creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

**저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.**

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

치의과학박사 학위논문

# Silver diamine fluoride가 타액 생물막과 치아의 물리적 특성에 미치는 영향

2021년 2월

서울대학교 대학원

치의과학과 소아치과학 전공

서 미 경

# Silver diamine fluoride가 타액 생물막과 치아의 물리적 특성에 미치는 영향

지도교수 김 영 재

이 논문을 치의과학박사 학위논문으로 제출함

**2020년 10월**


서울대학교 대학원

치의과학과 소아치과학 전공

서 미 경


서미경의 치의과학박사 학위논문을 인준함

**2021년 1월**

위 원 장 _____ 장 기 택 _____ (인)

부위원장 _____ 김 영 재 _____ (인)

위 원 _____ 진 보 형 _____ (인)

위 원 _____ 송 지 수 _____ (인)

위 원 _____ 이 성 훈 _____ (인)

국문초록

# Silver diamine fluoride가 타액 생물막과 치아의 물리적 특성에 미치는 영향

서울대학교 대학원 치의과학과 소아치과학 전공
(지도교수 김 영 재)
서 미 경

## 1. 목적

치아우식은 소아에서 주된 만성질환 중 하나로, 치료하지 않은 치아우식은 통증 및 치성감염을 유발할 수 있으며, 아동의 성장과 삶의 질에도 영향을 줄 수 있다. 최근 치과 치료를 받기 힘들거나 접근이 힘든 환자에 있어서 우식병소의 통상적인 수복 대신 병소를 정지시키는 것이 추천되었다. 이를 위해 치아우식의 정지에 효과적이고, 저렴한 비용으로 도포할 수 있는 silver diamine fluoride (SDF)를 사용하는 것이 제안되었다. SDF는 항미생물효과를 보이며, 치아의 재광화를 촉진하고 탈회를 억제하며, 상아질의 교원질이 분해되는 것을 억제하는

등의 효과가 있는 것으로 알려져 있다. SDF의 항미생물효과와 SDF 도포시의 치아의 물리적 특성 변화에 대해서 연구한 논문들이 존재하나, 제한된 종류의 미생물을 이용하여 실험을 진행하였으며, 유치에 도포했을 경우에 대한 연구가 부족하다. 따라서 이 연구는 우식원성의 타액 생물막을 이용하여 SDF의 항미생물효과를 평가하고 SDF가 유치의 물리적 특성에 미치는 영향에 대해 평가하고자 시행되었다.

## 2. 방법

세균이 제거된 타액을 이용하여 8-well glass chamber와 12-well polystyrene plate에 획득피막과 유사한 타액막을 형성하였다. 세균이 포함된 혼합타액과 자당이 포함된 brain heart infusion 배양액을 혼합하여 배지를 만든 후 *Streptococcus mutans* ATCC 25175를 첨가하여 타액 미생물이 포함된 배지를 제작하였다. 이를 타액으로 코팅된 8-well glass chamber와 12-well polystyrene plate에 접종하고 배양하여 우식원성의 타액 생물막을 형성하였다. SDF가 우식원성의 생물막에 미치는 영향을 평가하기 위해 타액 생물막이 형성된 12-well polystyrene plate에 SDF를 처리한 후 집락형성단위(CFU)를 측정하였다. 또한 8-well glass chamber에 형성된 타액 생물막에 SDF를 처리한 후 live/dead staining kit를 이용하여 염색하고 공초점레이저주사현미경으로 관찰하였다. 치아에서의 항미생물효과를 평가하기 위해 유치 법랑질과 상아질 시편의 실험군에

SDF를 처리한 후 12-well polystyrene plate에 타액 미생물이 포함된 배지와 치아 시편을 넣고 배양하여 치아 시편 상방에 생물막을 형성하였다. 대조군은 SDF를 처리하지 않고 동일한 과정을 진행하였다. 이후 실험군과 대조군의 생물막 CFU를 측정하고, 배지의 CFU 또한 측정하였다. SDF가 치아의 물리적 특성에 미치는 영향을 평가하기 위해 치아 시편의 미소경도와 표면 거칠기를 측정하였다.

# 3. 결과

타액 생물막에 SDF를 처리한 경우, 전체 미생물과 *S. mutans*가 시간 경과에 따라 유의하게 감소되었다($p < 0.001$). 공초점레이저주사현미경으로 관찰 시 생물막 내 죽은 세포가 시간 경과에 따라 점차 증가되었다. 치아 시편에 SDF를 도포한 후 우식원성의 생물막을 배양한 결과, SDF 도포시 생물막의 형성이 저해되는 것으로 나타났다($p = 0.029$). 법랑질 시편과 상아질 시편을 이용한 실험 모두에서 배지의 플랑크톤 미생물 또한 증식이 억제되었다($p = 0.029$). 법랑질과 상아질 시편에 SDF를 처리한 경우 시편의 미소경도가 증가하였다(법랑질 : $p = 0.028$, 상아질 : $p = 0.002$). 법랑질 시편에서는 SDF 도포시에 표면 거칠기가 유의하게 감소되었다($p = 0.002$).

이번 연구 결과 SDF가 뛰어난 항미생물효과를 보이며, SDF 처리시 치아우식 병소가 경화됨을 확인할 수 있었다. SDF의 이러한 효과들로 인해 임상에서의 항우식효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

**주요어** : Silver diamine fluoride, 물리적 특성, 미소경도, 우식원성 생물막, 유치, 타액 생물막, 표면 거칠기

**학번** : 2016 - 35968

# 목차

I. 서론 ..... 1

II. 연구 대상 및 방법 ..... 7

1. 연구 재료 및 대상 ..... 7

2. 항미생물 효과 평가 ..... 7

2.1. Silver diamine fluoride에 대한 *S. mutans*의 민감도 평가 ..... 7

2.2. Silver diamine fluoride의 항생물막 효과 평가 ..... 8

2.3. 치아에 대한 항미생물 효과 평가 ..... 13

3. 치아의 물리적 특성에 미치는 영향 평가 ..... 14

3.1. 치아 시편 준비 ..... 14

3.2. 미소경도(Microhardness)에 대한 영향 평가 ..... 16

3.3. 표면 거칠기(Surface roughness)에 대한 영향 평가 ..... 16

4. 통계 분석 ..... 17

III. 연구 결과 ..... 17

1. 항미생물 효과 평가 ..... 17

1.1. Silver diamine fluoride에 대한 *S. mutans*의 민감도 평가 ..... 17

1.2. Silver diamine fluoride의 항생물막 효과 평가 ..... 19

1.3. 치아에 대한 항미생물 효과 평가 ..... 21

2. 치아의 물리적 특성에 미치는 영향 평가 ..... 24

2.1. 미소경도(Microhardness)에 대한 영향 평가 ..... 24

2.2. 표면 거칠기(Surface roughness)에 대한 영향 평가 ..... 24

IV. 총괄 및 고찰 ..... 25

V. 결론 ..... 42

참고문헌 ..... 44

Abstract ..... 60

# I. 서론

지난 수십 년간 치아우식의 유병율은 크게 감소하였으나 치아우식은 여전히 소아의 주된 만성질환 중 하나이다[1-5]. 일부 연구에서는 치아우식의 유병률이 감소 추세를 보이다가 최근 다시 증가하고 있음을 보고한 바 있다[6]. 치아우식 유병률이 증가한 원인은 명확하게 파악하기는 어려우나, 사회경제적으로 낮은 계층에 있는 아동이나 이민자 등이 치아우식 예방 관련 혜택을 보지 못하는 점, 또는 식습관의 변화 등이 원인으로 추정된다[6].

유아기 우식증의 유병률은 스웨덴 11.4%, 이탈리아 7 - 19%, 그리스 36%, 일본 41% 브라질 45.8%, 미국 50%, 인도 51.9%, 이스라엘 64,7%, 캐나다 74%, 팔레스타인 76%, 아랍에미리트 83%로 보고된 바 있으며, 나라와 인종, 문화 등에 따라 다양하게 나타난다[5-9].

우리나라의 아동 구강건강실태조사 결과에 따르면, 5세 아동의 유치우식경험자율은 1995년 82%에서 2010년 61.5%로 감소하였으나, 이후 약간 증가하는 추이를 보여 2018년 68.5%로 조사되었다. 또한 5세 아동 1인이 평균적으로 보유하고 있는 우식경험유치수는 1995년 5.7개에서 큰 감소를 보여 2006년도에 2.8개로 조사되었고, 이후 약간 증가하여 2015년도에는 3.4개로 조사되었다[10-14]. 이렇듯 여전히 절반 이상의 소아가 치아우식에 이환되고 있으며, 치아우식의 유병률 감소가 둔화되고 오히려 약간의 증가추세를 보이고 있다.

사회경제적 지위가 낮거나 치과가 충분하지 않은 곳에 거주하여 치과

진료에 접근이 힘든 그룹은 여전히 높은 치아우식 유병률을 보이고 있으며 치과 치료를 제대로 받지 못하는 경우도 존재한다[2, 15-18]. 또한 행동유도가 힘든 소아나 장애인의 치아우식 치료는 어려움을 동반한다. 이러한 경우 행동유도를 위해 진정법이나 전신마취 등의 부가적인 방법이 필요할 수 있으며 이는 많은 비용이 요구된다[19, 20]. 뿐만 아니라 의과적인 문제로 인해 치과치료를 받기 힘든 경우도 존재한다[21]. 치료되지 않은 치아우식은 통증과 감염을 유발할 수 있으며, 치아우식 치료가 제대로 이루어지지 않을 경우 아동의 전신 건강에까지 영향을 미쳐 아동의 성장과 삶의 질 등에도 영향을 줄 수 있다[22].

따라서 치과치료를 받기 힘들거나 접근이 힘든 아동에 있어서 치료받지 못한 우식병소를 정지시키는 것이 추천되었으며, 이를 위해 silver diamine fluoride (이하 SDF)를 도포하는 것이 제안되었다. SDF 도포의 주된 이점은 다음과 같다. 우선 효과적으로 우식을 정지시켜서 치료되지 않은 우식으로 인한 통증과 감염의 위험을 예방할 수 있다. 치료 비용이 저렴하며, 치료를 위해 고비용의 장비나 부대시설이 필요하지 않다. 또한 치료 과정이 단순하며 비침습적이다[21, 23-27].

소아치과 분야 및 장애인 환자의 치과치료에서 SDF는 환자가 통상적인 수복치료를 받기에 협조가 힘든 경우나 의과적인 문제로 치과치료를 받기 어려운 경우, 여러 개의 우식병소를 가져서 한 번 이상의 내원이 필요한 경우에 우식의 진행을 늦추기 위해 사용될 수 있다. 더불어 치과의사의 수가 충분하지 않은 지역이나, 사회경제적 요인 등으로 인해

치과 치료에 접근하기 힘든 어린이들에게 사용할 수 있는 비용 효율적인 대안이 될 수 있다[21, 23].

SDF는 1960년대에 일본에서 처음으로 치아우식의 정지를 위해 사용되기 시작하였다[28]. 21세기 이후에는 중국, 호주, 브라질 등의 여러 나라에서 치아우식의 정지를 위해 사용되었으며, 미국에서는 2014년에 지각과민의 처치를 위해 38% SDF의 판매가 허가되었다[21]. 50년 이상의 오랜 기간동안 사용되면서 치아의 검정색 착색을 제외하면 SDF 사용에 따른 다른 심각한 합병증은 보고되지 않았으며, 효과적으로 치아우식을 억제할 수 있음이 확인되었다[22]. SDF로 치아우식을 치료하였을 때 치아우식이 정지된 비율은 35 – 98%로 보고되었으며, 임상연구들에 대한 메타분석 결과 총 81%의 우식이 정지된 것으로 보고되었다[22]. SDF는 치아우식을 정지시키는 효과와 더불어 새로운 우식병소가 생기는 것을 예방할 수 있다. 유견치, 유구치와 제1대구치에 SDF를 도포한 결과, 새로운 우식병소가 생기는 것이 유치에서는 약 80%가 예방되었고, 제1대구치에서는 약 65%의 비율로 예방되었다[29]. 이렇게 우식 정지에 뛰어난 효과를 보이는 SDF는 우식 병소에 대한 치료 방법 중 하나로 권장되기도 한다. 유아기 우식증과 관련하여 International Association of Paediatric Dentistry에서 2019년에 발표한 연구에서는 환아의 우식 위험도 평가(caries risk assessment)에 따라 예방 및 치료계획을 수립할 것을 권고하였다. 이 연구에서는 우식위험도가 높은 환자의 경우, 와동이 형성된 우식 병소를

SDF를 도포하여 우식을 정지시키고 주기적으로 관찰하거나 수복을 시행하도록 권고하였다[30].

SDF는 불소 바니쉬와 acidulated phosphate fluoride (APF) 겔 등의 다른 불소제제보다 우식을 예방하고 정지시키는데 더 효과적으로 사용될 수 있다. Shalin 등[31]은 불소 바니쉬(6% 불화나트륨과 6% 불화칼슘), 1.23%의 APF 겔, 38% SDF를 도포하고 6개월 후에 하악 제1대구치의 협면에서 법랑질의 불소함량을 측정하였다. 실험 결과 SDF를 도포한 그룹은 나머지 두 그룹보다 불소 함량이 크게 증가하였다. 더불어 불소 바니쉬를 도포한 그룹에서는 새로운 우식병소가 10개의 면에서 발생하였고, APF 겔을 도포한 그룹에서는 9개의 면에서 발생한 반면, SDF를 도포한 그룹에서는 2개의 면에서만 새로운 우식병소가 발생하여 SDF가 새로운 우식병소의 생성을 더욱 효과적으로 감소시킬 수 있음을 확인하였다. 또한 Chu 등[32]은 38%의 SDF를 일년에 한 번 도포하는 것이 5%의 불화나트륨 바니쉬를 3개월 마다 도포하는 것보다 우식병소를 경화시키고 정지시키는 효과가 더 뛰어나다고 하였다.

SDF는 24.4 - 28.8%의 은과, 5.0 - 5.9%의 불소 및 8%의 암모니아를 포함한다. 이 중 암모니아는 은이온과 결합하여 디아민-은 이온을 형성하여 안정화시키는 역할을 하며 고농도의 불소(44,800ppm)와 은(253,870ppm)이 치아우식을 억제하는 역할을 한다[33]. 불소와 은은 항미생물효과를 보이며, 치아의 재광화를 촉진하고, 탈회를 억제하고, 상아질의 교원질이 분해되는 것을 억제하는 등의 효과가

있다[21, 34]. SDF는 이러한 복합적인 작용으로 인해 치아우식의 진행을 억제하며, 새로운 치아우식의 발생을 예방할 수 있다.

