

6세 이하의 어린이에서 *Streptococcus mutans*와 *Streptococcus sobrinus*의 분포에 관한 연구

안승태 · 박재홍 · 이금호

경희대학교 치과대학 소아치과학교실

국문초록

Mutans streptococci는 치아우식증과 관련이 있다고 보고 되고 있으며, 이 streptococci 종 중에서 *S. mutans*나 *S. sobrinus*가 인간의 치아우식증에서 가장 일반적으로 나타난다. 치아우식증에서 이 세균종의 분포는 인종과 지역에 따라 다양하다.

본 연구에서는 2-6세인 52명의 치아우식증 환자에서 비우식부위와 우식부위로부터 치태를 채취하여 DNA를 추출한 후 *dex*와 *gtf* 유전자에 기초한 *S. mutans*와 *S. sobrinus*에 특이한 primer를 제작한 후 PCR을 시행하여 *S. mutans*와 *S. sobrinus*의 분포도를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 어린이 치아우식증 환자에서 *S. mutans*나 *S. sobrinus*가 발견된 어린이는 37명(71.2%)이었다.
2. 이들 어린이 중에서, *S. mutans* 또는 *S. sobrinus*가 비우식부위에서만 발견된 어린이는 3명(5.8%), 우식부위에서만 발견된 어린이는 22명(42.3%), 두 부위 모두에서 발견된 어린이는 12명(23.1%)이었다.
3. *S. mutans*나 *S. sobrinus*가 나타난 비우식부위 치태는 15개(28.8%), 우식부위치태는 34개(65.4%)였다.
4. 비우식부위의 경우 *S. mutans*만 출현한 어린이는 52명 중 8명(15.4%), *S. sobrinus*만 출현한 어린이는 6명(11.5%), 두 세균종이 같이 출현한 어린이는 1명(1.9%)이었다.
5. 우식부위에서 *S. mutans*만 출현한 어린이는 52명 중 24명(46.2%), *S. sobrinus*만 출현한 어린이는 2명(3.8%), 두 세균종이 같이 출현한 어린이는 8명(15.4%)이었다.
6. *S. mutans*는 *gtf*에 기초한 primer, *S. sobrinus*는 *dex*에 기초한 primer가 PCR에서 효과적으로 각각의 세균을 검출하였다.

이상의 결과로 미루어 우리나라 어린이의 경우 치아우식증은 MS와 밀접한 연관성이 있으며, MS 중에서도 *S. mutans*가 중요하다고 판단된다. 한편 *S. mutans*와 *S. sobrinus*의 동반출현은 치아우식증과 더욱 밀접한 관련이 있는 것으로 보인다.

주요어 : *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, Polymerase chain reaction (PCR)

I. 서 론

치아우식증은 어린이에서 가장 많이 발생하는 구강질환으로 치아상실을 초래하는 주요 원인이다. 선진국에서는 치아우식증

이 감소하고 있는 추세이지만 우리나라를 비롯하여 많은 나라에서는 아직도 치아우식증이 어린이의 구강 건강을 해치는 요인으로 남아있다.

치아우식증은 치태 내 세균에 의해 치아 경조직이 탈회되는 현상으로, 주 원인균은 mutans streptococci (이하 MS)로 알려져 있으며¹⁾, MS는 어린이에서 우식활성 정도와 깊은 관계가 있다. 동물에서 MS가 구강에 정착했을 때 일반적으로 우식이 환이 발견되지 않는 치아 평활면에서도 치아우식증이 발생할 수 있다²⁾. MS는 다양한 동물실험에서나 역학조사에서 치아우식증의 개시에 중요한 역할을 할 뿐만 아니라^{3,4)} 치아우식증이

교신저자 : 이금호

서울시 동대문구 회기동

경희대학교 치과대학 소아치과학교실

Tel: 02-958-9371

E-mail: ikeungho@khu.ac.kr

많이 진행된 우식부위 내 치태에서 MS가 많이 나타나는 것으로 미루어 우식의 진행에도 중요한 세균으로 인식되고 있다^{5,6}. 어린이에서 MS의 출현이 빨리 나타날수록 치아우식증의 시작 시기가 빨라지고 우식정도도 심하며, 특히 인접면 우식이 심하게 나타나고 있다^{7,8}.

MS는 과거 *Streptococcus mutans*로 불리던 생리·생화학적 성상이 서로 다른 이종성 세균군으로 현재는 생화학적, 혈청학적, 유전적 차이에 따라 *Streptococcus cricetus(criceti)*, *S. rattus (ratti)*, *S. ferus*, *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. macacae*, *S. downei* 등 7개의 세균종으로 분류된다⁹. *S. ferus*를 제외한다면 나머지 세균종들은 모두 동물에서 치아우식증을 유발하며, 이 우식원성은 효소 glycosyltransferase(GTF)를 이용하여 sucrose로부터 세포의 다당체인 glucan을 합성하는 능력과 직접적인 연관성이 있다^{5,6,9}.

MS 중에서 *S. mutans*와 *S. sobrinus*가 인간의 구강 내에서 가장 많이 발견되고, 이 두 세균종은 사람의 치아우식증과 가장 깊은 관련성을 갖고 우식부위의 치태 내에 나타나는 것으로 보고되고 있으며, 어린이에서도 치아우식증과 가장 관련이 깊은 세균으로 알려져 있다. 많은 역학조사결과에 따르면 두 세균 중에서도 *S. sobrinus*보다 *S. mutans*가 우식부위에서 더 많이 출현한다고 보고되고 있지만, 일부 조사에서는 *S. mutans*보다는 오히려 *S. sobrinus*가 높은 우식활성과 연관성이 있다고 보고하고 있다⁵⁻¹⁴. 한편 치아우식증이 거의 없는 어린이에서도 MS가 높은 출현빈도를 보이고 있고¹², MS(*S. mutans*)이외에 다른 세균종들도 치아우식증과 연관성이 있기 때문에¹⁵ 우리나라의 치아우식증에서 우선 MS의 중요성을 관찰하고 확인하는 것이 중요한 과제라 할 수 있다. 특히 *S. mutans*와 *S. sobrinus* 중 어느 종이 치아우식증과 밀접하게 관여되어 있는지를 밝히는 것은 치아우식증 발생기전과 어린이에서 치아우식증의 발현시기를 예측하고 예방하는데 매우 중요할 것이다⁵.

