항균 필러를 함유한 광중합형 치면열구전색재의 S. mutans억제효과 지혁준

항균 필러를 함유한 광중합형 치면열구전색재의 *Streptococcus mutans* 억제효과

연세대학교 대학원

치 의 학 과

지 혁 준

항균 필러를 함유한 광중합형 치면열구전색재의 *Streptococcus mutans* 억제효과

연세대학교 대학원

치 의 학 과

지 혁 준

항균 필러를 함유한 광중합형 치면열구전색재의 *Streptococcus mutans* 억제효과

지도 최 병 재 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2003년 12월 일

연세대학교 대학원

치 의 학 과

지 혁 준

지혁준의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2003년 12월 일

감사의 글

본 논문을 완성함에 있어 시종 지도 편달하여 주신 최병재 지도교수님께 충심으로 감사드리며 많은 조언과 격려를 주신 김경남 교수님, 손홍규 교수님, 이종갑 교수님, 최형준 교수님, 이제호 교수님, 김성오 교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한 본 연구에 많은 도움을 주신 치과재료학 교실의 이덕연 교수님과 소아치과학 교실원 여러분께 감사드립니다. 특히 제가 믿고 의지하는 사랑하는 지원이와 어머님 아버님 그리고 장인 장모께 이 논문을 바칩니다.

차 례

그림 및 표 차례 ····· iii

국문 요약 ····· v

Ⅰ. 서론 ····· 1

Ⅱ. 재료 및 방법 ····· 4
1. 연구재료 ····· 4
가. 치면열구전색재 ····· 4
나. 항균 필러 ····· 5
2. 연구방법 ····· 5
가. 항균 필러를 함유한 치면열구전색재의 제조 ····· 5
나. 액체 및 고체배지의 제조 ····· 7
다. AP7 필러의 항균력 측정 ····· 7
라. 액체 배지에서 AP7 필러를 함유한 치면열구전색재의 세균억제능력 측정 ····· 7
마. 항균필러의 용출물이 갖는 항균력 측정 ····· 7
바. 필름 밀착법에 의한 AP7의 세균억제능력 측정 ····· 8
사. 세포독성 시험 ····· 8

Ⅲ. 결과 ····· 11
1. AP7 필러의 항균력 ····· 11
2. 액체 배지에서 AP7 필러를 함유한 치면열구전색재의 세균억제능력 흡광도(optical density)를 통한 항균력 ····· 14
3. 항균필러의 용출물이 갖는 항균력 ····· 11
4. 필름 밀착법에 의한 AP7의 세균억제능력 ····· 18
5. 세포독성 ····· 19

Ⅳ. 총괄 및 고찰 ····· 22
Ⅴ. 결론 ····· 26

참고 문헌 ····· 28

영문 요약 ····· 31

그림 차례

Fig. 1. Pit & fissure sealant (Concise™) used in this study ····· 4
Fig. 2. Light curing XL 3000 device used in this study ····· 4
Fig. 3. Antibacterial filler (AP7) ····· 5
Fig. 4. Sonicator used to disperse AP7 filler in the sealant ····· 6
Fig. 5. Film adhesion method ····· 9
Fig. 6. Optical microscopic images of sealants incorporating different amount of AP7 filler ····· 12
Fig. 7. Inhibitory effect of AP7 antibacterial filler on the S. mutans on the agar plate ····· 13
Fig. 8. Optical density of S. mutans in BHI broth incubated in the presence of (a) nothing (b) Concise™ only (c) S-AP7-5 (d) AP7 only: Initial bacterial concentration in BHI broth is 1×10^2 cfu/㎖, 5wt% of specimen was added into 20㎖ BHI Broth. ·· 15
Fig. 9. Colony images on BHI agar plates incubated in the presence of (a) nothing (b) Concise™ only (c) S-AP7-5 (d) AP7 only

Fig. 10. Optical density of S. mutans in BHI broth incubated in the presence of (a) nothing, (b) Concise™ only, (c) S-AP7-0.5, (d) S-AP7-1, (e) S-AP7-2, (f) S-AP7-5, Initial bacterial concentration in BHI broth is 1×10^2 cfu/㎖; 12.5 - 50% of AP7 elute was added in BHI broth ····· 17
Fig. 11. Inhibitory effect of sealants incorporating different amount of AP7 ····· 18
Fig. 12. Cell toxicity images of (a) positive control (b) negative control, (c) Concise™, (d) S-AP7-1, (e) S-AP7-2, and (f) S-AP7-5 ·· 20

