

The Effect of Silver Diamine Fluoride on Salivary Biofilm

Meekyung Seo, Ji-Soo Song, Teo Jeon Shin, Hong-Keun Hyun,
Jung-Wook Kim, Ki-Taeg Jang, Sang-Hoon Lee, Young-Jae Kim

Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Seoul National University

Abstract

Silver diamine fluoride (SDF) is an effective and efficient agent for arresting dental caries. It can be useful in treating children with behavioral or medical limitations. The purpose of this study was to evaluate the antimicrobial effect of SDF by using salivary biofilm.

Pellicle-like saliva coated structure was prepared by using unstimulated saliva. For developing cariogenic biofilm, *Streptococcus mutans* was added to the mixture of pooled saliva and inoculated into a saliva coated glass or chamber. SDF was applied to cariogenic biofilm to evaluate the antimicrobial effect of SDF. As time passed, total bacteria and *S. mutans* were reduced after application of SDF ($p < 0.000$). Confocal laser scanning microscope also showed the increment of the ratio of dead cell.

As a result of experiment using enamel and dentin of primary teeth, it was confirmed that the growth of cariogenic biofilm was inhibited when the SDF was treated ($p = 0.029$ each).

This study showed excellent anti-microbial effect of SDF. And anti-caries effect in clinical practice can be expected.

Key words : Silver diamine fluoride, Silver compounds, Salivary biofilm, Cariogenic biofilm, Primary teeth

I. 서 론

지난 수십년간 치아우식의 유병률은 크게 감소하였으나 여전히 치아우식은 소아에서 가장 흔한 만성질환이다[1-4]. 우리나라에서 시행되는 구강건강실태조사 결과에 따르면 5세 아동의 유치우식경험자율은 1995년 82.0%에서 2010년 61.5%로 감소하였으나, 이후 약간 증가하는 추이를 보여 2018년 68.5%로 조사되었다. 또한 5세 아동 1인이 평균적으로 보유하고 있는 우식경험치수는 1995년 5.7개에서 큰 감소를 보여 2006년도에 2.8개로 조사되었으며, 이후 약간 증가하여 2015년도에는 3.4개로 조

사되었다[5-9]. 이렇듯 여전히 절반 이상의 많은 소아청소년들이 치아우식에 이환되고 있으며, 치아우식의 유병률의 감소가 둔화되고 오히려 약간의 증가추세를 보이고 있다. 특히 사회경제적 지위가 낮은 그룹이나 치과 진료에 접근이 힘든 그룹은 여전히 높은 치아우식 유병률을 보이고 있으며 치과 치료를 제대로 받지 못한 경우들도 존재한다[2,10-13].

행동조절이 힘든 소아나 장애인의 치아우식 치료는 어려움을 동반한다. 이러한 경우 행동조절을 위해 진정법이나 전신마취 등의 부가적인 방법이 필요할 수 있으며 이는 많은 비용이 요구된다[14,15]. 또한 의과적인 문제로 인해 치과치료를 받기 힘든

Corresponding author : Young-Jae Kim

Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Seoul National University, 101 Daehak-ro, Jongno-gu, Seoul, 03080, Korea

Tel: +82-2-2072-3080 / Fax: +82-2-744-3599 / E-mail: neokarma@snu.ac.kr

Received June 9, 2020 / Revised July 10, 2020 / Accepted July 7, 2020

※This study was supported by grant no 04-2018-0101 from the SNUHD Research Fund.

경우도 존재한다[16]. 이렇듯 치과치료를 받기 힘들거나 접근이 힘든 아동에 있어서 치료받지 못한 우식병소를 정지시키는 것이 추천되었으며, 이를 위해 silver diamine fluoride(SDF)을 도포하는 것이 제안되었다. SDF는 우식을 정지시키기 위해 사용될 수 있는 저렴한 약제로, 우식의 정지에 효과적이며 침습적인 치료를 동반하지 않고 쉽게 도포할 수 있다[16-19]. 소아치과 분야에서 SDF는 환아가 통상적인 수복치료를 받기에 매우 어린 경우나 의과적인 문제로 치과치료를 받기 힘든 경우에 우식의 진행을 늦추기 위해 사용될 수 있다. 더불어 치과의사의 수가 충분하지 않은 지역이나, 치과 치료에 접근하기 힘든 어린이들에게 사용할 수 있는 비용 효율적인 대안이 될 수 있다[16,17].

SDF는 24.4 - 28.8%의 은, 5.0 - 5.9%의 불소를 포함한다. 이는 불소와 은의 작용으로 항미생물효과를 보이며, 추가적으로 치아의 재광화를 촉진하고, 탈회를 억제하고, 상아질의 교원질이 분해되는 것을 억제하는 등의 효과로 우식을 정지시킨다[16,20].