치아우식증에서 *S. mutans*와 *S. sobrinus*의 중요성을 관찰하기 위해서는 우선 믿을 만한 분리 배양방법이 필요하다. MS의 분리는 주로 mitis-salivarius(MS) 배지에서 시행되어왔다. 이 배지상에 형성된 MS의 집락은 다른 구강 streptococci와는 구별되지만 7개의 MS 세균종 간의 구별은 어렵다. Gold 등¹⁶은 MS를 선택배양하기 위해 MS 배지에 20% sucrose, 0.2 units/ml bacitracin이 첨가된 MSB배지를 고안하였다. 이 배지에서 *S. mutans*는 건조하고 간유리 표면 같은 집락을 형성하는 반면, *S. sobrinus*는 세포의 다당체 생산으로 집락주변에 점액이 형성되는 특징이 있지만¹⁷, 이 현상은 항상 나타나는 것이 아니기 때문에 집락의 특징만으로 두 세균을 구별하기는 어렵다. 그리고, MSB 배지에서 *S. mutans*와 *S. sobrinus*의 성장이 억제될 수 있고 억제정도는 *S. sobrinus*가 더 크기^{18,19} 때문에 MSB배지를 사용하여 정확히 두 세균을 구별, 동정하는 것은 어렵다. 또한 MSB배지를 사용하는 경우 MS배지보다는 덜 하지만 여전히 MS 이외의 균종이 성장할 수 있는 가능성이 있어¹⁶ 부정확한 결과를 초래할 수도 있다. 따라서, 세균종 동정

을 위해서는 추가검사가 필수적이다¹⁸. 집락을 보다 자세히 구별하기 위한 해부현미경의 사용⁷, 또는 일반적으로 많이 사용하고 있는 생화학 검사^{11,14}, membrane fatty acid spectra와 peroxidase 반응법 등은 MS 세균종을 동정하는 데 있어서는 부정확한 방법으로 알려져 있다¹⁹⁻²¹. 그 외에 특이항체를 이용한 면역형광법^{8,12}, 면역확산법¹⁴, immunoblot²⁰이나 DNA-DNA hybridization^{22,23}방법으로 보다 정확한 동정이 가능해졌으나 여전히 균을 먼저 분리해야하는 불편이 있고, 그 과정이 까다롭고 시간이 오래 걸리는 단점이 있다.

이 같은 단점을 극복하기 위해 최근 들어 세균종-특이 primer를 사용한 polymerase chain reaction(이하 PCR)을 이용하여 정확하게 MS에 속한 세균종을 동정하는 연구가 활발하게 진행되고 있다^{21,24-28}. 이 PCR방법은 세균배양방법이나 세균배양 후 시행하는 생화학, 면역학적, 유전학적 방법에 비해 용이하고 시간이 절약되고 특이성, 정확성, 효율성이 높다²⁹. 더구나 PCR방법은 매우 민감한 방법이라 조사대상 세균이 소수가 존재하더라도 검출이 가능하고^{25,27}, 세균분리 과정 없이 타액이나 치태를 직접 시료로 사용하여 MS를 동정할 수 있는 장점이 있다^{24,26-28}. 따라서 PCR방법은 치아우식증에서 MS의 의미를 확인하고 이해하는데 필요한 역학조사에서 최근 가장 각광받는 방법으로 인식되고 있다.

우리나라에서는 우식부위에서의 MS 세균 종 분포를 조사한 연구가 있었으나³⁰ 어린이에 대한 비교연구가 없었으므로 본 연구에서는 *S. mutans*와 *S. sobrinus*와 치아우식증과의 관계를 관찰하기 위하여 어린이 치아의 우식부위와 비우식부위로부터 치태를 채취한 다음, *S. mutans*와 *S. sobrinus*에 특이한 primer를 사용하여 PCR방법으로 이들 세균종의 치태 내 분포를 조사하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 우식부위 치태 시료 채취

경희대학교 치과대학 부속치과병원 소아치과에 내원한 2-6세 어린이 중에서 구내경과 탐침으로 검사하여 C2(C2:상아질까지 진행된 치아우식증)이상의 우식치아를 3개 이상 갖고 있는 환자 중 문진을 통해 최근 14일간 항생제 복용 또는 48시간 내에 전문적 불소도포 시술을 받은 경험이 없는 52명의 어린이를 선별하였다.

대조군으로 우식치아와 가능한 멀리 떨어져 있는 구치부에서 치아우식증이 없는 치아를 선택하여 순면으로부터 치은연상 치태를 멸균된 spoon excavator로 채취하였다. 실험군으로 치아우식증의 정도가 C2이상인 치아를 선택한 다음 이들 치아의 우식부위 치태를 멸균된 spoon excavator로 채취하였다. 채취한 치태는 멸균된 1ml phosphate-buffered saline(PBS)이 들어 있는 Eppendorf tube에 수집한 후 DNA 추출을 위해 즉시 실험실로 수송하였다.

2. Polymerase chain reaction (PCR)

1) 치태의 DNA정제

실험실로 수송된 치태시료는 vortex로 진탕한 다음 4℃에서 2분간 원심분리하여 상층액은 버리고 균pellet을 100μl lysis buffer (500mM Tris-HCl [pH 9.0], 20mM EDTA [pH 8.0], 10mM NaCl, 1% SDS)에 부유시켰다. 균부유액에 10 μl의 Proteinase K (20mg/μl)를 첨가하고 37℃에서 1시간 배양하였다. 동량의 P:C:I 용액(Sigma)을 넣고 vortex한 다음 4℃에서 20분간 원심분리하고 나서 상층액을 수집하였다. 수집한 상층액에 100% ethanol (500μl)을 첨가한 후 4℃에서 5분간 원심분리하여 상층액은 제거하고 원침된 DNA pellet은 다시 100% ethanol에 부유시키고 원심분리를 반복하였다. 상층액은 제거하고 DNA pellet을 공기 중에 건조시킨 후 TE buffer 20μl에 용해시켰다³¹⁾.