표 차례

Table 1. Sample identification of sealants in this study ····· 6
Table 2. Zone-index, lysis-index and response-index criteria ····· 10
Table 3. Zone-index, lysis-index and response-index of sealants as a function of amounts of AP7 ····· 19

국문 요약

항균 필러를 함유한 광중합형 치면열구전색재의 *Streptococcus mutans* 억제효과

변연누출 등에 의한 이차우식증을 예방하기 위하여 기존의 치면열구전색재 제품인 Concise™(3M Co., St. Paul., MN, U.S.A.)에 항균 필러(AP7)를 첨가하여 새로운 수복용 항균 치면열구전색재를 제조하였다. 이에 대한 생물학적 성질로서 항균력 실험을 하였다. 기존의 제품인 Concise™ 대조군과 비교 시험하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. S. mutans를 접종한 고체배지에 항균필러 AP7과 Concise™ 을 넣고 배양한 결과 Concise™은 항균성이 없었으며 AP7 필러 주위에는 세균 증식억제대(Inhibitory zone)가 형성된 것을 확인 할 수 있었다.

2. Concise™과 5wt%의 AP7 필러를 함유한 Concise™, 그리고 AP7 필러의 액체배지에서 S. mutans의 증식억제능력을 O.D값으로 평가하였다. AP7필러만 넣은 경우에서는 S. mutans의 증식이 현저히 억제되는 것을 알 수 있었다. 하지만 대조군에 비해서 Concise™과 5wt%의 AP7을 함유한 Concise™은 S. mutans의 증식억제능력의 차이가 거의 없었다.

3. 대조군과 2.5㎖, 5.0㎖, 7.5㎖, 10.0㎖의 AP7용출액을 넣고 O.D값을 측정한 결과 모든 경우에서 S. mutans의 증식억제효과가 거의 없었다. 이는 항균성이 AP7의 용출에 의한 것만이 아니라는 것을 보여준다.

4. 필름밀착법에 의한 S. mutans의 증식억제실험 결과, Concise™에 첨가한 AP7 필러의 양이 증가할수록 항균작용은 더 강해지며 이는 균이 수복물에 부착되는 것이 억제됨을 의미한다.

5. 본 연구에서 사용된 항균 필러(AP7) 자체의 세포독성과 치면열구전색재의 세포독성 측정 결과, 세포 탈색지수와 사멸지수가 0으로 측정되어 반응지수가 0/0으로 나타났다. 또한 항균 필러를 치면열구전색재에 첨가하여 제조한 후 세포독성을 측정한 결과 역시 탈색지수와 사멸지수가 0으로 측정되어 반응지수 또한 0/0이었다.

이상의 실험결과로부터 AP7을 첨가한 항균 치면열구전색재의 항균력은 AP-7의 함량이 증가함에 따라 증가하여 우수한 구강 항균력을 지닌 것으로 판명되었다. 결론적으로, 본 연구를 통해 기존의 치면열구전색재보다 우수한 항균 치면열구전색재가 제조되었음을 확인하였다. 기존 치면열구전색재에 AP7을 첨가하여 항균 치면열구전색재를 제조하는데는 성공하였으나 그 항균기전과 최고의 항균성을 갖는 가장 적절한 AP7 성분 함량을 알아내는데 더 많은 연구가 필요하다.

핵심되는 말 : 항균 필러, 치면열구전색재, O.D값, 항균력, 용출

항균 필러를 함유한 광중합형 치면열구전색재의 *Streptococcus mutans* 억제효과

연세대학교 대학원 치의학과

(지도 교수 최 병 재)

지 혁 준

Ⅰ. 서 론

이상적인 치과치료란 자연 그대로의 치질을 회복시켜 주는 것으로 저작 및 발음 등과 같은 기능적인 회복과 더불어 형태 등의 심미적 수복도 의미한다. 그러나 과거의 치료는 기능회복에 주안점을 두었으며 마찬가지로 재료 역시 이러한 방향으로 발전되어 왔으나 전반적인 삶의 질의 향상과 더불어 심미적인 재료에 치과의사뿐만 아니라 환자들은 더 많은 관심을 갖게 되었다. 이러한 관점에서 볼 때 다양한 심미성 수복물의 등장은 당연한 결과이다. 심미수복을 위한 충전재료에는 글래스 아이노머 시멘트(Ferracane 등, 1989; 신 등, 1992), 세라믹, 콤포짓 레진등이 사용된다(Hembree, 1986).

