

Immuno-slot blot method를 이용한 우식 경험 아동과 비경험 아동간의 *Streptococcus mutans*에 대한 타액내 IgA 역가의 비교

음종혁 · 정태성 · 김 신

부산대학교 치과대학 소아치과학교실

국문초록

본 연구는 어린이의 치아우식증을 야기하는 주된 원인균인 *Streptococcus mutans*에 대한 타액내 Immunoglobulin A의 양을 좀 더 쉽고 빠르며 정확하게 분석하는 방법을 개발하는데 일차적 목적을 두었고 이 방법을 사용하여 우식 경험군과 비경험군 간의 타액내 IgA 역가에 차이가 있는지 관찰하였다. 본 연구에서 사용한 immuno-slot blot method에서 항체 역가 측정의 기본 개념은 *Streptococcus mutans*의 단백질을 1/2씩 희석하여 nitrocellulose membrane에 결합시킨 후 1/100으로 희석된 타액에 의해 검출될 수 없는 최대의 단백질 희석배수를 구하는 것이다. 연구 결과 우식 경험군과 비경험군의 희석배수 평균치는 우식 비경험군이 $2^{6.278 \pm 2.260}$, 우식 경험군이 $2^{5.730 \pm 0.499}$ 로 IgA의 농도가 우식 비경험군에서 약간 높게 나타났다. 그러나 우식 비경험군의 경우 표준편차가 매우 높아 양 군간에 유의한 차이는 없었다.

주요어 : Immuno-slot blot method, 타액내 항체역가, *Streptococcus mutans*

I. 서 론

치아우식증은 선진국에서는 점차 감소하는 경향을 보이고 있으나¹⁾, 80%이상의 어린이가 살고 있는 개발도상국 혹은 후진국에서 치아우식증은 여전히 주된 감염성 질환의 하나이며 그 발병률도 증가하고 있다²⁾. 치아우식증의 발현에는 무수한 변수가 복합적으로 작용하므로 이들에 대한 개별적인 분석은 어려운 실정이다. 그러나, *Streptococcus mutans*(이하 *S. mutans*)는 치아우식증의 주원인균이며 이의 감염정도가 치아우식 수준에 비례한다는 점을 고려한다면³⁾, *S. mutans*에 대한 정확한 분석은 어린이의 치아우식의 정도를 예측할 수 있는 한 가지의 지표가 될 수 있을 것이다⁴⁾.

치아우식증은 *S. mutans*로 알려진 표현형이 유사한 일단의 세균총에 의해 유발된다. *S. mutans*는 1924년 J. Kilian Clarke에 의해 최초로 발견되었으나, 그 당시 치아우식증의 원인균이라는 직접적인 근거는 밝혀지지 않았다⁵⁾. 그러나 1960년대에 이르러 실험기법의 발전과 동물실험 등에 의해 *S. mutans*와 치아우식증의 관계가 밝혀졌다⁶⁾. *S. mutans*는 구형 또는 난원형의 형태를 가진 직경 0.5~2.0 μ m의 세균으로 쌍이나 연쇄상으로 액상배지에서 배양되는 그람 양성균이다. 배양의 최적온도는 37 $^{\circ}$ C이며 구강내 정상 세균총의 대부분을 차지한다⁷⁾. 오늘날 *S. mutans*는 치아우식증의 주원인균으로 생각되고 있

으며⁸⁾, 4세 어린이의 경우 33~75%⁹⁾, 청소년의 80~90%, 그리고 모든 성인에게서 발견된다¹⁰⁾. 이에 효율적으로 대항하기 위한 방법으로는 세균의 전이과정을 차단하는 법, 감염균을 억제 혹은 제거하는 법, 그리고 이 질환에 특히 취약한 개체를 집중적으로 보호하는 법을 들 수 있다¹¹⁾. 치아우식증의 경우 후자의 두 가지 방법을 적용하기 위한 연구는 이미 상당히 진전되어 있으며, 치아우식증 원인균의 전이과정을 차단하려는 시도에 관해서도 연구가 진행되어 이미 다소나마 바람직한 결과를 얻은 바 있다¹²⁻¹⁴⁾.

그러나 *S. mutans*와 치아우식증 간의 상관관계가 잘 알려져 있음에도 불구하고¹⁵⁾, 구강위생¹⁶⁾, 식이 습관¹⁷⁾ 등 환경적 요인도 치아우식의 정도에 영향을 미치기 때문에 치아우식증을 예측할 수 있는 지표를 결정하는 것은 매우 어려운 일이다. 또한 원인균이 존재하지만, 치아우식증에 대한 감수성에 개인적인 차이가 존재하는 것은 개인의 저항력과 밀접한 관계가 있다고 생각되며, 특히 타액에 존재하는 IgA가 큰 역할을 한다는 점이 동물 실험으로 밝혀져 있다. 즉 *S. mutans*의 단백질을 항원으로 이용해 동물에 주사하여 면역반응을 유발한 군에서 치아우식증에 대한 저항력이 증가되는 현상이 관찰되었고¹⁸⁾, 인체에 있어서도 *glucosyl transferase(GTF)*를 투여하여 타액내 IgA의 분비를 촉진시켰을 때 *S. mutans*의 수가 감소되는 것이 보고된 바 있다¹⁹⁾. 타액내 IgA의 정확한 방어기전은 알려져 있지 않으나, 세

균이 치아나 점막 표면에 부착되는 것을 저해하거나²⁰⁾, 세균의 산 생성을 방해함으로써¹¹⁾ 치아우식을 방어하는 것으로 알려져 있다. 그러나 타액내 IgA가 치아우식의 정도와 직접적인 관련이 있다는 보고가 있는 반면²¹⁾, 연관성이 없다는 보고도 있어²²⁾, 향후 많은 연구가 필요하며, 이를 위해서는 타액내 IgA를 보다 효과적으로 측정할 수 있는 방법이 필요할 것으로 사료되었다.