치아우식은 미생물이 유발하는 치아 조직의 국소적인 화학적 용해이다. 치아 표면을 덮은 생물막, 즉 치태 내의 미생물은 발효가능한 탄수화물을 대사하여 산성 산물을 생성한다. 이러한 유기산은 국소적인 pH가 임계치 이하로 저하되도록 하며, 이로 인해 치아 경조직이 탈회된다. 칼슘, 인산염, 탄산염이 치아 외부로 확산되는 과정이 지속될 경우 결과적으로 우식 와동이 유발된다[35-39]. 이렇듯 치아우식은 산을 생성하는 미생물이 형성하는 생물막, 기질, 치아 경조직과 타액 등의 다양한 요소가 관여되어 발생하는 질환이다.

구강 미생물총은 매우 다양한 미생물을 포함한다. 16S rRNA를 이용한 연구에 따르면 구강 내에서 약 700여종의 미생물들이 확인되었다. 하지만 통상적인 미생물 배양 방법을 통해서는 구강 내 다양한 미생물 중 제한된 종만 국한되어 배양이 가능하다[40, 41]. 최근 SDF의 항미생물 효과와 SDF가 치아에 미치는 영향에 대한 몇몇 연구가 발표되었으나, 대부분 제한된 종의 구강 미생물을 이용하여 연구를 진행하였다. Chu 등[42]의 연구에서는 *Streptococcus mutans*와 *Actinomyces naeslundii* 각각의 단일종 생물막을 형성하여 SDF의 항미생물효과를 평가하였다. Mei 등[43]의 연구에서는 *S. mutans*와 *Lactobacillus acidophilus*의 두 종으로 형성된 생물막을 이용하였으며, Mei 등[44]의 다른 논문에서는 5종의 미생물(*S. mutans, Streptococcus sobrinus, L. acidophilus, Lactobacillus rhamnosus, A.*

*naeslundii*)이 혼합된 생물막으로 연구를 진행한 바 있다. 현재까지 SDF의 항미생물효과에 대해 연구한 논문에서 타액을 이용한 연구는 존재하지 않는다.

SDF가 치아의 물리적 특성에 미치는 영향에 대해서는 선행 연구들에서 미소경도, X선 회절분석, 푸리에 변환 적외선 분광학 등을 이용하여 평가되었다. 이러한 연구들 중 법랑질의 미소경도에 대해 평가한 Abdil-nafaa 등[45]과 Mohammadi 등[46]의 연구에서는 유전치를 사용하여 연구를 진행한 바 있으나, 상아질의 미소경도에 대해 평가한 선행 연구들은 대부분 제3대구치를 이용하여 연구를 진행하였다. Christiana 등[47]은 유치와 제3대구치를 인공적으로 산부식시킨 후 재광화시킨 결과, 제3대구치가 탈회 및 재광화가 더 쉽게 일어난다고 하였다. 통상적으로 유치는 영구치보다 산에 의해 쉽게 용출된다고 알려져있으나, 제3대구치의 경우 맹출 후 구강 내에 노출된 시간이 길지 않아 맹출 후 성숙과정을 오래 거치지 못하여, 오랜 기간 동안 구강 내에 노출된 유치보다 쉽게 탈회와 재광화 과정을 거치게 되는 것으로 추정된다. 이렇듯 유치와 제3대구치는 산과 불화물에 대한 반응성의 차이를 보이기 때문에 임상에서 SDF의 주된 적용 대상인 유치를 이용한 연구가 필요하다.

이에 본 연구에서는 타액 생물막을 이용하여 SDF의 항미생물효과를 평가하고, 유치의 법랑질과 상아질을 이용하여 SDF가 치아의 물리적 특성에 미치는 영향 대해 평가하고자 하였다.

# II. 연구 대상 및 방법

이 연구는 서울대학교치의학대학원 의학연구윤리심의위원회의 심의를 거쳐 수행하였다(S - D20180016).

## 1. 연구 재료 및 대상

탈락시기에 도래하여 발거된 30개의 유구치를 연구에 사용하였다. 발거된 유치를 0.1%의 thymol 용액에 보관하였다. ICDAS (International Caries Detection and Assessment System) 기준에 따라 건전한 치면(ICDAS code 0)을 연구에 사용하였다[48].

38%의 SDF는 시판중인 Advantage arrest (Elevate oral care, West Palm Beach, FL, USA)를 사용하였다.

## 2. 항미생물 효과 평가

### 2.1. Silver diamine fluoride에 대한 *S. mutans*의 민감도 평가

항미생물 효과의 평가에 앞서서 SDF에 대한 민감도 측정을 위해 성장억제 최소농도(Minimal Inhibitory Concentration ; MIC) 방법을 사용하였다. 96-well plate의 2번째와 3번째 오의 빈 well에 trypticase soy 액체배지를 180 μL 첨가한 후, 여기에 10배 희석한 SDF를 3번째 오의 첫번째 열(column)에 180 μL를 넣고, 이후 2번째 열부터 11번째 열까지 2배 연속 희석법을 이용하여 SDF를 희석하였다. 3번째

오의 12번째 열과 2번째 오는 대조군으로 SDF를 첨가하지 않았다. 이후 배지에 *S. mutans* ATCC 25175의 세균부유액(1 X $10^8$ bacteria/mL)을 20 μL 씩 접종하고, plate를 37℃의 혐기성환경($H_2$ 5%, $CO_2$ 10%, $N_2$ 85%)에서 16시간 동안 배양하였다. 이후 분광광도계를 이용하여 660 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 세균 성장 여부를 조사하였다[49, 50].

2.2. Silver diamine fluoride의 항생물막 효과 평가

생물막의 형성을 위한 전처리된 plate를 제작하기 위해, 10명의 건강한 공여자로부터 얻은 비자극성 타액 10 mL 씩을 혼합하여 4℃에서 7,000 x g로 10분간 원심분리 하였다. 상층액 50 mL를 인산완충용액(phosphate buffered saline, pH 7.2)을 이용하여 두 배로 희석한 후, 이를 8-well glass chamber와, 12-well polystyrene plate에 400 μL, 1 mL 씩 각각 분주하였다. 8-well glass chamber와 12-well polystyrene plate를 37℃에서 건조시킨 후, 자외선 살균기에서 살균하였다. 이 과정을 5회 반복하여 획득피막과 유사한, 타액막이 형성된 plate와 chamber를 만들었다(Fig.1)[51-53].

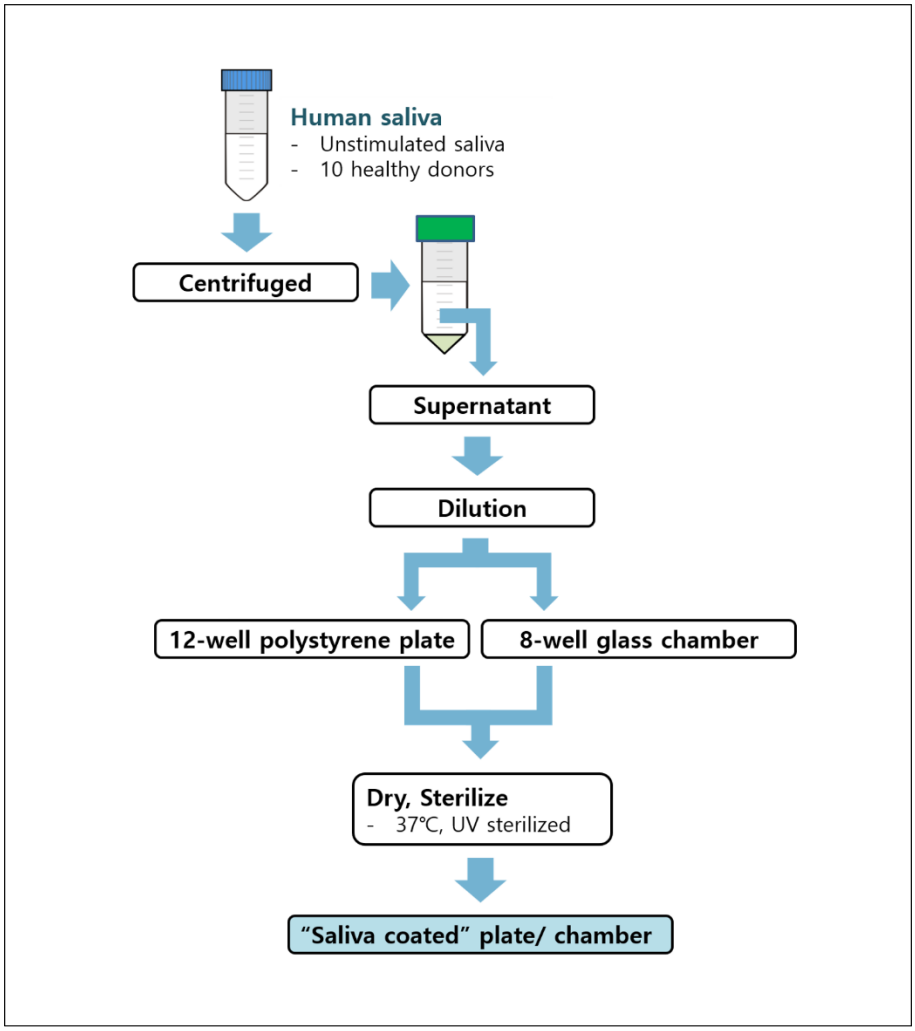


Fig. 1. Experimental methods for preparation of "saliva coated" plate and chamber.

우식원성의 타액 생물막을 형성하기 위해, 11명의 건강한 공여자로부터 비자극성 타액을 10 mL 씩 수집한 후 혼합하였다. 혼합 타액을 2% 자당을 포함한 brain heart infusion (BHI) 배양액 동량과 섞은 후, 이 혼합액을 4℃에서 7,000 x g로 10분간 원심분리하여 구강세포 등의 잔해를 제거하였다. 원심분리 후 상층액만을 새로운 튜브에 수집한 후,

우식원성의 생물막을 형성하기 위해 *S. mutans* ATCC 25175를 첨가하였다. 이를 10초간 혼합한 후, 타액으로 코팅된 12-well polystyrene plate에 1 mL, 타액으로 코팅된 8-well glass chamber에 400 μL 씩 접종하였다. 이 plate와 glass chamber를 37℃의 혐기성 환경에서 72시간 동안 배양하였으며, 매일 2% 자당을 함유한 BHI 배양액을 새로 교환해주었다. 이렇게 하여 우식원성의 생물막이 형성된 12-well polystyrene plate와 8-well glass chamber를 인산완충용액으로 세차례 세척하여 부유성의 세균은 제거하였다[51-53].

SDF가 우식원성의 타액 생물막에 미치는 항미생물효과를 평가하기 위해 SDF를 증류수를 이용하여 1,000배로 희석한 후 생물막이 형성된 12-well polystyrene plate에 200 μL씩 적용하였다. 이를 네 군으로 나누어, SDF 적용 직후(SDF - immediate), 10초 후(SDF - 10초), 30초 후(SDF - 30초)에 적용된 SDF를 제거하고, 인산완충용액으로 plate를 세척하였다. 대조군에는 SDF를 적용하지 않았다. 이후 생물막을 plate에서 떼어낸 후 균질화 하였으며, 이렇게 형성된 미생물 혼탁액을 자당이 없는 BHI 배양액을 이용하여 10 - $10^6$배로 연속희석하여, 집락형성단위(colony forming unit ; CFU)를 측정하였다. CFU 측정시 mitis salivarius bacitracin (MSB) 고체배지와 BHI 고체배지를 사용하였으며, MSB 고체배지는 *S. mutans*의 CFU, BHI 고체배지는 미생물 전체의 CFU를 측정하기 위하여 사용되었다[51, 53]. 이 과정을 각 군당 8회씩 반복하여 시행하였으며, 각 군의 8번의

측정값에 대한 평균을 기록하였다.

SDF가 우식원성의 생물막에 미치는 항미생물효과의 특성을 공초점레이저주사현미경(Confocal Laser Scanning Microscope ; CLSM)으로 평가하기 위해 SDF를 증류수를 이용하여 1,000배로 희석한 후 생물막이 형성된 8-well glass chamber에 200 μL씩 적용하였다. 이를 네 군으로 나누어, SDF 적용 직후(SDF - immediate), 10초 후(SDF - 10초), 30초 후(SDF - 30초)에 적용된 SDF를 제거하고, 인산완충용액으로 plate를 세척하였다. 대조군에는 SDF를 적용하지 않았다. 이후 생물막을 live/dead staining kit (LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial viability kit, Invitrogen, Eugene, OR, USA)를 이용하여 propidium iodide (PI)과 SYTO 9으로 염색하였다. 염색 후 chamber는 암실에서 상온으로 1시간 동안 보관하였다. 이후, 공초점레이저주사현미경(LSM 700, Carl-Zeiss, Oberkochen, Germany)을 이용하여 각각의 시편에 대한 생물막 이미지를 얻었다(Fig.2) [42].