구강 미생물총은 매우 다양한 미생물을 포함하며 계통발생학적으로 수백 종의 미생물이 존재한다. 하지만 통상적인 미생물 배양은 구강 내 다양한 미생물 중 제한된 종만 국한되어 배양이 가능하다[21]. 최근 SDF의 항미생물 효과와 SDF가 치아에 미치는 영향에 대한 몇몇 연구가 발표되었으나 대부분의 연구가 제한된 종의 구강 미생물을 이용하여 연구를 진행하였다. 현재까지 SDF의 항미생물효과에 대해 연구한 논문에서 실제의 타액을 이용한 연구는 존재하지 않는다.

이에 본 연구에서는 타액 생물막을 이용하여 SDF의 항미생물 효과를 평가하고자 한다.

II. 연구 대상 및 방법

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

1. 연구 재료

탈락시기에 도래하여 발거된 16개의 유구치를 연구에 사용하였다. 발거된 유치는 0.1%의 thymol 용액에 보관하였다. ICDAS(International Caries Detection and Assessment System) 기준에 따라 건전한 치면(ICDAS code 0)을 연구에 사용하였다[22].

38.0%의 SDF인 Advantage arrest(Elevate oral care, West Palm Beach, USA)를 사용하였다.

2. 항미생물 효과 평가

1) 타액 생물막에 대한 항미생물 효과 평가

생물막의 형성을 위한 전처리된 plate를 제작하기 위해, 한 명의 건강한 공여자로부터 얻은 비자극성 타액을 4.0°C에서 7000 x g로 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 pH 7.2의 phosphate-buffered saline(PBS)를 이용하여 두 배로 희석한 후, 이를 8 - well glass chamber와, 12 - well polystyrene plate에 분배하였다. 8 - well glass chamber와 12 - well plate를 37.0°C에서 건조한 후, 자외선 살균기에서 살균하였다. 이 과정을 5회 반복하여 획득피막과 유사한, "타액으로 코팅된" plate와 chamber를 만들었다[23-25].

우식원성의 타액 생물막을 형성하기 위해, 11명의 건강한 공여자로부터 비자극성 타액을 같은 양을 수집한 후 혼합하였다. 혼합 타액을 2.0% 자당을 포함한 brain heart infusion(BHI) 배양액 동량과 섞은 후, 이 혼합액을 4.0°C에서 7000 x g로 10분간 원심분리하여 구강세포 등의 잔해를 제거하였다. 원심분리 후 상층액만을 새로운 튜브에 수집한 후, 우식원성의 생물막을 형성하기 위해 *Streptococcus mutans* ATCC 25175를 첨가하였다. 이를 10초간 혼합한 후, 타액으로 코팅된 12 - well plate에 1.0 ml, 타액으로 코팅된 8 - well glass chamber에 400.0 µl씩 접종하였다. 이 plate와 glass chamber를 혐기성 환경에서 37.0°C에서 72시간 동안 배양하였으며, 매일 2.0% 자당을 함유한 BHI 배양액을 새로 교환해주었다. 이렇게 하여 우식원성의 생물막이 형성된 12 - well plate와 8 - well glass chamber를 PBS로 세 차례 세척하여 부유성의 세균은 제거하였다[23-25].

SDF가 우식원성의 타액 생물막에 미치는 항미생물효과를 평가하기 위해 SDF를 증류수를 이용하여 1000배로 희석하여 생물막이 형성된 12 - well plate에 200.0 µl씩 적용하였다. 이를 세 군으로 나누어, SDF 적용 직후(SDF - immediate), 10초 후(SDF - 10 seconds), 30초 후(SDF - 30 seconds)에 적용된 SDF를 제거하고, PBS로 plate를 세척하였다. 대조군에는 SDF를 적용하지 않았다. 이후 생물막을 plate에서 떼어낸 후 균질화 하였으며, 이렇게 형성된 미생물 혼탁액을 자당이 없는 BHI 배양액을 이용하여 10 - 10⁶배로 연속희석하여, 집락형성단위(colony forming unit; CFU)를 측정하였다. CFU 측정시 mitis-salivarius bacitracin(MSB) agar plate와 BHI agar plate를 사용하였으며, MSB agar plate는 *S. mutans*, BHI agar plate는 미생물 전체의 CFU를 결정하기 위하여 사용되었다[23,25]. 이 과정을 각 군당 8회씩 반복하여 시행하였으며, 각 군의 8번의 측정 값에 대한 평균을 기록하였다.

SDF가 우식원성의 생물막에 미치는 항미생물효과의 특성을 공초점레이저현미경(Confocal Laser Scanning Microscope;

CLSM)으로 평가하기 위해 SDF를 증류수를 이용하여 1000배로 희석하여 생물막이 형성된 8 - well glass chamber에 200.0 μ 씩 적용하였다. 이를 세 그룹으로 나누어, SDF 적용 직후, 10초 후, 30초 후에 적용된 SDF를 제거하고, PBS로 plate를 세척하였다. 대조군에는 SDF를 적용하지 않았다. 이후 생물막을 live/dead staining kit (LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial viability kit, Invitrogen, Eugene, USA)를 이용하여 propidium iodine(PI)과 SYTO 9 으로 염색하였다. 염색 후 chamber는 암실에서 상온으로 1시간 동안 보관하였다. 이후, CLSM(LSM 700, Carl-Zeiss, Oberkochen, Germany)을 이용하여 각각의 시편에 대한 생물막의 이미지를 얻었다[26].