따라서 본 연구는 *S. mutans*에 대한 타액내 IgA 역가를 보다 용이하고 신속하게 측정할 수 있는 방법을 개발하는데 일차적인 목적을 두었고, 이 방법을 사용하여 우식 경험군과 비경험군 간의 타액내 IgA 역가에 차이가 있는지, 그리고 차이가 존재한다면 치아우식증에 대한 감수성을 예측하는 지표로 사용될 수 있을지의 여부를 검토할 목적으로 시행되었다.

II. 연구대상 및 방법

1. 연구대상

우식 비경험군 : 유치원 재학중인 4~6세 어린이중 우식을 경험하지 않은 9명의 어린이를 대상으로 하였다(Table 1).

우식 경험군 : 특정 소아치과에 치료를 위해 내원한 어린이중 우식경험치의 개수가 4개 이상인 3~7세의 어린이 10명을 대상으로 하였다(Table 2).

우식의 지표는 dmft index로 제시하였다.

2. 타액의 채취

오전 10시부터 오후 1시 사이에 스포이드를 사용하여 어린이의 비자극성 타액을 약 2ml 정도 채집하여 연령, 성명 및 성별이 명시된 멸균된 플라스틱 통에 저장한 후 채취일 오후에 시료를 실험실로 옮겨 분석할 때까지 -20°C에서 보관하였다.

Table 1. The sex and age of caries non-experienced children

Number of examined child	sex	age
(1)	F	6y
(2)	M	5y
(3)	F	4y 8m
(4)	M	4y 8m
(5)	M	5y 10m
(7)	M	5y 3m
(8)	M	5y 4m
(9)	M	5y

3. *S. mutans*의 배양

ATCC에서 구입한 *S. mutans*(serotype c)를 MS(Mitis salivarius) agar(Difco B 298)에 0.2unit의 bacitracin과 1ml/l tellulite를 혼합한 MSB(Mitis Salivarius Bacitracin) 평판배지에 도말한 후, anaerobic jar에 시료와 함께 CO₂ envelope를 넣고 뚜껑을 덮어 밀폐한 후 37°C에서 48시간동안 혐기성 배양하였다. 촛불을 점화한 candle jar내에서 혐기성 배양된 *S. mutans*의 집락을 백금침으로 채취하여 다른 MSB 평판배지에 도말하고 동일한 방법으로 다시 혐기성 배양함으로써, 순수한 *S. mutans*를 배양하였다. 순수배양된 *S. mutans*를 백금침으로 채취하여 BHI(Brian Heart Infusion) broth에서 24시간동안 혐기성 배양하여 최종의 시험균액으로 사용하였다.

4. *S. mutans* 단백질의 분리

배양된 균주를 1% phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)를 포함한 phosphate-buffered saline(PBS, pH7.2)에 2~3회 세척한 후, 적당량(배양액 총량의 1/20)의 1% PMSF를 포함한 PBS에 suspend하였다. 이를 얼음에 채운 상태에서 80W의 강도로 5분간 3회 초음파 분쇄를 시행한 후, 5000Xg에서 15분간 원심분리한 상층액을 얻었다. 상층액의 단백질 농도를 Bio-Rad 단백질 분석시약을 사용하여 결정 한 후, 분석시까지 -20°C에서 보관하였다.

5. Slot-blotting

분리된 *S. mutans*의 단백질 2.5µg이 PBS 용액 200µl에 들어있도록 농도를 조정 한 후 1/2씩 연속적으로 희석하여 nitrocellulose membrane에 부착시킬 준비를 하였다. 한편으로 slot blot apparatus에 PBS에 미리 적신 nitrocellulose membrane과 filter paper를 놓고 Fig. 1에서와 같이 조립한 후, 각 sample well에 150µl의 PBS를 넣은 후 진공펌프에 연

Table 2. The sex, age and dmft status of caries experienced children

Number of caries experienced child	sex	age	dmf status		
			d	m	f
(a)	F	4y 2m	11	2	
(b)	M	5y 6m			9
(c)	M	6y 4m	3	3	2
(d)	M	3y 10m	6		
(e)	M	5y	5		
(f)	M	3y 4m	16		
(g)	F	4y 7m	8		4
(h)	M	6y 5m			5
(i)	M	6y 3m	4		
(j)	F	3y 8m	3		8

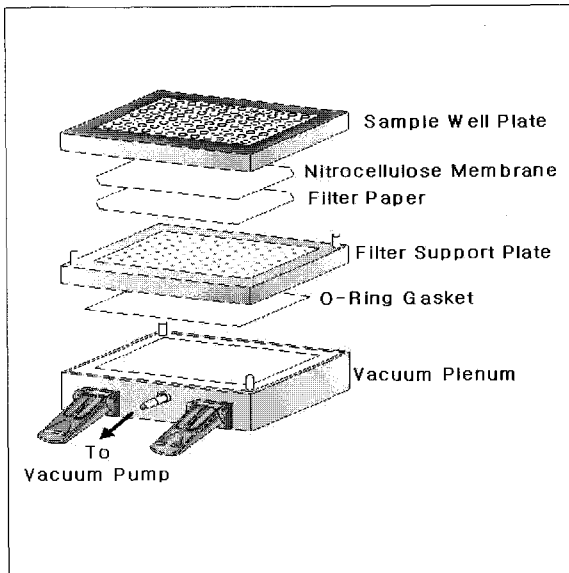


Fig. 1. Diagram of slot blot apparatus assembly.

