, 1991.
24. Johnson NW. Some aspects of the ultrastructure of early human caries seen with the electron microscope. *Arch Oral Biol* 12:1505-1521, 1967.
25. Koch G, Petersson LG, Kling E. Effect of 250 and 1000ppm fluoride dentifrice on caries. A three-year clinical study. *Swed Dent J* 6(6):233-238, 1982.
26. Lammers PC, Borggreven JM, Driessens FC. Influence of fluoride on *in vitro* remineralization of artificial sub-surface lesions determined with a sandwich technique. *Caries Res* 24:81-85, 1990.
27. Lammers PC, Borggreven JM, Driessens FC. Influence of fluoride and pH on *in vitro* remineralization of bovine enamel. *Caries Res* 26:8-13, 1992.
28. Margolis HC, Moreno EC. Kinetics and thermodynamic aspect of enamel demineralization. *Caries Res* 19:22-35, 1985.
29. Margolis HC, Moreno EC. Physicochemical perspective on the cariostatic mechanism of systemic and topical fluorides. *J Dent Res* 69 (Spec. Iss):606-613, 1990.
30. Margolis HC, Zang YP, Lee CY, Kent RL, Moreno EC. Kinetics of enamel demineralization *in vitro*. *J Dent Res* 78(7):1326-1335, 1999.
31. Moreno EC, Margolis HC. Composition of human plaque fluid. *J Dent Res* 67:1181-1189, 1988.
32. Moreno EC, Zahradnik RT. Chemistry of enamel sub-surface demineralization *in vitro*. *J Dent Res* 53(2):226-235, 1974.
33. Nancollas GH. Enamel apatite nucleation and crystal growth. *J Dent Res* 58(B):861-869, 1979.

34. Pearce EI, Larsen MJ, Cutress TW. Studies on the influence of fluoride on the equilibrating calcium phosphate phase at a high enamel/acid ratio. *Caries Res* 29:258-265, 1995.
35. Shellis RP. A scanning electron-microscopic study of solubility variations in human enamel and dentine. *Arch Oral Biol* 41:473-495, 1996.
36. Shellis RP, Hallsworth AS. The use of scanning electron microscopy in studying enamel caries. *Scanning Microsc* 1(3):1109-1123, 1987.
37. Silverstone LM. The surface zone in caries and in caries-like lesions produced *in vitro*. *Br Dent J* 20:145-157, 1968.
38. Silverstone LM. The structure of carious enamel including the early lesions. *Oral Sci Rev* 4:100-160, 1973.
39. Silverstone LM. The significance of remineralization in caries prevention. *J Can Dent Assoc* 50:157-167, 1984.
40. Silverstone LM, Hicks MJ, Featherstone MJ. Dynamic factors affecting lesion initiation and progression in human dental enamel. 1. The dynamic nature of enamel caries. *Quint Int* 19:683-710, 1988.
41. Silverstone LM, Wefel JS, Zimmerman BF, Clarkson BH, Featherstone MJ. Remineralization phenomena. *Caries Res* 11:59-84, 1977.
42. Silverstone LM, Wefel JS, Zimmerman BF, Clarkson BH, Featherstone MJ. Remineralization of Natural and Artificial Lesions in Human Dental Enamel *in vitro*. Effect of calcium concentration of the calcifying fluid. *Caries Res* 15:138-157, 1981.
43. Takaaki Y. Crystalline structure of enamel in carious lesion. *J Jpn Dent Ass* 46:1167-1176, 1997.
44. Takaaki Y, Yasuo M. High-resolution electron microscopy of enamel-crystal demineralization and remineralization in carious lesions. *J Electron Microsc* 52(6):605-613, 2003.
45. Takuma S, Ogiwara H, Suzuki H. Electron-probe and electron microscope studies of carious dentinal lesions with a remineralized surface layer. *Caries Res* 9(4):278-285, 1975.
46. Ten Cate JM. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. *Caries Res* 16:201-210, 1982.
47. Ten Cate JM. Review on fluoride, with special emphasis on calcium fluoride mechanism in caries prevention. *Eur J Oral Sci* 105:461-465, 1997.
48. Tohda H, Yangisawa T, Takana N, Takuma S. Growth and fusion of apatite crystals in the remineralized enamel. *J Electron Microsc* 39:238-244, 1990.
49. Varughese K, Moreno EC. Crystal growth of calcium apatite in dilute solutions containing fluoride. *Calcif Tissue Int* 33:431-439, 1981.
50. Warshawsky H, Nancy A. Stereo electron microscopy of enamel crystallites. *J Dent Res* 61:1504-1514, 1982.
51. 금기연, 이찬영. 수종의 유기산이 법랑질 인공우식의 형성에 미치는 영향. *대한치과보존학회지* 21:470-488, 1996.
52. 김민경, 금기연, 이찬영. 법랑질 인공우식의 재광화에 미치는 pH의 영향에 관한 연구. *대한치과보존학회지* 22:193-208, 1997.
53. 김성철, 이찬영. 재광화 완충용액의 pH 변화가 상아질의 재광화에 미치는 영향. 박사학위논문, 연세대학교 대학원, 서울, 2005.
54. 박성호, 이찬영, 이정석. 유산완충액을 이용한 인공치아우식의 형성에 미치는 산의 농도와 pH에 관한 연구. *대한치과보존학회지* 18:277-290, 1993.
55. 박정원, 허복, 이찬영. 유기산 완충용액의 포화도가 법랑질 및 상아질의 재광화에 미치는 영향과 수산화인회석의 AFM 관찰. *대한치과보존학회지* 25:459-473, 2000.
56. 오현석, 이찬영. 산 완충용액의 pH 및 유산의 농도가 인공치근우식의 형성에 미치는 영향. 박사학위논문, 연세대학교 대학원, 서울, 2005.
57. 이찬영. 산 완충용액을 이용한 인공치아우식 형성. 연세치대논문집 7:34-41, 1992.
58. 한원섭, 금기연, 이찬영. 인공치아우식의 재광화에 미치는 불소의 영향. *대한치과보존학회지* 21:161-173, 1996.
59. 한원섭, 이찬영. 유기산 완충용액의 불소농도가 상아질의 재광화에 영향. 박사학위논문, 연세대학교 대학원, 서울, 2004.