2) 치아에 대한 항미생물 효과 평가

SDF를 치아에 적용했을 때의 항미생물 효과를 평가하기 위해 법랑질 시편과 상아질 시편을 제작하였다. 법랑질 시편의 경우, 저속의 다이아몬드 디스크(Edenta, Au, Switzerland)를 이용하여 주수 하에 유치를 3.0 mm \times 3.0 mm 크기로 자른 후, 인공 우식의 형성을 위해 산성완충용액으로 치아를 탈회시켰다. 사용된 산성완충용액은 5.0 L 의 증류수, 2.2 g의 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 2.0 g의 KH_2PO_4 , 10.0 ml의 MHDP 용액, 14.3 mL CH_3COOH 과 pH 4.9 로 적정하기 위한 10.0 M KOH 을 포함하며, 72시간동안 적용하였다. MHDP 용액은 100.0 mL 증류수와 5.2 mg methylene diphosphoric acid를 이용하여 제작하였다[27].

상아질 시편의 경우, 같은 방법으로 유치를 3.0 mm \times 3.0 mm 크기로 자르고 법랑질을 제거한 후, 1000 grit 샌드페이퍼를 이용하여 연마하였으며, smear layer를 제거하기 위해 1.0% citric acid 에서 5분간 처리하고, 증류수로 세척하였다[28]. 이후, 법랑질 시편과 같은 방법으로 탈회시켰다.

이와 같은 방식으로 법랑질 시편 8개, 상아질 시편 8개를 제작하였다. 압축공기로 치면을 건조시킨 후, 38.0%의 SDF 1.0 μ 를 적용하고 마이크로브러쉬로 도포하였으며, 3분 후에 증류수로 치아를 세척하였다[16].

이후, 법랑질 시편 4개와, 상아질 시편 4개를 실험군으로 하여 SDF를 적용하였다. 나머지 법랑질 시편 4개와, 상아질 시편 4개는 대조군으로 하여 SDF를 적용하지 않았다.

이전과 같은 방식으로, 혼합 타액(pooled saliva)과 2.0% 자당을 포함한 BHI 동량을 섞고 원심분리 하여 상층액만을 수집한 후, *S. mutans* ATCC 25175를 첨가하여 타액 미생물이 포함된 배지를 제작하였다. 이 배지와 법랑질 또는 상아질 시편을 12 - well plate에 넣은 후, 혐기성 환경에서 37.0°C에서 72시간 동안 배양하였으며, 매일 2.0% 자당을 함유한 BHI 배양액을 새로 교환해주었다. 이후, 치아에 붙어있는 생물막을 분리하여 CFU를

측정하였다. CFU 측정 시 *S. mutans*의 측정을 위해 MSB agar plate를 사용하였으며, 전체 미생물의 측정을 위해 BHI agar plate를 사용하였다. 이후 법랑질과 상아질 각각의 실험군, 대조군의 측정치에 대한 평균값을 기록하였다.

3. 통계 분석

통계 분석은 IBM SPSS 25.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)을 이용하였다. Mann - Whitney test를 사용하여 분석하였다.

III. 연구 성적

1. 타액 생물막에 대한 항미생물 효과 평가

우식원성의 생물막에 SDF를 처리한 결과, 처리한 즉시, 10초 후, 30초 후에 전체 미생물이 점차적으로 감소하였다($p < 0.000$, Fig. 1). 또한 *S. mutans*도 시간 경과에 따라 점차 감소하는 것을 확인할 수 있었다($p < 0.000$, Fig. 1).

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 CLSM으로 관찰한 결과, 대조군은 두꺼운 층의 살아있는 미생물로 구성된 생물막을 형성하고 있었다(Fig. 2A). SDF를 처리한 즉시, 일부 세포가 노란색과 붉은색으로 관찰되며(Fig. 2B), 10초 후에는 붉은색의 죽은 세포가 현저히 증가된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2C). 30초 후에는 대다수의 세포가 붉은색으로 관찰되어 사멸한 것을 알 수 있었으며, 일부 층에서만 살아있는 미생물을 발견할 수 있었다(Fig. 2D).

2. 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. 3). 상아질 시편을 이용한 연구에서도 SDF를 처리한 치아 시편은 전체 미생물의 CFU가 대조군에 비해 낮게 나왔다($p = 0.029$). 상아질 시편에서 SDF를 처리했을 때 *S. mutans*는 검출되지 않았다($p = 0.029$, Fig. 4).

