

## 소아의 치면세균막에 존재하는 mutans streptococci의 분포

국중기\* · 박종휘 · 유소영\* · 김화숙\* · 이난영

조선대학교 치과대학 소아치과학교실 및 구강생물학연구소, 구강생화학교실\*

### 국문초록

한국인 소아의 치면세균막에 존재하는 mutans streptococci 중 및 생물형의 발현빈도와 치아우식경험지수와 상관관계를 알아보기 위하여, 조선대학교 치과병원에 내원한 12세 미만 113명의 소아 환자의 치아우식경험지수를 구하고, 이들의 상하악 유전치 및 유구치의 협면 및 설면의 치면세균막 샘플을 채취하여 mutans streptococci를 mitis-salivarius bacitracin 배지에서 선택적으로 분리하였다. 이들의 biotype을 알아보기 위해 생화학적 검사를 실시하였고, 이들의 종 수준에서의 동정을 위해 dextranase 유전자를 표적으로 하는 중합효소연쇄반응을 시행하여 하였다. 113명의 환자 중에서 40명의 치면세균막에서 40 균주의 mutans streptococci이 검출되었다. 이들 중 생물형 제 I형(45%)이 가장 많이 검출되었으며, 그 다음으로 제 IV형(32.5%), 제 II형(15%), 제 V형(5%), 제 III형(2.5%) 순으로 검출되었다. 또한, 종 수준에서의 발현빈도를 알아본 결과 *S. mutans*가 69%, *S. sobrinus*는 31%였다. Mutans streptococci 중 또는 생물형에 따른 환자의 치아우식경험지수간의 차이는 없는 것으로 조사되었다( $p>0.05$ ). 이상의 결과를 종합할 때, 한국인의 소아의 구강 내에 존재하는 mutans streptococci 중 생물형 제 I형인 *S. mutans*가 가장 높은 빈도로 존재하며, 치아우식증이 세균학적 요소만이 아닌 기타 여러원인 요소에 의해 발병되는 다는 여러 연구 결과와 일치함을 알 수 있었다.

**주요어** : Mutans streptococci, 생물형, 치아우식증

### I. 서 론

치아우식증은 치주질환과 함께 구강 내에서 빈번하게 발생하는 양대 구강병 중 하나로 알려져 있다. 치아우식증은 숙주요인, 병원체요인, 식이요인들과 시간이라는 요인이 결부되어 발생하는 것으로 알려져 있다. 특히, 치아우식증의 발병에 있어서 세균의 존재가 필수적임이 무균동물을 이용한 실험에서 밝혀진 이후<sup>1)</sup>, 여러 연구에 의하여 현재 치아우식증의 유발에 관여한다고 알려진 연쇄상구균을 총칭하여 mutans streptococci라고 하고, 사람에서 주로 분리되는 *Streptococcus mutans* 및 *S. sobrinus*, 원숭이에서 분리된 *S. downei*, 흰쥐에서 분리된

*S. rattus*, 그리고 햄스터에서 분리된 *S. cricetus* 등이 여기에 포함된다고 알려져 있다<sup>2)</sup>. 역학 조사에 따르면, 사람의 치면세균막에는 *S. mutans*가 *S. sobrinus*보다 빈번하게 존재하다는 보고가 있다<sup>2,3)</sup>. 반면에 *S. sobrinus*가 오히려 치아우식증 활성능에 더 관여한다는 보고도 있다<sup>4)</sup>.

일반적으로 병원성 세균을 검출하는 방법으로 현미경을 이용하여 병소 샘플을 직접 관찰하는 방법, 세균배양법, 생화학 검사법, 간접면역형광법, 종특이 DNA 프로브법, 중합효소연쇄반응법 등이 있다. 이러한 방법들 중 mutans streptococci은 선택배지인 mitis-salivarius bacitracin(MSB) agar<sup>5)</sup>를 이용하여 분리 동정될 수 있다. 그러나 이러한 전통적인 방법은 비교적 정확하지 않고, 시간과 노동력이 많이 든다는 단점이 있다. 또한 가장 널리 이용되는 MSB 선택배지에서는 *S. sobrinus*의 성장이 억제된다고 알려져 있다<sup>6)</sup>. 그러므로 이러한 세균배양법의 단점을 보완할 수 있는 mutans streptococci의 검출법이 필요하게 되었다.