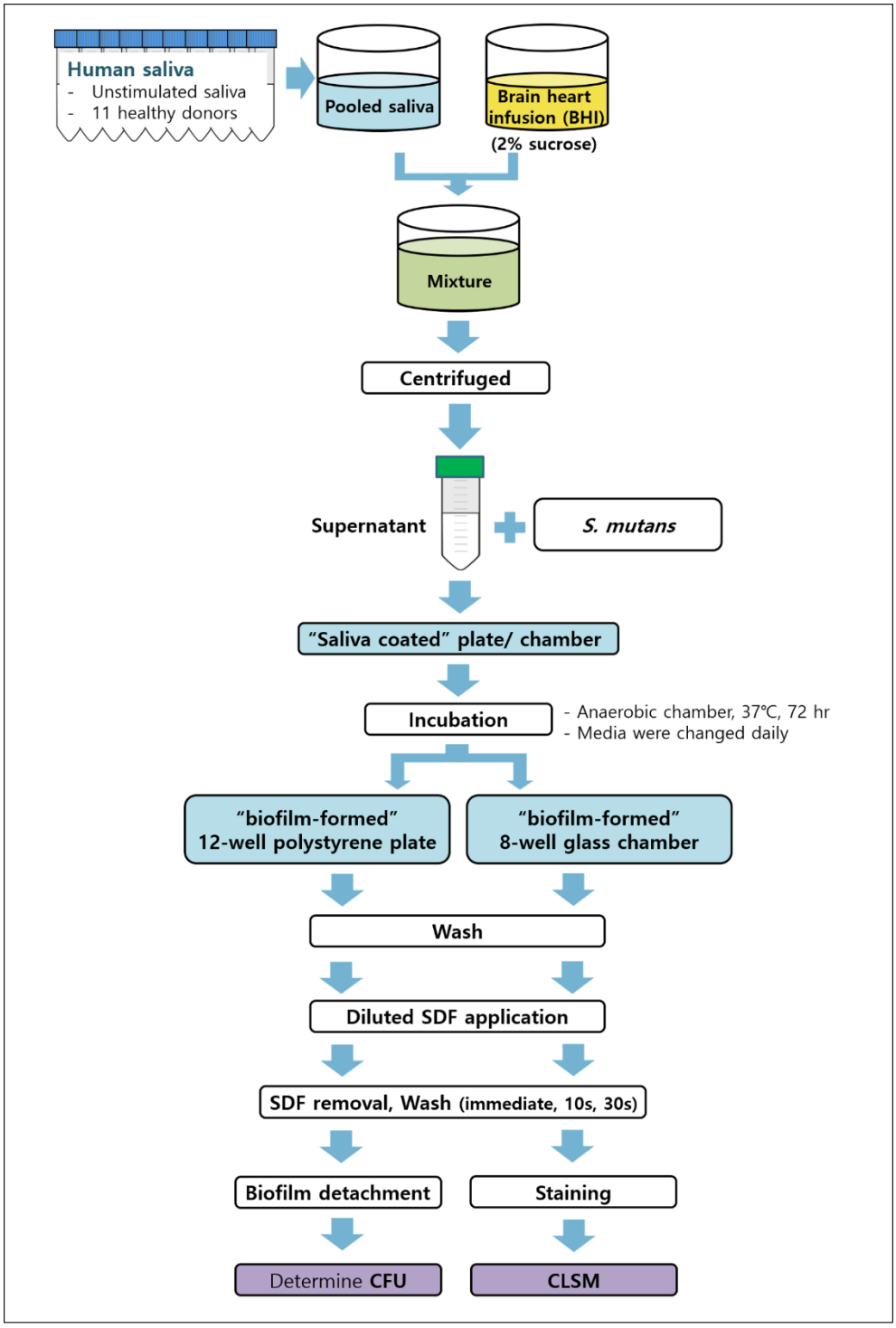


Fig. 2. Experimental methods for development of salivary biofilm and evaluation of antimicrobial effect.

2.3. 치아에 대한 항미생물 효과 평가

SDF를 치아에 적용했을 때의 항미생물 효과를 평가하기 위해 법랑질 시편과 상아질 시편을 제작하였다. 법랑질 시편은 저속의 다이아몬드 디스크(Edenta, Au, Switzerland)를 이용하여 주수 하에 유치를 3.0 mm X 3.0 mm 크기로 자른 후, 인공우식의 형성을 위해 산성완충용액으로 치아를 탈회시켰다. 사용된 산성완충용액은 5 L 의 증류수, 2.2 g의 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 2 g의 $KH_2PO_4$, 10 mL의 MHDP 용액(100 mL 증류수와 5.2 mg methylene diphosphoric acid를 이용하여 제작), 14.3 mL $CH_3COOH$과 pH 4.9로 적정하기 위한 10 N KOH 을 포함하며, 72시간 동안 적용하였다[54].

상아질 시편의 경우, 같은 방법으로 유치를 3.0 mm X 3.0 mm 크기로 자르고, DEJ와 평행한 방향으로 DEJ에서 0.5 mm 하방까지 제거하여 시편을 제작하였다. 1,000 grit 샌드페이퍼를 이용하여 연마 하였으며, smear layer를 제거하기 위해 1% 구연산으로 5분간 처리하고, 증류수로 세척하였다[43]. 이후, 법랑질 시편과 같은 방법으로 탈회시켰다.

이와 같은 방식으로 법랑질 시편 8개, 상아질 시편 8개를 제작하였다. 이후, 법랑질 시편 4개와, 상아질 시편 4개를 실험군으로 하여 SDF를 적용하였다. 압축공기로 법랑질 시편과 상아질 시편의 치면을 건조시킨 후, 38%의 SDF 1 $\mu$L를 적용하고 마이크로브러쉬로 도포하였으며, 3분 후에 증류수로 치아를 세척하였다[21]. 나머지 법랑질 시편 4개와, 상아질 시편 4개는 대조군으로 하여 SDF를 적용하지 않았다.

이전과 같은 방식으로, 혼합 타액(pooled saliva)과 2% 자당을 포함한 BHI 액체배지 동량을 섞고 원심분리 하여 상층액만을 수집한 후, *S. mutans*를 첨가하여 타액 미생물이 포함된 배지를 제작하였다. 이 배지와 법랑질 또는 상아질 시편을 12-well polystyrene plate에 넣은 후, 혐기성 환경에서 37℃에서 72시간 동안 배양하였으며, 매일 2% 자당을 함유한 BHI 배양액을 새로 교환해주었다. 이후, 치아에 붙어있는 생물막을 분리하여 CFU를 측정하였다(생물막 CFU). 배지의 CFU 또한 측정하였다(플랑크톤 CFU). CFU 측정 시 *S. mutans*의 측정을 위해 MSB 고체배지를 사용하였으며, 전체 미생물의 측정을 위해 BHI 고체배지를 사용하였다. 이후 법랑질과 상아질 각각의 실험군, 대조군의 측정치에 대한 평균값을 기록하였다.

## 3. 치아의 물리적 특성에 미치는 영향 평가

### 3.1. 치아 시편 준비

저속의 다이아몬드 디스크(Edenta, Au, Switzerland)를 이용하여 주수 하에 유치를 3.0 mm X 3.0 mm 크기로 잘라 법랑질 시편을 제작하였다. 상아질 시편은 유치를 3.0 mm X 3.0 mm 크기로 자르고 법랑질을 제거하여 제작하였다. 상아질 시편 제작시에는 DEJ와 평행한 방향으로 법랑질을 제거하였으며, DEJ에서 0.5 mm 하방까지 제거하여 상아질 시편을 제작하였다.

법랑질 시편 16개, 상아질 시편 16개에 대해 다음의 과정을 진행하였다. 시편들을 polyvinyl chloride (PVC) ring (지름 25 mm, 내경 15 mm, 높이 8 mm)에 위치시킨 후, 실험을 위한 한 면만 노출되도록 자가중합형 아크릴릭 레진(Vertex Self – Curing, Vertex – Dental B.V., Soesterberg, Netherlands)으로 매몰하였다[55]. 레진 중합 후, 1,000 grit sandpaper를 이용하여 연마하였으며, smear layer를 제거하기 위해 1% 구연산에서 5분간 처리하고, 증류수로 세척하였다[43]. 이후 이 시편들을 이전과 같은 방법으로 탈회시켰다(Fig. 3).

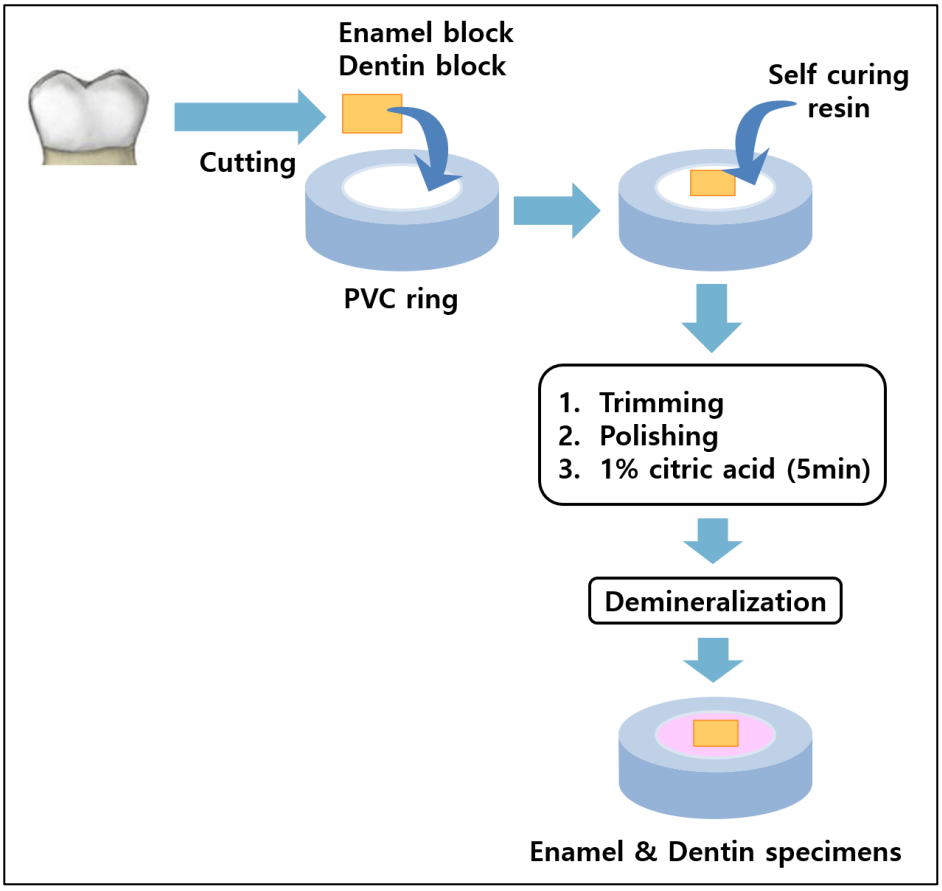


Fig. 3. Preparation of specimens for evaluating the effect of SDF on physical properties of enamel and dentin.

### 3.2. 미소경도(Microhardness)에 대한 영향 평가

탈회된 법랑질 시편 12개, 상아질 시편 12개에 대한 미소경도를 측정한 후, SDF를 도포하고 3분 후에 증류수로 세척한 후, 혼합 타액에 상온 보관하였다[56-58]. 7일 후에 미소경도를 재측정하였다.

미소경도의 측정은 Micro Vickers hardness testing machine (HVM-2, Shimadzu, Kyoto, Japan)을 이용하여 Vickers microhardness 시험을 진행하였다. 법랑질 및 상아질 시편을 각각 0.1 Kgf ($9.8 \times 10^{-1}$ N)으로 20초 동안 피라미드 모양의 다이아몬드 압자를 사용하여 하중을 가한 후 현미경을 사용하여 압흔을 관찰 및 측정하고, Vickers hardness number를 계산하였다.

### 3.3. 표면 거칠기(Surface roughness)에 대한 영향 평가

탈회된 법랑질 시편 2개와 상아질 시편 2개는 실험군으로 하여 SDF를 도포하고 3분 후에 증류수로 세척하였다. 나머지 법랑질 시편 2개와 상아질 시편 2개는 대조군으로 SDF를 도포하지 않았다. 3일 후 실험군과 대조군의 표면 거칠기를 측정하였다. 각각의 시편에 대해 3회씩 반복측정하였다.

표면 거칠기에 대한 영향을 평가하기 위해 Contactless 3D surface profiler (NV-2400, Nanosystem, Daejun, Korea)를 이용하여 법랑질 및 상아질 시편에 대한 표면분석을 시행하여 중심선 평균 거칠기(Ra값)을 측정하였다.

## 4. 통계 분석

통계 분석은 IBM SPSS 25.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)을 이용하였다. SDF의 타액생물막에 대한 항미생물효과를 평가하기 위해 Kruskal-Wallis test를 시행하였으며, 사후검정으로 Mann-Whitney test를 시행하였다. 치아에 대한 항미생물효과, 표면 거칠기에 대한 영향을 평가하기 위해 Mann-Whitney test를 사용하여 분석하였다. 미소경도에 대한 SDF의 영향을 평가하기 위해 Wilcoxon signed rank test를 시행하였다. 통계적 유의 수준은 0.05로 하였다.

# III. 연구 결과

## 1. 항미생물 효과 평가

### 1.1. Silver diamine fluoride에 대한 *S. mutans*의 민감도 평가

SDF의 미생물 저해효과를 평가하기 위해 흡광도를 측정한 결과를 Fig. 4에 나타내었다.

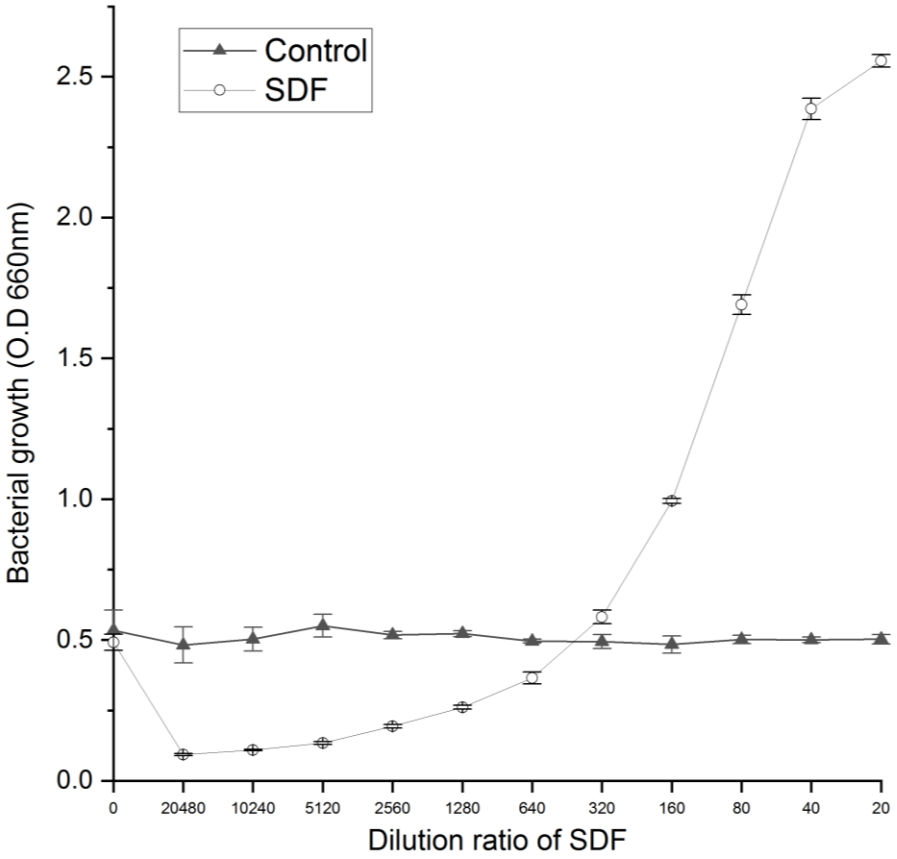


Fig. 4. The inhibition of bacterial growth by SDF. (triangle (▲) : control, circle (◯) : SDF-treatment).