결하여 well과 nitrocellulose filter 사이에서 시료의 누출이 없도록 하였다. 희석된 단백질을 각 well에 넣은 후, 진공펌프를 작동시켜 시료가 nitrocellulose membrane에 부착되도록 하였다. 250 μ l의 PBS를 2~3회 통과시켜 세척한 후, 조립된 slot blot apparatus를 해체하여 nitrocellulose membrane을 회수하였다. 2~3회 PBS로 nitrocellulose membrane 전체를 세척한 후 공기중에서 건조시켜 다음 실험에 사용하였다.

6. Immunodetection

공기중에서 건조시킨 단백질이 부착된 nitrocellulose membrane을 blocking solution(PBS with 10% nonfat dried milk, 0.001% tween20)으로 5~8시간 상온에서 반응시켰다. PBS로 5분간 3회 세척한 후 채취한 타액을 blocking solution에 1/100로 희석한 용액을 1시간 상온에서 진탕하며 반응시킨 후, PBS로 5분간 3회 세척하여 타액내 항체와 nitrocellulose membrane에 부착된 단백질간의 결합반응을 종료하였다. 결합된 항체를 분별하기 위하여 broad spectrum(보통 pan secondary Ab라고 함, mouse, rabbit, guinea pig, rat, human의 항체와 반응) biotinylated secondary antibody와 상온에서 30분간 반응시킨 후 30분간 streptavidin-peroxidase를 conjugate시켰다. 이러한 일련의 반응 결과를 AEC(3-amino-9-ethylcarbazole)과 반응시켜 발색반응을 관찰하였다.

7. 타액내 항체역가 비교

Slot blot 결과를 AlphaImager(version 5.0, Alpha Innotech Corp., USA)를 이용하여 입력한 후, 각각의 결과에 대한 농도를 동 시스템에 내장된 densitometry의 기능을 이용하여 측정하였다. 각 측정치의 상대치를 희석농도의 log 값에

대한 그래프를 그린 후 회귀직선을 SigmaPlot(Version 5.0, SPSS, Richmond, CA, USA)으로 계산하여 측정값이 0이 되는 희석농도의 -log 값을 구하여 비교하였다.

III. 연구성적

우식 비경험군의 연령은 4세 8개월에서 6세 사이였으며 남아 7명, 여아 2명이었다. 우식 경험군의 연령은 3세 4개월에서 6세 5개월 사이였으며 남아 7명, 여아 3명이었다.

*S. mutans*의 단백질을 12.5 μ g을 최고 농도로 하여 1/2 씩 희석하여 125/2¹⁰ μ g까지 slot blot apparatus를 이용하여 nitrocellulose membrane에 결합을 시킨 후 1/100로 희석한 타액과 반응시킨 결과를 보면 육안으로는 약 125/2⁵ μ g까지 농도 차이를 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

*S. mutans*로부터 추출된 단백질이 nitrocellulose membrane과 결합하였고, 타액내의 항체와 반응하며 단백질의 농도가 감소함에 따라 발색정도도 비례하여 감소함이 관찰되었다. 10명의 우식 경험군과 9명의 우식 비경험군을 대상으로 한 결과는 각 개인의 발색정도가 유사한 양상으로 나타나 육안으로 차이점을 관찰하기는 어려웠다.

이 결과를 AlphaImager에서 densitometry를 시행하여 각각의 band intensity를 얻었고(Fig. 3), densitometry 결과와 slot blot의 결과를 비교하여 적합한 band peak를 결정하였다.

각각의 peak를 계산함에 있어서 background 만큼의 density를 뺀 후 slot blot의 band 넓이와 맞게 peak의 넓이를 조절 한 후 각 peak의 면적을 계산하였다(Fig. 4).

Immuno blot의 발색 정도가 개인마다 편차가 있으므로, 최고 농도의 단백질 band에서 나타난 면적을 1로 하여 각 상대치를 산출하였다. 이 상대치를 Y축으로 하고 단백질 희석 배수의 log²값을 취하여 X축으로 하여 plotting한 결과를 가지고 Sigmaplot 5.0 컴퓨터 프로그램을 사용하여 각각에 대한 회귀 직선을 산출하였다. 각 회귀직선이 Y=0일 때의 값을 얻어 실제 희석배수를 계산하였다. 이 값은 단백질을 계속 희석하였을 때 타액내의 항체가 반응할 수 있는 최대 단백질 희석 배수이며, 이 값이 높을수록 항체의 농도가 높음을 의미한다.

