

공초점 레이저 주사 현미경을 이용한 법랑질 초기 우식 재광화의 정량적 분석

차승우 · 윤태철 · 박성호 · 이찬영 · 금기연
연세대학교 치과대학 치과보존학교실

ABSTRACT

QUANTITATIVE ANALYSIS OF MINERAL CHANGE IN THE INITIAL CARIOUS LESION USING CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPY

Seung-Woo Cha, Tai-Cheol Yoon, Sung-Ho Park, Chan-Young Lee, Kee-Yon Kum.
Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Yonsei University

Dental Caries which has high prevalence rate, accounts for majority of dental diseases. Many treatment and preventive treatment has been developed, thereby reducing the prevalence rate, but in our country, fluoridization has not spread widely yet, so prevention has not been done satisfactorily.

When dental caries progresses, irreversible damage of tooth structure occurs. In initial dental caries, demineralized tooth structure can be remineralized, so restorative treatment is unnecessary.

In this study, 20 teeth restored with composite resin without fluoride release were used and divided into two groups. Incipient dental caries were artificially made and remineralization procedure was done for 1 and 2 weeks, for each group. Changes in mineral contents around the margins were analysed with confocal laser scanning microscope.

The results were as follow.

1. Both total fluorescence of the lesion and average fluorescence of the lesion of remineralized samples decreased compared to demineralized state. ($p < 0.01$)
2. Confocal laser scanning microscopy can be used in quantitative analysis of mineral change.

In result, confocal laser scanning microscopy can be used in quantitative analysis of mineral change and it could be used in many different fields of dentistry in the future.

Key words : Confocal laser scanning microscopy, Demineralization, Remineralization, Initial dental caries

I. 서 론

치아 우식증은 어린이에서부터 성인에 이르기까지 높은 이환률을 가지는 질병으로서, 그동안 이에 대한 여러 가지 치료방법 및 예방법들이 개발되어 그 발병률이 다소 감소하였으나 우리나라의 경우 상수도 불소화등 예방책들이 적극적으로 행해지지 않아 치과 질환의 상당 부분을 차지하고 있다^{39,46)}.

치아 우식증은 치질의 파괴를 동반하는 감염성 질환으로서 치태 내 세균, 음식물, 타액의 상호작용에 의해 유발되는 다인성 질환이다. 치태 내 세균이 음식물을 분해하여 생성된 유기산이 치질을 탈회시키게 되고, 이 때 용해된 무기질은 타액 내 용해되어 있는 무기질과 상호 작용을 하면서 우식이 진행되게 된다³⁴⁾.

정상적인 구강내 환경에서 치아의 무기질은 지속적인 상실과 재침착을 되풀이하면서 항상성을 유지하고 있다. 따라

* 이 연구는 한국과학재단 특정기초연구비(98-0304-14-01-3)의 지원을 받아 이루어진 논문임.

서 이러한 무기질 교환의 평형을 유지시켜줌으로써 치아의 건강을 유지하고 치아 우식을 예방할 수 있다. 그러나 일단 구강내 환경의 평형이 깨어진 상태가 지속되면 치질 내의 기질이 파괴되어 비가역적인 치질의 손실을 가져오게 되므로 우식을 초기에 발견하는 것이 중요하다.

초기 우식이 진행된 경우에는 표면 법랑질 주변의 환경을 무기질에 대해 과포화 상태를 유지시켜줌으로써 재광화를 유도하려는 시도가 이루어지고 있다^{8,13,30}. Chow 등³⁰에 의하면 고농도의 calcium과 phosphate 용액을 이용한 재광화 과정에서 Ca^{2+} 이 병소 내로 효과적으로 확산되기 위해서는 calcium 용액이 phosphate 용액보다 염기성이어야 한다고 보고하였고, 한 등⁵⁰과 Heilman 등^{24,25}은 불소의 농도에 따른 재광화 효과의 차이를 보고한 바 있다. 그러나, 이러한 재광화 술식은 아직 임상적으로 적용되어지지 못하고 있으며 정성적인 연구와 함께 정량적인 분석을 통한 체계화가 요구되고 있다.

치아에서의 무기질 함량 변화를 정량적으로 분석하는 방법에는 transversal microradiography(TMR)가 대표적으로 이용되어져 왔으나, 얇은 치아 시편(100 μ m)을 제작해야 하며, 방사선 조사를 요하는 단점이 있다.

최근 여러 생명공학 분야에서 각광을 받고 있는 공초점 레이저 주사 현미경(confocal laser scanning microscopy)은 이러한 얇은 시편 제작이나 방사선 조사 없이 보다 쉽고 빠르게 무기질의 함량 변화를 정량적으로 측정할 수 있다.

Gonzalez와 Fontana 등^{17,21}은 법랑질의 탈회와 재광화된 정도를 microradiography와 공초점 레이저 주사 현미경으로 동시에 관찰하여 두 측정 방법간의 연관성을 조사한 결과, microradiography에서 얻은 ΔZ 와 공초점 레이저 주사 현미경에서 얻은 area of the fluorescent lesion, total fluorescence of the lesion, average fluorescence of the lesion이 유의하게 일치하는 결과를 보임을 밝힌 바 있다.