콤포짓 레진은 소아치과영역에서 글래스 아이노머 시멘트와 더불어서 가장 많이 쓰이는 심미재료로써 그 중요성은 매우 크다. 콤포짓트 레진의 가장 큰 임상적인 문제는 그 어느 다른 충전재보다 더 많은 세균과 치태가 부착하는 것으로 이는 곧 이차 치아우식증을 유발시키는 가능성이 더 큰 것을 의미한다(Skjöland, 1973)

치아우식증은 만성적인 침습성 질환으로 탈회라는 과정을 통해서 치질이 서서히 파괴되는 질환이다(Norman 등, 1993). 이 탈회과정은 구강 내 상주하는 세균의 대사산물인 산을 통해서 유발하는데 구강 내 산을 발생하는 세균 중 *Streptococcus mutans*(*S. mutans*)가 중요한 원인균이다(Beeiweiss, 1976). *S. mutans*은 항원성에 따라 8개의 혈청형(a-h)으로 나누어 지는데 이 중 혈청형 c가 치태 형성의 주된

세균이다. S. mutans는 glycosyltransferase를 분비하여서 자당에서 비수용성 다당류인 글루칸(glucan)을 합성한다. 이 비수용성 다당류는 치태의 기본이 되어서 치아 표면에 세균이 부착하도록 도와준다(Hamada와 Slade, 1980). 치태 내 S. mutans를 비롯한 일부 세균들은 탄수화물대사에서 산을 만들어서 치아에 탈회를 유발한다(Arends와 Christoffersen, 1986). 이러한 치아우식증을 예방하는 방법에는 불소제재사용(Rawls 등, 1983; Young 등, 1996; Swartz 등, 1984), 칫솔질, chlorhexidine(Jedrychowski 등, 1983), 치면열구전색재 사용 등이 있다(Ripa, 1985). 이 중 치면열구전색제는 교합면 치아 우식증 예방에 매우 효과적이다.
치면열구전색재는 수복재료가 산부식된 법랑질 표면에 결합하여 이를 물리적으로 막아줌으로써 이 부위를 치아 우식증으로부터 예방하는것이다.
실제로 초기치아우식증이 존재하는 치면열구를 전색하였을때 밀폐성이 완전할 경우 우식 부위의 생존 미생물 수가 우식증을 유발하지 못하는 수준으로 감소되었다고 보고 되었다.

치아 우식증은 표층이 손상되지 않으면 우식부위의 재석회화가 가능한 동적인 과정(dynamic process)이므로(Brannstrom, 1984) 초기 치아 우식증의 재석회화와 이차 치아 우식증 예방을 위한 많은 연구가 이루어져 왔다. 이와 연관되어서 치아 수복물의 항균활성을 통한 세균을 억제하려는 노력에 관심을 갖게 되었다(Margolis 등, 1986). Chlorhexidine, 인산칼슘, 다양한 항균필러등을 첨가한 충전재를 통해서 충전재 표면에 세균의 부착과 치태의 축적을 억제하기 위해서 항균제를 방출하는 방법등이 시도되었다(Jedrychowski 등, 1983; Takemura 등, 1983; Ribeiro와 Ericson, 1991). 그러나 이런 물질들의 항균작용은 어떤 물질의 방출에 의존하고 있으며, 이런 과정은 수복재의 기계적 성질을 변화시키거나, 항균효과가 서서히 사라지거나 구강 내 미생물 군락의 변화와 관련된 항상성의 파괴등이 야기되었다. 이처럼 여러 항우식법 중에는 치아 자체의 변색, 교차반응 및 내성균주 발현 등의 문제점들이 나타난다(Jedrychowski 등, 1983; Syafiuddin 등, 1997; Tanagawa 등, 1999; Kudou 등, 2000).