여러 세균 검출법 중 현재 가장 신뢰받을 수 있는 방법이 핵

교신저자 : 이 난 영

광주광역시 동구 서석동 375번지

조선대학교 치과대학 소아치과학교실

Tel : 062-220-3860 Fax : 062-225-8240

E-mail : nandent@chosun.ac.kr

산을 이용하는 방법이고, 그 중에서도 중합효소연쇄반응법이 가장 빠르고, 정확한 것으로 알려져 있다. 몇몇 연구자들에 의해 *S. mutans*와 *S. sobrinus*에 대한 종-특이 중합효소연쇄반응 프라이머가 개발되었다<sup>7-9)</sup>. 최근 Igarashi 등<sup>10)</sup>은 *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. downei*, *S. rattus*, *S. cricetus* 등의 5종의 *mutans streptococci*를 dextranase 유전자 핵산염기서열을 바탕으로 중합효소연쇄반응 프라이머를 설계하고, 이들의 반응산물을 *HaeIII* 제한효소로 절단한 다음 이들의 제한효소 절편 길이의 다양성을 전기영동으로 관찰하여 이들 5종 모든 세균을 검출할 수 있는 방법이 개발되었다. 그러나 이러한 방법은 중합효소연쇄반응을 시행한 다음 그 증폭 산물을 다시 제한효소로 절단해야 하는 번거로움이 있고 사람의 구강 내에서는 *S. mutans*와 *S. sobrinus* 두 종이 주로 존재하기 때문에 굳이 5종 모두를 개별적으로 구별해야 할 필요성이 있는 경우가 아니라면 위에 소개한 종-특이 중합효소연쇄반응 프라이머를 이용하는 방법이 더욱 효과적이라 할 수 있다. 이러한 유전자형에 의한 *mutans streptococci*의 분류 이외에도 생화학적 검사에 의한 생물형(biotype)이나, 면역학적 방법을 이용한 혈청형(serotype)으로 *mutans streptococci*를 분류하기도 하는데 현재까지 5가지(I-V) 생물형<sup>11,12)</sup>과 8가지(a-h) 혈청형<sup>13,14)</sup>이 존재하는 것으로 알려져 있다.

국내에서는 Kim 등<sup>15)</sup>이 한국아동의 치아우식경험과 치면상 *S. mutans*의 분포에 대한 보고를 한 바 있으나 그 후 한국인에서의 *mutans streptococci*과 관련된 역학조사는 미진한 실정이다. 또한 근래에는 *mutans streptococci*의 분자생물학적 방법을 이용한 검출 방법들이 개발되었기 때문에 예전의 연구에 비해 좀 더 정확한 검출 결과를 얻을 수 있게 되었다. 그러므로, 이 연구에서는 Igarashi 등<sup>7,8)</sup>이 개발한 *S. mutans* 및 *S. sobrinus*를 각각 종-특이적으로 검출할 수 있는 중합효소연쇄반응 프라이머를 이용한 중합효소연쇄반응법 및 기존의 생화학적 방법을 이용하여, 한국인 소아의 치면세균막에 존재하는 *mutans streptococci*의 종을 구별하고, 소아의 치아우식경험 지수와의 상관관계를 조사하고자 한다.

## II. 연구 재료 및 방법

### 1. 연구 대상 및 치면세균막 채취

조선대학교 치과병원에 내원한 환자 중 12세 미만의 소아 113명을 조사 대상으로 하였다. 환자의 나이, 성별 및 치아우식 경험지수(dft index)를 조사하고, 상하악 유전치 및 유대구치의 협면 및 설면에서 가압멸균된 큐렛을 이용하여 채취하였다. 각 개인에서 채취한 치면세균막은 500  $\mu$ l의 1×PBS가 넣어진 하나의 eppendorff tube에 담아 실험실로 옮겨 다음의 실험에 사용하였다.

### 2. 세균 배양

본 실험에 대조군으로 사용한 *mutans streptococci*는 *Streptococcus mutans* KCTC 3065, *S. sobrinus* KCTC 3088, *S. downei* KCTC 3634, *S. rattus* KCTC 3655 및 *S. cricetus* KCTC 3640이었으며, 이들은 한국유전자은행(KCTC, Daejeon, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 위에서 채취한 치면세균막 샘플은 수 차례 vortexing한 후 멸균된 멸균용을 이용하여 *mutans streptococci*를 선택적으로 배양할 수 있는 20% 자당이 함유된 mitis salivarius-bacitracin(MSB; bacitracin 농도는 0.5  $\mu$ g/ml) 한천배지에서 도말하고, 이를 상온의 공기 중에서 24시간 배양한 다음, 다시 37°C의 Candle jar에서 48시간 배양하였다. 이때 성장한 세균 균락 중 그 형태가 다른 것을 다른 종으로 생각하고 각각에서 대표적으로 1개씩을 선별하여 3% 과산화수소를 분해할 수 있는 지를 검사하여 음성인 것만을 Todd Hewitt broth(TH broth, Difco, Lab., Detroit, MI, USA)에 접종하여 37°C CO<sub>2</sub> 세균 배양기에서 키운 다음 15%가 되도록 glycerol을 넣고 -70°C에서 보관하여 다음의 실험에 사용하였다.

### 3. 생화학 검사

*Mutans streptococci*의 생물형을 결정하기 위하여 다음의 생화학 검사를 시행하였다. 생물형의 판정 기준은 Shklair와 Keen<sup>11,12)</sup>의 방법을 따랐다(Table 1).

#### 1) Catalase test

MSB 배지에서 증식이 용이한 자라나는 staphylococci를 제외시키기 위해 catalase test를 시행하였다. 대부분의 staphylococci는 본 검사에 양성 반응을 보이지만, *mutans streptococci*는 음성이다. MSB 배지에서 72 시간 배양한 세균 균락을 조심히 멸균된 백금으로 떼어낸 다음, 이를 3% 과산화수소에 넣어 산소가 발생할 경우 양성(+), 그렇지 않을 경우 음성(-)으로 판정하였다.