2) Primer 제작

우식부위와 비우식치아 부위의 치태 내 *S. mutans*와 *S. sobrinus*를 검색할 PCR을 위해 primer (Genotech)를 제작하였다. 우선 사용하는 치태시료 내 DNA의 존재여부를 확인하기

위한 확인용으로 universal primer를 제작하였다³¹⁾. *S. mutans*를 위한 primer로 *S. mutans*의 *dexA* 유전자 염기서열 중에서 *S. mutans*에만 존재하는 특이 염기서열에 해당하는 부위를 지정하는 forward, reverse primer²⁴⁾를 제작하였다. *S. sobrinus*를 위한 primer도 역시 *dex* 유전자에서 *S. sobrinus*에 특이한 염기서열에 따라 forward, reverse primer를 제작하였다²⁵⁾.

치태에 존재하는 *S. mutans*와 *S. sobrinus*를 PCR로 검색할 때 놓칠 수 있는 확률을 최대한 줄이기 위해, 위에 기술한 primer 이외에도 *S. mutans*를 위해서는 *gtfB*, *S. sobrinus*를 위해서는 *gtfI* 유전자에 기초하여 각 세균종에 특이한 primer²⁶⁾를 제작하였다(Table 1).

3) 표준균주

제작된 primer가 정상적으로 PCR산물을 만들어 낼 수 있을지와 PCR 조건의 표준화를 위해 표준균주는 *S. mutans* NCTC 10449와 *S. sobrinus* B-13를 사용하였다. Brain heart infusion(Difco) 액체배지에 표준균주로부터 위에서와 같은 방법으로 DNA를 추출하였다.

Table 1. Specific primer for *S. mutans* and *S. sobrinus* used in the present study

Primer set	Sequence (5' to 3')	Size (bp)	Reference
Universal primers	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG(F*) GGC TAC CTT GTT ACG ACT T(R)	3,480	31
<i>S. mutan (dexA)</i>	TAT GCT GCT ATT GGA GGT TC(F) AAG GTT GAG CAA TTG AAT CG(R)	1,272	24
<i>S. sobrinus (dex)</i>	TGC TAT CTT TCC CTA GCA TG(F) GGT ATT CGG TTT GAC TGC(R)	1,610	25
<i>S. mutans (gtfB)</i>	ACT ACA CTT TCG GGT GGC GGT G(F) CAG TAT AAG CGC CAG TTT CAT C(R)	517	26
<i>S. sobrinus (gtfI)</i>	GAT AAC TAC CTG ACA GCT GAC T(F) AAG CTG CCT TAA GGT AAT CAC T(R)	712	26

* F and R denote forward and reverse primers, respectively

Table 2. Composition of PCR mixture

Composition	Universal	dex	gtf
DNA template(20~60μg/μl)	2	2	2
Primer(F)	2 (10pmol)	0.5~1 (10pmol)	1 (1pmol)
Primer(R)	2 (10pmol)	0.5~1 (10pmol)	1 (1pmol)
Taq polymerase (5 units/μl)	0.25	0.2	0.2
10×buffer	2.5	2	2
MgCl ₂	1 (1mM)	1.2 (1.5mM)	1.2 (1.5mM)
dNTPs	2 (0.2mM)	1.6 (0.2mM)	1.6 (0.2mM)
Distilled water	13.25	11~12	11
Total(μl)	25	20	20

4) PCR

PCR은 primer (1~10pmol) 0.5~2 μ l, DNA template (20~60 μ g/ μ l) 2 μ l, dNTP (0.2mM) 1.6~2 μ l, MgCl₂ (1~1.5mM) 1~1.2 μ l, Taq polymerase (Takara; 5 units/ μ l) 0.2~0.25 μ l, 그리고 나머지는 증류수를 첨가하여 최종 용량을 20~25 μ l로 조절하였다(Table 2).

PCR은 *dex* primer를 사용하는 경우, 최초 denaturation을 위해 94 $^{\circ}$ C에서 3분간, 이후 30번의 PCR cycle은 95 $^{\circ}$ C에서 1분, 50 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 시행하였고, cycle이 끝난 후 72 $^{\circ}$ C에서 최종적으로 5분간 처리하였다. 한편, *gtf* primer를 사용할 때는 denaturation을 위해 95 $^{\circ}$ C에서 5분간, 이후 30번의 PCR cycle은 95 $^{\circ}$ C에서 30초, 59 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 시행하였고, cycle이 끝난 후 72 $^{\circ}$ C에서 최종적으로 10분간 처리하였다.

5) 전기영동 및 기록

PCR산물은 2% agarose gel상에서 전기영동하였고, gel은 ethidium bromide (0.5 μ g/ μ l)로 염색한 후 Gel Doc™ EQ (Bio-Rad)에서 PCR산물을 관찰하고 사진촬영하여 기록하였다.

III. 실험성적

1. 표준균주의 PCR 산물

Primer의 정확성과 효율성을 확인하기 위해 먼저 표준균주를 사용하여 PCR을 시행한 결과, 이전 연구에서 보고된 것처럼 *dexA* primer를 사용한 *S. mutans* PCR산물은 1,272bp, *gtfB* primer를 사용한 *S. mutans* PCR산물은 517bp, 그리고 *dex* primer와 *gtfI* primer를 사용한 *S. sobrinus*의 PCR산물은 각각 1,610bp, 712bp로 나타남으로서(Fig. 1) 위의 primer를 사용하여 환자로부터 얻은 DNA시료에 대한 PCR을 진행시켰다.