이 연구의 목적은 레진 수복물 변연부 법랑질의 초기 우식 병소의 재광화에 따른 무기질의 변화를 공초점 레이저 주사 현미경을 사용하여 정량적으로 비교 평가 해보는 것이다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 광중합 복합레진 수복

발거된 영구치 중 우식이나 탈회가 일어나지 않은 치아 20개를 선택하여, 불소가 함유되지 않은 pumice를 사용해서 치면을 연마하여 치면에 침착된 debris 나 불소 등을 제거함으로써 개체간의 차이를 가능한 최소화하도록 하였다. 세척한 치아의 협측 중앙 부위에 #330 bur를 사용하여 3mm×2mm×2mm(가로×세로×깊이) 크기의 와동을 형

성하고, 37% 인산으로 15초간 산부식한 후 10초간 세척한 다음, 제조자의 지시에 따라 Prime & Bond NT (Dentsply, USA)와 Spectrum(Dentsply, USA)을 이용하여 수복하였다. 그 다음 fine grit diamond bur로 finishing하고, white stone, white rubber로 세마하였다.

2. 실험 용액의 제조

1) Stock 용액의 제조

30% lactic acid(Sigma Co., 분자량 90.08, 밀도 1.080)를 이용하여 1M의 lactic acid를 제조하였다.

CaCl₂(Sigma Co., 분자량 147.0)를 이용하여 0.3M의 용액을 제조하고 자동분석기(747 Automatic analyzer, Hitachi, Japan)를 이용하여 제조한 용액의 농도를 확인하였다.

K₃PO₄(Sigma Co., 분자량 136.1)을 이용하여 0.9M의 용액을 제조한 후, 자동분석기(747 Automatic analyzer, Hitachi, Japan)로 분석하여 용액의 농도를 확인하였다.

2) 탈회 완충 용액의 제조

Stock 용액을 이용하여 Ca 15mM, P 9.5mM, Sodium azide 3.08mM, lactic acid 100mM, 포화도 0.1555가 되도록 용액을 제조한 후 8N KOH 표준용액을 이용하여 pH 4.3이 되도록 조절하였다. 이 용액을 다시 자동분석기(747 Automatic analyzer, Hitachi, Japan)로 분석하여 Ca과 P의 농도를 확인하고 치아의 탈회용액으로 사용하였다.

3) 재광화 완충 용액의 제조

농도 100ppm의 염화불소 표준용액(100ppm NaF Standard solution, Orion Research Inc., USA)과 stock 용액을 이용하여 불소 농도 2ppm인 용액을 제조하고(Table 1), 이를 자동 분석기(747 Automatic analyzer, Hitachi, Japan)로 확인한 후 재광화 용액으로 이용하였다.

Table 1. The composition of remineralization solution

Composition	Concentration
Lactic acid	10mM
Calcium	37.4mM
Phosphate	15.0mM
Sodium azide	3.08mM
Fluoride	2ppm
pH	4.3
Degree of Saturation	0.38999

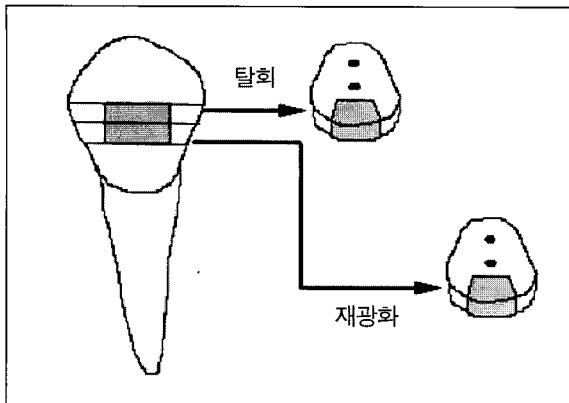


Fig. 1. The procedure of tooth sample preparation.

4) 인공 치아 우식의 형성

레진으로 수복한 치아의 치근 부위에 치아 절단시 교정이 가능하도록 자가 중합형 레진을 사용하여 원통형의 손잡이를 만들고 탈회 완충 용액 20ml가 담긴 50ml 플라스틱 용기에 치관부가 완전히 잠기도록 위치시켰다. 이 플라스틱 용기를 25℃에서 치아 치관부의 법랑질을 48시간 동안 탈회시켰다. 탈회된 치아를 low speed diamond saw (ISOMET™, Buehler, USA)를 이용하여, 레진 수복물의 occlusal 1/2을 포함하도록 치아 장축에 수직으로 절단하여 0.8~1.0mm의 탈회 시편을 제작한다(Fig. 1).

5) 재광화

탈회 시편 제작 후 남은 치아의 절단면에 재광화 용액과의 접촉을 차단할 수 있도록 현미경 하에서 Scotchbond Multipurpose bonding resin(3M, USA)을 도포하고 질소 가스 하에서 광중합을 시행하였다. 20개의 치아를 무작위로 10개씩 2개의 group으로 나누어 재광화 용액을 탈회 시와 동일하게 50ml 플라스틱 용기에 20ml 씩 담아 치관부가 완전히 잠기도록 위치시키고 25℃에서 첫 번째 group은 1주간, 두 번째 group은 2주간 재광화를 시행하였다.

재광화 시킨 치아의 절단면에 도포된 bonding resin을 #800 사포를 이용하여 제거하고 low speed diamond saw(ISOMET™, Buehler, USA)를 이용하여, 레진 수복물의 나머지 cervical 1/2을 포함하도록 치아 장축에 수직으로 절단하여 0.8~1.0mm의 재광화 시편을 제작하였다(Fig. 1).