#### 2) 당(mannitol, sorbitol, raffinose 및 melibiose)분해능 평가

세균이 배지 내에 포함되어 있는 특이 당질을 발효시킬 수 있는 능력을 알아보는 실험으로 Phenol red broth(Difco, Lab.)에 mannitol, sorbitol, raffinose 및 melibiose를 첨가하여 각각 1%가 되도록 하고 이를 통상적으로 가압 멸균한 다음 200  $\mu$ 씩 96-well plate에 분주하였다. 다음 24시간 동안 TH broth에서 배양한 20  $\mu$ 의 세균 배양액을 각각의 well에 접종하고 이를 48 시간동안 10% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 세균 배양기에서 배양하였다. 이때 노란색일 경우 양성(+), 오렌지 색 또는 붉은 색을 띠는 경우 음성(-)으로 판정하였다.

3) Arginine의 가수분해능 평가

Arginine dihydrolase의 생성여부를 알아보는 실험으로 먼저 TH broth에서 24시간 mutans streptococci를 배양하고, 이들 세균배양액 20 μl를 0.5% yeast extract, 0.5% tryptone, 0.2% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05% dextrose, 0.3% L-arginine hydrochloride가 혼합된 배지 200 μl에 접종하여 48 시간 동안 10% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37℃ 세균 배양기에서 배양하였다. 여기에 20 μl의 Nessler solution(5% KI, 2% HgCl<sub>2</sub>, 1N NaOH)을 떨어트려 짙은 갈색을 띠면 양성(+), 그렇지 않으면 음성(-)으로 판정하였다.

4. Mutans streptococci의 지놈 DNA 추출

Mutans streptococci를 종 특이적으로 동정하기 위한 중합효소연쇄반응의 주형으로 사용할 세균 지놈 DNA는 G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit(iNtRON Inc., Seoul, Korea)를 이용하여 추출하였다. 이를 간략히 설명하자면 다음과 같다. 세균 배양액 1.5 ml를 eppendorff tube에 넣고, 1분간 원심분리(12,000×g)하여 세균의 압착결정을 얻었다. 여기에 50 μl의 pre-buffer와 3 μl의 Lysozyme 용액을 넣고 혼합한 다음 37℃ 항온기에 1시간 동안 방치한 후 250 μl의 G-buffer를 넣어 잘 섞은 후 65℃에서 15분간 반응시켰다. 여기에 250 μl의 binding solution을 넣고 잘 섞은 후 spin column에 옮기고, 1분간 원심분리(12,000×g)하여 column에 통과한 용액은 버리고 500 μl의 washing buffer A를 넣고 실

온에서 동일한 조건에서 원심분리하였다. Column에 통과된 용액은 버리고 500 μl의 washing buffer B를 넣어 1분간 원심분리(12,000×g)하였다. 그 후 column을 새로운 eppendorff tube에 옮기고 100 μl의 elution buffer를 넣고 실온에서 1분간 원심분리(12,000×g)하여 그 여과액을 보관하여 중합효소연쇄반응에 사용하였다.

5. 중합효소연쇄반응

*S. mutans*와 *S. sobrinus*를 검출하기 위한 중합효소연쇄반응에 사용된 프라이머는 Table 2와 같다. 이들 프라이머는 바이오니아사(Bioneer Corp., Seoul, Korea)에 주문하여 제작하였다. 중합효소연쇄반응은 AccuPower™ PCR Premix (Bioneer corp.)를 이용하였으며 그 과정은 다음과 같다. 앞에서 추출한 1 ng의 세균 지놈 DNA, 10 pmol 씩의 프라이머 쌍을 넣고 최종 반응 부피가 20 μl가 되도록 멸균된 증류수를 넣고 PTC-100™ Programmable Thermal Controller(Model: PTC-100, MJ Research Inc. Watertown, MA, U.S.A)를 이용하여 중합효소연쇄반응을 시행하였다. 이때 중합효소연쇄반응 조건은 다음과 같다. 94℃에서 2분간 초기 변성을 실시한 다음 94℃에서 1분간 변성, 55℃에서 1분간 annealing, 72℃에서 1분간 extension하는 과정을 27회 반복하여 증폭한 다음 마지막으로 72℃에서 10분간 extension하였다. 최종 반응물을 2 μl씩 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 그 증폭 여부를 확인하였다.

Table 1. Interpretive table for biotyping of mutans streptococci

Biotype	Fermentation				Deamination of Arginine
	Manitol*	Sorbitol	Raffinose	Melibiose	
I	+	+	+	+	-
II	+	+	+	+	+
III	-	+	+	+	-
IV	+	±	-	-	-
V	+	+	+	-	-

\*Aerobically at 37℃ for 48 h.