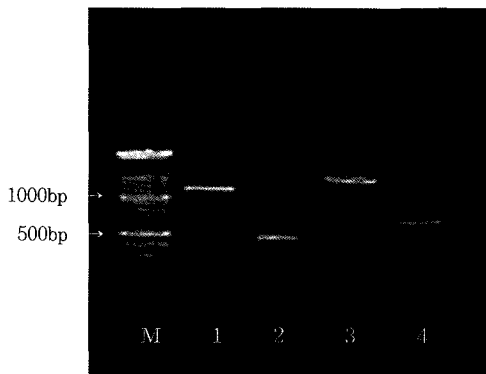


Fig. 1. Electrophoresis of PCR products of the reference bacterial DNA. Lanes : M, 100bp ladder DNA molecular weight marker (XIV; Roche); 1, *S. mutans* with *dexA* primer; 2, *S. mutans* with *gtfB* primer; 3, *S. sobrinus* with *dex* primer; 4, *S. sobrinus* with *gtf I* primer.

Table 3. Detection of MS in caries-free and caries-active plaques from children by PCR

Subjects	Age	<i>S. mutans</i>	<i>S. sobrinus</i>
1	4	-/+*	-/-
2	5	-/+	-/-
3	3	-/+	-/-
4	4	+/+	-/-
5	4	-/-	-/-
6	4	-/-	-/-
7	5	+/-	-/-
8	5	-/+	-/-
9	5	-/+	-/-
10	4	-/+	-/+
11	3	-/-	-/-
12	3	-/+	-/+
13	5	-/+	-/-
14	3	-/-	-/-
15	3	-/-	-/-
16	4	-/-	-/-
17	3	-/+	-/-
18	2	+/+	-/+
19	3	-/+	-/-
20	5	-/-	-/-
21	2	-/-	-/-
22	3	-/-	-/-
23	4	-/-	-/-
24	3	+/+	+/+
25	3	+/+	-/-
26	3	+/+	-/-
27	3	-/-	-/-
28	4	-/-	-/-
29	3	+/+	-/-
30	2	-/+	-/-
31	6	-/+	+/-
32	3	-/+	+/+
33	3	-/-	+/+
34	3	-/-	-/-
35	4	-/+	-/-
36	4	-/+	-/-
37	3	-/+	-/-
38	3	-/+	-/-
39	2	-/+	-/+
40	4	-/+	-/-
41	3	-/+	+/+
42	4	-/+	-/-
43	2	-/+	-/-
44	3	-/+	-/+
45	2	-/-	-/-
46	3	+/+	-/-
47	5	-/+	-/-
48	3	+/-	-/-
49	4	-/-	-/+
50	4	-/-	-/-
51	3	-/+	+/+
52	3	-/-	+/+

* -/+ indicates *S. mutans* was not found in caries-free plaques but in caries-active plaques

2. 어린이에서 MS의 분포도

52명의 어린이로부터 채취한 각각의 비우식치아부위와 우식부위의 치태 DNA를 template로 하여 PCR을 시행하여 MS의 분포도를 조사한 결과는 Table 3에 나타나 있다.

채취한 부위와 상관없이 이들 52명의 치아우식증 환자에서 MS의 분포도를 조사했을 때 MS가 발견된 어린이는 52명 중 37명(71.2%)이었고, 전혀 발견되지 않은 어린이는 15명(28.8%)이었다 (Table 4).

이들 치아우식증 환자 개개인의 치태 채취부위에 따른 MS의 분포도를 조사했을 때는, *S. mutans* 또는 *S. sobrinus*가 비우식부위에서만 발견된 어린이는 3명(5.8%), 우식부위에서만 발견된 어린이는 22명(42.3%), 두 부위 모두에서 발견된 어린이는 12명(23.1%)이었다(Table 4).

3. 치태 내 MS의 분포도

치아우식증 환자에서 채취한 각각의 비우식부위와 우식부위 치태에서 *S. mutans*와 *S. sobrinus* 분포도를 조사하였다. *S. mutans* 또는 *S. sobrinus*가 PCR로 검출된 치태는 비우식부

위의 경우 15개(28.8%), 우식부위의 경우 34개(65.4%)였다 (Table 5).

4. 치태 내 *S. mutans*와 *S. sobrinus*의 분포도

치태에서 *S. mutans*와 *S. sobrinus* 각각의 분포도를 조사하였다. 비우식치아부위에서 채취한 치태의 경우 *S. mutans*만 검출된 것은 52개 중 8개(15.4%), *S. sobrinus*만 검출된 것은 6개(11.5%), 두 세균종이 함께 검출된 것은 1개(1.9%)였다.

우식부위에서 채취한 치태의 경우, *S. mutans*만 검출된 것은 52개 중 24개(46.2%), *S. sobrinus*만 검출된 것은 2개(3.8%), 두 세균종이 같이 검출된 것은 8개(15.4%)였다 (Table 6).

5. Primer의 PCR 효율성

PCR에 사용된 각기 다른 primer가 *S. mutans*나 *S. sobrinus*를 검출하는데 얼마나 더 효과적인지를 비교하였다(Table 7). 비우식부위에서 *S. mutans*가 발견된 9개의 치태 중 7개(77.8%)는 *dexA*와 *gtfB* primer가 동시에 *S. mutans*를 검출

Table 4. Number of children harboring MS (MS) in their caries-free (CF) and caries-active (CA) plaques

Case	No. of children (%)
MS in CF only	3/52(5.8)
MS in CA only	22/52(42.3)
MS in CF and CA	12/52(23.1)
no MS in CF or CA	15/52(28.8)
Total	52/52(100.0)

Table 5. Number of children harboring MS (MS) in their plaques

Plaque	No. of children	No. of children with MS (%)
Caries-free	52	15(28.8)
Caries-active	52	34(65.4)

Table 6. Number of children harboring *S. mutans* and/or *S. sobrinus* in their caries-free and caries-active plaques