이 방법으로 각 군의 항체 역가를 구한 결과 우식 경험군의 경우 최대단백질 희석배수가 2⁵~2⁷ 사이에서 집중되어 나타나는 반면(Fig. 5), 우식 비경험군의 경우 개인편차가 지극히 커서 관찰된 9명중 2명은 우식 경험군보다 낮고, 5명은 우식 경험군과 비슷하며, 2명은 높은 IgA 농도를 나타내었다(Fig. 6).

즉 *S. mutans*에 대한 항체가 우식 경험군과 우식 비경험군 모두에서 만들어졌으나, 우식경험군의 경우 일정량의 항체가 생성된 후, 더 이상의 항체 생성은 없는 경향을 보인 반면, 우식 비경험군의 경우 특정한 경향을 관찰하기 어려웠고, 개인적인 편차가 매우 큼을 알 수 있었다. 희석배수 평균치를 비교해 볼 때 우식 비경험군의 평균 희석배수는 2^{6.278±2.260}, 우식 경험군의

경우 $2^{5.730 \pm 0.499}$ 로 나타나, 이 결과로 추정된 IgA의 농도가 우식 비경험군에서 약간 높게 나타났다. 그러나 우식 비경험군의 경우 표준편차가 매우 높아 양 군 사이에 유의한 차이는 없으므로 나타났다. 즉 student t-test를 시행했을 때 $p=0.464$ 로 유의성은 없었다.

추정된 IgA의 상대적 농도와 연령 사이의 연관성을 보았을 때, 양 군 모두에서 연령에 따른 항체 농도의 증가 혹은 감소의 경향을 발견할 수 없었다. 성별에 따른 차이점의 경우 양군 모두에서 여아의 수가 각각 3명(우식경험군)과 2명(우식비경험군)으로 숫자가 적어 통계적인 의미를 파악하기는 어려웠으나, 우식경험군의 경우 $2^{5.80}$, $2^{5.75}$, $2^{5.90}$, 우식 비경험군의 경우 $2^{3.45}$, $2^{4.80}$ 으로 양 군 모두 여아의 경우에 평균치보다 높은 항체값을 보여주었다.

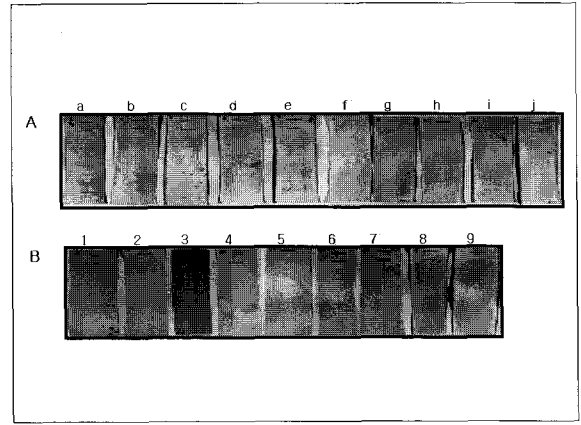


Fig. 2 Immuno-blot analysis for titration of salivary IgA to *S. mutans*. Saliva from caries-experienced (A) and non-experienced (B) group was used as primary antibody to serially diluted crude protein extracts of *S. mutans* serotype c.

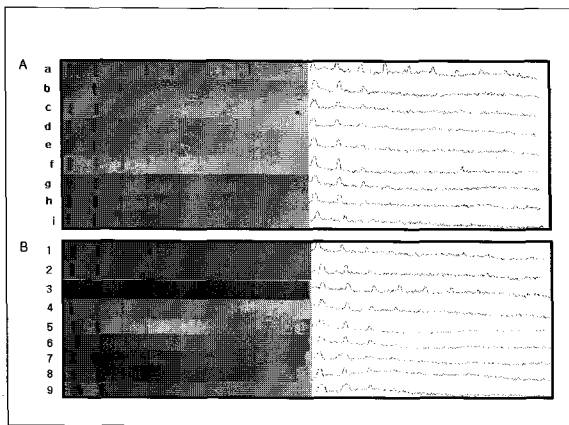


Fig. 3 Densitometry of immuno-slot blot results in caries-experienced (A) and non-experienced (B) group using Alphamager. Optical densities of each band was measured after subtracting background from each profile.

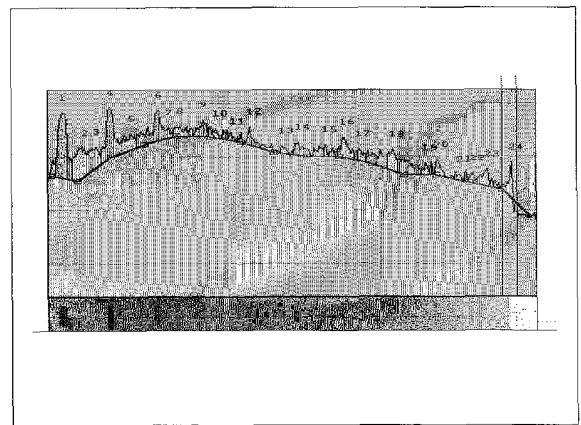


Fig. 4 Relative optical density of each band was measured after subtracting background from each profile.