이에 따라 몇몇 학자들은 항우식의 다른 방법을 모색하게 되었는데 물질 자체의 항우식성을 증가시키는 것과 같이 입증된 부착술(adhesive system)을 사용하여 치아-수복 계면에서 우식 잠재성을 최소화하는 방법에 관심을 두었다(Golberg 등, 1981). 따라서 부작용없이 치아 우식증을 예방할 수 있는 기초 연구의 일환으로 세균의 성장을 억제하거나, 획득피막에 세균이 부착되는 것을 억제할 수 있는 항균재를 사용한 항치아우식에 대한 노력이 시도되고 있는 시점이다. 이는 치과 수복물에 세균 활성의 억제 및 세균 대사를 방해할 목적으로 항균활성을 지니게 하는 것이다. 여기에는 은과 같은 금속이온이나 (Yoshida 등,1999) Vancomycin(Kudou 등, 2000), Metronidazole과 같은 항생제등을 이용한 방법도 보고가 되었으며, 최근에

는 제4 ammonium계 단량체인 methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB)를 이용한 방법이 소개되었다(Imazato 등, 1999). 하지만 항균제를 기계적 성질이 우수한 치면열구전색재에 혼합했을때 처리방법이나 가열로 인한 항균효과의 단기적 내구성 및 이의 붕괴같은 문제점을 극복하고 적절한 양의 항균제가 오랜 기간동안 방출될 수 있을 것으로 기대되어서 이번 실험을 하게 되었다.

본 연구의 목적은 항균 필러인 AP7(Nisho Co.,Japan)을 치면열구전색재 (Concise™,3M Co.)에 다양한 농도로 섞은 뒤 이에 대한 S. mutans의 증식억제효과를 고찰하고자 한다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 연구재료

가. 치면열구전색재

본 연구에서는 항균필러를 함유한 치면열구전색재를 제조하기 위하여 치면열구전색재로 현재 치과에서 사용되고 있는 Concise™(3M, St. Paul, MN, U.S.A., Fig. 1)를 이용하였고, 광중합을 시키기 위해 광조사기(Curing Light XL 3000, 3M Co., St. Paul, MN., U.S.A., Fig. 2)를 이용하였다.

Fig. 1. Pit & fissure sealant (Concise™) used in this study.

Fig. 2. Light curing XL 3000 device used in this study.

나. 항균필러

본 연구에 사용된 항균 필러는 AP7(Nisho, Japan)으로 무·유기 복합 항균제이다(인산지르코늄계 무기항균제 + 유기항균제).

Fig. 3. Antibacterial filler (AP7).

2. 연구방법

가. 항균 필러를 함유한 치면열구전색재의 제조

현재 사용중인 치면열구전색재(Concise™)에 항균 필러(AP7)를 각각 0.5, 1, 2, 5 wt% 첨가한후 균일하게 혼합하고, 필러들의 균일한 분산을 위해 Sonicator(SH-2100, 세한초음파산업, Fig. 4)를 이용하여 5분간 분산시켰다. 이러한 공정을 통해 AP7을 함유한 항균 치면열구전색재를 제조하였으며, 대조군으로는 항균필러를 첨가하지 않은 Concise™를 사용하였다. AP7의 함량에 따라 제조한 항균 치면열구전색재와 대조군의 조성은 Table 1 과 같다.

Fig. 4. Sonicator used to disperse AP7 filler in the sealant.

Table 1. Sample identification of sealants in this study.

Code name	Concise™ (part)	AP7 (part)
Control	100	0
S-AP7-0.5	100	0.5
S-AP7-1	100	1
S-AP7-2	100	2
S-AP7-5	100	5

나. 액체 및 고체배지의 제조

1) 액체배지

Brain heart infusion(BHI) 액체배지는 증류수 1,000 ㎖에 37g의 BHI powder를 첨가한 후 121℃에서 30분간 고압증기멸균후 사용하였다.

2) 고체배지

BHI 아가 고체배지는 1,000 ㎖의 증류수에 37g의 BHI를 첨가한 용액에 15g의 Bacto-agar를 넣고 121℃에서 30분간 고압증기멸균을 하였다. 액체상태의 배지는 petri-dish에 약 15㎖씩 넣은 후 실온에서 냉각후 사용하였다.

다. AP7 필러의 항균력 측정

두께 0.5 mm, 직경 10 mm의 Teflon 주형에 치면열구전색재를 채워 넣고 한면을 각각 40초씩 총 80초간 광중합하여 시편을 제작하였다.