Occurrence	No. of children (%)	
	Caries-free plaques	Caries-active plaques
<i>S. mutans</i> only	8/52(15.4)	24/52(46.2)
<i>S. sobrinus</i> only	6/52(11.5)	2/52(3.8)
<i>S. mutans</i> + <i>S. sobrinus</i>	1/52(1.9)	8/52(15.4)
Total	15/52(28.8)	34/52(65.4)

Table 7. Detection efficiency of different primers for *S. mutans* and *S. sobrinus* in caries-free (CF) and caries-active (CA) plaques

MS		MS detected by					
		<i>dexA</i>	<i>gtfB</i>	<i>dexA</i> + <i>gtfB</i>	<i>dex</i>	<i>gtfI</i>	<i>dex</i> + <i>gtfI</i>
<i>S. mutans</i>	CF	1	1	7	-	-	-
	CA	2	7	23	-	-	-
<i>S. sobrinus</i>	CF	-	-	-	5	1	1
	CA	-	-	-	5	1	4

하였다. 그러나 dexA나 *gtfB* primer만이 검출된 경우도 각각 1개씩으로 나타났다. 우식부위에서 *S. mutans*가 발견된 32개의 치태 중 23개(71.9%)가 두 개의 primer 모두에 의해 *S. mutans*가 검출되었다. 두 primer 중 dexA primer에 의해서만 나타난 것이 2개(6.3%), *gtfB* primer에 의해서만 나타난 것은 7개(21.9%)나 되었다.

비우식부위에서 *S. sobrinus*가 발견된 7개 치태 중에서 dex와 *gtfI* primer 모두에 의해 *S. sobrinus*가 검출된 것은 1개에 불과하였고 대부분 (5개, 71.4%)은 dex primer에 의해서만 검출되었다. 한편 우식부위에서 *S. sobrinus*가 발견된 10개 치태 중에서 dex와 *gtfI* primer 모두에 의해 *S. sobrinus*가 검출된 것은 4개(40.0%), dex primer에 의해서만 검출된 것은 5개(50.0%), *gtfI* primer에 의해 검출된 것은 1개(10.0%)에 불과하였다.

IV. 고 찰

MS는 유치가 맹출하기 전에는 구강 내에서 거의 발견되지 않지만, 연령이 증가하고 맹출한 치아수가 증가할수록 MS가 출현하는 어린이의 비율도 증가한다. Masuda 등³²⁾은 생후 13~24개월 된 어린이의 약 40%에서 MS가 발견된다고 보고하였다. 이들 어린이에서 MS가 발견되는 시기가 가장 빠른 경우 13개월에도 나타난다고 하였다. 일반적으로 MS의 출현시기와 치태 내 분포율은 치아우식증의 발생과 정도에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으나^{5,8)}, 모든 치아우식증에 반드시 MS만이 관련되어 있는 것은 아니라는 연구보고도 또한 많이 있다^{12,15,33)}.

이와 같이 MS가 치아우식증과 관련성이 있는지에 대한 논리가 정립되지 않은 것은 종족이나 개인에 따라 나타날 수 있는 음식이나 음식섭취방법 등의 차이 때문에 나타난 현상일 수도 있다^{5,33-35)}. MS가 치아우식증에 중요하다고 했을 때 MS 중에서 사람에게서 많이 나타나는 것으로 알려진 *S. mutans*와 *S. sobrinus* 두 세균종 중 어느 것이 더 치아우식증과 연관성을 갖는지에 대해서도 아직까지는 분명하지 않아^{5,6,8,9,11-14)} 이에 대한 조사와 연구도 또한 필요하다.

본 연구에서는 52명의 2~6세 치아우식증 환자를 대상으로, 같은 환자에서 우식부위와 비우식치아부위로부터 각각 독립적으로 치태를 채취하여 보다 정확한 PCR방법으로 우식부위와 비우식부위에서의 *S. mutans*와 *S. sobrinus* 분포도의 차이를 비교함으로써 이들 세균과 치아우식증의 연관성을 조사하였다. 52명의 어린이환자에서 *S. mutans*나 *S. sobrinus*가 발견된 어린이는 모두 37명(71.2%)였다(Table 4). 본 연구와 비슷한 조건에서 치아우식증이 있는 3~5세 일본 어린이 77명으로부터 맹출이 완전히 일어난 치아에서 소독된 칫솔로 수집한 치태 시료를 PCR로 조사한 Okada 등²⁷⁾은 *S. mutans*와 *S. sobrinus*의 분포도가 85.8%라고 보고하였다. 이외에 직접적으로 비교할만한 연구는 없지만, 중국 내 소수민족 126명의 4개 제1대구치 치태를 PCR로 조사한 Wu 등²¹⁾의 연구에 따르면 약

90%가 *S. mutans*나 *S. sobrinus*를 갖고 있는 것으로 나타나 있다. 본 연구가 이들 연구에서 보고된 *S. mutans*나 *S. sobrinus* 분포도보다 다소 낮게 나타났다. 채취한 시료양이 이들 연구보다는 다소 적었기 때문에 세균을 일부 검출하지 못했을 가능성을 배제할 수는 없지만, 종족간의 차이일수도 있어 앞으로 보다 다양한 모집단을 대상으로 보다 많은 양의 시료를 채취하여 연구가 계속 진행되어야 할 것으로 생각된다.

어린이의 비우식부위 치태에서 *S. mutans* 또는 *S. sobrinus*가 발견된 경우는 52개중 15개(28.8%), 우식부위에서는 52개중 34개(65.4%)로 나타나, 비우식부위보다 우식부위에서의 분포도가 2배 이상 높게 나타났는데(Table 5), 이 결과는 MS의 출현이 치아우식증과 관련이 있다는 일반적인 견해와 일치한다. 앞서 언급한 연구들^{21,27)}에 비하면 *S. mutans*나 *S. sobrinus*가 적게 나타났음에도 불구하고 이 결과는 매우 의미 있는 결과라고 생각된다. 같은 치아우식증 환자에서 우식부위와 비우식부위로 구분하여 치태를 따로 채취했기 때문에, *S. mutans*와 *S. sobrinus*의 분포도가 비우식부위에 비해 우식부위에서 2배 이상 나타나서 MS가 치아우식증에 직접적으로 관련이 있다고 생각된다.