IV. 총괄 및 고찰

이번 연구에서 우식원성의 타액 생물막에 대한 SDF의 항미생물효과를 살펴본 결과, 우식원성의 타액 생물막에 SDF 처리시

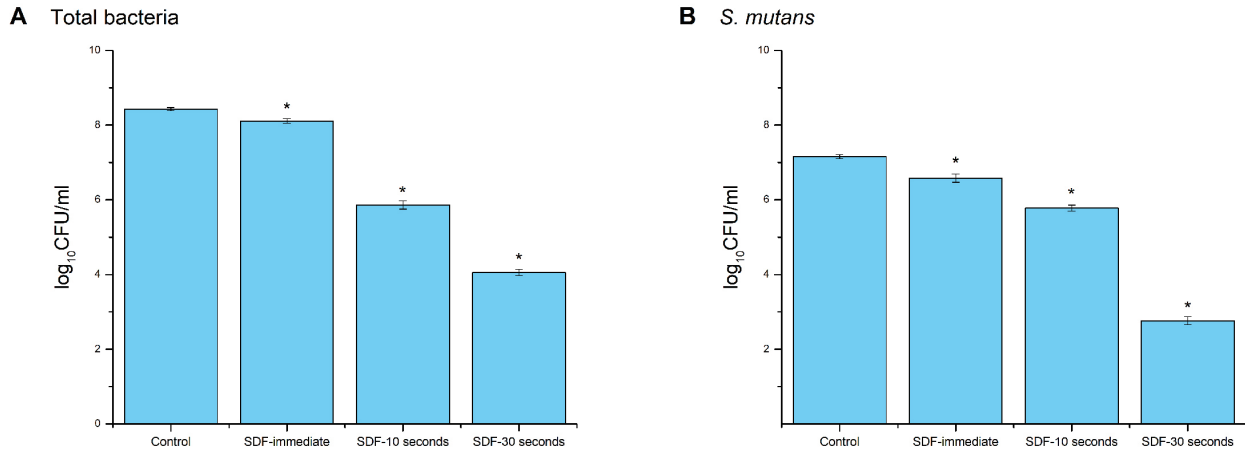


Fig. 1. Bacterial counts of cariogenic biofilm after application of silver diamine fluoride. (A) Colony-forming unit of total bacteria. (B) Colony-forming unit of *S. mutans*. (Mann - Whitney test : $p < 0.05$)

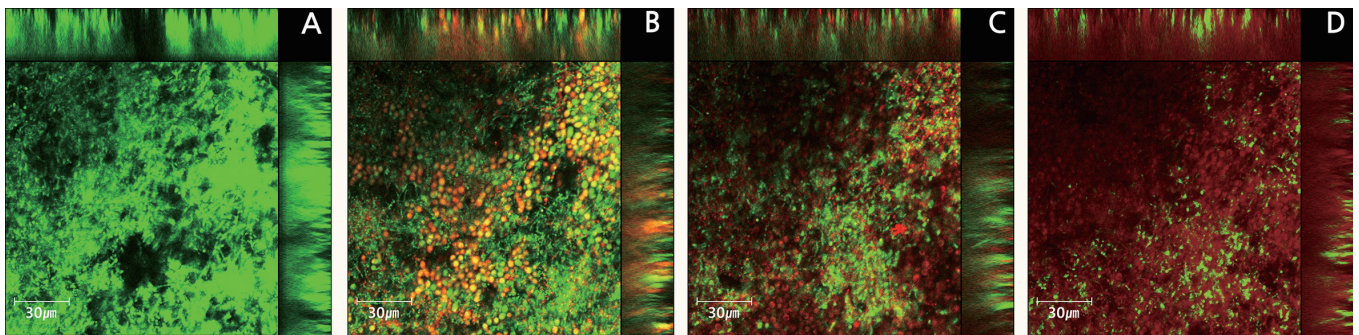


Fig. 2. Confocal laser scanning microscopy images of cariogenic biofilms (x400). (A) Control. (B) Immediate after application of silver diamine fluoride. (C) 10 seconds after application of silver diamine fluoride. (D) 30 seconds after application of silver diamine fluoride.