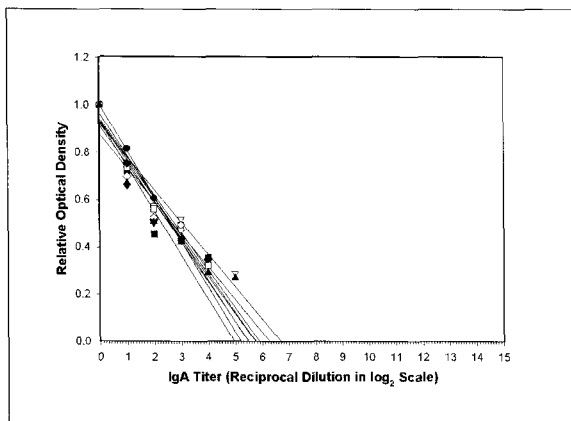


Fig. 5 Graph of IgA titer in caries-experienced group. Relative optical densities were plotted against dilution fold of blotted crude protein extracts of *S. mutans*.

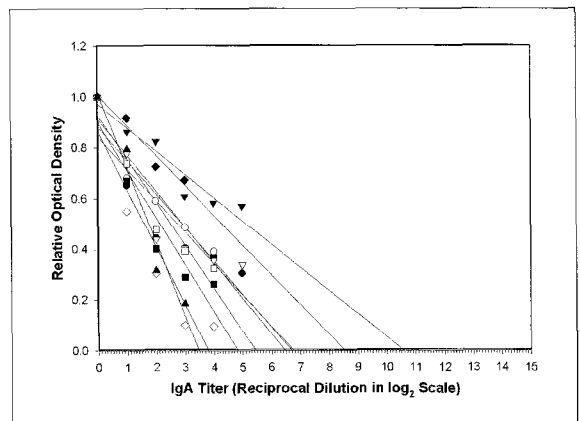


Fig. 6 Graph of IgA titer in non-experienced group.

IV. 총괄 및 고찰

치아 우식증을 유발하는 요인으로는 크게 숙주 요인, 병원체 요인, 환경 요인으로 대별될 수 있다. 여기에는 수많은 세부 요인들이 있어서 한 두 가지의 요소만으로 우식 감수성이 크고 적음을 판별할 수는 없다. 일반적인 우식 감수성에 대한 진단 방법으로 임상에서는 주로 *S. mutans*에 대한 수를 평가하는 방법과 타액분비량 및 완충능을 측정하는 방법이 많이 행해지고 있다. 전자로는 strip mutans test를 많이 사용하며 임상에서는 kit화되어 편리하게 사용이 가능하다. 그러나 세균의 수가 많음에도 불구하고 우식이 없는 경우도 있는 반면, 세균의 수는 상대적으로 적어도 우식이 호발되는 경우도 있을 수 있으며 이러한 경우 숙주의 항체 요소를 고려하지 않을 수 없을 것이다.

본 연구는 어린이의 치아우식증에 관여하는 여러 요인 중 숙주 방어기전의 하나인 항체 생산량을 측정하는 방법을 좀 더 쉽고 빠르게 정확하게 분석하는 방법을 개발하기 위한 목적으로 시도되었다. 질병 원인균에 의한 항체형성의 정도를 측정하기 위해 ELISA 등의 방법이 사용되지만 고가의 단일 클론 항체를 사용하는 등 그 방법이 경제적 부담이 크고 까다로운 면이 있다²³⁾. 따라서 치아우식증의 예방 및 치료 인자의 측정을 위해 보다 경제 적이며 다수의 대상자들에게 적합한 방법이 필요하다고 사료되었다. 본 연구는 치아우식증의 대표적인 원인균으로 생각되는 *S. mutans*에 대한 타액내 IgA 역가를 측정하는 것을 모델로 하여 그 방법을 개발하는데 목적을 두었다.

타액내 *S. mutans*에 대한 항체형성 정도를 알아보기 위한 기존의 방법으로는 ELISA와 western blot을 들 수 있다. ELISA의 경우 대량의 시료를 대상으로 항체의 양을 측정할 수 있는 유용한 방법이다. Chia 등은 중국인을 대상으로 우식 경험군과 비경험군 간의 항체형성정도를 ELISA법으로 시행하였으나, 이때의 항체는 *glucosyltransferase(GTF)*에 대한 항체의 양이지 *S. mutans*에 대한 전체적인 항체의 양은 아니었다²⁴⁾. 즉 ELISA는 정확도를 높이기 위해 단일 클론 항체를 사용하므로 정확도는 높으나 특정한 단백질에 대한 항체의 역가만을 측정하기에 전체적인 항체량을 측정하는데는 적합하지 못하고 고가의 시약과 기기를 사용해야만 하는 문제를 가지고 있다. Western blot의 경우 각각의 단백질을 전기영동을 통해 분리하고, 분리된 각 단백질에 반응하는 항체의 상대적인 양을 측정하는 것이므로 전체적인 항체의 양을 측정하는 방법이 되지는 못한다. 따라서 단일 미생물에 대한 항체 생성량을 간편하고 경제적으로 측정할 수 있는 방법으로는 본 연구에서 사용한 immuno-slot blot method가 유용할 것으로 생각되었다.