6) 공초점 레이저 주사 현미경 관찰

group 1, 2의 탈회 시편과 재광화 시편 각 20개 시편을 deionized water에 2분간 세척하고 slide glass에 sticky wax를 이용하여 고정하였다. 고정된 시편에 0.1mM rho-

damine B 용액을 1방울 점적하여 1시간 동안 염색하고 세척은 하지 않았다. 염색된 시편은 Bio-Rad MRC 600 confocal argon-crypton laser(Glattbrugg, Switzerland)가 구비된 Leica[®] DMRBE microscope으로 관찰하였으며, 여기서 얻은 사진을 TCS NT system(Hidelberg, Germany)을 사용하여 분석하여, 일정한 면적의 측정된 영역 내의 모든 pixel intensity를 더한 합인 total fluorescence of the lesion과 측정된 area내의 fluorescent pixel value의 평균인 average fluorescence of the lesion의 두 가지 parameter를 측정하여 기록하였다. 공초점 레이저 주사 현미경의 설정은 488nm excitation wave length를 가진 argon laser를 광원으로 사용하였으며 confocal slit은 15μm에 설정하였고 515nm FITC barrier를 사용하였다. contrast와 brightness는 최대로 설정하고 일정하게 유지하였다.

7) 통계분석

측정된 결과는 SPSS 8.0 program을 이용하여 비모수 분석인 Wilcoxon signed rank test를 통해 탈회 및 재광화 1, 2 주 전후의 측정치 변화를 비교하였다.

Ⅲ. 결 과

본 실험에서는 총 20개의 치아에서 각 군별로 탈회 시편과 재광화 시편을 얻어 공초점 레이저 주사 현미경으로 관찰하였으며, 여기서 얻은 상으로부터, 측정된 area 내의 모든 pixel intensity를 더한 합인 total fluorescence of the lesion(TFL)과 측정된 area 내의 fluorescent pixel value의 평균인 average fluorescence of the lesion(AFL)을 측정하여 재광화 전후의 무기질 성분의 변화를 분석하였다.

1. 탈 회

탈회 시편은 군의 구별 없이 20개의 시편을 모두 분석하였으며, total fluorescence of the lesion과 average fluorescence of the lesion을 각각 비교하였다(Fig. 1~4). Total fluorescence of the lesion과 average fluorescence of the lesion 모두 graph 상에서 분석한 결과 다양한 탈회 정도를 나타내었으나, 분포 형태는 유사하였다. 각각 total fluorescence of the lesion은 평균 $2.57 \pm 1.11 (\times 10^6)$, average fluorescence of the lesion은 평균 84.07 ± 43.14 의 값을 보였다.

2. 재광화

1주간 재광화한 그룹과 2주간 재광화한 그룹의 total flu-

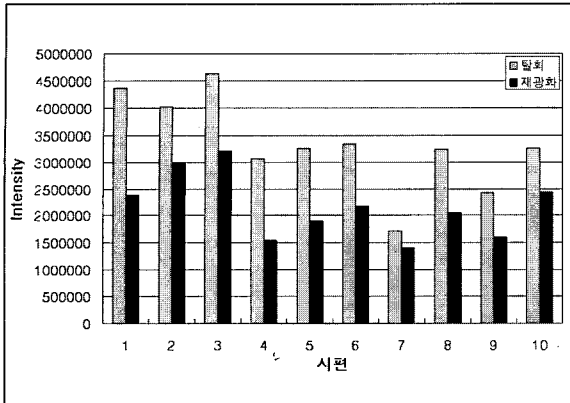


Fig. 2. The change of TFL in one week remineralization group.

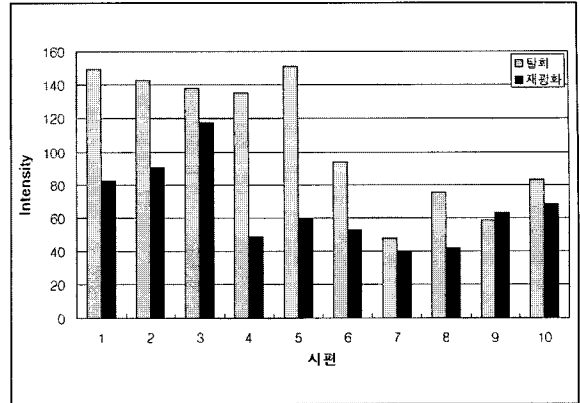


Fig. 3. The change of AFL in one week remineralization group.

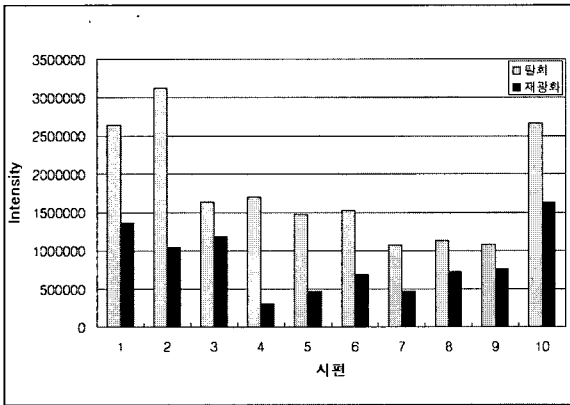


Fig. 4. The change of TFL in two weeks remineralization group.

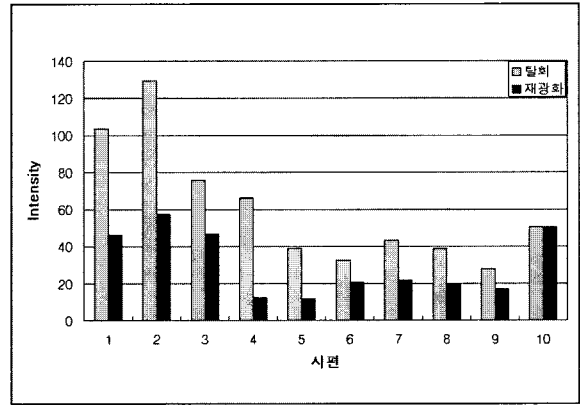


Fig. 5. The change of AFL in two weeks remineralization group.