MS의 우식원성은 구강에 유입된 sucrose를 세균효소 GTF가 세포외 다당체인 glucan을 합성하고, glucan 때문에 세균세포의 간격이 커지면서 치태 내로 당의 유입이 쉬워지고 그로인해 세균의 산생산이 많아진다^{5,6)}. 본 연구에서 모든 우식부위에서 *S. mutans*나 *S. sobrinus*가 나타나지는 않았는데, 다른 MS 세균종이 우식부위에 관여하지³⁰⁾ 않았나 생각해 볼 수 있다. *S. mutans*나 *S. sobrinus*가 중요한 우식세균이긴 하지만 최근 치근부 우식증이나 우식 시작시기에 중요한 역할을 하는 Actinomyces 종, 치아우식증의 2차 원인균으로 인식되는 lactobacilli, 심부 우식증에 관여하는 것으로 밝혀진 Bifidobacterium 종¹⁵⁾들이 우리나라 어린이들에서는 MS 도움 없이 독자적으로 치아우식증을 유발했을 가능성이 있다. 이것을 MS의 분포도가 낮게 나타난 원인으로 생각해 볼 수 있을 것이다. 한편, glucan 합성이외에도 다른 세균에 비해 산성환경에 적응하는 능력(aciduricity)이 크다는 것이 MS의 우식원성에 기여하는 요인인데, 차이는 분명 있으나 최근 연구에 따르면 sanguinis streptococci도 산성환경에 처했을 때 적응할 수 있는 기전이 발현되고, 산생성능력도 증가한다는³⁶⁾ 사실에 주목할 필요가 있다.

본 연구에서 28.8%의 비우식부위에서도 *S. mutans*나 *S. sobrinus*가 발견되었다. Carlsson 등¹²⁾의 연구에서도 이들 세균종이 치아우식증이 없는 어린이에서 본 연구결과보다 높은 96%정도의 분포를 보였다. Carlsson 등¹²⁾은 배양방법으로 조사한 연구에서 치아우식증이 거의 없는 상황인데도 어린이의 타액 내 분포도가 높게 나타날 수 있다고 보고하였다. 이들은 연구에 참여한 특정집단이 치아우식증을 쉽게 유발하지 않는 생활을 하고 있는 데 반해, MS는 그 사이에 사람들에서 사람들로 빠르게 전파될 수 있기 때문에 나타난 결과라고 추측하였다. 따라서 앞으로 다양한 모집단에서 MS이외의 mitis 또는 sali-

V. 결 론

varius streptococci 등 다양한 세균^{15,28)}에 대한 조사도 아울러 이루어져야 할 것으로 생각된다.

본 연구에서 *S. mutans*가 비우식부위의 9개 치태(17.3%), 우식부위에서는 32개 치태(61.5%)에서 나타났다. *S. sobrinus*는 비우식부위에서 7개(13.5%), 우식부위에서 10개(19.2%)로 나타나, *S. mutans*가 *S. sobrinus*보다 분포도가 높을 뿐만 아니라 치아우식증과도 더 관계가 깊은 것으로 생각된다. 이것은 기존에 발표된 여러 연구들의 결과^{5,23,26,28,32)}와 일치하고 있다. 그러나 Igarashi 등²⁵⁾은 치아우식증이 있는 어린이와 어린이의 치태에서 *S. sobrinus*가 각각 83%, 61%의 분포를 나타내기 때문에 *S. sobrinus*도 치아우식증에 중요한 세균이라고 발표하였다. 본 실험에서는 Igarashi 등²⁵⁾이 사용한 것과 같은 primer를 사용하였으나 낮은 *S. sobrinus*의 분포도를 보였다. 이것은 조사대상자 고유의 차이라고 판단되고, 적어도 우리나라 어린이의 경우는 *S. sobrinus*는 치아우식증에서 의미가 적다고 판단된다. 최근 들어 *S. sobrinus*는 치아우식증과 관계가 없는 것으로 인식되고 있다¹⁵⁾.

*S. sobrinus*는 대부분의 경우 *S. mutans*와 같이 나타나고⁸⁾, 같이 나타날 경우는 이 두 세균종이 단독으로 나타날 때보다 치아우식증이 심한 것으로 알려지고 있다^{21,27)}. 본 실험은 dmft지수와 상관없이 우식이 진행되고 있는 우식활성부위에서 직접 치태를 채취하여 *S. mutans*와 *S. sobrinus*의 분포도를 조사했기 때문에 dmft와의 연관성을 유추하기 힘들다. 그러나 *S. mutans*와 *S. sobrinus*가 함께 나타난 9개 치태 중 8개가 우식부위치태에서 나타난 사실은 *S. mutans*와 *S. sobrinus*가 함께 있으면 치아우식활성도 커진다고 생각된다.

본 실험에서 *S. mutans*와 *S. sobrinus*를 최대한 많이 발견하기 위해 *dex* 유전자와 *gtf* 유전자에 기초하여 제작한 2가지 primer를 사용하였다. 그 결과 *dex*와 *gtf* primer 모두가 *S. mutans*를 검출한 경우는 전체 41개 중 30개였고(73.2%), *gtf*유전자를 기준으로 한 primer가 *dex* primer보다는 민감한 것으로 나타났다. *dex*와 *gtf* primer 모두가 *S. sobrinus*를 검출한 경우는 전체 17개 중 5개(29.4%)에 불과했다. *dex* primer만으로 *S. sobrinus*를 검출한 경우가 10개(58.8%), *gtf* primer는 2개(11.8%)에 불과하여 *S. sobrinus*의 경우는 *dex* primer가 보다 효율적이라 판단된다. 이런 primer의 PCR 효율성 차이는 연구들마다 결과가 다르게 나타난다. 임상시료로부터 직접 특정세균을 검색하고자 할 때는 그 특정세균에 보다 민감한 primer를 선택하는 것이 중요할 것으로 생각되며, 가능하다면 1개 세균종에 1개 이상의 primer를 병용하여 PCR을 시행하는 것이 필요하다고 사료된다.