Table 2. PCR primers for the detection of *S. mutans* and *S. sobrinus*

Species		Nucleotide sequences (5'→3')	Size of amplicon
<i>S. mutans</i> *	SD1	TAT GCT GCT ATT GGA GGT TC	1272 bp
	SD2	AAG GTT GAG CAA TTG AAT CG	
<i>S. sobrinus</i> **	SOF12	TGC TAT CTT TCC CTA GCA TG	1610 bp
	SOR1623	GGT ATT CCG TTT GAC TGC	

\*Ono et al., 1994

\*\*Igarashi et al., 2000

6. 통계분석

$\chi^2$  test와 Student T test를 이용하여 각 종간의 유의성을 분석하고 사후 검증으로 ANOVA(Scheffe) test를 사용하였다.

III. 연구결과

본 연구에 참여한 113명의 환자의 치면세균막 샘플을 mutans streptococci를 선택적으로 배양할 수 있는 20% 자당이 함유된 MSB 한천 배지에서 배양한 결과 63명의 환자 샘플에서 세균이 배양되었다. 이들 중 한 한천배지에서 세균 군락이 서로 다른 것 들 중 대표적인 것들을 선택하여 catalase test 결과 모두 음성임을 확인하고 본 연구의 결과를 얻는 데까지 보존된 균주는 총 68 균주였다. 이들의 생물형을 결정하기 위하여 생화학 검사를 실시한 결과, 40 균주만이 mutans streptococci임을 알 수 있었다(Table 3). 이들 40 균주는 각각의 균주가 40명(남아 20명, 여아 20명)에서 유래된 것으로 1명당 한 종류의 mutans streptococci이 검출되었다(Table 3). 즉, 본 연구에서는 연구 대상 환자의 치면세균막에서 35.4%라는 낮은 분리 빈도를 보였다. 이러한 40명 환자의 연령은 2년 3개월에

서 9년 7개월까지 다양하였으며, 이들의 평균 연령은 4년 3개월이었다.

본 연구에서 분리한 mutans streptococci 중 생물형 제 I형(45%)이 가장 많이 검출되었으며, 그 다음으로 제 IV형(32.5%), 제 II형(15%), 제 V형(5%), 제 III형(2.5%) 순으로 검출되었다(Table 3, 4). 생물형과 숙주의 치아우식경험지수와의 관계에서는 생물형 제 II형이 분리된 환자의 치아우식경험지수가 가장 높았으며, 제 I형, 제 V형, 제 V형, 제 III형을 가진 숙주일수록 낮게 나오는 경향을 보였다(Table 4). 그러나 이들의 표준 편차 값이 크고, 표본수가 적기 때문에 통계학적 유의성을 검증하기는 어려웠다( $p>0.05$ ).

이 연구에서 분리된 40균주의 mutans streptococci를 종특이 프라이머를 이용한 중합효소연쇄반응법에 의한 중 수준에서의 동정을 시도한 결과, 29균주가 기존에 알려진 생물형과 종 이 일치하였다(Table 3). 즉, 생물형 제 IV형으로 조사된 ChDC 1025, ChDC 1051, ChDC 1054, ChDC 1164 균주들과, 제 II형이라 조사된 ChDC 1139 균주, 그리고, 제 I형인 ChDC 1143 균주 등은 두 가지 종-특이 프라이머에 의해 아무런 반응이 없었으며, 제 I형이라 조사된 ChDC 1111 균주, 제 III형인 ChDC 1163 균주들은 두 가지 종-특이 프라이

**Table 3.** The dft index, and detection of biotypes and species of the mutans streptococci according to the patients

Patient No.	Sex	Age (year, month)	dft index	Strains	Biotype <sup>a</sup>	PCR	
						Sm <sup>b</sup>	Ss <sup>c</sup>
1	M	5, 6	2	ChDC 1010	IV	-	O
2	F	4, 10	13	ChDC 1011	IV	-	O
3	M	3, 0	18	ChDC 1014	IV	-	O
4	F	5, 2	11	ChDC 1017	IV	-	O
5	F	2, 3	11	ChDC 1018	I	O	± <sup>d</sup>
6	M	3, 2	8	ChDC 1019	I	O	-
7	F	4, 1	6	ChDC 1021	IV	-	O
8	F	5, 9	11	ChDC 1022	I	O	±
9	F	4, 5	9	ChDC 1023	I	O	-
10	F	6, 0	3	ChDC 1025	IV	-	-
11	M	7, 4	8	ChDC 1026	II	O	-
12	M	5, 0	19	ChDC 1027	II	O	-
13	M	4, 6	11	ChDC 1035	I	O	-
14	M	2, 4	15	ChDC 1036	I	O	-
15	M	3, 1	15	ChDC 1038	II	O	-
16	F	8, 5	4	ChDC 1044	I	-	O
17	M	3, 8	14	ChDC 1045	V	O	-
18	F	3, 9	13	ChDC 1047	II	O	-
19	M	2, 4	14	ChDC 1049	I	O	-
20	F	3, 7	14	ChDC 1051	IV	-	-

<sup>a</sup> From Shklair and Keene (1976)

<sup>b</sup> Detection of *S. mutans*

<sup>c</sup> Detection of *S. Sobrinus*

<sup>d</sup> Weakly amplified

Table 3. (Continued)