본 연구에서 개발한 immuno-slot blot method를 이용한 항체역가 측정의 기본 개념은, *S. mutans*의 단백질을 1/2씩 희석하여 nitrocellulose membrane에 결합시킨 후 일정 비율로 희석된 타액에 의해 검출될 수 없는 최대의 단백질 희석배수를 구하는 것이었다. 이는 타액내의 항체가 많으면 많을수록 소량의 단백질을 검출할 수 있으리라는 가정에 의한 것이었다. 일차 항원으로 사용된 타액의 경우 1/200으로 희석했을 때 ELISA

등에 의해 항체의 역가를 관찰할 수 있었던 기존의 결과에 비추어²⁵⁾ 충분한 양이 되도록 1/100 희석 배수를 사용하였다. 발색 반응 후 발색반응의 정도를 육안으로 판정하여 결과를 해석하기는 어려웠으나, densitometry에 의한 결과 분석시 단백질 희석배수와 각 band의 intensity는 거의 비례함을 보여주었고, 이를 band의 intensity를 읽지 못하는 단백질의 희석배수를 직선상에 존재하는 가상선을 추정함으로써 구할 수 있었다. 따라서 이 방법은 고가의 ELISA방법을 거치지 않고도 항체의 역가를 계산할 수 있는 간편한 방법으로 생각되었다. 그러나 이방법의 경우 ELISA와는 달리 항체의 절대치를 구할 수 없다는 단점이 있었는데, 정제된 항체를 사용하여 standard curve를 얻는다면 해결될 수 있을 것으로 사료되었다.

본 연구에서 개발한 immuno-slot blot method를 사용하여 3~6세 어린이를 대상으로 우식 경험군과 우식 비경험군 사이의 항체역가를 비교해 보았다. 그 결과 우식 경험군의 경우 매우 유사한 항체 역가가 도출되었으며, 이것은 우식 경험군의 경우라도 어느 정도의 항체는 생성됨을 보여주는 것으로 사료되었다. 그러나 우식 비경험군과 비교했을 때 높은 항체역가를 보이는 경우가 없었고, 우식의 정도와 항체역가의 값에 연관성이 없는 것으로 미루어 일정량 이상의 항체를 생산하지 못함으로써 치아우식에 대한 저항력이 항진되지 못하는 것이 치아우식의 한 원인으로 생각되었다. 반면 우식 비경험군의 경우 항체역가의 개인적인 편차가 매우 크게 나타남을 관찰할 수 있었다. 기존의 결과들로 유추해 보았을 때, 우식 비경험군의 경우 우식 경험군보다 높은 항체역가가 관찰되기를 기대하였으나²¹⁾, 평균치에서 높은 경향을 보이기는 하지만 개인차가 매우 큰 것으로만 결과가 도출되었다. 이것은 세균에 폭로된 경험이 적을 경우 오히려 항체의 역가가 낮을 수 있고, 군에 폭로된 경험이 많을 경우에만 많은 양의 항체가 생성되는 것으로 생각되며, 이를 증명하기 위해서는 각 개인의 *S. mutans*의 존재량을 측정 후 항체역가를 계산하고, 그 상관관계를 도출하는 연구가 향후 필요할 것으로 생각되었다.

이상의 결과를 고려해 볼 때, 치아우식증은 한 가지의 원인요소만 살펴보고 그 결과를 해석하는 것은 매우 위험할 것으로 생각되었다. 또한 치아우식증과 면역기능 간의 관계는 대단히 복잡하며 단순히 host-parasite relationship만으로 설명하기 곤란한데, 그 이유는 여기에는 많은 결정요인들이 작용하기 때문으로 판단되었다. 우선 이미 전술한 바와 같이, 원인 균주의 성격과 양이 중요한 인자로 작용하며, 각종 환경적 요인, 예를 들면, 식이, 생활습관, 구강위생상태 등이 또 다른 요인으로 작용할 수 있다. 더구나 인종에 따라 IgA의 *S. mutans*에 대한 반응 정도가 다름도 보고되고 있어^{26,27)}, 한 가지 요인만으로 요약하여 치아우식의 pathogenecity를 설명할 수는 없었다. 다만 최근의 보고에 의하면 우식 비경험군이나 우식 경험군 모두에서 타액내 IgA는 존재하며, *S. mutans*의 특정 단백질에 관여하는 특정 IgA의 농도 차이와 우식정도 간의 관련성이 있다고 하였다²⁵⁾. 이는 IgA의 양이 문제가 되기보다는 IgA의 양상이 더 큰 요인으로 작용함을 시사하지만, 이것은 개인적인 유전자의 차

이점부터 자라오면서 겪게 되는 여러 요인에 폭로되었을 때의 반응이 다름에 기인한 것이지, 이것에 우식증과 어떤 관련성을 부여하기는 어렵다는 반증이 있다^{19,25)}. 이러한 가설은 가족내의 타액내 IgA의 양상이 비슷하다는 결과²⁹⁾가 그 정당성을 뒷받침한다.

치아우식의 방어기전으로 *S. mutans*에 대한 항체가 작용하리라는 가설은 긍정적인 결과와 부정적인 결과가 공존한다. 일부 보고에 의하면, 타액내 IgA의 양이 많을수록 치아우식의 정도가 낮아 이 항체의 형성이 치아우식의 예방효과가 있다^{21,30,31)}. 그러나 다른 연구자들은 혈액내의 IgG 항체의 형성이 치아우식의 예방효과가 있고, 타액내 IgA의 경우 관련성이 없다는 보고도 있었다^{22,28)}. 이는 치아우식증의 원인과 방어기전이 다양함에 의한 것으로 사료된다. 타액을 예로 들어 볼 때, 타액 자체의 성질(점도, 분비량, 완충능력 ; pH 조절능력 등)뿐 아니라, 타액내 효소의 양 및 성격, 화학적 구성성분, 총 단백질의 양, 항체의 종류 등이 미생물에 대한 방어능력을 좌우한다^{32,35)}. 따라서 본 연구에서 알고자 한 항체의 생성량과 치아우식의 상관관계는 큰 의미를 부여하기 어려웠고, 측정 결과도 의미 있는 차이를 보여 주지는 못하였다. 그러므로 의미있는 결과의 도출을 위해서는 대상군의 수를 크게 늘이거나, 주변 환경요인이 거의 동일한 쌍생아를 통한 향후 연구가 필요할 것으로 사료되었다.