SDF는 은을 포함하고 있어서 높은 농도에서는 혼탁도가 높아 OD값이 control 보다 높게 측정되었다. SDF는 20,480배 이상으로 희석이 된 경우에도 미생물의 성장을 억제하였는데, 이 농도에서도 미생물을 배양해보았을 때, 전혀 배양이 되지 않았다. 1,000배 미만으로 희석된 SDF를 사용한 경우에는 SDF 적용 즉시 모든 미생물이 제거되어 시간에 따른 미생물 억제 효과를 확인하기 힘들었다. 따라서 본 연구에서는 시간 경과에 따른 효과를 확인할 수 있도록 1,000배로 희석된 SDF를 사용하여, SDF 적용 직후, 10초 후, 30초 후의 효과를

확인하였다.

1.2. Silver diamine fluoride의 항생물막 효과 평가

우식원성의 생물막에 SDF를 처리한 결과, 처리한 즉시, 10초 후, 30초 후에 전체 미생물이 점차적으로 감소되었다($p < 0.001$, Fig. 5A). 또한 *S. mutans*도 시간 경과에 따라 점차 감소되는 것을 확인할 수 있었다($p < 0.001$, Fig. 5B). 약제를 적용한 직후, 전체 미생물의 51.7%, *S. mutans*의 72.7%가 제거되었으며, 10초 경과시에 전체 미생물의 99.7% *S. mutans*의 95.7%가 제거되었다. 30초 후에는 전체 미생물과 *S. mutans* 모두 99.9%가 제거되었다.

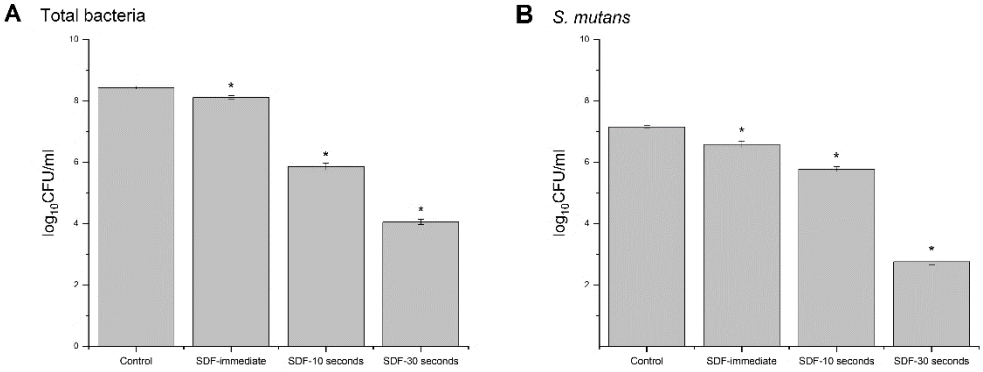


**Fig. 5.** Bacterial count in cariogenic biofilm after treatment with silver diamine fluoride. (A) Colony-forming unit of total bacteria. (B) Colony-forming unit of *S. mutans.* Asterisk (*) indicates significant difference compared with control group ($p < 0.05$).
Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney test.

생물막을 live/dead staining kit로 염색하면 살아있는 세포는 SYTO – 9 탐침으로 탐지되어 초록색을, 죽은 세포는 PI 탐침으로 탐지되어 붉은색을 띄게 된다. SDF를 적용한 생물막을 live/dead staining kit로 염색하여 공초점레이저주사현미경으로 관찰한 결과, 대조군은 두꺼운 층의 살아있는 미생물로 구성된 생물막을 형성하고 있었다(Fig. 6A). SDF를 처리한 즉시, 일부 세포가 노란색과 붉은색으로 관찰되며(Fig. 6B), 10초 후에는 붉은색의 죽은 세포가 현저히 증가된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 6C). 30초 후에는 대다수의 세포가 붉은색으로 관찰되어 사멸한 것을 알 수 있었으며, 일부 층에서만 살아있는 미생물을 발견할 수 있었다(Fig. 6D).

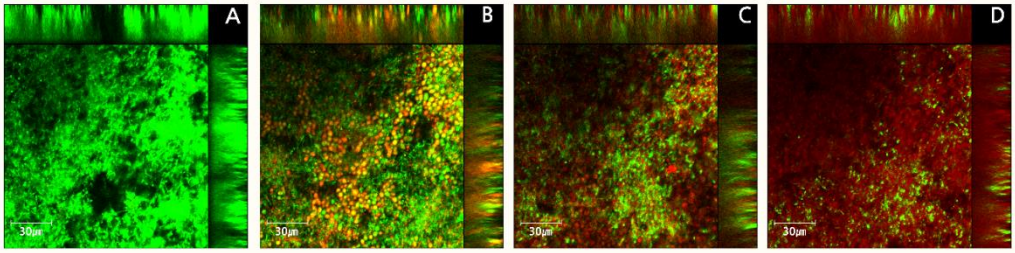


**Fig. 6.** Image of cariogenic biofilm using confocal laser scanning microscope (x400). After treatment with SDF, the number of live bacterial cells (green) were gradually decreased, and the number of dead bacterial cells (red) were gradually increased over time. (A)Control. (B) Immediate after treatment with silver diamine fluoride. (C) 10 seconds after treatment with silver diamine fluoride. (D) 30 seconds after treatment with silver diamine fluoride.

1.3. 치아에 대한 항미생물 효과 평가

SDF를 처리한 법랑질 시편은 대조군 치아시편에 비해, 생물막의 CFU 측정시 전체 미생물과 *S. mutans*가 모두 낮은 수치를 보였다($p = 0.029$, Fig. 7). 전체 미생물은 대조군 대비 1.4 X $10^{-5}$배의 미생물만 배양되었으며, *S. mutans*는 대조군 대비 8.7 X $10^{-4}$배만 배양되었다.

배지의 플랑크톤 CFU 또한 SDF를 처리한 그룹에서 전체 미생물과 *S. mutans* 둘 다 낮게 나왔다($p = 0.029$, Fig. 8). 전체 미생물은 대조군 대비 9.7 X $10^{-6}$배의 미생물이 배양되었으며, *S. mutans*는 대조군 대비 1.9 X $10^{-3}$배의 미생물만이 배양되었다.

상아질 시편을 이용한 연구에서도 SDF를 처리한 치아 시편은 전체 미생물이 대조군 대비 1.0 X $10^{-4}$배만 배양되었다($p = 0.029$). 상아질 시편에서 SDF를 처리했을 때 *S. mutans*는 검출되지 않았다($p = 0.029$, Fig. 9).

플랑크톤 CFU 또한 SDF를 처리한 그룹에서 전체 미생물과 *S. mutans* 모두 감소함을 확인할 수 있었다($p = 0.029$, Fig. 10). 전체 미생물은 대조군 대비 1.1 X $10^{-2}$배만이 배양되었고, *S. mutans*는 대조군 대비 1.7 X $10^{-2}$배만 배양되었다.

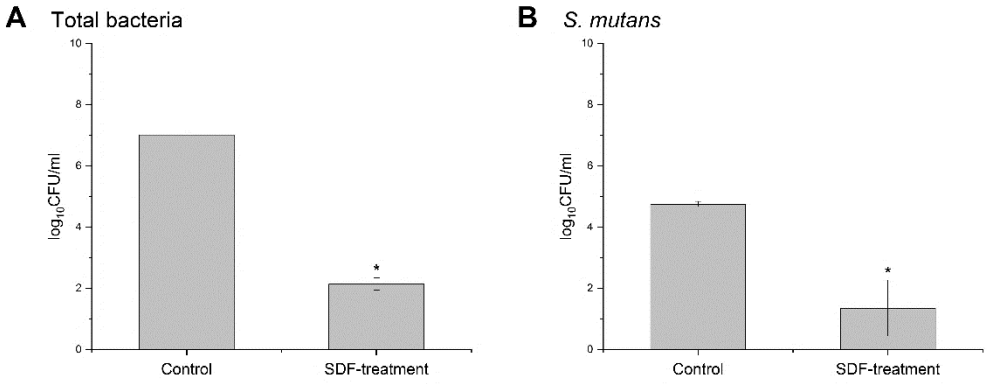


Fig. 7. Bacterial count in biofilm on enamel surface after treatment with silver diamine fluoride. (A) Colony-forming unit of total bacteria. (B) Colony-forming unit of *S. mutans.* Asterisk (*) indicates significant difference compared with control group ($p < 0.05$).
Mann-Whitney test.

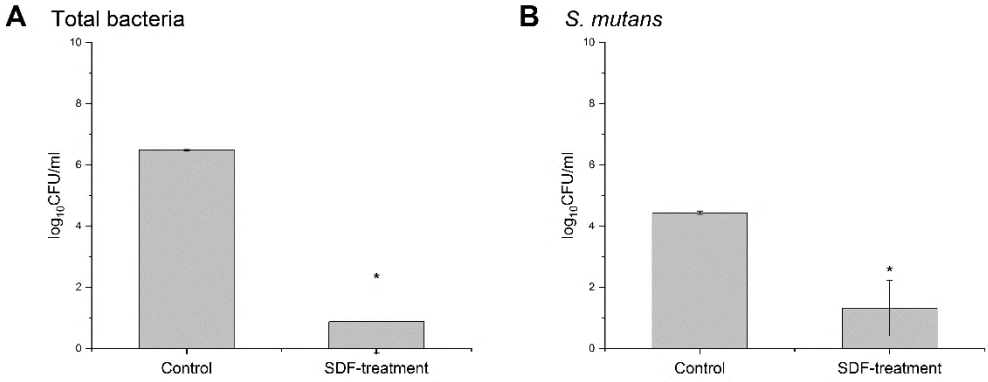


Fig. 8. Bacterial count in planktonic bacteria of broth containing enamel specimen after treatment with silver diamine fluoride. (A) Colony-forming unit of total bacteria. (B) Colony-forming unit of *S. mutans.* Asterisk (*) indicates significant difference compared with control group ($p < 0.05$).
Mann-Whitney test.

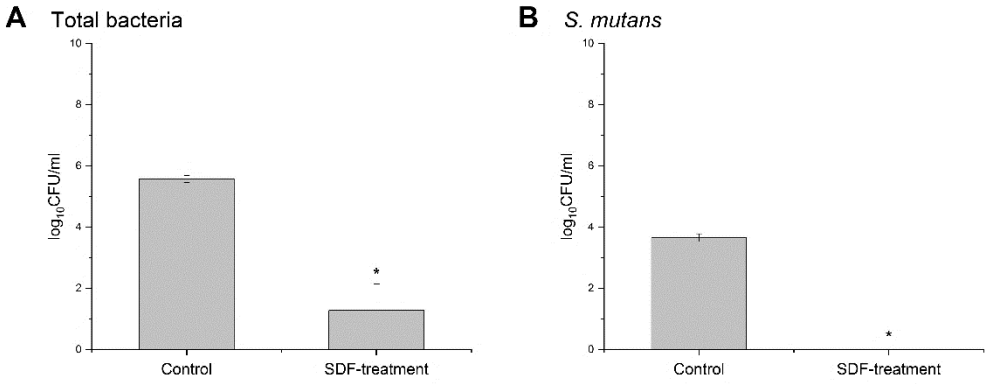


Fig. 9. Bacterial count in biofilm on dentin surface after treatment with silver diamine fluoride. (A) Colony-forming unit of total bacteria. (B) Colony-forming unit of *S. mutans.* Asterisk (*) indicates significant difference compared with control group ($p < 0.05$).
Mann-Whitney test.

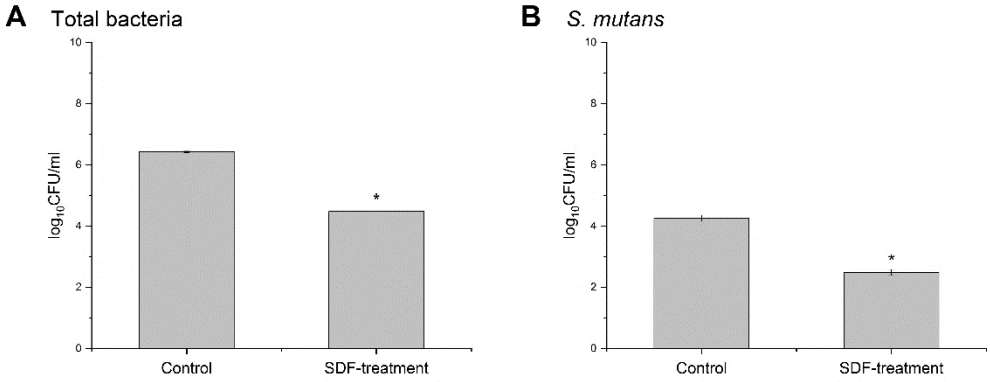


Fig. 10. Bacterial count in planktonic bacteria of broth containing dentin specimen after treatment with silver diamine fluoride. (A) Colony-forming unit of total bacteria. (B) Colony-forming unit of *S. mutans.* Asterisk (*) indicates significant difference compared with control group ($p < 0.05$).
Mann-Whitney test.

## 2. 치아의 물리적 특성에 미치는 영향 평가

### 2.1. 미소경도(Microhardness)에 대한 영향 평가

법랑질 시편에서 SDF를 처리하기 전의 미소경도와 SDF를 처리한 후의 미소경도를 측정한 결과, SDF 처리 후 미소경도가 10.8% 증가하였다($p$ = 0.028, Fig. 11A). 상아질 시편에서도 SDF를 처리한 후 미소경도가 42.1% 증가함을 확인할 수 있었다($p$ = 0.002, Fig. 11B).

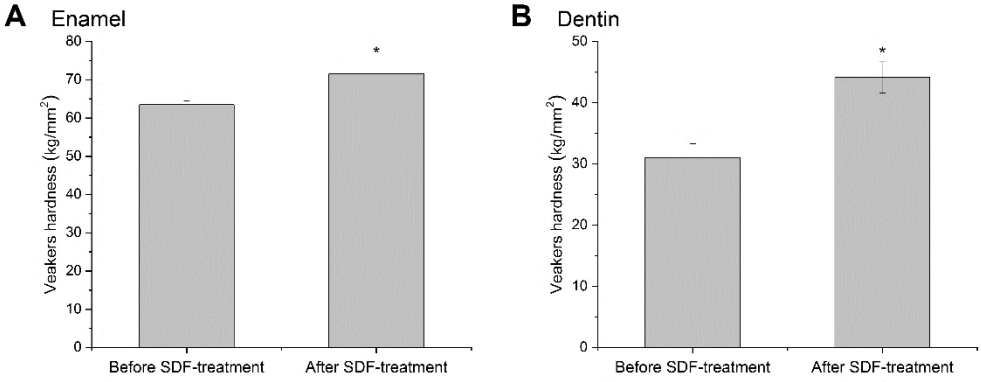


**Fig. 11.** Changes in microhardness after treatment with SDF. (A) Enamel specimen (B) Dentin specimen. Asterisk (*) indicates significant difference compared with control group ($p < 0.05$).
Wilcoxon signed rank test.