Fig. 6. The CLSM image of demineralized tooth sample.

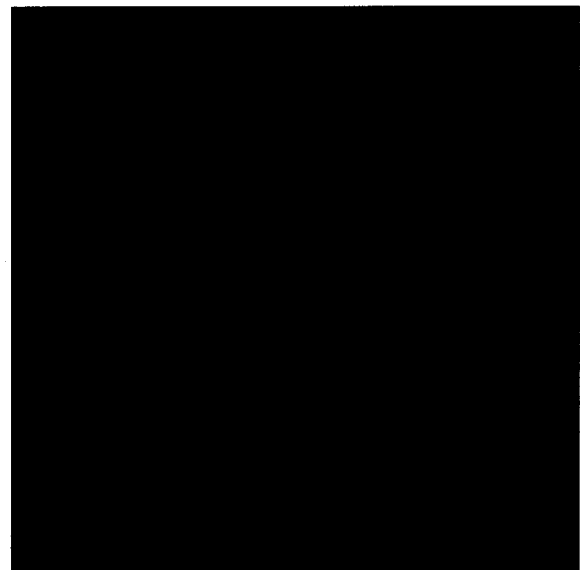


Fig. 7. The CLSM image of remineralized tooth sample.

orescence of the lesion을 비교한 결과 1군의 경우 평균 34.31% fluorescence가 감소하였고, 2군의 경우 평균 50.79% 감소하였다.

Average fluorescence of the lesion의 경우도 1군의 경우 평균 33.56% 감소하였고, 2군의 경우 평균 47.56% 감소하였다.

각 군의 재광화 전후의 결과를 비모수 분석인 Wilcoxon signed rank test를 통해 분석한 결과 1주와 2주 군 모두에서 재광화 전에 비해 재광화 후에 total fluorescence of the lesion과 average fluorescence of the lesion이 유의하게 감소하였음을 보여주었다($p < 0.01$).

IV. 총괄 및 고찰

치아의 무기질 성분은 구강 내에서 상실과 재침착을 지속하면서 항상성을 유지하고 있다. 여러 가지 요인에 의해 이러한 항상성이 깨어짐으로써 치아 우식이 발생하게 된다. 치아 우식에 영향을 미치는 인자들은 유기산의 종류, 유기산의 농도, pH^{43,45,47,48}, 구강내 타액의 광물질 포화도¹³, 치아의 무기질 및 유기질의 화학적 조성, 불소의 농도^{50,51} 등을 들 수 있다.

초기 법랑질 우식은 임상적으로 백색반점으로 관찰되어지는데, 주된 특징은 상대적으로 탈회되지 않은 표면층(surface layer)과 탈회가 많이 진행된 표면하층(subsurface layer)의 양상을 들 수 있다. 이러한 현상은 1935년 Hollander와 Saper에 의해 처음 발견되어 많은 사람들에게 의해 연구되어져 왔다.

Moreno 등³⁴에 의하면 치태 내 세균의 대사 산물로서 유기산이 생성되면 이 산이 pellicle을 통해서 표면 법랑질 내로 확산되게 된다. 유기산 농도와 pH가 일정 조건에 다다르게 되면 표면 법랑질에서 무기질의 분해가 일어나고 $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (DCPD)와 $\text{Ca}_5\text{F}(\text{PO}_4)_3$ (FA)의 침전이 일어나 enamel, DCPD, FA 세가지 solid phase와, 법랑질 표면에 바로 근접한 곳과 표면 미세 공동(surface pore) 내의 fluid 사이에 평형 상태를 이루게 된다. 이 때 3가지 solid phase로 평형을 이룬 용액이, 표면하 법랑질 내의 pore를 채우고 있는 용액보다 인산과 acid buffer의 화학적 반응성(chemical potential)이 더 높기 때문에 표면 법랑질에서 표면하 법랑질로 산성 성분들의 이동이 일어나게 되고, 반면에 표면하 법랑질의 무기질의 분해로 생성된, 보다 염기성인 용액은 표면 법랑질 쪽으로 확산되게 된다. 따라서 이 염기성 용액에 의해 표면층에서는 평형관계를 유지하기 위해 여러 phase의 침전이 일어나게 되고 이러한 과정에 의해서 우식 병소에 표면 병소(surface layer)와 표면하 병소(subsurface layer)의 구분을 보이게 된다. 그리고 표면 병소의 용액 구성 성분들은 구강 내로 확산되게 되는데

이 확산되는 속도가 표면 병소에서 침전되는 속도보다 빠르면 우식이 진행되는 것이다.

In vitro 상에서 인공 우식을 형성하는 방법 중에서 법랑질에서 주로 사용되는 방법은 acidified gel을 이용한 방법^{24,37}, partially saturated buffer를 이용한 방법³⁴, surface dissolution inhibitor¹⁵, 등이 있으며, 이 등⁴⁹과 오 등⁴⁸도 partially saturated buffer를 이용하여 인공 우식을 유발하는 실험을 한 바 있다.

본 실험에서는 이들 방법 중 우식 영향 인자들을 비교적 자유롭게 조절이 가능한 partially saturated buffer를 사용하여 인공 우식을 형성하였다.