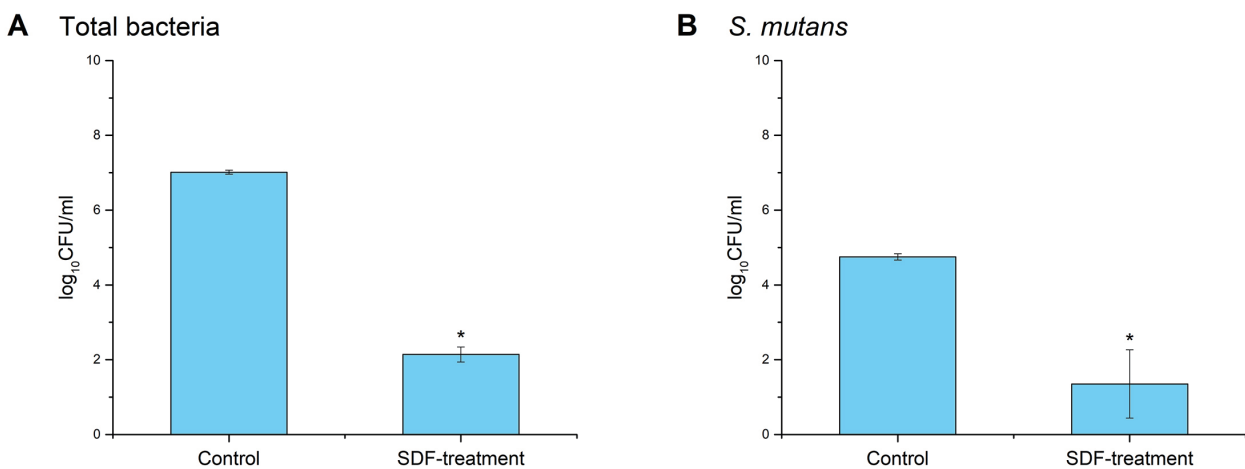


Fig. 3. Bacterial counts of biofilm on enamel surface after application of silver diamine fluoride. (A) Colony-forming unit of total bacteria. (B) Colony-forming unit of *S. mutans*. (Mann - Whitney test : $p < 0.05$)

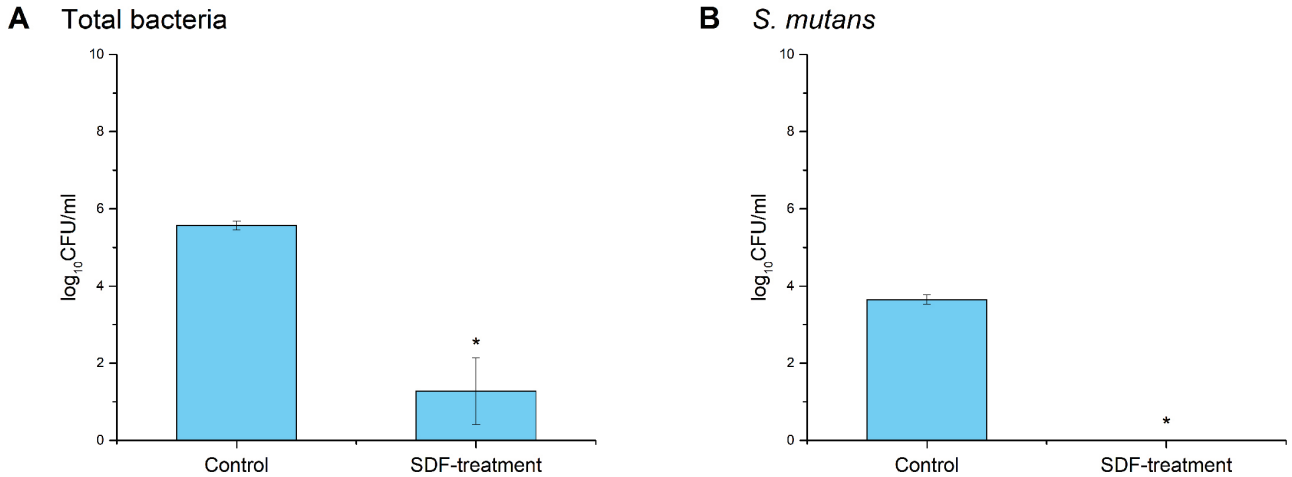


Fig. 4. Bacterial counts of biofilm on dentin surface after application of silver diamine fluoride. (A) Colony-forming unit of total bacteria. (B) Colony-forming unit of *S. mutans*. (Mann - Whitney test : $p < 0.05$)

전체 미생물과 *S. mutans*가 시간이 지남에 따라 점차적으로 감소하였다. 연구에 앞서 SDF의 농도에 따른 항미생물효과 평가를 통해 SDF를 1000배 미만으로 희석할 경우 모든 미생물이 즉시 제거됨을 확인하였다. 따라서 이번 연구에서는 시간 경과에 따른 효과를 확인할 수 있는 1000배로 희석된 SDF를 사용하여, SDF 적용 직후, 10초 후, 30초 후의 효과를 확인하였다.

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. SDF를 1000배 희석하여 적용 하였음에도 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 [16]. 하지만 협조가 어려운 소아 환자에서는 단지 수초만의 적용만이 가능할 수도 있는데, 이번 연구 결과 희석된 SDF를 30초 적용하는 경우에도 대부분의 우식원성 미생물이 사멸되었다. 따라서 임상에서 환자의 협조도 부족으로 SDF를 충분한 시간동안 적용하지 못하는 경우에도 충분한 항미생물효과를 얻을 수 있을 것이라고 추정할 수 있다.