### 2.2. 표면 거칠기(Surface roughness)에 대한 영향 평가

법랑질 시편에 SDF를 처리한 경우, 표면 거칠기가 유의하게 감소하였다($p$ = 0.002, Fig. 12A). 반면 상아질에서는 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다($p$ = 0.937, Fig. 12B).

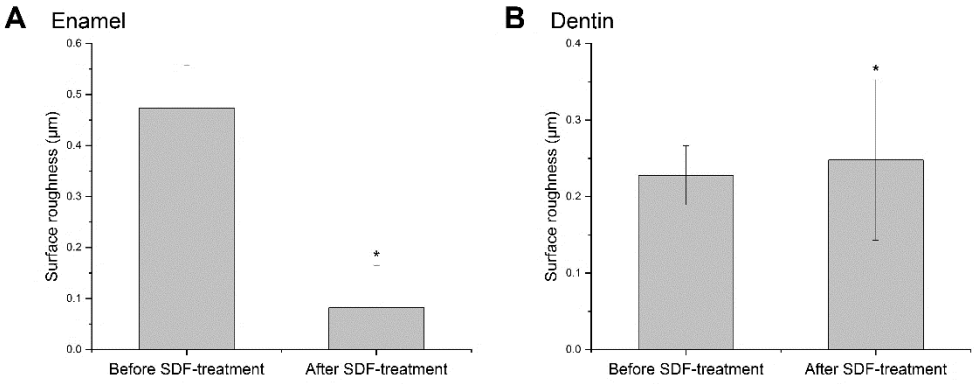


Fig. 12. Changes in surface roughness after treatment with SDF. (A) Enamel specimen (B) Dentin specimen. Asterisk (*) indicates significant difference compared with control group ($p < 0.05$).
Mann-Whitney test.

# IV. 총괄 및 고찰

이번 연구에서 우식원성의 타액 생물막에 대한 SDF의 항미생물효과를 살펴본 결과, 우식원성의 타액 생물막에 SDF 처리시 전체 미생물과 *S. mutans*가 시간이 지남에 따라 점차 감소하였다. 약제를 적용한 직후에도 전체 미생물과 *S. mutans* 모두 절반 이상의 미생물이 제거되었다. 특히 SDF를 1,000배 희석하여 적용하였음에도 불구하고 30초 후 전체 미생물과 *S. mutans* 모두 99.9%가 제거되어 SDF의 강력한 항미생물효과를 확인할 수 있었다. 임상 적용 시, SDF는 1 - 3분 동안 적용할 것이 권고된다[21]. 하지만 협조가 어려운 소아

환자에서는 단지 수초만의 적용만이 가능할 수도 있는데, 이번 연구 결과 매우 희석된(1,000배) SDF를 30초 적용하는 경우에도 대부분의 우식원성 미생물이 사멸되었다. 또한 SDF에 대한 *S. mutans*의 민감도 평가 결과에서 언급하였듯이 SDF를 1,000배 미만으로 희석한 경우 약제를 적용한 즉시 모든 미생물이 제거되었다. 따라서 실제 임상 환경에서 SDF를 도포하는 순간 대부분의 미생물이 제거될 것으로 추측 가능하며, 환자의 협조도 부족으로 SDF를 충분한 시간동안 적용하지 못하는 경우에도 충분한 항미생물효과를 얻을 수 있을 것이라고 추정할 수 있다.

공초점레이저주사현미경으로 관찰한 결과에서는 SDF 처리 후, 시간이 지남에 따라 생물막 내에서 사멸된 세포가 점차 증가하였다. 또한 두꺼운 층을 형성하고 있던 우식원성 생물막이 SDF 처리 후 일부 층에서만 살아있는 세포가 발견되었다. 즉, SDF는 단순히 미생물을 제거하는 효과뿐 아니라 생물막을 파괴하여 더욱 효과적으로 우식원성 미생물을 억제한다는 것을 확인할 수 있었다.

SDF의 구성성분인 불소는 '산 생성' 과 '글루칸(glucan) 합성' 이라는 중요한 독성인자(virulence factor)를 억제함으로써 *S. mutans*의 활성을 억제할 수 있다[59]. 불소는 효소에 직접적으로 결합하거나(에놀라아제(enolase), 우레아제(urease), 포스파타아제(phosphatase), P-ATPase 등) 금속-불소 복합체가 효소에 결합함으로써(니트로게나아제(nitrogenase), F-ATPase 등) 다양한 효소를 직접 억제하는 작용을 한다[59]. 특히, 불소는 알루미늄과 함께 작용하여 F-ATPase의 활

성을 억제하는데, 이는 세포막 사이의 pH 차이를 감소시킨다. 또한 불화수소(HF)는 세포막 사이의 양성자 운반체로서 작용하여 세포막의 양성자 투과도를 증가시켜 세포막 간의 pH 차이를 사라지게 한다[59, 60]. 불소의 이러한 작용들로 인해 세포막 간의 pH 차이가 감소하게 되면, 상대적으로 염기성이 된 세포질에서는 불화수소가 불소이온과 수소이온으로 분리되며, 이는 해당작용 효소(glycolytic enzymes)를 억제하게 된다. 더불어 pH 차이가 감소하면 세포막을 통해 양성자를 다시 들여오기 위해 ATP 요구량이 많아지게 되며, 미생물 세포의 에너지 상태를 위태롭게 한다. 결과적으로 미생물 세포는 산성화 또는 기아 상태와 유사한 상태가 된다[59, 61]. 이렇듯 불소는 세포내 pH를 교란시킴으로써 산을 생성하는 미생물에 영향을 미친다. 뿐만 아니라 이러한 작용으로 인해 산 생성이 감소함으로써 생물막 내에 *S. mutans*와 같은 우식원성의 내산성 미생물이 선택적으로 살아남게 되는 과정을 막을 수 있다[62, 63].

불소가 있는 환경에서는 *S. mutans*의 세포외다당류의 생성 또한 감소된다. 세포외다당류 중 특히 불용성 글루칸은 우식원성의 streptococci가 치아 표면에 부착하고 생물막을 형성하는데 중요한 역할을 하여 미생물이 우식원성을 보이고 구조적으로 견고해질 수 있도록 한다. 이러한 이유로 글루칸의 생성은 *S. mutans*의 독성인자로 분류된다[64-66]. 글루칸의 생성은 포도당전이효소(glycosyltransferase)에 의해 촉매되는데, 불소는 *S. mutans*의 포도당전이효소의 생산과 분비작용을 부분적으로 억제한다[59, 64].

은이온도 미생물의 포도당전이효소를 불활성화하여 미생물이 치아에 부착하는 것을 억제하며 따라서 은이온 또한 미생물의 생물막 형성을 효과적으로 억제할 수 있다[44, 67]. 이와 더불어 SDF의 은이온은 미생물의 효소, DNA 복제, 세포벽과 세포막 구조에 영향을 주어 항미생물 효과를 보이는 것으로 제안되고 있다[34, 68-70]. 은이온은 아미노산 중 시스테인(cysteine)의 티올기(thiol group, -SH)에 결합할 수 있다. 시스테인은 효소의 활성에 필수적인 요소로, 은이온이 시스테인에 결합할 경우 효소의 활성을 억제하고, 대사 과정을 방해하여, 결과적으로 미생물의 사멸을 유발할 수 있다. DNA의 주성분인 구아닌에 은이온이 결합할 경우 미생물의 DNA 복제를 억제할 수 있다[68]. 은이온은 세포막 단백질에 있는 이황화 이온($S_2^{2-}$)과 결합하며, 이는 세포막의 투과성을 증가시킨다[68]. 또한 은이온은 세포벽에 있는 음전하를 띄는 펩티도글리칸(peptidoglycan)과 정전기적으로 결합할 수 있고, 세포막의 수송 기능을 방해할 수 있다. 이러한 작용으로 인해 미생물 세포 형태가 뒤틀릴 수 있으며, 미생물 세포의 사멸을 유발할 수 있다[68]. 공초점레이저주사현미경 결과에서 Fig. 6B를 살펴보면 SDF 처리 직후 노란색 또는 붉은색의 커다란 둥근 형태의 구조가 나타났다가 이후 Fig. 6C에서는 사라졌다. 노란색 형광은 SYTO - 9이 PI로 완전히 대체되지 않았을 때 관찰되는 현상으로, 미생물의 세포가 사멸과정 중에 있는 것이라고 평가할 수 있다[71]. 따라서 SDF 적용 직후에 일시적으로만 관찰되는 이러한 구조는 SDF의 세포벽과 세포막에의 영향으로 인해 세포가 부풀어오른 후 파괴되어 나타나는 현상이라고

추측해볼 수 있다.

은으로 인해 사멸된 미생물은 살아있는 다른 미생물에 상당한 살균효과를 가지는 일명 “좀비 효과”를 보이게 된다. 은이 이러한 특성을 보이는 이유는 금속으로 인해 미생물이 사멸된 경우, 미생물이 죽은 이후에도 금속의 효과는 사라지지 않기 때문이며, 또한 죽은 미생물이 지속적으로 금속 이온을 방출할 수 있는 저장고의 역할을 하기 때문이다[72]. 이러한 특성으로 은은 지속적인 항미생물효과를 보일 수 있다.

치아에 대한 항미생물 효과 평가시에는 SDF의 적용 과정을 임상에서의 적용 방법과 유사하게 하여 연구를 진행하였다. 임상에서는 압축공기로 치면을 건조시킨 후, 치아 하나 당 5 μL의 SDF를 도포하고, 1 – 3분동안 적용시키도록 권고되고 있다[21]. 따라서 치아 시편을 압축공기로 건조한 후, SDF를 적용하고 3분 후에 증류수로 세척하여 남아있는 SDF를 제거하였다. SDF를 적용한 양은 시편의 크기를 고려하여 치아 하나에서의 적용 양인 5 μL보다 적은 1 μL의 양을 적용하였다. 이전 연구에서는 2.0 mm X 2.0 mm X 4.0 mm의 시편의 절반에 해당하는 표면에 0.6 μL의 SDF를 적용하여 연구를 진행한 바 있다[42].

연구 결과, 치아에 SDF를 처리한 경우 법랑질과 상아질 표면에 우식원성의 생물막이 형성되는 것이 감소함을 확인할 수 있었다. 즉, SDF를 처리할 경우 이미 형성되어 있는 우식원성 생물막을 감소시킬 뿐 아니라, 약제의 적용 이후에 우식원성 생물막이 형성되는 것도

감소시켰다. 특히 SDF는 치아우식을 유발하는 주 원인균인 *S. mutans*의 증식 또한 억제하였다. 앞서 언급한 Chu 등[42]과 Mei 등[43, 44]의 연구에서도 치아에 SDF를 도포할 경우 항미생물효과를 보임을 확인할 수 있었다. 하지만 이들 연구는 특정 미생물들만 배양하여 구강 내의 생물막을 충분하게 재현하지 못했으며 SDF의 주요 적용 대상인 유치가 아닌 제3대구치로 연구를 진행했다는 한계가 있다. 따라서 이번 연구에서는 실제 구강 내의 생물막을 재현하기 위해 타액을 이용하여 획득피막과 유사한 구조를 형성한 후, 여기에 타액과 *S. mutans,* 자당을 이용하여 우식원성의 타액 생물막을 구현하였다. 이와 같은 타액 생물막은 자일리톨 저항성 *S. mutans*와, 자일리톨 민감성 *S. mutans*의 생물막 형성에 대한 특성을 파악하고자 하는 연구에서 사용된 바 있다[53]. 또한 우식원성의 타액 생물막은 프로바이오틱스의 항미생물효과를 평가하기 위해 사용된 바 있으나 현재까지 SDF의 항미생물효과를 평가하기 위해서는 사용된 바 없다[51, 52]. 또한 이번 연구에서는 유치를 사용하여 실제 임상상황과 유사한 조건이 되도록 하여 연구를 진행하였다는 점에 있어서 의의가 있다.

대조군 및 실험군 모두 법랑질 시편에서 상아질 시편보다 전체 미생물과 *S. mutans*가 많이 배양되었는데, 이는 상아질 표면에서 더 많은 미생물이 배양된다는 이전의 연구들과는 반대되는 결과이다. 이전 연구들에서는 치아 표면에 미생물이 증식하는데 있어서 초기 미생물 집락화를 위한 틈새 또는 거친 질감이 중요하게 작용한다고 하였으며, 상아세관이 미생물 증식을 위한 틈새를 제공하여 상아질에서 더 많은

미생물이 증식한다고 하였다[73, 74]. 이번 연구에서 상아질 시편에 적은 미생물이 배양된 이유는 표면거칠기의 차이로 인한 것으로 추측해볼 수 있다. 상아질 시편 제작시에는 법랑질을 제거한 후 절삭면을 샌드페이퍼로 연마하였으며, 실제 임상 상황과 유사하게 진행하기 위해 법랑질 시편은 따로 연마를 거치지 않았다. 미백제가 법랑질과 상아질의 거칠기와 표면 특성에 미치는 영향에 대해 연구한 Çobankara 등[75]의 연구에서도 법랑질 시편은 연마 과정을 따로 거치지 않고, 상아질 시편만 상아질의 노출을 위해 절삭 및 연마 과정을 진행하였다. 해당 연구에서 상아질 시편이 법랑질 시편보다 낮은 표면 거칠기를 보였으며, 저자는 이를 치아 표면의 절삭 및 연마 때문일 수 있다고 추측했다. 따라서, 이번 연구에서도 연마를 진행한 상아질 시편이 법랑질 시편보다 낮은 표면 거칠기를 가지게 된 것으로 추측할 수 있다. 표면 거칠기가 높을수록 미생물의 부착이 용이한데, 상아질 표면의 연마에 의해 거칠기가 감소하여 미생물의 부착이 감소했다고 추측해볼 수 있다[73, 76, 77].

구강 내 미생물은 플랑크톤 상태 또는 표면에 부착된 상태로 존재하며, 타액은 플랑크톤 미생물의 배지 역할을 한다. 플랑크톤 미생물에서 생물막이 형성되는 과정은 획득피막의 형성으로 시작된다. 획득피막은 구강위생 후 수 분 내에 치아표면에 타액에서 기원한 단백질 등이 흡착되어 형성되는 무세포성 막이다. 타액 내에 있던 플랑크톤 미생물 중 몇몇 종들이 획득피막과 약하고 가역적인 비공유결합을 형성한다.