시편의 탈회 과정에서 pH는 박 등⁴⁷의 실험에서의 결과를 참고로, 법랑질에서 와동의 형성 없이 표면하층이 관찰되면서 우식이 가장 잘 일어날 수 있도록 4.3으로 정하여 시행하였으며, 탈회 용액의 포화도, 유기산의 농도 등도 이에 준하여 정하였다. 온도는 Boyle 등⁷의 연구에 의하면 20℃와 37℃ 간에 우식 형성에 별다른 차이가 없었으므로 실온인 25℃에서 탈회 및 재광화를 시행하였다.

재광화 용액은 한 등⁵⁰의 결과에 의하면 불소의 농도 1, 2, 4ppm 중 2ppm에서 가장 재광화가 잘 일어난 것을 보고하였으므로, 이에 준하여 2ppm으로 하였으며, 본 실험에서는 재광화 용액의 pH가 4.3으로 낮게 설정되었으나, 김 등⁴⁵에 의하면 법랑질에서는 pH가 높을수록 더 많은 재광화가 일어나므로, pH를 높게 설정했다면 재광화가 더욱 증가했을 것으로 생각된다.

치아의 법랑질에서 무기질 변화를 측정하는 여러가지 방법들이 발전되어 왔다. 이들 방법에는 법랑질 표면의 microhardness 측정⁵, 법랑질 cross-section의 microhardness 측정^{10,16}, polarized light microscopy³⁶, different microradiography techniques²⁶, iodine absorptiometry¹¹, light scattering⁴⁰ 등이 있다. 모든 방법들이 각기 장단점을 가지고 있으나, transversal microradiography가 무기질의 함량 변화, 분포를 직접 정량적으로 측정하기 위한 가장 실용적인 방법으로 알려져 왔다. 그러나 이 방법은 치아를 100 μm 정도의 얇은 시편으로 제작해야 하는 어려움이 있었고, 오랜 시간 x-ray를 조사하여야 하며, 필름을 현상, 정착하는 부가적인 과정들이 요구되었다.

본 연구에서 사용된 공초점 레이저 주사 현미경(confocal laser scanning microscopy)은 생물학과 의학 연구 분야에서 cell labeling을 위해 사용되거나, 장기 조직을 in vivo 상에서 비파괴적인 방법으로 관찰하기 위해 사용되었다¹⁷. 그리고 치과 영역에서도 여러가지로 적용되어져 왔는데 이전 연구에서 초기 또는 이차 우식을 가진 탈회된 법랑질 시편을 반으로 잘라 형광염료로 염색하고 공초점 레이저 주사 현미경을 사용하여 분석하여 무기질의 상실을 측정하는 간단하고 빠른 술식이 보고되었고¹⁷, 최근 연구에서는 재광화

술식을 시행한 탈회된 사람의 법랑질 시편을 절단하여 형광 염료에 염색하고 공초점 레이저 주사 현미경을 사용 재광화 후의 무기질 변화를 또한 확인할 수 있는지를 결정하기 위해 분석하였다²¹⁾. 이렇게 지금까지 무기질 변화를 정량적으로 분석하기 위해 주로 사용되었던 transversal microradiography과는 달리, 공초점 레이저 주사 현미경은 시편의 제작과정이 보다 용이하여 손상되지 않은 치아에서 초점이 일치된 부위의 subsurface image를 얻을 수 있으므로 두꺼운 시편에서 기계적인 시편의 절단 없이 각 층의 단면을 관찰할 수 있으며, 주사 전자 현미경과 같은 다른 술식에서 나타날 수 있는 탈수에 의한 뒤틀림도 일어나지 않는다. 그밖에 컴퓨터로 상의 조절이 가능하고, 필요할 경우 시편의 각 층의 상을 모아 3차원 영상을 구현할 수도 있으며²⁰⁾, 면역형광 염색법을 통해 이차 우식 내에 존재하는 세균을 관찰하는 등^{19,20)} 치과 영역에서도 보다 다양한 분야에서 사용이 가능할 것으로 생각된다^{18,44)}.

치아를 공초점 레이저 주사 현미경으로 관찰하기 위해 brilliant sulfaflavine, tetracycline, alizarin red 등 여러 가지 형광 염료가 사용되어져 왔는데, Benn과 Watson이 rhodamine B로 우식 병소를 염색하여 관찰하였으며⁶⁾, Gonzalez 등이 rhodamine B의 농도와 염색 시간, 염색 방법 등을 달리하여 실험한 결과, 0.1mM을 시편에 점적하고 1시간 동안 위치시킨 후 관찰하였을 때 가장 좋은 결과를 가져왔으므로^{17,18,21)} 본 실험에서도 0.1mM의 rhodamine B를 사용하여 염색하였다.

공초점 레이저 주사 현미경의 관찰시 주의할 점은 치아를 절단할 때 도말층(smear layer)이 형성되므로 scanning시 절단면 10~50 μ m 하방에 초점을 맞추어 시행해야 그러한 artifact에 의한 영향을 줄일 수 있으며, 항상 일정한 면적을 정해두고 각 계측치를 측정하여야 표준화된 수치를 얻을 수가 있다.