CLSM으로 관찰한 결과에서는 SDF 처리 후 생물막 내에서 사멸된 세포가 점차적으로 증가하였다. 또한 두꺼운 층을 형성하고 있던 우식원성 생물막이 SDF 처리 후 일부 층에서만 살아있는 세포가 발견되었다. 즉, SDF를 처리할 경우 단순히 미생물을 제거하는 효과뿐 아니라 생물막을 파괴하여 더욱 효과적으로 우식원성 미생물을 억제할 수 있음을 알 수 있다.

SDF의 구성성분인 불소는 생물막의 형성을 억제하며 미생물의 효소에 영향을 주어 항미생물 효과를 보인다. 이와 더불어 SDF의 은이온은 미생물의 세포벽과 세포막 구조를 파괴하고, 미생물의 효소를 파괴하며, DNA 복제를 억제하고 생물막의 형성을 억제함으로써 항미생물 효과를 보이는 것으로 제안되고 있다. 또한 은은 노출된 상아질 유기 기질을 파괴하는 단백질(예, 기질금속단백질 분해효소, 카텝신, 세균의 콜라겐 분해효소)을 억제함으로써 우식의 진행과 발생을 억제할 수 있다[20,29-31]. CLSM 결과에서 Fig. 2B를 살펴보면 SDF 처리 직후 노란색 또는 붉은색의 커다란 둥근 형태의 구조가 나타났다가 이후 Fig. 2C에서는 사라졌다. 노란색 형광은 SYTO - 9이 PI로 완전히 대체되지 않았을 때 관찰되는 현상으로, 미생물의 세포가 사멸과정 중에 있는 것이라고 평가할 수 있다[32]. 따라서 SDF 적용 직후에 일시적으로만 관찰되는 이러한 구조는 SDF의 세포벽과 세포막에의 영향으로 인해 세포가 부풀어오른 후 파괴되어 나타나는 현상이라고 추측해볼 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 5.0 µl의 SDF를 도포하고, 1 - 3분동안 적용시키도록 권고되고 있다[16]. 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

× 2.0 mm × 4.0 mm의 시편의 절반에 해당하는 표면에 0.6 μl의 SDF를 적용하여 연구를 진행한 바 있다[26].

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 이 연구에서는 SDF가 우식을 유발하는 주 원인균인 *S. mutans*의 증식 또한 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 법랑질 시편에서는 SDF를 적용한 후, 전체 미생물은 대조군의 1.4×10^5 배의 세균만 배양되었으며, *S. mutans*는 대조군의 8.7×10^4 배만 배양되었다. 또한 상아질 시편에서는 SDF를 적용한 경우 전체 미생물은 대조군의 1.0×10^4 배만 배양되었으며, *S. mutans*는 전혀 배양되지 않았다.

대조군 및 실험군 모두 법랑질 시편에서 상아질 시편보다 전체 미생물과 *S. mutans*가 적게 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[33,34]. 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[35]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[33,36,37].

선행연구에서도 이번 연구와 유사하게 SDF의 항미생물효과를 확인한 바 있다. Chu 등[26]의 연구에서는 사람의 제3대구치로 만든 상아질 시편에 *S. mutans*와 *Actinomyces naeslundii* 각각의 단일종 생물막을 형성하여 SDF의 항미생물효과를 평가하였다. Mei 등[28]의 연구에서는 사람의 제3대구치를 이용한 시편에 *S. mutans*와 *Lactobacillus acidophilus*의 두 종으로 형성

된 생물막을 이용하였으며, Mei 등[38]의 다른 논문에서는 5종의 미생물(*S. mutans*, *Streptococcus sorbinus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *A. naeslundii*)이 혼합된 생물막으로 연구를 진행한 바 있다. 하지만 이러한 연구들은 해당 미생물들만 배양하여 구강 내의 생물막을 충분히 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 타액생물막은 자일리톨 저항성 *S. mutans*와, 자일리톨 민감성 *S. mutans*의 생물막 형성에 대한 특성을 파악하고자 하는 연구에서 사용된 바 있다[25]. 또한 우식원성 생물막에 대한 프로바이오틱스의 항미생물효과에 대해 평가하기 위해 사용된 바 있으나 현재까지 SDF의 항미생물효과에 대해 평가하기 위해서는 사용된 바 없다[23,24]. 또한 이번 연구에서는 유치를 사용하여 실제 임상 상황과 유사한 조건이 되도록 하여 연구를 진행하였다는 점에 있어서 의의가 있다.