이후 미생물 세포 표면의 부착소와 획득피막 내의 수용체의 상호작용 등으로 인해 강하고 비가역적인 결합을 형성하게 된다. 이렇게 일차적으로 부착된 미생물에 이차적으로 미생물들이 부착하게 되어 생물막에 다양한 미생물종이 포함되게 된다. 미생물이 증식하게 되면서 세포외기질도 합성되며, 이는 생물막을 구조적으로 견고해질 수 있도록 하고 외부 환경으로부터 생물막을 보호하는 역할을 한다. 반대로 생물막에 있는 미생물은 구강위생과정 등으로 인해 치아 표면에서 제거되어 다시 플랑크톤 미생물이 된다. 플랑크톤 미생물과 생물막 미생물은 이와 같은 유동적인 과정을 거치게 된다[41, 78, 79].

이번 연구에서는 SDF를 도포할 경우 치아에 생성되는 생물막이 감소됨을 확인하였을 뿐 아니라 배양액의 플랑크톤 미생물 또한 감소됨을 확인할 수 있었다. 이러한 플랑크톤 미생물에 대한 효과는 SDF를 우식부위에 도포할 경우 구강 내 전체 미생물총에도 영향을 줄 가능성을 시사한다. 하지만 이러한 작용이 실제 구강 내에서 어떠한 영향을 가져오는지, 그리고 장기적으로 어떠한 영향을 미치는지에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다.

생물막을 형성하고 있는 미생물들은 플랑크톤 미생물보다 항미생물제에 높은 저항성을 보인다. 이는 미생물이 생물막을 형성할 경우 생물막의 기질 구조가 항미생물제의 침투를 방해하기 때문일 수 있으며, 생물막 내부의 환경과 미생물의 생태 및 유전자 발현이 항미생물제의 최대 활성을 위한 조건과 다르기 때문일 수 있다[41, 80-82]. Bjarnsholt 등[83]은 생물막을 형성하는 미생물의 살균을 위해서는 플랑크톤

미생물보다 10 – 100배 높은 농도의 은이 필요하다고 보고하였다. 하지만 이번 연구에서는 법랑질 시편을 이용한 실험 중 전체 미생물의 CFU를 평가했을 때(SDF 처리시의 생물막 미생물은 대조군에 비해 1.4 X $10^{-5}$배, 플랑크톤 미생물은 대조군에 비해 9.7 X $10^{-6}$배)를 제외하고는 SDF가 플랑크톤 미생물에 대해 더 큰 효과를 보이지는 않았다. 이는 실험 목적과 연구 방법에서의 차이로 인한 것으로 추정된다. 본 연구는 치아에서 방출되는 SDF가 플랑크톤 미생물에도 영향을 미치는지를 평가하기 위해 치아 표면에 SDF를 도포한 후 그 상방에 생물막을 배양하면서 배지의 미생물에까지 영향을 미치는지를 평가하였다. 따라서 항미생물제를 플랑크톤 미생물과 생물막 미생물에 각각 적용한 대부분의 연구들과는 달리 플랑크톤 미생물과 비교시 생물막 미생물이 항미생물제에 대해 높은 저항성은 보이지 않은 것으로 추측할 수 있다.

고농도의 불소와 은으로 인한 부가적인 효과로 SDF는 다른 불소 도포제보다 높은 항미생물효과를 보인다. 상아질 시편에 38%의 SDF와 5%의 불화나트륨을 적용한 후 *S. mutans*를 이용한 우식원성의 생물막을 배양한 연구에 따르면 5%의 불화나트륨은 *S. mutans*의 감소를 보이지 않았으나, 38%의 SDF는 *S. mutans*에 대해 명확한 항미생물효과를 보였다[84]. 또한 SDF와 불소 바니쉬(6% 불화나트륨, 6% 불화칼슘), APF 겔의 항미생물효과를 비교한 연구에 따르면 SDF는 나머지 두 약제와 비교시 *S. mutans*의 수를 더 현저하게 감소시켰다고

보고하였다[85]. 이렇듯 뛰어난 항미생물효과를 보이는 SDF는 치아우식의 정지 및 억제를 위해 다른 불소 도포제보다 더욱 효과적으로 사용될 수 있을 것이다.

SDF의 불소 농도는 44,800ppm으로, 5%의 NaF는 22,600ppm, APF 겔은 12,300ppm의 불소를 포함하는 것을 고려했을 때, SDF는 다른 불소도포제보다 약 2 – 3배의 불소 농도를 함유한다. 하지만 SDF는 다른 불소도포제에 비해 매우 소량만을 사용하며, 잘 조절된 불소농도를 지닌 제품을 올바르게 사용할 경우에는 불소증을 유발하지 않는다. SDF는 아동의 몸무게 10 kg 당 한 방울(25 μL, 9.5 mg SDF)을 사용하도록 권장된다. 한 방울의 SDF는 5개의 치아에 도포하기에 충분한 양으로, SDF를 적절하게 도포할 경우 0.25 mL의 불소 바니쉬를 도포하는 것보다 적은 양의 불소를 포함하게 된다[21, 23].

SDF는 드물게 점막에 자극을 주거나 점막 병소를 유발할 수 있으나, 이는 치료하지 않아도 48시간 내에 사라진다. 또한 피부에 일시적으로 착색이 일어날 수 있으나, 2일에서 14일 내에 사라진다. 이외에 금속 맛 또는 쓴맛이 느껴질 수 있다. 하지만 현재까지 심각한 치수 손상이나, 전신적인 부작용은 보고되지 않았다. SDF 도포시에는 치은의 보호를 위해 바세린을 도포하거나, 거즈나 코튼롤로 적용 부위를 격리시킨 후, 작은 크기의 마이크로브러쉬를 이용하여 SDF를 도포하고, 코튼으로 도포한 부위에 있는 과잉의 SDF를 제거함으로써 전신적인 흡수 및 치은의 자극을 최소화할 수 있다[21, 23].

미소경도의 측정은 경조직의 무기질 함량을 평가할 수 있는 방법으로, 다양한 연구들에서 사용되었다[86, 87]. 치아의 경도와 무기질의 함량의 관계는 지수함수로 표현될 수 있다[88]. 치아우식이 발생할 경우 치아의 무기질 함량이 감소하게 되며, 이는 치아의 경도 감소를 유발한다. 반대로 치아우식이 정지될 경우 무기질 함량이 증가하며, 경도는 증가한다[89]. 이번 연구에서 SDF를 적용한 결과, 미소경도가 법랑질 시편에서는 10.8%, 상아질 시편에서는 42.1% 증가하였다. 즉, SDF를 도포할 경우 법랑질과 상아질 모두에서 무기질 함량이 증가함을 확인할 수 있었다.

SDF가 치아 경조직에 미치는 영향을 평가한 선행 연구들에서도 SDF가 치아우식에 의한 무기질의 소실을 방지하여 미소경도를 증가시킨다고 보고 하였다. Abdil-nafaa 등[45]은 유전치 법랑질에 SDF를 도포한 결과 치아우식에 의해 법랑질의 미소경도가 저하되는 것이 감소되었다고 하였다. 더불어 SDF를 도포한 그룹은 불소 바니쉬를 도포한 그룹보다 미소경도가 유의하게 덜 감소하여, SDF가 불소 바니쉬보다 무기질의 소실을 더 효과적으로 방지할 수 있다고 하였다. 유사한 연구를 시행한 다른 논문에서도 SDF와 불소 바니쉬가 법랑질의 미소경도의 저하를 감소시킨다고 하였다. 하지만 이 논문에서는 SDF와 불소 바니쉬 간에는 유의한 차이를 보이지 않았다고 하여 이 점에 대해서는 추가 연구가 필요할 것으로 보인다[46]. 상아질에서도 SDF가 미소경도에 미치는 영향에 대해서 연구가 진행된 바 있다. 제3대구치를 이용하여 SDF가 치아 경조직에 미치는 영향을 평가한 연구에서는 SDF를 적용할 경우

치아우식에 의해 상아질의 미소경도가 감소되는 것을 줄여줄 수 있다고 하였다[42, 44]. 이들 연구에서는 미생물 배양액을 이용하여 인공우식병소를 형성한 후 SDF를 도포하고 시편을 다시 미생물 배양액에서 일정 기간 동안 침지시켰다. 연구 결과 SDF를 도포한 시편이 대조군보다 유의하게 높은 미소경도를 보였다[42, 44]. Chu 등[87]의 연구에서도 우식병소에 SDF를 도포하여 치아우식이 정지한 경우, 연화상아질에 비해 높은 미소경도를 보인다고 하였다. 정지된 치아우식의 경우 표면 근처 50 $\mu$m의 미소경도는 40 kg/mm$^2$ 이상을 보였으며 반면 연화상아질의 경우 우식병소 표면 근처 50 $\mu$m에서는 미소경도가 10 kg/mm$^2$ 이하였다. 이러한 미소경도 수치는 이번 연구에서 측정된 상아질 미소경도 값과는 차이를 보인다. 상아질의 미소경도는 상아법랑경계에서 치수쪽으로 이동할수록 감소하며, 반면 외피 상아질(mantle dentin)은 다른 부위보다 무른 특성을 보여 저작력과 법랑질 미세균열에 대한 완충 역할을 한다. 또한 상아질의 구조는 방향성을 가지므로 시편 제작시 절단하는 방향도 미소경도에 영향을 준다. Chu 등[87] 은 이러한 특성들 때문에 상아질 시편을 제작하는 부위 및 방법, 우식병소의 생성방법 등에 따라 미소경도는 넓은 범위를 가질 수 있으며, 따라서 연구 간의 미소경도의 비교는 적절하지 않을 수 있다고 하였다[87, 90-92].

법랑질의 치아우식과 상아질의 치아우식은 차이가 있다. 법랑질의 치아우식은 미생물이 생성하는 산에 의한 무기질의 용해과정이며, 상아질 치아우식의 경우 무기질의 탈회와 I형 교원섬유 네트워크의

유기질 분해가 함께 일어나는 복합적인 과정이다[93, 94]. 이번 연구 결과 법랑질에서는 미소경도가 10.8% 증가된 반면, 상아질에서는 미소경도가 42.1%로 크게 증가하여 법랑질과 상아질에서의 SDF의 효과가 차이를 보였다. Zhi 등[95]의 연구에서도 유사하게 법랑질과 상아질에서의 효과 차이를 확인할 수 있었다. 해당 연구에서는 미세단층촬영기를 이용하여 선형감쇠계수를 측정하여 SDF가 법랑질과 상아질에 미치는 영향을 평가하였는데, 법랑질은 재광화될 경우 선형감쇠계수가 17 – 21% 증가하였으며, 상아질은 재광화시 42 – 48%가 증가하였다. 이러한 법랑질과 상아질에서의 차이는 법랑질과 상아질의 치아우식과 재광화 과정의 차이에서 기인한 것으로 추정되며, 정확한 원인에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다.

앞서 언급한 바와 같이 미소경도의 증가는 SDF가 치아우식으로 인한 치아의 무기질 소실을 억제함으로써 나타난다. SDF와 치아가 반응할 때의 정확한 화학반응은 밝혀지지 않았으나 추정되는 화학반응은 다음과 같다[96].

$$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + Ag(NH_3)_2F \rightarrow 30CaF_2 + 20Ag_3PO_4 + NH_4OH$$

X선 회절분석을 시행한 연구가 SDF가 치아경조직과 반응시 주로 불화칼슘과 인산은이 생성됨을 뒷받침해주며, Lou 등[96]은 SDF가 수산화인회석과 반응시 표면에 불화칼슘의 구형의 입자들이 생성됨을 확인하였다. 불화칼슘은 치아우식이 발생할 수 있는 환경에서 pH에 의해 조절되어 불소를 서서히 방출한다. 특히, SDF의 반응 생성물로

인한 알칼리성 환경으로 인해 불화칼슘의 용해성이 낮아지게 되어, 불화칼슘은 이후의 치아우식 위험에서 사용될 수 있는 불소 저장고로서의 역할을 한다. 불화칼슘은 불화인회석보다 내산성이 적으나, 재광화동안 인산염과 반응하여 불화인회석을 생성할 수 있다. SDF의 반응 생성물인 인산은은 수산화인회석과 불화인회석보다 용해도가 높기 때문에 인산염의 저장고로서의 역할을 할 수 있어 불화칼슘이 불화인회석으로 되는 과정을 촉진할 수 있다[27, 68-70, 97].

또한 SDF를 처리할 경우 앞서 언급한 불화칼슘, 인산은과 더불어 프로테인은(silver protein)이 형성되며 이들은 상아질 표면에 침착되어 우식병소에서 칼슘과 인이 소실되는 것을 방지해주는 역할을 한다[44, 70, 98]. SDF는 이러한 재광화 기전으로 인해 치아의 무기질 소실을 방지하고 우식병소에서 무기질이 재침착 될 수 있도록 하는 것으로 추정되며 따라서 미소 경도가 증가하게 된다.

SDF가 치아의 물리적 특성에 미치는 영향에 대해서는 미소경도 외에도 미세단층촬영기(micro-CT), 에너지 분산 X-선 분광법(Energy Dispersive X-ray Spectroscopy), 주사 전자현미경(Scanning Electron Microscope), 투사 전자현미경(Transmission Electron Microscope) 등을 이용하여 다양한 연구가 진행되었다. 주사 전자현미경-에너지 분산 X-선 분광법을 이용하여 분석한 결과 우식병소에 SDF를 적용한 경우, 대조군에 비해 칼슘과 인이 높은 농도로 존재하였다[42]. 주사 전자현미경을 이용하여 표면을 분석한 결과 정지된 우식병소의 경우 관간상아질과 관내상아질 모두에서 공간이

좁아져 있었다. 또한 정지된 우식병소의 경우 구형의 입자들이 밀도있는 과립상을 이룬 형태가 관간상아질에서 관찰되었으며, 이는 재광화 과정이 일어나고 있음을 의미한다. 불화칼슘의 작은 구형입자들이 SDF 도포 후 확인되었으며, 이는 불소의 저장소처럼 작용하여 불소를 점차적으로 방출해 재광화를 촉진한다[99-101]. 주사 전자현미경을 이용하여 분석한 결과에 따르면 활성 우식병소의 경우 결정구조가 거의 관찰되지 않은 반면, 정지된 우식병소의 경우 침상의 결정구조가 관찰되었다[99, 100]. X-선 회절분석으로 결정구조를 평가하였을 때 역시 우식병소는 수산화인회석 결정이 용해되어 낮은 결정화도를 보이는 반면, SDF를 도포한 그룹은 대조군에 비해 수산화칼슘의 결정화도가 높음이 확인되었다[43]. 푸리에 변환 적외선 분광도계(Fourier-transformation infrared spectroscopy ; FTIR)로 성분의 변화를 분석한 연구들도 있다. FTIR 분석시 인산($HPO_4^{2-}$)은 무기질의 함량을 의미하며, 건전한 상아질에서 높은 강도로 나타난다. 반면, amide I는 type I 교원질의 분해로 나타나며, 우식 상아질에서 높은 강도로 나타난다. FTIR 분석에서는 SDF 도포시 대조군에 비해 log[amide I : $HPO_4^{2-}$]이 감소하여, SDF를 도포할 경우 탈회의 정도를 감소시킬 수 있다는 것이 확인되었다[42-44, 102].