항균력 실험을 위해 BHI 아가 고체배지에 1×10^6 cfu/㎖의 S. mutans를 100㎕ 접종하고, 여기에 Concise™ 시편과 AP7 분말을 각각 위치시켰다. 37℃ incubator에서 24시간 배양 후 시편 주위에 형성되는 세균 증식억제대(inhibitory zone) 크기를 관찰하였다.

라. 액체배지에서 AP7 필러를 함유한 치면열구전색재의 세균억제능력 측정

두께 0.5 mm, 직경 10 mm의 Teflon 주형에 Concise™, 항균 치면열구전색재(S-AP7-5)를 채워 넣고 한면을 각각 40초씩 총 80초간 광중합하여 시편을 각각 제작하였다. 또한 AP7 항균 필러 powder만을 10 mm 금속 주형에 채우고 압축프레스를 이용하여 두께 0.5 mm, 직경 10 mm의 AP7 pellet 시편을 제작하였다. BHI 액체배지에 S. mutans를 1×10^2 cfu/㎖ 농도로 접종하여 세균이 포함된 BHI 액체배지를 제조하였다.

Concise™, S-AP7-5 그리고 AP7 시편을 각각 1g씩 20㎖의 BHI 액체배지(S. mutans 농도: 1×10^2 cfu/㎖)에 넣고, Elisa reader(파장 = 570 nm)를 이용해서 시간의 증가에 따른 S. mutans의 광학농도(optical density, OD)를 측정하였다. 또한 시편을 넣지 않은 BHI 액체배지에 S. mutans를 접종하여 양성대조군으로 사용하였다. 또한, BHI 액체배지에서 S. mutans를 48시간 증식시킨 후에 이들을 100㎕씩 BHI 아가 고체 배지에서 접종하였다. 접종한 고체배지를 37℃ CO_2 incubator에서 24시간 배양 후 S. mutans의 colony 형성을 관찰하였다.

마. 항균필러의 용출물이 갖는 항균력 측정

AP7의 용출액의 항균력을 평가하기 위해, 먼저 4g의 AP7을 증류수 20㎖에 넣고 121℃에서 1시간동안 용출하였다(ISO 10993). 2.5, 5.0, 7.5, 10.0㎖의 AP7의 용출액을 20㎖ BHI 액체배지(S. mutans 농도: 1×10^2 cfu/㎖)에 넣고, 시간에 따라 각각의 optical density값을 측정하여 S. mutans의 증식을 살펴보았다.

바. 필름 밀착법에 의한 AP7의 세균억제능력 측정

Concise™ 대조군과 AP-7을 1, 2, 5wt%로 첨가한 항균 치면열구전색재를 각각 지름 50 mm, 두께 1 mm의 petri-dish에 넣고 총 80초간 광조사하여 시편을 제작하였다. 제작한 시편을 600번 사포를 이용하여 표면을 고르게 연마하고 압축공기로 세척한 후 E.O. 가스로 멸균 소독하였다. 항균력 실험에 사용한 균주는 S. mutans로써 먼저 20㎖ BHI 액체배지에 100㎕의 균을 풀어 37℃의 CO_2 배양기에서 24시간동안 배양하였다.

아래 그림과 같이 24시간동안 배양된 균을 대조군과 실험군 시편에 각각 4㎕씩 접종한 후 polyethylene film으로 덮고 다시 CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 이렇게 배양된 균은 시편을 덮은 film을 살짝 떼어낸 후 BHI 액체배지로 1,000배 희석하여 필름에 붙어있는 세균을 떼어 내었다. 위에서 수집된 세균 희석액 100㎕를 BHI 아가 고체배지에 접종하였다. 이렇게 접종된 BHI 아가 고체배지 시편을 CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 S. mutans의 colony 형성을 관찰하였다.

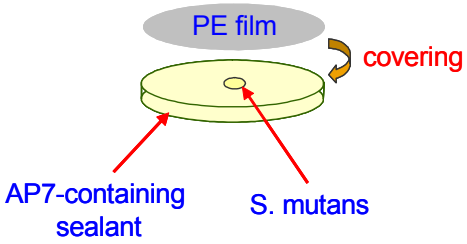


Fig. 5. Film adhesion method.