이전의 생체 외 연구결과에 따르면 SDF는 치아 경조직과 반응 시 불화칼슘(CaF_2)과 인산염(Ag_3PO_4)을 주요 생성물로 생성한다고 제안되었으며 이러한 생성물들로 인해 우식 예방효과와 우식부위의 경화를 보인다고 제안되었다[29,39,40]. 300 ppm 이상의 고농도의 불소 적용시 생성되는 불화칼슘은 불소를 천천히 방출하는 저장고로서의 역할을 하여 우식을 예방하는 역할을 한다. 불화칼슘은 내산성이 낮지만, 재광화를 하는 동안 인산과 반응하여 내산성이 보다 높은 불화인회석을 형성한다. 또한 SDF의 반응 생성물로 인한 알칼리성 환경으로 인해 불화칼슘이 용해성이 낮아지기 때문에 이후의 우식에 대한 불소 저장소로서 작용할 수 있게 된다[29].

은이온도 우식 예방과 생물막 형성 억제에 중요한 역할을 하며, 특히 Lou 등[41]은 불화칼슘이 용해도가 높기 때문에 은이 우식 예방효과에 더 중요한 역할을 할 것이라고 제안하였다. 인공우식 병소에 SDF 처리를 한 이전의 연구들에서도 SDF를 처리할 경우 생물막 형성과 추가적인 와동 형성에 저항성을 보인다고 보고하였으며, 이러한 효과를 남아있는 은이온에 의한 것으로 추정하였다[16,42]. 이번 연구에서도 법랑질과 상아질에 SDF를 처리했을 때 타액 생물막이 형성되는 것이 억제된 것으로 보이며, 이는 앞선 연구결과와 같이 불소와 은이온 등의 작용으로 인한 것으로 추정된다.

이러한 고농도의 불소와 은으로 인한 부가적인 효과로 인해 SDF는 다른 불소 도포제보다 높은 항미생물효과를 보인다. 상아질 시편에 38.0%의 SDF와 5%의 불화나트륨을 적용한 후 우

식원성의 생물막을 배양한 이전의 연구에 따르면 5%의 불화나트륨은 *S. mutans*의 감소를 보이지 않았으나, 38%의 SDF는 *S. mutans*에 대해 명확한 항미생물효과를 보였다[43]. 또한 SDF와 불소바니쉬(6% 불화나트륨, 6% 불화칼슘), acidulated phosphate fluoride젤의 항미생물효과를 비교한 in vivo 연구에 따르면 SDF는 나머지 두 약제와 비교시 *S. mutans*의 수를 더 현저하게 감소시켰다고 보고하였다[44]. 이렇게 다른 불소 도포제와 비교 시 뛰어난 항미생물효과를 보이는 SDF는 우식의 정지 및 억제 위해 다른 불소 도포제보다 더욱 효과적으로 사용될 수 있을 것이다.

이번 연구에서의 생물막 형성 억제 효과는 72시간 배양 후의 결과로, 단기적인 측면에서만 생물막 형성 억제 효과를 확인했다는 한계가 존재한다. 은이온은 죽은 세균과 상아질 단백질에 저장되어 있다가, 살아있는 세균이 추가될 경우 다시 활성화되어 지속적인 항미생물효과를 보이는 것으로 보고되었다[16,45]. 이러한 은이온의 항미생물효과가 장기적으로 지속될수록 우식의 발생 및 진행을 더욱 효과적으로 예방할 수 있을 것이다. 따라서 이와 같은 은이온의 지속적인 항미생물효과를 확인하기 위해서는 향후 우식병소에 SDF를 처리한 후 장기적인 관찰을 하여 항미생물효과가 얼마나 장기간동안 지속되는가를 확인하는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료되는 바이다.

V. 결 론

이 연구는 우식원성의 타액 생물막을 이용하여 SDF의 항미생물효과를 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 우식원성의 생물막 형성 억제 효과를 평가하였다.

우식원성의 타액 생물막에 SDF를 처리한 결과 시간 경과에 따라 전체 미생물과 *S. mutans*의 수가 유의하게 감소하였다. 또한 CLSM을 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 억제됨을 확인하였다.

연구 결과 SDF는 우식원성 생물막을 감소시킬 뿐 아니라 생물막의 형성을 억제함을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 통해 임상에서도 효과적으로 우식원성 미생물을 억제할 수 있을 것으로 추정할 수 있으며, 이로 인한 항우식효과를 기대할 수 있다.

추후 항미생물효과의 지속성에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

Authors' Information

Meekyung Seo <https://orcid.org/0000-0003-2517-4093>

Ji-soo Song <https://orcid.org/0000-0002-4469-5903>

Teo Jeon Shin <https://orcid.org/0000-0003-4499-8813>

Hong-Keun Hyun <https://orcid.org/0000-0003-3478-3210>

Jung-Wook Kim <https://orcid.org/0000-0002-9399-2197>

Ki-Taeg Jang <https://orcid.org/0000-0002-4060-9713>

Sang-Hoon Lee <https://orcid.org/0000-0001-8345-8372>

Young-Jae Kim <https://orcid.org/0000-0003-4916-6223>

References

- Lagerweij MD, Van LC : Declining caries trends: are we satisfied? *Curr Oral Health Rep*, 2:212-217, 2015.
- Marthaler TM : Changes in dental caries 1953-2003. *Caries Res*, 38:173-181, 2004.
- Marthaler TM, Brunelle J, Vrbic V, et al. : The prevalence of dental caries in Europe 1990-1995. *Caries Res*, 30:237-255, 1996.
- 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.
- Mintory 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 May 15, 2020).
- Mintory 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 May 15, 2020).
- 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.
- 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.