국문초록

유산 완충용액의 pH 및 포화도 변화에 따른 법랑질 내 수산화인회석 결정 형태의 변화

전영의 · 정일영 · 노병덕 · 이찬영*

연세대학교 대학원 치의학과 치과보존학교실

법랑질 초기 우식이 회복된다는 것이 보고된 이래 법랑질에 대하여 불소를 첨가한 상태에서 행했던 이전의 연구들은 법랑질 인공우식의 재광화가 표면층의 증가와 함께 병소본체의 폭 감소가 일어난다는 정량적인 평가는 많이 하였으나 불소를 첨가하지 않은 상태에서는 재광화가 일어났다는 연구는 부족하였고, 또 수산화인회석 결정의 입자 변화에 대한 관찰도 미비하였다.

본 연구는 탈회나 균열이 없는 소구치 및 대구치를 대상으로 탈회 완충용액을 이용하여 법랑질을 2일간 탈회시키고, pH와 포화도가 상이한 7가지 유산 완충용액으로 10일 동안 재광화를 유도한 후 치아를 파절시켜 수산화인회석 결정의 변화를 원자현미경과 주사전자현미경을 이용하여 정성적으로 비교 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 탈회된 부위에서 관찰된 수산화인회석 결정은 정상적인 수산화인회석 결정보다 크기가 작았으며 결정 사이의 공간이 증가하면서 결정들이 불규칙하게 존재하는 것이 관찰되었다.
2. 재광화된 부위에서는 탈회에 의하여 형성된 빈 공간에 작은 수산화인회석 결정이 새로 침착되는 양상과 결정들이 융합하여 다양한 모습을 갖는 더 커진 결정들을 관찰할 수 있었다.
3. 동일한 pH에서 포화도가 더 높은 3군, 4군은 1군, 2군에 비하여 표면층에서부터 병소본체까지 작은 결정들이 모여 큰 cluster를 형성하였으며 특히 4군에서는 병소본체까지 완전한 재광화가 일어났다. 비슷한 포화도에서는 pH가 더 낮은 5군, 6군은 7군에 비하여 병소본체까지 재광화가 일어났으며 3군, 4군처럼 결정들이 모여 cluster를 형성하기보다는 개개의 입자들이 뚜렷한 외형을 가지며 매우 치밀하게 분포되어 있었다.

주요어: 법랑질, 재광화, pH, 포화도, 원자현미경, 주사전자현미경