연구 결과 법랑질 시편에서는 SDF 도포시 표면거칠기가 유의하게 감소함이 확인되었다. 최근 발표된 연구에서도 SDF를 도포할 경우, pH-cycle에 의한 법랑질의 표면 거칠기 증가를 유의하게 감소시킨다고

보고하였으며, 특히 SDF는 불소 바니쉬(1% 불화나트륨, 4% 불화칼슘, 0.5% 불화아민)보다 더 효과적이라고 하였다[103]. 법랑질의 탈회가 발생할 경우 수산화인회석이 용출되면서 다공성의 구조를 형성하여 표면 거칠기가 증가되며, 반대로 재광화가 일어날 경우 표면 거칠기가 감소될 수 있다[104]. 앞서 언급하였듯이 표면거칠기가 높을 경우 치아 표면에 미생물이 증식하는데 있어서 초기 미생물이 집락화하기 좋은 환경을 제공하게 된다[73, 74, 77]. 따라서 SDF를 도포하여 법랑질의 표면거칠기가 감소될 경우 치아 표면에 미생물의 증식을 억제하는 효과를 추가적으로 가져올 수 있을 것이다. 반면 상아질 시편에서는 표면거칠기 변화가 유의하지 않은 결과를 보였다. 이는 SEM을 이용한 이전 연구에서 활성 우식병소의 경우 거칠고 다공성의 표면을 보이는 반면, SDF를 도포하여 정지된 우식병소는 상대적으로 매끈한 표면을 보이며 상아질 교원 섬유의 노출이 적었다고 한 것과는 상반된 결과이다[101]. 이러한 연구 결과의 차이는 표면 거칠기 실험시 시편을 혼합 타액에 보관하지 않았다는 점과, 각 군당 표본 크기가 크지 않았다는 점이 한계로 작용했을 수 있으며, 이에 대해서는 추후 추가 연구가 필요할 것으로 보인다.

본 논문에서는 SDF가 우식원성 타액 생물막에 미치는 영향과 치아에 도포시에 보이는 항미생물효과를 평가하였다. 더불어 치아의 물리적인 특성에 미치는 영향을 분석하여 SDF의 항우식효과에 대한 연구를 진행하였다.

본 연구는 타액을 이용하여 우식원성 생물막을 유사하게 재현하고자 하였다는 의의가 있다. 하지만 현재 실험실 상에서 배양할 수 있는 미생물은 전체 구강내 미생물총의 50% 이하로 추정되며 현재까지의 기술로는 배양이 불가능한 종들이 다수 존재하는 만큼, 추후 배양 기술 개발 및 후속 연구들을 통해 구강내 상태를 보다 유사하게 재현하기 위한 노력이 필요할 것이다[41, 105].

이번 연구에서의 생물막 형성 억제 효과는 72시간 배양 후의 결과로, 단기적인 측면에서만 생물막 형성 억제 효과를 확인했다는 한계가 존재한다. 앞서 언급하였듯이 은이온은 죽은 세균과 상아질 단백질에 저장되어 있다가, 살아있는 세균이 추가될 경우 다시 활성화되어 지속적인 항미생물효과를 보이는 것으로 보고되었다[21, 72]. 은이온의 항미생물효과가 장기적으로 지속될수록 치아우식의 발생 및 진행을 더욱 효과적으로 예방할 수 있을 것이다. SDF의 은이온으로 인한 항미생물효과의 지속성을 확인하기 위해서 향후 치아우식병소에 SDF를 처리한 후 장기적인 관찰을 하여 항미생물효과가 얼마나 오래 계속되는가를 확인하는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

이번 연구에서는 SDF가 치아의 물리적 특성에 미치는 영향에 대해 평가하기 위해 미소경도와 표면 거칠기를 평가하였다. 지금까지 다양한 연구들에서 여러 방법을 통해 치아의 물리적 특성에 미치는 영향을 평가하였으나, 대부분 영구치를 이용하여 연구가 진행되었다. 따라서 앞으로 이러한 다양한 연구방법을 유치를 이용하여 시행함으로써 유치의 물리적인 특성에 미치는 영향에 대해 추가적으로 평가하는 연구가

필요할 것으로 사료된다.

# V. 결론

이 연구는 우식원성의 타액 생물막을 이용하여 SDF의 항미생물효과를 평가하고, SDF가 치아의 물리적 특성에 미치는 영향에 대해 평가하고자 시행되었다.

이를 위하여 획득피막과 유사한 구조를 형성한 후, 여기에 타액과 자당, *S. mutans* 등을 혼합하여 우식원성의 생물막을 구현하여 SDF의 항미생물효과를 평가하였다. 또한 유구치 법랑질시편과 상아질시편에 SDF를 처리한 후 생물막 형성을 억제하는 효과를 평가하였다.

우식원성의 타액 생물막에 아저해농도(sub-MIC)의 SDF를 처리한 결과 시간 경과에 따라 전체 미생물과 *S. mutans*의 수가 유의하게 감소하였다. 또한 공초점레이저주사현미경을 통한 관찰에서도 생물막 내에서 죽은 세포의 비율이 점차 증가하여 30초 후에는 대부분의 미생물이 사멸하였음을 확인할 수 있었다. 유치 법랑질과 상아질 시편에 형성된 생물막으로 진행한 연구에서는 SDF 처리시 전체 미생물과 *S. mutans*의 증식이 억제되어, SDF는 우식원성 생물막을 감소시킬 뿐 아니라 생물막의 형성을 억제함을 확인할 수 있었다. 또한 법랑질과 상아질 시편 모두에서 플랑크톤 미생물의 증식 또한 저해되었다.

치아 시편에 SDF를 적용한 결과, 법랑질과 상아질 모두에서 미소경도가 증가하였으며, 이를 통해 치아의 무기질 함량이 증가함을 확인할 수 있었다. 법랑질 시편에 SDF를 도포한 경우 표면거칠기가 감소하였다.

이러한 결과를 통해 임상에서도 효과적으로 우식원성 미생물을 억제하고, 치아우식부위를 경화시킬 수 있을 것으로 추정할 수 있으며, 이로 인한 항우식효과를 기대할 수 있다.

# 참고문헌


1. Lagerweij MD, Van LC : Declining caries trends: Are we satisfied?. *Curr Oral Health Rep*, 2:212-217, 2015.
2. Marthaler TM : Changes in dental caries 1953-2003. *Caries Res*, 38:173-181, 2004.
3. Marthaler TM, Brunelle J, Vrbic V, et al. : The prevalence of dental caries in Europe 1990-1995. *Caries Res*, 30:237-255, 1996.
4. Prabakar J, Arumugham IM, Leelavathi L, et al. : Prevalence and Comparison of Dental Caries experience among 5 to 12 year old school children of Chandigarh using dft/DMFT and SiC Index: A Cross-sectional study. *J Family Med Prim Care*, 9:819-825, 2020.
5. Anil S, Anand PS: Early childhood caries : prevalence, risk factors, and prevention. *Front Pediatr*, 5:157-163, 2017.
6. Bagramian RA, Garcia-Godoy F, Volpe AR : The global increase in dental caries. A pending public health crisis. *Am J Dent*, 22:3-8, 2009.
7. Niji R, Arita K, Mitome M, et al. : Maternal age at birth and other risk factors in early childhood caries. *Pediatr Dent*, 32:493-498, 2010.
8. Tiberia MJ, Milnes AR, Cheung WS, et al. : Risk factors for

early childhood caries in Canadian preschool children seeking care. *Pediatr Dent*, 29:201-208, 2007.

9. Congiu G, Campus G, Lugliè PF : Early childhood caries (ECC) prevalence and background factors: a review. *Oral Health Prev Dent*, 12:71-76, 2014.
10. Minitry of Health and Welfare : 2003 Korean Children' s Oral Health Survey. Available from URL: http://www.mohw.go.kr/react/jb/sjb030301vw.jsp?PAR_MENU_ID=03&MENU_ID=032901&CONT_SEQ=335704, (Accessed on October 5, 2020)
11. Minitry of Health and Welfare : 2018 Korea National Children' s Oral Health Survey. Available from URL: http://www.mohw.go.kr/react/jb/sjb030301vw.jsp?PAR_MENU_ID=03&MENU_ID=032901&CONT_SEQ=349651, (Accessed on October 5, 2020)
12. Han DH, Kim JB, Park DY : The decline in dental caries among children of different ages in Korea, 2000-2006. *Int Dent J*, 60:329-335, 2010.
13. Kim HN, Han DH, Kim JB, *et al.* : The decline in dental caries among Korean children aged 8 and 12 years from 2000 to 2012 focusing SiC Index and DMFT. *BMC oral health*, 16:38-46, 2016.

14. Lee SH : Present situation and prospect of pediatric dentistry in Korea-Focused on management of dental caries. *J Korean Acad Pediatr Dent*, 39:206-225, 2012.
15. Prakash P, Subramaniam P, Durgesh BH, Konde S : Prevalence of early childhood caries and associated risk factors in preschool children of urban Bangalore, India: A cross-sectional study. *Eur J Dent*, 6:141-152, 2012.
16. Ajami BA, Shabzendedar M, Rezay YA, Asgary M : Dental treatment needs of children with disabilities. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*, 1:93-98, 2007.
17. Ivančić JN, Majstorović M, Szirovicza L, *et al.* : Dental caries in disabled children. *Coll Antropol*, 31:321-324, 2007.
18. Taani DQ : Relationship of socioeconomic background to oral hygiene, gingival status, and dental caries in children. *Quintessence Int*, 33:195-198, 2002.
19. Wang YC, Lin IH, Huang CH, Fan SZ : Dental anesthesia for patients with special needs. *Acta Anaesthesiol Taiwan*, 50:122-125, 2012.
20. Dougherty N : The dental patient with special needs: a review of indications for treatment under general anesthesia. *Spec Care Dentist*, 29:17-20, 2009.
21. Horst JA, Ellenikiotis H, UCSF Silver Caries Arrest Committee,

Milgrom PM : UCSF protocol for caries arrest using silver diamine fluoride: rationale, indications, and consent. *J Calif Dent Assoc*, 44:16-28, 2016.

22. Gao S, Zhao I, Chu CH, et al. : Clinical trials of silver diamine fluoride in arresting caries among children: a systematic review. *JDR Clin Trans Res*, 1:201-210, 2016.
23. Crystal YO, Marghalani AA, Graham L, et al. : Use of silver diamine fluoride for dental caries management in children and adolescents, including those with special health care needs. *Pediatr Dent*, 39:135E-145E, 2017.
24. Chibinski AC, Wambier LM, Reis A : Silver diamine fluoride has efficacy in controlling caries progression in primary teeth: a systematic review and meta-analysis. *Caries Res*, 51:527-541, 2017.
25. Crystal YO, Niederman R : Silver diamine fluoride treatment considerations in children's caries management. *Pediatr Dent*, 38:466-471, 2016.
26. Bedi R, Sardo-Infirri J : Oral health care in disadvantaged communities. *FDI World Dent Press*, 1999.
27. Chu CH, Lo ECM : Promoting caries arrest in children with silver diamine fluoride: a review. *Oral Health Prev Dent*, 6:315-321, 2008.

28. Yamaga R, Yokomizo I : Silver ammonia fluoride solution and method of its use. In.: *United States Patent Office*; 1971.
29. Llodra JC, Rodriguez A, Morato M, et al. : Efficacy of silver diamine fluoride for caries reduction in primary teeth and first permanent molars of schoolchildren: 36-month clinical trial. *J Dent Res*, 84:721-724, 2005.
30. Tinanoff N, Baez RJ, Twetman S, et al. : Early childhood caries epidemiology, aetiology, risk assessment, societal burden, management, education, and policy: Global perspective. *Int J Paediatr Dent*, 29:238-248, 2019.
31. Shah S, Bhaskar V, Trivedi K : Efficacy of silver diamine fluoride as a topical fluoride agent compared to fluoride varnish and acidulated phosphate fluoride gel: An in vivo study. *J Pediatr Dent*, 2:5-12, 2014.
32. Chu CH, Lo ECM, Lin HC : Effectiveness of silver diamine fluoride and sodium fluoride varnish in arresting dentin caries in Chinese pre-school children. *J Dent Res*, 81:767-770, 2002.
33. Mei ML, Lo ECM, Chu CH : Clinical use of silver diamine fluoride in dental treatment. *Compend Contin Educ Dent*, 37:93-98, 2016.
34. Rosenblatt A, Stamford TCM, Niederman R : Silver diamine fluoride: a caries "silver-fluoride bullet". *J Dent Res*,

88:116-125, 2009.

35. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB : Dental caries. *Lancet*, 369:51-59, 2007.

36. Cury JA, Tenuta LMA : Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions?. *Braz Oral Res*, 23:23-30, 2009.

37. Pitts NB, Zero DT, Ismail A, et al. : Dental caries. *Nat Rev Dis Primers*, 3:1-16, 2017.

38. Featherstone JD : The continuum of dental caries—evidence for a dynamic disease process. *J Dent Res*, 83:39-42, 2004.

39. Featherstone JD : Dental caries: a dynamic disease process. *Aust Dent J*, 53:286-291, 2008.

40. Dewhirst FE, Chen T, Wade WG, et al. : The human oral microbiome. *J Bacteriol*, 192:5002-5017, 2010.

41. Moter A, Devine DA : Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontol 2000*, 55:16-35, 2011.

42. Chu CH, Mei L, Seneviratne CJ, Lo ECM : Effects of silver diamine fluoride on dentine carious lesions induced by Streptococcus mutans and Actinomyces naeslundii biofilms. *Int J Paediatr Dent*, 22:2-10, 2012.

43. Mei ML, Chu CH, Lo ECM, et al. : Caries arresting effect of silver diamine fluoride on dentine carious lesion with S. mutans

and L. acidophilus dual-species cariogenic biofilm. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 18:e824-831, 2013.