사. 세포독성 시험

본 연구에서 AP7을 첨가한 치면열구전색재의 세포독성을 평가하기 위하여 배양세포에 의한 한천중층 실험을 이용하였다. 세포는 L-929를 사용하였고, 지름 10mm, 두께 2mm의 시편을 제작하여 표면을 연마한 후 한천배지에 접촉시키기 전에 ethylene oxide 가스로 멸균하였다. 양성대조군은 구리판을, 음성대조군은 슬라이드 글라스를 사용하였으며 이들 역시 접촉면적이 시편과 동일하도록 제작하여 이용하였다.

L-929세포의 부유액(3×10^5/㎖)을 만든 후 90mm의 petri-dish에 세포 부유액 10㎖을 첨가한 후 24시간 배양하였다. 배양액을 제거하고, 45~50℃의 Eagle's agar medium 10㎖을 각각의 petri-dish에 첨가하였다. 실온에서 30분간 방치하여 고체화 된 Eagle's agar medium의 중앙부위에 neutral red vital stain 용액 10㎖을 천천히 첨가하여 전면에 염색액이 퍼지도록 한 후 30분간 방치하였다. 염색액을 제거하고 가능한 한 빨리 시편을 한천에 밀착시키도록 얹은 후 37℃ 5% CO_2 농도의 배양기 안에서 24시간 배양하였다.

Petri-dish를 백지 위에 놓고 육안과 자로 탈색된 부위의 크기를 관찰하여 탈색지수를 구하였고, 위상차현미경(Olympus C2, Tokyo, Japan)을 이용하여 탈색된 부위 내에서 세포가 사멸된 비율을 측정하여 사멸지수를 구하였다. 탈색지수(zone index)와 사멸지수(lysis index)에 따른 반응지수(response index)에 의한 세포 독성에 대한 평가를 하였다(response index = zone index/lysis index). 탈색지수, 사멸지수 및 반응지수의 기준과 이에 준한 세포독성도의 기준은 Table 2과 같다.

Table 2. Zone-index, Lysis-index and Response-index Criteria.

Lysis index	Description
0	No observable lysis
1	Up to 20% of zone lysed
2	Over 20% to 40% of the zone lysed
3	Over 40% to 60% of the zone lysed
4	Over 60% to 80% of the zone lysed
5	Over 80% lysed within the zone

.

Scale	Response index	Interpretation
0	0/0	Noncytotoxic
1	1/1	Mildly cytotoxic
2	2/2 - 3/3	Moderately cytotoxic
3	4/4 - 5/5	Severely cytotoxic

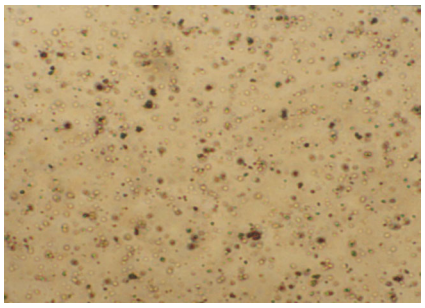
Ⅲ. 결　　과

1. AP7 필러의 항균력

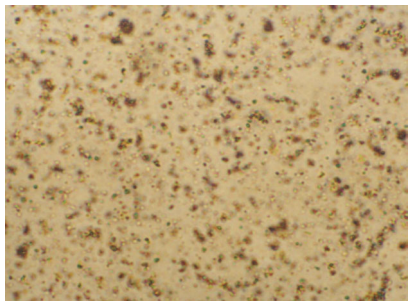
Concise™ 에 AP7을 첨가하여 제조한 항균 치면열구전색재의 현미경적 소견을 Fig. 6에서 볼 수 있다. 레진 기질사이에 AP이 균일하게 분산되어 있는 양상을 보인다. 필러의 양을 증가시켜도 레진기질에 분산이 잘 이루어짐을 알 수 있었다.

AP7의 항균력을 측정한 결과, Fig. 7에서 알 수 있듯이 Concise™ 로만 구성된 원판 주변에는 균들이 자란 것을 관찰할 수 있으나, AP7 필러주위에는 세균 증식억제대 (inhibitory zone)가 형성된 것을 볼 수 있다.

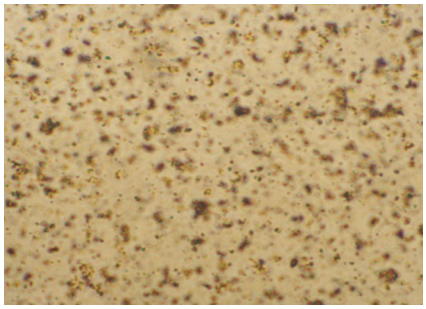
이는 AP7필러가 항균력을 갖는다는 것을 의미한다. 즉, 항균성을 갖는 성분이 소량 용출됨을 알 수 있다.