Patient No.	Sex	Age (year, month)	dft index	Strains	Biotype <sup>a</sup>	PCR	
						Sm <sup>b</sup>	Ss <sup>c</sup>
21	M	5, 6	8	ChDC 1052	IV	-	O
22	F	3, 1	3	ChDC 1053	II	O	-
23	F	4, 3	9	ChDC 1054	IV	-	-
24	M	3, 2	12	ChDC 1056	I	O	±
25	F	3, 5	10	ChDC 1060	I	O	-
26	M	3, 8	8	ChDC 1062	I	O	-
27	F	3, 5	4	ChDC 1063	I	O	-
28	M	2, 11	5	ChDC 1109	IV	-	O
29	F	3, 6	13	ChDC 1111	I	O	O
30	M	3, 5	0	ChDC 1115	I	O	±
31	F	4, 6	17	ChDC 1135	IV	-	O
32	F	4, 5	1	ChDC 1136	V	-	O
33	F	4, 1	14	ChDC 1139	II	-	-
34	F	4, 0	4	ChDC 1140	I	O	-
35	F	9, 7	8	ChDC 1143	I	-	-
36	M	5, 5	24	ChDC 1145	I	O	-
37	M	3, 7	5	ChDC 1163	III	O	O
38	M	2, 6	8	ChDC 1164	IV	-	-
39	M	2, 7	10	ChDC 1165	IV	-	O
40	M	4, 2	8	ChDC 1183	I	-	±

<sup>a</sup> From Shklair and Keene (1976)

<sup>b</sup> Detection of *S. mutans*

<sup>c</sup> Detection of *S. Sobrinus*

<sup>d</sup> Weakly amplified

Table 4. Proportion of mutans streptococci biotypes and dft index

Biotype	I	II	III	IV	V	Total
n (%)	18 (45)	6 (15)	1 (2.5)	13 (32.5)	2 (5)	40 (100)
dft index	9.7±5.3	12.0±5.7	5	9.5±5.0	7.5±9.2	9.8±5.3

\*  $\chi^2$  test : p>0.05(n)

\* ANOVA(Scheffe) test : p>0.05(dft index)

머에 의해 모두 반응물이 증폭되었다(Table 3). 또한, 제 I형인 ChDC 1183, ChDC 1044 균주와 제 V형인 ChDC 1136균주 들은 중합효소연쇄반응 결과 예상과는 반대로 *S. sobrinus*-특이 프라이머만 반응하였다(Table 3). 이와 같이 생물형과 종의 관계가 일치하지 않은 11 균주는 *S. mutans* 및 *S. sobrinus* 중에서 제외하여 실험 결과를 분석한 결과, *S. mutans*(69%)가 *S. sobrinus*(31%)보다 발현 빈도가 2.2배 정도 높았다(Table 5). 그러나 두 종의 존재에 의한 치아우식

경험지수에는 차이가 거의 없었다(Table 5). 이들 11 균주를 가지고 있는 환자의 치아우식경험지수(7.9±4.4)는 그렇지 않은 경우보다 낮게 나타났다(Table 6). 또한, 종 수준에서 동정이 된 29 균주들의 생물형에 따른 각각의 환자들의 치아우식 경험지수를 비교한 결과 표본수가 1개인 제 V형을 제외한 나머지 제 I형, 제 II형 및 제 IV형에 따른 치아우식경험지수의 차이는 보이지 않았다(Table 7)(p>0.05).

**Table 5.** Proportion of *S. mutans* and *S. sobrinus* and dft index

Species	<i>S. mutans</i>	<i>S. sobrinus</i>	Total
n (%)	20 (69.0)	9 (31.0)	29 (100)
dft index	10.7±5.6	10.0±5.4	10.4±5.5

\*  $\chi^2$  test :  $p > 0.05(n)$

\* ANOVA(Scheffe) test :  $p > 0.05(dft\ index)$

**Table 6.** The dft index according to the distribution of non-identified mutans streptococci in species-level

n	dft index
11	7.9±4.4

**Table 7.** The dft index according to the distribution of mutans streptococci biotypes except non-identified mutans streptococci in species-level

Biotype	I	II	III	IV	V	Total
n (%)	14 (48.5)	5 (17.2)	0 (0.0)	9 (31.0)	1 (3.4)	29 (100)
dft index	10.1±5.7	11.6±6.2	-	10.0±6.3	14	10.4±5.5