Gonzalez와 Fontana 등은 공초점 레이저 주사 현미경을 사용한 실험에서 무기질의 변화를 정량적으로 관찰하기 위해 (1) Area of the fluorescent lesion : 일정 길이의 영역 내에서 0의 fluorescence threshold 이상으로 발광하는 모든 pixel로 구성된 면적으로 결정, (2) Total fluorescence of the lesion: 측정된 영역 내의 모든 pixel intensity를 더한 합, (3) Average fluorescence of the lesion: 측정된 영역 내의 fluorescent pixel value의 평균 등의 세 가지 측정치를 얻어서 이를 microradiography의 ΔZ 값과의 상관관계를 측정한 결과 area of the fluorescent lesion이 가장 높은 값을 나타내었고, total fluorescence of the lesion은 유의차 있게 연관성을 보였으며, average fluorescence of the lesion이 가장 낮은 연관성을 보였다^{17,21,23)}. 본 실험에서 사용한 TCS NT system(Hidelberg, Germany)상에서는 area of the fluorescent lesion을 직접 측정할 수 없어서, 나머지 두 매개변수를 가지고 치아의 무기질 함량을 분석하였다.

처음 치아를 탈회시킨 20개의 시편의 상을 분석한 결과, 표준편차가 크게 나타난 것으로 보아 치아 시편마다 탈회되는 정도에 있어서 개체별로 차이를 보이는 것으로 생각된다. 그리고 Angela²⁾에 의하면 resin modified glass ionomer로 수복된 치아를 인공적으로 우식을 유발하여 이를 microradiography로 분석한 결과 수복물에서 유리된 불소에 의해 법랑질의 탈회가 억제되는 결과를 가져왔으나, 본 연구에서는 변연부에서의 이차 우식 양상만을 기대하고 불소가 유리되지 않는 레진을 사용하였다. 결과적으로 바로 수복한 레진과 법랑질 계면 사이에서는 탈회에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 보이며, Fig. 7의 탈회된 법랑질에서의 intensity 변화와 Fig. 8에서와 같이 계면에서의 intensity의 변화를 비교해 보았을 때, 탈회된 법랑질에서는 surface layer가 존재하기 때문에 처음에는 낮은 intensity를

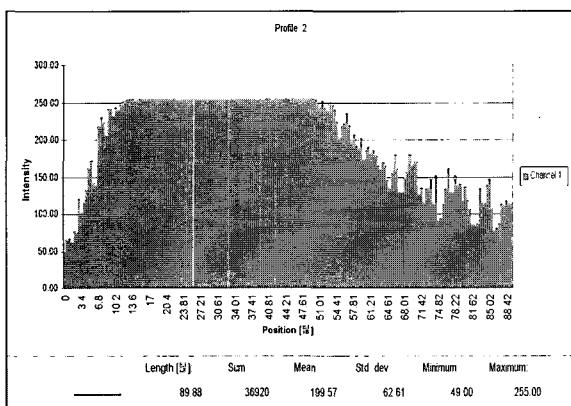


Fig. 8. The change of intensity on the demineralized enamel.

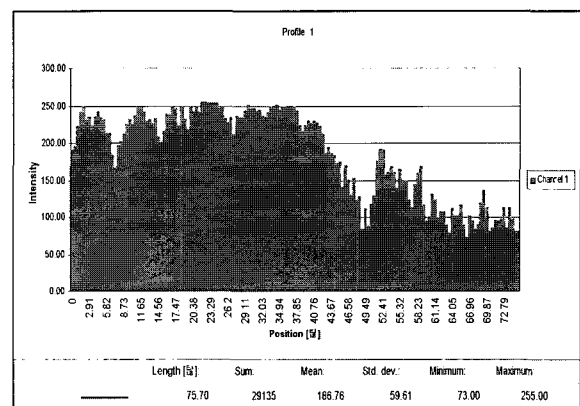


Fig. 9. The change of intensity at the resin-enamel interface.

보이다가 차츰 증가하는 양상을 보였으나 레진과 법랑질 계면에서는 처음부터 거의 일정한 intensity를 보이는 것을 알 수 있었다. 계면에서의 전반적인 탈회 정도를 법랑질 상에서와 비교했을 때는 거의 유사한 정도의 탈회 양상을 보였으며, 약간 감소된 양상이 관찰되기도 하였다. 몇 개의 시편에 있어서 지나치게 큰 intensity를 보이는 시편이 있었는데 이것은 레진과 법랑질의 계면이 치아 시편 제작 과정에서 손상되어 rhodamine B 염료가 그 부위로 침투되어 나타난 것으로 여겨진다. 그러므로 실제 임상에서 수년간 구강내에 위치된 수복물에서는 탈회 양상이 본 실험과는 다르게 나타날 수 있을 것으로 사료된다.

본 실험에서는 탈회 조건과 재광화 조건을 동일하게 하고 재광화 시간만을 달리해서 공초점 레이저 주사 현미경으로 관찰하였으나, 앞으로 공초점 레이저 주사 현미경이 transversal microradiography를 대체할 수 있는 방법으로서 보다 효과적인 분석이 가능하도록 하기 위해서는 인공 구강 모델 상에서 pH, 포화도, 용액의 농도, 불소의 농도 등의 조건들을 변화시켜 추가적인 연구가 필요하리라 사료되며, 치아 시편을 표준화하려는 노력으로 신뢰도를 높일 수 있도록 하고, 불소가 유리되는 수복물의 사용이나 레진 수복 후 thermocycling과 cyclic load를 시행하여 실제 구강 내와 같은 조건에서 수복물의 우식에 대한 영향을 알아보는 것이 필요할 것으로 본다.