V. 결 론

본 연구는 어린이의 치아우식증을 야기하는 주된 원인균인 *S. mutans*에 대한 타액내 IgA의 양을 좀 더 쉽고 빠르게 정확하게 분석하는 방법을 개발할 목적으로 시도되었다. 본 연구에서 개발한 immuno-slot blot method를 이용하여 우식 경험군과 비경험군간의 타액내 IgA 역가를 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 본 연구에서 사용한 immuno-slot blot method는 기존의 ELISA나 western blot과 비교할때 하나의 미생물 전체에 대한 항체의 생성량을 간편하고 경제적으로 측정할 수 있는 방법이었다.
2. 우식 경험군의 항체역가는 최대단백질 희석배수가 $2^5 \sim 2^7$ 사이에서 집중되어 나타나는 반면, 우식 비경험군의 경우 개인 편차가 지극히 커서 관찰대상 9명중 2명은 우식 경험군보다 낮았고, 5명은 우식 경험군과 유사하였으며, 2명은 높은 IgA 농도를 나타내었다. 이는 우식 경험군의 경우라도 어느 정도의 항체는 생성됨을 보여주는 것으로 사료되었다. 그러나 우식 비경험군과 비교했을 때 높은 항체역가를 보이는 경우가 없었고, 우식의 정도와 항체역가의 값에 연관성이 없는 것으로 미루어 일정량 이상의 항체를 생산하지 못함으로써 치아우식에 대한 저항력이 항진되지 못하는 것이 치아우식의 한 원인으로 생각되었다. 반면 우식 비경험군의 경우 항체역가의 개인적인 편차가 매우 크게 나타났으며 이는 군에 폭로된 경험이 적을 경우에는 항체의 역가가 낮고, 군에 폭로된 경험이 많을 경우에는 많은 양의 항체가 생성된 것으로

사료되었다.

3. 희석배수 평균치를 비교해 볼 때 우식 비경험군의 평균 희석 배수는 $2^{6.278 \pm 2.260}$, 우식 경험군의 경우 $2^{5.730 \pm 0.499}$ 로 나타나, 이 결과로 추정된 IgA의 농도가 우식 비경험군에서 약간 높게 나타났다. 그러나 우식 비경험군의 경우 표준편차가 매우 높아 양 군 간에 유의한 차이는 없는 것으로 나타났다 (P=0.464).

참고문헌

1. Watt R, Sheiham A : Inequalities in oral health : a review of the evidence and recommendations for action. Br Dent J 187:6-12, 1999.
2. Cirino SM, Scantlebury S : Dental caries in developing countries. preventive and restorative approaches to treatment. New York State Dental Journal 64:32-39, 1998.
3. Bratthall D, Serinirach R, Hamberg K, et al. : Immunoglobulin A reaction to oral streptococci in saliva of subjects with different combinations of caries and levels of mutans streptococci. Oral Microbiol Immunol 12:212-218, 1997.
4. Tenovuo J : Salivary parameters of relevance for assessing caries activity in individuals and populations. Community Dent Oral Epidemiol 25:82-86, 1997.
5. Clarke JK : On the bacterial factor in the etiology of dental caries. British J Exp Pathol 5:141-147, 1924.
6. Hamada S, Michalek S, Kiyono H, et al. : Molecular microbiology and immunobiology of Streptococcus mutans. Elsevier Science Publishing Inc. New York pp.7-20, 1986.
7. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, et al. : Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th ed. Williams & Wilkins Baltimore, Maryland pp.20 & 527-558, 1994.
8. Slots J, Taubman MA : Contemporary Oral Microbiology and Immunology. Mosby St. Louis, MI pp.377-424, 1992.
9. Caufield PW, Cutter GR, Dasanayake AP : Initial acquisition of mutans streptococci infections in infants: evidence for a discrete window of infectivity. J Dent Res 72:37-45, 1993.
10. Alaluusua S, Kleemola-Kujala E, Grönroos L, et al. : Salivary caries-related tests as predictors of future caries increment in teenagers. Oral Microbiol Immunol 5:77-81, 1990.
11. Hamada S, Slade HD : Biology, immunology, and

- cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev 44:331-384, 1980.
12. Lindquist B, Edward S, Torell P, et al. : Effect of different caries preventive measures in children highly infected with *mutans streptococci*. Scand J Dent Res 97:330-337, 1989.
 13. Kohler B, Andreen I, Jonsson B, et al. : Effect of caries preventive measures on *Streptococcus mutans* & *lactobacilli* in selected mothers. Scand J Dent Res 90:102-108, 1982.
 14. Zickert I, Emilson CG, Krasse B : Effect of caries preventive measures in children highly infected with the bacterium *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol 27:861-868, 1982.
 15. Krasse B : From the art of filling teeth to the science of dental caries prevention : a personal review. J Public Health Dent 56:271-277, 1996.
 16. Axelsson P, Kristoffersson K, Karlsson R, et al. : A 30-month longitudinal study of the effects of some oral hygiene measures on *Streptococcus mutans* and approximal dental caries. J Dent Res 66:761-765, 1987.
 17. Andr en I, Köhler B : Effects of Weight Watchers' diet on salivary rate, buffer effect and numbers of *mutans streptococci* and *lactobacilli*. Scand J Dent Res 100:93-97, 1992.
 18. Lehner T, Challacombe SJ, Caldwell J : Immunological basis for vaccination against dental caries in rhesus monkeys. Nature 254:517-520, 1975.
 19. Smith DJ, Taubman MA, King WF : Effect of local deposition of antigen on salivary immune responses and reaccumulation of *mutans streptococci*. J Clin Immunol 10:273-281, 1990.
 20. Taubman MA, Smith DJ : Significance of salivary antibody in dental diseases. Ann N Y Acad Sci 694:202-215, 1993.
 21. Gregory RL, Filler SJ, Michalek SM, et al. : Salivary immunoglobulin and serum antibodies to *Streptococcus mutans* ribosomal preparations in dental caries-free and caries-susceptible human subjects. Infect Immun 51:348-351, 1986.
 22. Challacombe SJ, Lehner T : Serum and salivary antibodies to cariogenic bacteria in man. J Dent Res 55:139-148, 1976.
 23. Challacombe SJ, O'Hagan DT, McGee JP, et al. : Biodegradable microparticles for oral immunization. Vaccine 11:149-54, 1993.
 24. Chia JS, Lin SW, Yang CS, et al. : Antigenicity of a synthetic peptide from glucosyltransferases of *Streptococcus mutans* in humans. Infect Immun 65:1126-1130, 1997.
 25. Chia, JS, Chang WC, Yang CS, et al. : Salivary and serum antibody response to *Streptococcus mutans* antigens in humans. Oral Microbiol Immunol 15:131-138, 2000.
 26. Bratthall D : Discovery! A *Streptococcus mutans* safari! J Dent Res 76:1332-1336, 1997.
 27. Widerström L, Bratthall D, Hamberg K : Immunoglobulin A antibody activity to *mutans streptococci* in parotid, submandibular and whole saliva. Oral Microbiol Immunol 7:326-331, 1992.
 28. Challacombe SJ : Serum and salivary antibodies to *Streptococcus mutans* in relation to the development and treatment of human dental caries. Arch Oral Biol 25: 495-499, 1980.
 29. Smith DJ, Tauman MA, King WF, et al. : Immunological characteristics of a synthetic peptide associated with a catalytic domain of mutans streptococcal glucosyltransferase. Infect Immun 62:5470-5476, 1994.
 30. Block MS, Smith DJ, Ebersole JL, Taubman MA : Effects of saliva and sera from caries-free and caries-prone subjects on glucosyltransferase (GTF). J Dent Res 58:145-150, 1979.
 31. Lehtonen OP, Grahn EM, Stahlberg TH, et al. : Amount and avidity of salivary and serum antibodies against *Streptococcus mutans* in two groups of human subjects with different dental caries susceptibility. Infect Immun 3:308-313, 1984.
 32. McNabb PC, Tomasi TB : Host defense mechanisms at mucosal surfaces. Ann Rev Microbiol 35:477-496, 1981.
 33. Mandel ID : The functions of saliva. J Dent Res 66:623-627, 1987.
 34. Grahn E, Tenovuo J, Lehtonen OP, et al. : Antimicrobial systems of human whole saliva in relation to dental caries, cariogenic bacteria, and gingival inflammation in young adults. Acta Odontol Scan 46:67-74, 1988.
 35. Tenovuo JO : Human salivary: clinical chemistry and microbiology, Vol. 1, Florida:CRC Press, Inc., 151-160, 1989.

Abstract

**COMPARISON OF SALIVARY ANTIBODY IgA TITRE TO
STREPTOCOCCUS MUTANS BETWEEN THE CARIES-EXPERIENCED
AND NON-EXPERIENCED GROUPS USING IMMUNO-SLOT BLOT METHOD**

Jong-Hyeok Eum, Tae-Sung Jeong, Shin Kim

Department of Pediatric Dentistry, College of Dentistry, Pusan National University

The aim of this study is to develop and establish rapid, convenient, and accurate method of analyzing salivary IgA against *S. mutans* semi-quantitatively. Relative salivary IgA titer was calculated as maximum dilution fold of *S. mutans* protein that was not detected by salivary antibody after measuring relative intensity of the immuno blot bands by densitometry. Analyses were performed in caries-experienced and non-experienced children. Mean IgA titer of non-experienced group shows higher level than that of caries-experienced without statistical significance due to high individual variety of antibody titer in non-experienced group: $2^{6.278 \pm 2.260}$ in non-experienced group and $2^{5.730 \pm 0.499}$ in caries-experienced group ($p=0.464$). Those results suggest that naturally induced salivary IgA antibodies against *S. mutans* were present in all subjects, but high titer of antibodies were not achieved in caries-experienced group. On the contrary, antibody titer in non-experienced group shows marked individual variations suggesting that antibody production is multifactorial. In conclusion, immuno-slot blot method developed in this study would be useful and applicable in semi-quantitative analysis of antibodies.

Key words : Immuno-slot blot method, Salivary IgA, *Streptococcus mutans*