\*  $\chi^2$  test :  $p > 0.05(n)$

\* ANOVA(Scheffe) test :  $p > 0.05(dft\ index)$

#### IV. 총괄 및 고찰

본 연구 결과 소아환자의 치면세균막에 존재하는 mutans streptococci 중 *S. mutans* 종의 발현 빈도가 *S. sobrinus*의 발현 빈도보다 약 2.2배 정도 높았으며, 생물형으로는 제 I형(45%)과 제 IV형(32%)이 대부분을 차지하는 것으로 조사되었다(Table 4, 5). 이러한 결과는 Kim 등<sup>15)</sup>이 한국인의 소아에서 동일인의 구강 내에서 제 I형이 59.2%, 제 IV형이 24.8%였다는 보고와 유사한 것이었다. Kim 등<sup>15)</sup>의 연구에서는 제 IV형을 포함한 제 I형부터 제 V형 모두를 *S. mutans*라고 규정하여 발표를 하였지만, 제 IV형을 *S. sobrinus*라고 생각한다면, *S. mutans* 발현빈도가 *S. sobrinus* 발현빈도보다 약 3배 정도 높게 조사된 것으로 본 연구보다 *S. mutans* 발현빈도가 더 높게 나타났다<sup>15)</sup>. 미국<sup>12,16,17)</sup>, 캐나다<sup>18)</sup>, 일본<sup>19,20)</sup>, 콜롬비아<sup>21)</sup>의 어린이들을 대상으로 한 연구에서도 *S. mutans*가 65~95%, *S. sobrinus*가 0.4~36%까지 검출되는 것으로 보고되어 본 연구와 비슷한 발현빈도를 나타내었다. 하지만, 이와는 다르게 탄

자니아의 어린이에서는 *S. mutans*가 검출되지 않고, *S. sobrinus*가 17%, *S. rattus*가 20% 검출되었다는 보고<sup>22)</sup>도 있으며, 호주인의 10~25세 사이의 연령층을 대상으로 조사된 바에 의하면, *S. mutans*와 *S. sobrinus*가 각각 30%와 35%로 서로 유사한 발현 빈도를 보였다. 이처럼 *S. mutans* 및 *S. sobrinus*는 모든 인류에서 비슷한 발현 빈도를 보이는 것은 아니며, 지역에 따른 차이는 있는 것으로 보인다.

소아의 치면세균막에서 분리된 mutans streptococci 생물형과 치아우식경험지수 간에 유의한 차이는 보이지 않았으며 ( $p > 0.05$ )(Table 4, 7), 이는 Kim 등<sup>15)</sup>의 결과와도 같았다. 또한, mutans streptococci의 종과 치아우식경험지수 간의 관계도 역시 유의한 차이는 보이지 않았다(Table 5). 이러한 결과는 치아우식증이 mutans streptococci 뿐만 아니라 사람의 타액 완충능, 타액의 점도, 타액의 분비량, 식이습관, 구강위생관리능력 등 다른 여러 요인에 의해 영향을 받기 때문인 것으로 사료된다. 하지만, 생물형으로는 mutans streptococci이지만, 본 연구에서 이용한 중합효소연쇄반응법으로는 종 수준에서 동

정이 안된 11 균주를 갖고 있는 소아의 치아우식경험지수는 2.5 정도 더 낮게 나왔다(Table 6). 이러한 결과는 이들 11 균주가 mutans streptococci가 아닐 경우도 있다는 것을 내포하고, 이럴 경우, mutans streptococci가 검출되지 않은 환자는 치아우식증이 발병할 가능성이 낮다는 것을 의미하기도 한다. 그러나, 이를 속단하기 어렵기 때문에 추후 연구에서 이들 11 균주의 16S rDNA를 클로닝하여 핵산염기서열결정법을 통한 정확한 세균 종 수준에서의 동정이 필요하다고 생각되는데 그 이유는 세균의 16S rRNA 유전자 염기서열은 종간에 그 보존성이 뛰어나기 때문에 계통분류학에 가장 믿을 수 있는 기준으로 알려져 있기 때문이다.

본 연구에서 113명의 환자 중에서 mutans streptococci가 검출된 환자는 63명에 불과하였다. 이러한 이유는 내원한 아동이 잇솔질 등을 미리 하고 왔기 때문인 것으로 사료된다. 실제로 환자의 치면세균막으로부터 샘플을 채취할 때 치면세균막이 거의 보이지 않았던 것들도 존재하였다. 그 외 또다른 요인으로 샘플링 후 실험실로 옮겨진 시간이 길어서 회복율이 떨어졌을 가능성도 있을 것으로 사료된다. 또한 최근의 보고에 의하면, 본 연구에서 사용한 MSB 선택배지가 *S. mutans*보다 *S. sobrinus*의 성장을 억제하는 보고도 있다<sup>13)</sup>. 본 연구에서도 지속적인 계대배양을 하면 회복되지 않고 소실되는 균주들도 존재하였다. 그러므로 mutans streptococci의 성장을 억제하지 않고 선택적으로 배양할 수 있는 배지의 개발이 앞으로의 역학조사를 위해서는 필요하리라 생각된다.