V. 결 론

본 연구에서는 레진으로 수복된 법랑질에 초기 우식을 유발한 후 재광화하여, 나타나는 무기질 함량 변화를 공초점 레이저 주사 현미경을 이용하여 정량적으로 분석하였다. 총 20개의 치아를 사용하였으며 무작위로 10개씩 두 개의 군으로 나누어 1군은 탈회 후 1주간, 2군은 탈회 후 2주간 재광화 시켜 공초점 레이저 주사 현미경에서 얻은 image를 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 탈회 시편과 재광화 시편의 공초점 레이저 주사 현미경 관찰 결과, 재광화 후 total fluorescence of the lesion과 average fluorescence of the lesion이 유의하게 감소하였다. ($p < 0.01$)
2. 공초점 레이저 주사 현미경은 치아 법랑질의 무기질 함량 변화를 정량적으로 측정하기 위해 효과적으로 사용 가능하다.

이상의 결과에서 우식 연구에 있어서 법랑질 우식과 재광화 과정에서의 무기질 함량의 변화를 정량적으로 측정하기 위해 공초점 레이저 주사 현미경이 성공적으로 이용될 수 있으며, 앞으로 치과 영역에서 이를 이용한 보다 다양한 접근이 가능하리라 사료된다.

참 고 문 헌

1. Almqvist H., Wefel J.S., Lagerlöf F., Ekstrand F., Hendrikson C.O.: In vitro root caries progression measured by ^{125}I absorptiometry: Comparison with chemical analysis., *J. Dent. Res.*, 67: 1217-1220, 1988.
2. Angela Wandera: In vitro enamel effects of a resin-modified glass ionomer: fluoride uptake and resistance to demineralization., *Pediatric Dentistry*, 20: 411-417, 1998.
3. Arends J., Christoffersen J.: The nature of early caries lesions in enamel., *J. Dent. Res.*, 65: 2-11, 1986.
4. Arends J., Dijkman T., Christoffersen J.: Average mineral loss in dental enamel during demineralization., *Caries Res.*, 21: 249-254, 1987.
5. Arends J., Schuthof J., Jongbloed WL: Lesion depth and microhardness indentations on artificial white spot lesions., *Caries Res.*, 14: 190-195, 1980.
6. Benn D.K., Watson T.F.: Correlation between film position, bite-wing shadows, clinical pitfalls, and the histologic size of approximal lesions., *Quintessence Int.*, 20: 131-141, 1989.
7. Boyle, E. L., Higham, S. M., and Edgar, W. M.: The production of subsurface artificial caries lesions on third molar teeth., *Caries Res.*, 32: 154-158, 1998.
8. Chow, L. C., and Takagi, S.: Remineralization of Root Lesions with Concentrated Calcium and Phosphate Solutions., *Dent. Mat. J.*, 14: 31-36, 1995.
9. Damen, J. J. M., Buijs, M. J., and Ten Cate J. M.: Fluoride-dependent formation of mineralized layers in bovine dentin during demineralization in vitro., *Caries Res.*, 32: 435-440, 1998.
10. Davison CL, Hoekstra IJ, Arends J: Microhardness of sound, decalcified and etched enamel related to calcium content., *Caries Res.*, 8: 135-144, 1974.
11. Derand, T., Loding, A., and Petersson, L. G.: Effect of Topical F- Solutions on Caries-Like Lesions in Root Surfaces., *Caries Res.*, 23: 135-140, 1989.
12. Dunipace, A. J., Zhang, W., Beiswanger, A. J., and Stookey, G. K.: An in vitro Model for Studying the Efficacy of Fluoride Dentifrices in Preventing Root Caries., *Caries Res.*, 28: 315-321, 1994.
13. Exterkate, R. A. M., Damen, J. J. M., and Ten Cate, J. M.: 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: 1599-1603, 1993.
14. Frank, R. M.: Structural Events in the Caries Process in Enamel, Cementum, and Dentin., *J. Dent. Res.*, 69(Spec Iss): 559-566, 1990.
15. Featherstone, J. D. B.: Diffusion phenomena during artificial carious lesion formation., *J. Dent. Res.*, 56(Spec Iss): D48-52, 1977.
16. Featherstone, J. D. B., Ten Cate J.M., Shariati M., Arends J.: Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles., *Caries Res.*, 17: 385-391, 1983.
17. Fontana M., Li Y., Dunipace A.J., Noblitt T.W., Fischer G.M., Katz B.P., Stookey G.K.: Measurement of enamel demineralization using microradiography and confocal microscopy., *Caries Res.*, 30: 317-325, 1996.
18. Gonzalez-Cabezas C., Fontana M., Stookey G.K.: Measurement of Mineral Gain and Loss on Dental Enamel and Dentin Using Confocal Microscopy..