PCR이 빠르고, 정확하고, 믿을 만한 검색방법이지만 정량이 되지 않는 것이 단점이다. 그러나 앞으로 real-time PCR³⁷⁾과 같은 방법을 사용하면 정량이 가능해지기 때문에 MS의 분포도 뿐만 아니라 치태 내 분포정도도 평가할 수 있을 것으로 보이며, 그러면 앞으로 MS와 치아우식증의 관계도 보다 정확하게 밝힐 수 있을 것으로 기대한다.

2~6세인 52명의 치아우식증 환자에서 비우식부위와 우식부위로부터 치태를 채취하여 DNA를 추출한 후 *dex*와 *gtf* 유전자에 기초한 *S. mutans*와 *S. sobrinus*에 특이한 primer를 제작한 후 PCR을 시행하여 *S. mutans*와 *S. sobrinus*의 분포도를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 어린이 치아우식증 환자에서 *S. mutans*나 *S. sobrinus*가 발견된 어린이는 37명(71.2%)이었다.
2. 이들 어린이 중에서, *S. mutans* 또는 *S. sobrinus*가 비우식부위에서만 발견된 어린이는 3명(5.8%), 우식부위에서만 발견된 어린이는 22명(42.3%), 두 부위 모두에서 발견된 어린이는 12명(23.1%)이었다.
3. *S. mutans*나 *S. sobrinus*가 나타난 비우식부위 치태는 15개(28.8%), 우식부위치태는 34개(65.4%)였다.
4. 비우식부위의 경우 *S. mutans*만 출현한 어린이는 52명 중 8명(15.4%), *S. sobrinus*만 출현한 어린이는 6명(11.5%), 두 세균종이 같이 출현한 어린이는 1명(1.9%)였다.
5. 우식부위에서 *S. mutans*만 출현한 어린이는 52명 중 24명(46.2%), *S. sobrinus*만 출현한 어린이는 2명(3.8%), 두 세균종이 같이 출현한 어린이는 8명(15.4%)이었다.
6. *S. mutans*는 *gtf*에 기초한 primer, *S. sobrinus*는 *dex*에 기초한 primer가 PCR에서 효과적으로 각각의 세균을 검출하였다.

이상의 결과로 미루어 우리나라 어린이의 경우 치아우식증은 MS와 밀접한 관련성이 있으며, MS 중에서도 *S. mutans*가 중요하다고 판단된다. 한편 *S. mutans*와 *S. sobrinus*의 동반출현은 치아우식증과 더욱 밀접한 관련이 있는 것으로 보인다.

참고문헌

1. Loesche WJ, Straffon LH : Longitudinal investigation of the role of *Streptococcus mutans* in human fissure decay. *Infect Immun*, 26:498-507, 1979.
2. Tanzer JM, Hageage GJ Jr, Larson RH : Variable experiences in immunization of rats against *Streptococcus mutans* associated dental caries. *Arch Oral Biol*, 18:1425-1439, 1973.
3. Beighton D, Hayday H, Walker J : The acquisition of *Streptococcus mutans* by infant monkeys (*Macaca fascicularis*) and its relationship to the initiation of dental caries. *J Gen Microbiol*, 128:1881-1892, 1982.
4. de Stoppelaar J, van Houte J, Dirks OB : The relationship between extracellular polysaccharide-producing streptococci and smooth surface caries in 13-year-old children. *Caries Res*, 3:190-200, 1969.

5. Loesche WJ : Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol Rev, 50: 353-380, 1986.
6. van Houte J : Role of micro-organisms in caries etiology. J Dent Res, 73:672-681, 1994.
7. Alaluusua S, Renkonen O-V : *Streptococcus mutans* establishment and dental caries experience in children from 2 to 4 years old. Scand J Dent Res, 91:453-457, 1983.
8. Köhler B, Andréen I, Jonsson B : The earlier the colonization by MS, the higher the caries prevalence at 4 years of age. Oral Microbiol Immunol, 3:14-17, 1988.
9. Coykendall AL : Classification and identification of the viridans streptococci. Clin Microbiol Rev, 2:315-328, 1989.
10. Tanzer JM, Freedman ML, Fitzgerald RJ, et al. : Diminished virulence of glucan synthesis- mutants of *Streptococcus mutans*. Infect Immun, 10:197-203, 1974.
11. Van Palenstein Helderma WH, Ijsseldijk M, Huis in't Veld JHJ : A selective medium for the two major subgroups of the bacterium *Streptococcus mutans* isolated from human dental plaque and saliva. Arch Oral Biol, 28:599-603, 1983.
12. Carlsson P, Gandour IA, Olsson B, et al. : High prevalence of MS in a population with extremely low prevalence of dental caries. Oral Microbiol Immunol, 2:121-124, 1987.
13. Fujiwara T, Sasada E, Mima N, et al. : Caries prevalence and salivary MS in 0~2-year-old children of Japan. Community Dent Oral Epidemiol, 19:151-154, 1991.
14. Hirosho H, Hirosho K, Isogai E, et al. : Close association between *Streptococcus sobrinus* in the saliva of young children and smooth-surface caries increment. Caries Res, 27:292-297, 1993.
15. Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, et al. : Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. Infect Immun, 40:1001-1009, 2002.
16. Gold OG, Jordan HV, van Houte J : A selective medium for *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol, 18:1357-1364, 1993.
17. Emilson CG : Prevalence of *Streptococcus mutans* with different colonial morphologies in human plaque and saliva. Scand J Dent Res, 91:26-32, 1993.
18. Jordan HV : Cultural methods for the identification and quantitation of *Streptococcus mutans* and lactobacilli in oral samples. Oral Microbiol Immunol, 1:23-27, 1986.
19. Rupf S, Merte K, Eschrich K, et al. : Peroxidase reaction as a parameter for discrimination of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. Caries Res, 35:258-264, 2001.
20. de Soet JJ, van Dalen PJ, Pavicic MJAMP, et al. : Enumeration of MS in clinical samples by using monoclonal antibodies. J Clin Microbiol, 28: 2467-2472, 1990.
21. Wu H, Fan M, Zhou X, et al. : Detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* on the permanent first molars of the Mosuo people in China. Caries Res, 37:374-380, 2003.
22. Smorawinska M, Kuramitsu HK : DNA probes for detection of cariogenic *Streptococcus mutans*. Oral Microbiol Immunol, 7(3):177-181, 1992.
23. Cangelosi GA, Iversen JM, Zuo Y, et al. : Oligonucleotide probes for MS. Mol Cell Probes, 8:73-80, 1994.
24. Igarashi T, Yamamoto A, Goto N : Direct detection of *Streptococcus mutans* in human dental plaque by polymerase chain reaction. Oral Microbiol Immunol, 5:294-298, 1996.
25. Igarashi T, Yamamoto A, Goto N : PCR for detection and identification of *Streptococcus sobrinus*. J Med Microbiol, 49:1069-1074, 2000.
26. Oho T, Yamashita Y, Shimazaki Y, et al. : Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human salivary polymerase chain reaction. Oral Microbiol Immunol, 15:258-262, 2000.
27. Okada M, Soda Y, Hayashi F, et al. : PCR detection of *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* in dental plaque samples from Japanese pre-school children. J Med Microbiol, 51:4443-4447, 2002.
28. Hoshino T, Kawaguchi M, Shinmizu N, et al. : PCR detection and identification of oral streptococci in saliva samples using *gtf* genes. Diagn Microbiol Infect Dis, 48:195-199, 2004.
29. Igarashi T, Yamamoto A, Goto N : Rapid identification of mutans streptococcal species. Microbiol Immunol, 40:867-871, 1996.
30. 이진용, 최유진, 하윤문 : 치아우식증환자와 치아정상인의 치태에서 분리한 *Streptococcus mutans*의 혈청형 분포에 관한 조사연구. 대한미생물학회지, 18:23-29, 1983.