44. Mei ML, Li Q, Samaranayake LP, et al. : Antibacterial effects of silver diamine fluoride on multi-species cariogenic biofilm on caries. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 12:4-10, 2013.
45. Abdil-nafaa SA, Qasim AA : The Effect of Silver Diamine Fluoride and Fluoride Varnish on Microhardness of Primary Teeth Enamel (An In Vitro Study). *Al-Rafidain Dent J*, 20:283-295, 2020.
46. Mohammadi N, Far MHF : Effect of fluoridated varnish and silver diamine fluoride on enamel demineralization resistance in primary dentition. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.*, 36:257-261, 2018.
47. Murakami C, Bönecker M, Rodrigues CRMD, et al. : Effect of fluoride varnish and gel on dental erosion in primary and permanent teeth. *Arch Oral Biol*, 54:997-1001, 2009.
48. Ismail AI, Sohn W, Pitts NB, et al. : The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries. *Community Dent Oral Epidemiol*, 35:170-178, 2007.
49. Tong Z, Zhang L, Deng D, et al. : An in vitro study on the effect of free amino acids alone or in combination with nisin on

biofilms as well as on planktonic bacteria of Streptococcus mutans. *PloS One*, 9:e99513, 2014.

50. Xie JL, Singh-Babak SD, Cowen LE : Minimum inhibitory concentration (MIC) assay for antifungal drugs. *Bio Protoc*, 2:e252, 2012.
51. Kim YJ, Lee SH : Inhibitory effect of Lactococcus lactis HY 449 on cariogenic biofilm. *J Microbiol Biotechnol*, 26:1829-1835, 2016.
52. Lee SH, Kim YJ : A comparative study of the effect of probiotics on cariogenic biofilm model for preventing dental caries. *Arch Microbiol*, 196:601-609, 2014.
53. Lee SH, Choi BK, Kim YJ : The cariogenic characters of xylitol-resistant and xylitol-sensitive Streptococcus mutans in biofilm formation with salivary bacteria. *Arch Oral Biol*, 57:697-703, 2012.
54. Lacerda AJF, Silva Ávila DM, Torres CRG : Adhesive systems as an alternative material for color masking of white spot lesions: do they work. *J Adhes Dent*, 18:43-50, 2016.
55. Torres CP, Ciccone JC, Borsatto MC, et al. : Tensile bond strength of self-etching adhesive systems to primary dentin. *Am J Dent*, 18:327-332, 2005.
56. Schemehorn BR, Orban JC, Winston AE, et al. : Remineralization

by fluoride enhanced with calcium and phosphate ingredients. *J Clin Dent*, 10:13-16, 1999.

57. Casals E, Boukpessi T, Faller RV, et al. : Anticaries potential of commercial dentifrices as determined by fluoridation and remineralization efficiency. *J Contemp Dent Pract*, 8:1-10, 2007.

58. Gonzalez-Cabezas C, Fontana M, Stookey GK, et al. : Measurement of enamel remineralization using microradiography and confocal microscopy. *Caries Res*, 32:385-392, 1998.

59. Koo H : Strategies to enhance the biological effects of fluoride on dental biofilms. *Adv Dent Res*, 20:17-21, 2008.

60. Marquis RE, Clock SA, Mota-Meira M : Fluoride and organic weak acids as modulators of microbial physiology. *FEMS Microbiol Rev*, 26:493-510, 2003.

61. Svensäter G, Sjögreen B, Hamilton IR : Multiple stress responses in Streptococcus mutans and the induction of general and stress-specific proteins. *Microbiology*, 146:107-117, 2000.

62. Bradshaw DJ, McKee AS, Marsh PD : Prevention of population shifts in oral microbial communities in vitro by low fluoride concentrations. *J Dent Res*, 69:436-441, 1990.

63. Bradshaw DJ, Marsh PD, Hodgson RJ, Visser JM : Effects of glucose and fluoride on competition and metabolism within in vitro dental bacterial communities and biofilms. *Caries Res*, 36:81-86, 2002.

64. Koo H, Sheng J, Nguyen PTM, Marquis RE : Co-operative inhibition by fluoride and zinc of glucosyl transferase production and polysaccharide synthesis by mutans streptococci in suspension cultures and biofilms. *FEMS Microbiol Lett*, 254:134-140, 2006.

65. Yamashita Y, Bowen WH, Burne RA, Kuramitsu HK: Role of the Streptococcus mutans gtf genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. *Infect Immun*, 61:3811-3817, 1993.

66. Islam B, Khan SN, Khan AU : Dental caries: from infection to prevention. *Med Sci Monit*, 13:RA196-RA203, 2007.

67. Tamesada M, Kawabata S, Fujiwara T, Hamada S : Synergistic effects of streptococcal glucosyltransferases on adhesive biofilm formation. *J Dent Res*, 83:874-879, 2004.

68. Peng JJY, Botelho MG, Matinlinna JP : Silver compounds used in dentistry for caries management: a review. *J Dent*, 40:531-541, 2012.

69. Mei ML, Ito L, Lo ECM, et al. : The inhibitory effects of silver

diamine fluorides on cysteine cathepsins. *J Dent*, 42:329-335, 2014.

70. Mei ML, Li Q, Lo ECM, et al. : The inhibitory effects of silver diamine fluoride at different concentrations on matrix metalloproteinases. *Dent Mater*, 28:903-908, 2012.
71. Stiefel P, Emrich SS, Weber KM, Ren Q : Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. *BMC microbiol*, 15:36-44, 2015.
72. Wakshlak RB, Pedahzur R, Avnir D : Antibacterial activity of silver-killed bacteria: the" zombies" effect. *Sci Rep*, 5:9555, 2015.
73. Jung DJ, Ahmad AA, Hannig C, *et al.* : Visualization of initial bacterial colonization on dentine and enamel in situ. *J Microbiol Methods*, 81:166-174, 2010.
74. Weerkamp A, Uyen HM, Busscher HJ : Effect of zeta potential and surface energy on bacterial adhesion to uncoated and saliva-coated human enamel and dentin. *J Dent Res*, 67:1483-1487, 1988.
75. Çobankara FK, Ünlü N, Altinöz HC, Özer F : Effect of home bleaching agents on the roughness and surface morphology of human enamel and dentine. *Int Dent J*, 54:211-218, 2004.
76. Yurdaguven H, Aykor A, Soyman M, et al. : Influence of a

prophylaxis paste on surface roughness of different composites, porcelain, enamel and dentin surfaces. *Eur J Dent*, 6:1-8, 2012.

77. Teughels W, Assche NV, Sliepen I, Quirynen M : Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res*, 17:68-81, 2006.
78. Rudney JD : Saliva and dental plaque. *Adv Dent Res*, 14:29-39, 2000.
79. Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG : Saliva and dental pellicle-a review. *Adv Dent Res*, 14:22-28, 2000.
80. Marsh PD : Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res*, 38:204-211, 2004.
81. Wu M, Xu L, Huang X, et al. : Disinfection of Cariogenic Pathogens in Planktonic Lifestyle, Biofilm and Carious Dentine with Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Photochem Photobiol*, 96:170-177, 2020.
82. Decker EM, Weiger R, Brecx M, et al. : Susceptibility of planktonic versus attached Streptococcus sanguinis cells to chlorhexidine. *Clin Oral Investig*, 7:98-102, 2003.
83. Bjarnsholt T, Kirketerp-Møller K, Givskov M, et al. : Silver against Pseudomonas aeruginosa biofilms. *APMIS*, 115:921-928, 2007.
84. Yu OY, Zhao IS, Chu CH, et al. : Caries-arresting effects of

silver diamine fluoride and sodium fluoride on dentine caries lesions. *J Dent*, 78:65-71, 2018.

85. Shah S, Bhaskar V, Trivedi K, et al. : Efficacy of silver diamine fluoride as an antibacterial as well as antiplaque agent compared to fluoride varnish and acidulated phosphate fluoride gel: An in vivo study. *Indian J Dent Res*, 24:575-581, 2013.

86. Angker L, Nijhof N, Swain MV, Kilpatrick NM : Influence of hydration and mechanical characterization of carious primary dentine using an ultra-micro indentation system (UMIS). *Eur J Oral Sci*, 112:231-236, 2004.

87. Chu CH, Lo ECM : Microhardness of dentine in primary teeth after topical fluoride applications. *J Dent*, 36:387-391, 2008.

88. Angker L, Nockolds C, Swain MV, Kilpatrick N : Correlating the mechanical properties to the mineral content of carious dentine—a comparative study using an ultra-micro indentation system (UMIS) and SEM-BSE signals. *Arch Oral Biol*, 49:369-378, 2004.

89. Pereira PN, Inokoshi S, Yamada T, Tagami J : Microhardness of in vitro caries inhibition zone adjacent to conventional and resin-modified glass ionomer cements. *Dent Mater*, 14:179-185, 1998.

90. Angker L, Swain MV, Kilpatrick N : Micro-mechanical

characterisation of the properties of primary tooth dentine. *J Dent*, 31:261-267, 2003.

91. Angker L, Swain MV, Kilpatrick N : Characterising the micro-mechanical behaviour of the carious dentine of primary teeth using nano-indentation. *J Biomech*, 38:1535-1542, 2005.
92. Vieira A, Hancock R, Grynpas M, et al. : How does fluoride affect dentin microhardness and mineralization?. *J Dent Res*, 84:951-957, 2005.
93. Zhao IS, Gao SS, Chu CH, et al. : Mechanisms of silver diamine fluoride on arresting caries: a literature review. *Int Dent J*, 68:67-76, 2018.
94. Mei ML, Ito L, Chu CH, et al. : Inhibitory effect of silver diamine fluoride on dentine demineralisation and collagen degradation. *J Dent*, 41:809-817, 2013.
95. Zhi QH, Lo ECM, Kwok ACY : An in vitro study of silver and fluoride ions on remineralization of demineralized enamel and dentine. *Aust Dent J*, 58:50-56, 2013.
96. Lou YL, Botelho MG, Darvell BW : Reaction of silver diamine fluoride with hydroxyapatite and protein. *J Dent*, 39:612-618, 2011.
97. Rølla G, Saxegaard E : Critical evaluation of the composition and use of topical fluorides, with emphasis on the role of calcium

fluoride in caries inhibition. *J Dent Res*, 69:780-785, 1990.

98. Yu DG, Kimura Y, Matsumoto K, et al. : Study on acid resistance of human dental enamel and dentin irradiated by semiconductor laser with Ag (NH3) 2F solution. *J Clin Laser Med Surg*, 19:141-146, 2001.

99. Mei ML, Ito L, Chu CH, et al. : An ex vivo study of arrested primary teeth caries with silver diamine fluoride therapy. *J Dent*, 42:395-402, 2014.

100. Yu OY, Mei ML, Chu CH, et al. : Remineralisation of enamel with silver diamine fluoride and sodium fluoride. *Dent Mater*, 34:e344-e352, 2018.

101. Cate JMT, Damen JJ, Buijs MJ : Inhibition of dentin demineralization by fluoride in vitro. *Caries Res*, 32:141-147, 1998.

102. Yip HK, Guo J, Wong WHS : Protection offered by root-surface restorative materials against biofilm challenge. *J Dent Res*, 86:431-435, 2007.

103. Abdil-nafaa SA, Qasim AA : The Effect of Silver Diamine Fluoride and Fluoride Varnish on Roughness of Primary Teeth Enamel (An In Vitro Study). *Al-Rafidain Dent J*, 20:296-307, 2020.

104. Elkassas D, Arafa A : Remineralizing efficacy of different

calcium-phosphate and fluoride based delivery vehicles on artificial caries like enamel lesions. *J Dent*, 42:466-474, 2014.

105. Wade W : Unculturable bacteria—the uncharacterized organisms that cause oral infections. *J R Soc Med*, 95:81-83, 2002.

Abstract

# The effect of silver diamine fluoride on salivary biofilm and physical properties of teeth

(Directed by Prof. Young-Jae Kim)

Meekyung Seo

School of dentistry, Department of pediatric dentistry

The Graduate school, Seoul National University

## 1. Objectives

Dental caries is one of the most common chronic diseases in children. Untreated caries lesions can cause pain and odontogenic infection, and they can affect growth and quality of life of children. Recently, it

has been recommended to arrest the caries lesion with silver diamine fluoride (SDF) instead of the conventional restoration in patients who have poor cooperation or difficulty accessing to dental treatment. SDF is effective agent for arresting dental caries and inexpensive. SDF can reduce the growth of microorganisms, restrain degradation of collagen in dentin, promote remineralization and inhibit demineralization of teeth. There are several studies about the antimicrobial effect of SDF and the effect on the physical properties of teeth, but these studies were conducted using limited species of microorganisms and researches evaluating the effect on primary teeth are insufficient. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial effect of SDF by using cariogenic salivary biofilm, and effect on physical properties of primary teeth.

## 2. Materials and Methods

Saliva-coated (pellicle-like) structure was formed on 8-well glass chambers and 12-well polystyrene plates using unstimulated saliva. After mixing pooled saliva and brain heart infusion broth, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 was added into the mixture. The mixture was inoculated into 8-well glass chamber and the 12-well polystyrene plate. They were cultured to form cariogenic salivary

biofilm. To evaluate the antibiofilm effects of SDF on cariogenic biofilm, bacterial viability was evaluated using colony forming unit (CFU) and confocal laser scanning microscope after treatment with SDF to cariogenic biofilm. In order to investigate the antimicrobial effect on the primary teeth, tooth specimens were treated with SDF. Biofilm was formed upon the tooth specimens using the same medium within a 12-well polystyrene plate. Thereafter, bacteria in the biofilm and planktonic bacteria in the medium were measured. To evaluate the effect of SDF on the physical properties of teeth, microhardness and surface roughness of tooth specimens were investigated.

## 3. Results

Total bacteria and *S. mutans* were significantly decreased immediately after treatment with SDF ($p < 0.001$). Confocal laser scanning microscope also demonstrated the increment of the dead cells. As a result of culturing cariogenic biofilm upon the enamel and dentin specimens after treatment with SDF, it was confirmed that the formation of cariogenic biofilm was disrupted when SDF was treated ($p = 0.029$). Proliferation of planktonic bacteria was also restrained in both group ($p = 0.029$). Microhardness of enamel specimens and dentin specimens was elevated after SDF-treatment ($p = 0.028$ in

enamel, $p = 0.002$ in dentin). Surface roughness of enamel specimens were decreased by SDF ($p = 0.002$).

---

**Key word:** Cariogenic biofilm, Microhardness, Physical property, Primary teeth, Salivary biofilm, Silver diamine fluoride, Surface roughness

**Student number:** 2016-35968