- Methods in Enzymology, 307: 485-496, 1999.
19. Gonzalez-Cabezas C., Fontana M., Stookey G.K.: Detection of Mutans Streptococci in secondary carious lesions using immunofluorescent techniques and confocal laser scanning microscopy., *Caries Res.*, 29: 198-203, 1995.
 20. Gonzalez-Cabezas C., Li Y., Gregory R. L., Stookey G.K.: Distribution of three cariogenic bacteria in secondary carious lesions around amalgam restorations., *Caries Res.*, 33: 357-365, 1999.
 21. Gonzalez-Cabezas C., Fontana M., Dunipace A. J., Li Y., Fischer G. M., Stookey G.K.: Measurement of enamel remineralization using microradiography and confocal microscopy., *Caries Res.*, 32: 385-392, 1998.
 22. Groeneveld A., Jongebloed W.L., Arends J.: The mineral content of decalcified surface enamel., *Caries Res.*, 8: 267-274, 1974.
 23. Hafstrom-Bjorkman U., Sundstrom F., de Josselin de Jong E., Oliveby A., Angmar-Mansson B.: Comparison of laser fluorescence and longitudinal microradiography for quantitative assessment of in vitro enamel caries., *Caries Res.*, 26(4): 241-247, 1992.
 24. Heilman, J. R., and Wefel, J. S.: Effect of remineralization on demineralized root surfaces., *J. Dent. Res.*, 68: 351-, 1989.
 25. Heilman, J. R., Jordan, T. H., Warwick, R., and Wefel, J. S.: Remineralization of root surfaces demineralized in solutions of differing fluoride levels., *Caries Res.*, 31: 423-428, 1997.
 26. Herkstr ter F.M., Noordmans J., ten Bosch J.J.: Wavelength-independent microradiography: Its use to measure mineral changes in curved and thick samples., *Caries Res.*, 24:399, 1990.
 27. Iijima Y., Takagi O., Ruben J., Arends J.: In vitro remineralization of in vivo and in vitro formed enamel lesions., *Caries Res.*, 33(3): 206-213, 1999.
 28. Ingram, G. S.: Chemical events during tooth dissolution., *J. Dent. Res.*, 69(Spec Iss): 581-586, 1990.
 29. Larsen, M. J.: Chemical events during tooth dissolution., *J. Dent. Res.*, 69(Spec Iss): 575-580, 1990.
 30. Laurence C. Chow, Shozo Takagi: Remineralization of root lesions with concentrated calcium and phosphate solutions., *Dent. Materials J.* 14: 31-36, 1995.
 31. Margolis, H. C., and Moreno, E. C.: Kinetic and thermodynamic aspects of enamel demineralization., *Caries Res.*, 19: 22-35, 1985.
 32. Margolis, H. C., Murphy, B. J., and Moreno, E. C.: Development of caries-like lesions in partially saturated lactate buffers., *Careis Res.*, 19: 36-45, 1985.
 33. Margolis, H. C., and Moreno, E. C.: Physicochemical Perspectives on the Cariostatic Mechanisms of Systemic and Topical Fluorides., *J. Dent. Res.*, 69(Spec Iss): 606-613, 1990.
 34. Moreno, E. C. and Zahradnik, R. T.: Chemistry of enamel subsurface demineralization in vitro., *J. Dent. Res.*, 53: 226-235, 1974.
 35. Robert H. Webb.: Theoretical Basis of Confocal Microscopy., *Methods in Enzymology*, 307: 3-20, 1999.
 36. Silverstone, L. M.: structure of carious enamel, including the early lesion., *Oral Sci Rev.*, 3: 100-160, 1973.
 37. Silverstone, L. M.: Observations on the dark zone in early enamel caries and artificial caries-like lesions., *Careis Res.*, 1: 261-274, 1967.
 38. Skrtic D., Hailer A.W., Takagi S., Antonucci J.M., Eanes E.D.: Quantitative assessment of the efficacy of amorphous calcium phosphate /methacrylate compsite in remineralizing caries-like lesions artificially produced in bovine enamel., *J. Dent. Res.* 75: 1679-1686, 1996.
 39. Sturdevant C. M., Roberson T. M., Heymann H. O., and Sturdevant J. R. The art and science of operative dentistry. 3rd Ed. 60-128, 1995.
 40. Ten Bosch J.J., van der Mei H.C., Borsboom P.C.F.: Optical monitor of in vitro caries., *Caries Res.*, 18: 540-548, 1984.
 41. Ten Cate, J. M., Nyvad, B., Van de Plassche-Simons, Y. M., and Fejerskov, O.: A quantitative analysis of mineral loss and shrinkage of in vitro demineralized human root surface., *J. Dent. Res.*, 70: 1371-1374, 1991.
 42. Ten Cate, J. M.: In vitro Studies on the Effects of Fluoride on De- and Remineralization., *J. Dent. Res.*, 69(Spec Iss): 614-619, 1990.
 43. Theuns, H. M., Van Dijk, J. W. E., Driessens, F. C. M., and Groeneveld, A.: Effect of time, degree of saturation, pH and acid concentration of buffer solutions on the rate of in-vitro demineralization of human enamel., *Archs Oral Biol.*, 30: 37-42, 1985.
 44. Watson T. F., Petroll W. M., Cavanagh H. D., Jester J. V.: In vivo confocal microscopy in clinical dental research., *J. Dent.* 1992.
 45. 김민경, 금기연, 이찬영.: 법랑질 인공우식의 재광화에 미치는 pH의 영향에 관한 연구., *대한치과보존학회지*, 22: 193-208, 1997.
 46. 김종배, 최유진. *공중구강 보건학*. 2nd Ed. 43-52, 1991.
 47. 박성호, 이찬영, 이정석.: 유산완충액을 이용한 인공치아우식의 형성에 미치는 산의 농도와 pH에 관한 연구., *대한치과보존학회지*, 18: 277-290, 1993.
 48. 오현석, 금기연, 노병덕, 이찬영.: 산 완충용액의 pH가 인공치근우식의 형성에 미치는 영향., *대한치과보존학회지*, 24: 495-502, 1999.
 49. 이찬영.: 산 완충용액을 이용한 인공치아우식 형성., *연세치대 논문집*, 7: 34-41, 1992.
 50. 한원섭, 금기연, 이찬영.: 인공치아우식의 재광화에 미치는 불소의 영향., *대한치과보존학회지*, 21: 161-173, 1996.
 51. 홍석진, 박기철, George K. Stookey: 인공 우식 법랑질에 대한 불소 함유 치약의 효과., *대한 구강 보건 학회지*, 20: 1-10, 1996.