본 연구에서는 그 분포가 희귀하다고 알려진<sup>15)</sup> 생물형 제Ⅲ형이 1 균주(ChDC 1163) 검출되었다. 이러한 제Ⅲ형은 호기성 배양 시 mannitol로부터의 산생성이 억제되므로 다른 생물형과 구분이 가능하다고 알려져 있다<sup>16)</sup>. 그러나 ChDC 1163 균주의 종 수준에서의 동정은 확실히 이루어지지 않았다. 즉, 본 실험에 사용된 *S. mutans* 및 *S. sobrinus* 각각을 검출할 수 있는 종-특이 프라이머에 모두 반응하였기 때문이었다. 일반적인 종-특이 프라이머들이 각각의 종에 특이적으로 존재하는 핵산염기서열을 바탕으로 설계되는 점을 고려할 때, ChDC 1163 균주의 dextranase 유전자 핵산염기서열에서는 *S. mutans* 및 *S. sobrinus* 균주들에서 존재하는 특이적 핵산염기서열 모두를 갖고 있기 때문인 것으로 사료된다. 이러한 예는 ChDC 1111(생물형 제Ⅰ형)에서도 볼 수 있다. 또한 이와는 반대로 두 가지 종-특이 프라이머 모두에 반응을 하지 않은 균주도 6 균주 존재하였다(Table 3). 이러한 결과는 첫째 본 연구에서 사용된 종-특이 프라이머의 특이성이 떨어지거나, 둘째 한국에서 분리되는 mutans streptococci의 dextranase 유전자 핵산염기서열이 기존에 알려진 다른 인종에서 분리된 균주들과 상이하거나, 셋째 생물형이 mutans streptococci와 같지만, 다른 그룹의 연쇄상구균이 분리되었기 때문일 것으로 생각된다. 첫번째 및 두번째가 원인일 경우 dextranase 유전자 이외의 다른 유전자를 표적으로 해서 다시 프라이머를 설계하거나, 한국인에서 분리된 mutans streptococci의 dextranase 유전자를

클로닝하여 핵산염기서열을 밝혀서 다시 종-특이 프라이머를 설계해야 할 것이고, 세번째가 원인일 경우 각각의 균주들을 16S rDNA 핵산염기서열법을 이용하여 재동정하여야 할 것으로 생각된다.

## V. 결 론

본 연구는 한국인 소아의 치면세균막에 존재하는 mutans streptococci 종 및 생물형의 발현빈도와 치아우식경험지수와 상관관계를 알아보기 위하여, 조선대학교 치과병원에 내원한 12세 미만의 소아 113명의 치아우식경험지수를 구하고, 이들의 상하악 유전치 및 유구치의 협면 및 설면의 치면세균막 샘플을 채취하여 mutans streptococci를 MSB 배지에서 선택적으로 분리한 다음, 이들의 biotype을 알아보기 위해 생화학적 검사를 실시하고, 이들의 종 수준에서의 동정을 위해 dextranase 유전자를 표적으로 하는 중합효소연쇄반응을 시행하여 mutans streptococci의 종의 발현빈도와 그들의 생물형을 비교하여 다음의 결과를 얻었다.

1. 113명의 환자 중 40명의 치면세균막에서 40 균주의 mutans streptococci가 검출되었다.
2. 40 균주의 mutans streptococci 중 생물형 제Ⅰ형(45%)이 가장 많이 검출되었으며, 그 다음으로 제Ⅳ형(32.5%), 제Ⅱ형(15%), 제Ⅴ형(5%), 제Ⅲ형(2.5%) 순으로 검출되었다.
3. 40 균주의 mutans streptococci를 종-특이 프라이머를 이용한 중합효소연쇄반응법에 의한 종 수준에서의 동정을 시도한 결과, 29 균주가 기존에 알려진 생물형과 종이 일치하였으며, 이중 *S. mutans*가 69%, *S. sobrinus*는 31%였다.
4. Mutans streptococci 종 또는 생물형에 따른 환자의 치아우식경험지수간의 통계학적 유의성은 없었다( $p>0.05$ ).

이상의 결과를 종합하여 볼때, 한국인의 소아의 구강 내에 존재하는 mutans streptococci 종의 발현빈도는 *S. mutans*가 가장 높았으며 생물형으로는 제Ⅰ형이 가장 빈번하게 검출되었다. 또한 이들과 치아우식경험지수간의 상관관계가 없는 것으로 조사되었으며, 이는 치아우식증이 세균학적 요소만이 아닌 기타 여러 원인 요소에 의해 발병된다는 여러 연구 결과와 일치함을 알 수 있었다.

## 참고문헌

1. Orland FJ : A review of dental research using germfree animals. Ann NY Acad Sci, 78:285-289, 1959.
2. Whiley RA, Beighton D : Current classification of the oral streptococci. Oral Microbiol Immunol, 13:195-216, 1998.
3. Hamada S, Masuda N, Kotani S : Isolation and