9. 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.
10. 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.
11. Ajami BA, Shabzendedar M, Rezay YA, Asgary M : Dental treatment needs of children with disabilities. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*, 1:93, 2007.
12. Ivančić JN, Majstorović M, Szivovicza L, *et al.* : Dental caries in disabled children. *Coll Antropol*, 31:321-324, 2007.
13. Taani DQ : Relationship of socioeconomic background to oral hygiene, gingival status, and dental caries in children. *Quintessence Int*, 33:195-198, 2002.
14. Wang YC, Lin IH, Huang CH, Fan SZ : Dental anesthesia for patients with special needs. *Acta Anaesthesiol Taiwan*, 50:122-125, 2012.
15. Dougherty N : The dental patient with special needs: a review of indications for treatment under general anesthesia. *Spec Care Dentist*, 29:17-20, 2009.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Crystal YO, Niederman R : Silver diamine fluoride treatment considerations in children's caries management. *Pediatr Dent*, 38:466-471, 2016.
20. Rosenblatt A, Stamford TCM, Niederman R : Silver diamine fluoride: a caries "silver-fluoride bullet". *J Dent Res*, 88:116-125, 2009.
21. Dewhirst FE, Chen T, Wade WG, *et al.* : The human oral microbiome. *J Bacteriol*, 192:5002-5017, 2010.
22. 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.
23. Kim YJ, Lee SH : Inhibitory effect of Lactococcus lactis HY 449 on cariogenic biofilm. *J Microbiol Biotechnol*, 26:1829-1835, 2016.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. Peng JJY, Botelho MG, Matinlinna JP : Silver compounds used in dentistry for caries management: a review. *J Dent*, 40:531-541, 2012.
30. Mei ML, Ito L, Lo ECM, *et al.* : The inhibitory effects of silver diamine fluorides on cysteine cathepsins. *J Dent*, 42:329-335, 2014.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. 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.

36. Yurdagüven 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.
37. 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.
38. Mei ML, Li Q, Samaranyake LP, *et al.* : Antibacterial effects of silver diamine fluoride on multi-species cariogenic biofilm on caries. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 12:4-10, 2013.
39. 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.
40. Chu CH, Lo ECM : Promoting caries arrest in children with silver diamine fluoride: a review. *Oral Health Prev Dent*, 6: 315-321, 2008.
41. Lou YL, Botelho MG, Darvell BW : Reaction of silver diamine fluoride with hydroxyapatite and protein. *J Dent*, 39: 612-618, 2011.
42. Knight GM, McIntyre JM, Gully NJ, *et al.* : An in vitro model to measure the effect of a silver fluoride and potassium iodide treatment on the permeability of demineralized dentine to *Streptococcus mutans*. *Aust Dent J*, 50:242-245, 2005.
43. 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.
44. 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, 2013.
45. Wakshlak RBK, Pedahzur R, Avnir D : Antibacterial activity of silver-killed bacteria: the "zombies" effect. *Sci Rep*, 5: 9555-9559, 2015.

국문초록

Silver diamine fluoride가 타액 생물막에 미치는 영향

서미경 · 송지수 · 신터전 · 현홍근 · 김정옥 · 장기택 · 이상훈 · 김영재

서울대학교 치의학대학원 소아치과학교실

Silver diamine fluoride(SDF)는 우식의 정지를 위해 사용될 수 있는 효과적이고 경제적인 약제로, 협조가 힘든 환자나 의과적인 문제로 치료를 받기 힘든 경우 등에서 사용될 수 있다. 이 연구는 타액 생물막을 이용하여 SDF의 항미생물효과를 평가하고자 시행되었다.

타액을 이용하여 획득피막 유사 구조를 형성한 후, 타액과 *Streptococcus mutans*를 첨가하여 우식원성의 타액 생물막을 형성하였다. 타액 생물막에 SDF를 처리한 결과, 전체 미생물과 *S. mutans*의 수가 유의하게 감소하였다($p < 0.000$). CLSM에서도 생물막 내 죽은 세포가 증가하였다. 유치 법랑질과 상아질 시편에 SDF를 처리한 후 우식원성의 생물막을 배양한 결과, SDF를 처리할 경우 생물막 형성이 저해되는 것을 확인할 수 있었다($p = 0.029$).

연구 결과 SDF의 뛰어난 항미생물효과를 확인할 수 있었으며, 이로 인한 임상에서의 항우식효과를 기대할 수 있다.