31. 박은아, 김선영, 김유영 등 : 치주염환자에서 흡연과 비흡연 상태에 따른 Porphyromonas gingivalis fimA 유전형 분포의 차이. J Bacteriol Virol, 33:119-129, 2003.
32. Masuda N, Tsutsumi N, Sobue S, et al. : Longitudinal survey of the distribution of various serotypes of *Streptococcus mutans* in infants. J Clin Microbiol, 10:497-502, 1979.
33. Toi CS, Cleaton-Jones PE, Daya NP : MS and other caries-associated acidogenic bacteria in five-year-old children in South Africa. Oral Microbiol Immunol, 14:238-243, 1999.
34. Grindefjord M, Dahillof G, Wikmer S, et al. : Prevalence of MS in one-year-old children. Oral Microbiol Immunol, 6:280-283, 1991.
35. Galaviz LAA, Medina M, DCA, Garcia ICE : Detection of potentially cariogenic strains of *Streptococcus mutans* using the polymerase chain reaction. J Clin Pediatr Dent, 27:47-52, 2002.
36. Takahoshi N, Yamada T : Acid-induced acid tolerance and acidogenicity of non-MS. Oral Microbiol Immunol, 14:43-48, 1999.
37. Rupf S, Merte K, Kneist S, et al. : Comparison of different techniques of quantitative PCR for determination of *Streptococcus mutans* counts in saliva samples. Oral Microbiol Immunol, 18:50-53, 2003.

Abstract

PREVALENCE OF *STREPTOCOCCUS MUTANS* AND *STREPTOCOCCUS SOBRINUS*
IN CHILDREN UNDER 6 YEARS OF AGE

Seung-Tae Ahn, Jae-Hong Park, Keung-Ho Lee

Department of Pediatric Dentistry, College of Dentistry, Kyung Hee University

Mutans streptococci have been reported to be implicated in dental caries. Of these streptococcal species, *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* are most commonly found in human dental caries. Prevalence of these bacterial species in dental caries is found to be varied in different races and countries. Therefore, importance of these bacteria in dental caries remains to be determined. The present study was performed to detect *S. mutans* and *S. sobrinus* in 52 Korean children with dental caries between 2 to 6 years of age. For the study, plaque samples were collected from caries-active(CA) and caries-free(CF) teeth of each subject. DNA was extracted from the plaques and amplified by polymerase chain reaction(PCR) using primers corresponding to *dex* and *gtf* genes. The results obtained from the study were as follows:

1. Of 52 children, 37 children (71.2%) were found to harbor *S. mutans* and/or *S. sobrinus*.
2. Of the MS-infected 37 children, 3 children (5.8%) harbored *S. mutans* and/or *S. sobrinus* in the CF plaques only, 22 children (42.3%) in the CA plaques only and 12 children (23.1%) in both CF and CA plaques.
3. *S. mutans* and/or *S. sobrinus* were detected in 34 CA plaques (65.4%), while 15 in CF plaques (28.8%).
4. In the case of CF plaques, 8 plaques (15.4%) were observed to harbor *S. mutans* only, 6 plaques (11.5%) to harbor *S. sobrinus* only and 1 plaque (1.9%) to harbor both species.
5. Of CA plaques, 24 plaques (46.2%) were detected to have *S. mutans* only, 2 plaques (3.8%) to have *S. sobrinus* only and 8 plaques (15.4%) to have both species.
6. In comparison with the efficiency of two different primers for PCR, it was found that the primer based on *gtf* gene was more effective in detecting *S. mutans*, while the primer corresponding to *dex* gene was better for *S. sobrinus*.

Overall results suggest that MS appears to be important in dental caries of the Korean children, and *S. mutans* is more closely associated with than dental caries as compared to *S. sobrinus*.

Key words : *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, Polymerase chain reaction (PCR)