- serotyping of *Streptococcus mutans* from teeth and feces of children. J Clin Microbiol, 11:314-318, 1980.
4. Fujiwara T, Sasada E, Mima N, et al. : Caries prevalence and salivary mutans streptococci in 0-2-year-old children of Japan. Community Dent Oral Epidemiol, 19:151-154, 1991.
  5. Gold OG, Jordan HV, van Houte : A selective medium for *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol, 18:1357-1364, 1973.
  6. Jordan HV : Cultural methods for the identification and quantitation of *Streptococcus mutans* and lactobacilli in oral samples. Oral Microbiol Immunol, 1:23-30, 1986.
  7. Igarashi T, Yamamoto A, Goto N : Direct detection of *Streptococcus mutans* in human dental plaque by polymerase chain reaction. Oral Microbiol Immunol, 11:294-298, 1996.
  8. Igarashi T, Yamamoto A, Goto N : PCR for detection and identification of *Streptococcus sobrinus*. J Med Microbiol, 49:1069-1074, 2000.
  9. Ono T, Hirota K, Nemoto K, et al. : Detection of *Streptococcus mutans* by PCR amplification of spaP gene. J Med Microbiol, 41:231-235, 1994.
  10. Igarashi T, Ichikawa, K, Yamamoto A, et al. : Identification of mutans streptococcal species by the PCR products of the dex genes. J Microbiol Methods, 46:99-105, 2001.
  11. Shklair I,L, Keene HJ : A biochemical scheme for the separation of the five varieties of *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol, 19:1079-1081, 1974.
  12. Shklair IL, Keene HJ : Let your antibody work-immunize early. J Dent Res, 55:C224-C225, 1976.
  13. Beighton D, Russell, RR, et al. : The isolation of characterization of *Streptococcus mutans* serotype h from dental plaque of monkeys (*Macaca fascicularis*). J Gen Microbiol, 124(Pt2):271-279, 1981.
  14. Bratthall D : Demonstration of five serological groups of streptococcal strains resembling streptococcus mutans. Odontol Revy, 21:143-152, 1970.
  15. Kim KK, Choe SJ, Lim CY : Relationship between the caries experience of Korean school children and the distribution of *Streptococci mutans* in dental plaque. J Kor Soc Microbiol, 18:11-21, 1983.
  16. Bright JS, Rosen S, Chorpensing FW : Survey of the seven serological types of *Streptococcus mutans* in six-year-old children. J Dent Res, 56:1421, 1977.
  17. Stiles HM, Meyers R, Brunelle JA, et al. : Occurrence of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* in the oral cavity and feces of young children. In Stiles, H.M. Loesche WJ, O'Brien(ed.) Proceedings : microbial aspect of dental caries (special supplement to Microbiology Abstracts) Information Retrieval Inc Washington DC, 3:187-199, 1976.
  18. Qureshi JV, Goldner M, Riche WH, et al. : *Streptococcus mutans* serotypes in young school-children. Caries Res, 11:141-152, 1977.
  19. Hamada S, Slade HD : Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Res, 44:331-384, 1980.
  20. 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.
  21. Thomson LA, Little WA, Bowen WH, et al. : Prevalence of *Streptococcus mutans* serotypes Actinomyces and other bacteria in the plaque of children. J Dent Res, 59:1581-1589, 1980.
  22. Kilian M, Thylstrup A, Fejerskov O : Predominant plaque flora of Tanzanian children exposed to high and low water fluoride concentrations. Caries Res, 13:330-343, 1979.
  23. de Soet JJ, van Dalen PJ, Pavicic MJ, et al. : Enumeration of mutans streptococci in clinical samples by using monoclonal antibodies. J Clin Microbiol, 28:2467-2472, 1990.
  24. Hirose H, Hirose 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.
  25. Oho T, Yamashita Y, Shimazaki Y, et al. : Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction. Oral Microbiol Immunol, 15:258-262, 2000.
  26. Perch B, Kjems E, Ravn T : Biochemical and serological properties of *Streptococcus mutans* from various human and animal sources. Acta Pathol Microbiol Scand [B] Microbiol Immunol, 82:357-370, 1974.
  27. Shklair IL, Keene HJ : A biochemical scheme for the separation of the five varieties of *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol, 19:1079-1081, 1974.



## Abstract

## DISTRIBUTION OF MUTANS STREPTOCOCCI IN DENTAL PLAQUE OF CHILDREN

Joong-Ki Kook\*, Jong-Whi Park, So-Young Yoo\*, Hwa-Sook Kim\*, Nan-Young Lee

*Department of Pediatric Dentistry, Department of Oral Biochemistry\*, College of Dentistry  
Oral Biology Research Institute, Chosun University*

The aim of this study is to survey the frequency of mutans streptococci species and biotypes isolated from dental plaque in Korean children and the relationship between species and biotypes of mutans streptococci and dft index. Dental plaques were collected from the anterior and molar teeth of upper and lower jaws in the subjects, aged below 12 years old. A dental examination was performed for dft (decayed, filled, total) with the WHO caries diagnostic criteria. The mutans streptococci from the sample were cultured selectively on mitis salivarius-bacitracine (MSB) agar plate. For biotyping of mutans streptococci, biochemical test was performed. From the culture, bacterial genomic DNA was prepared for using of PCR template for the identification of mutans streptococci at the species-level. Forty strains of mutans streptococci were isolated from dental plaques of 40 patients. The biotype I (45%) and biotype IV (32.5%) were most frequently detected. The prevalence of *S. mutans* and *S. sobrinus* was 69% and 31%, respectively. There was no positive relationship between species and biotypes of mutans streptococci and dft index. Our results revealed that biotype I and *S. mutans* were frequently detected in Korean children and support that dental caries incidents by many causative factors not only bacterial factor.

**Key words** : Mutans streptococcus, Biotypes, Dental caries