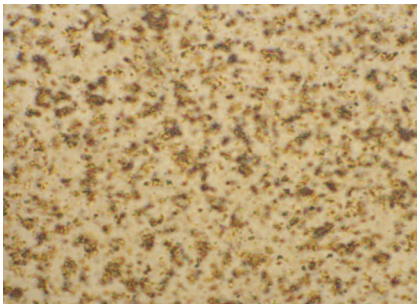
(a) Concise™



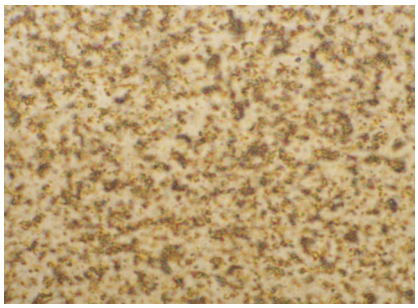
(b) S-AP7-0.5



(c) S-AP7-1



(d) S-AP7-2



(e) S-AP7-5

Fig. 6. Optical microscopic images of sealants incorporating different amount of AP7 filler.

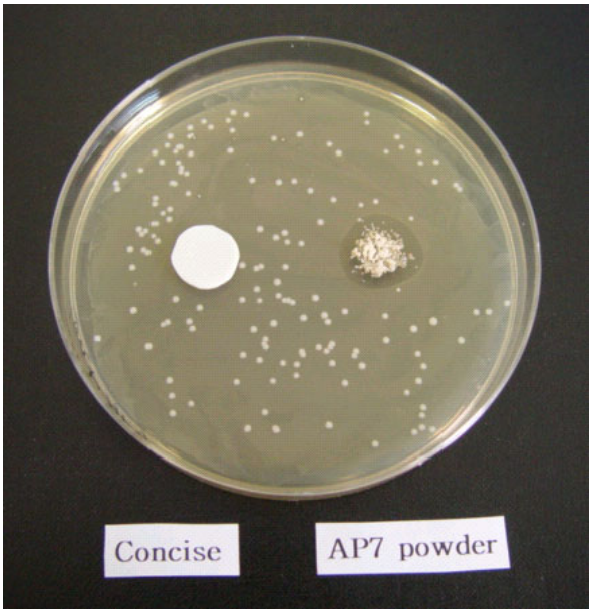


Fig. 7. Inhibitory effect of AP7 antibacterial filler on the S. mutans on the agar plate.

2. 액체배지에서 AP7 필러를 함유한 치면열구전색재의 세균 억제능력 측정

흡광도(Optical density)는 세기 I_0를 가진 어떤 빛이 용액층을 통과한 후에 광도가 I가 되면, 그 양은 $\log_{10}(I_0/I)$으로 정의된다. 람베르트베르의 법칙이 성립하는 경우에는 $\log_{10}(I/I) = \varepsilon cd$의 관계가 성립한다. ε은 몰흡광계수, c는 용액의 몰농도 , d는 액층(液層)의 두께를 나타낸다. 따라서 ε과 d를 알면 광학밀도 측정으로 농도 c를 결정할 수 있다. 그러나 광학밀도 ·흡광도 등의 정의는 상당히 애매하며, $\log_{10}(I_0/I)$를 흡광도라 하고 흡광도를 d로 나눈 값을 광학밀도라고 하는 경우도 있다. 이 경우 흡광도는 람베르트베르의 법칙이 성립하는 한 εc와 같고, 따라서 용질(溶質)의 농도에 비례한다. 그러므로 어떤 표준상황에서 흡광도를 알면 그 물질의 용액의 흡광도를 측정함으로써 농도를 구할 수 있다. 따라서 흡광도를 통해서 간접적으로 증가하거나 감소된 S. mutans를 확인할 수 있다. Fig. 8에서 보듯이 아무것도 들어가지 않은 대조군에서는 흡광도 값이 10에서 20분사이의 배양시간에서 급속히 증가되어 있는 것을 알 수 있으나 AP7필러만 들어있는 배지에서의 흡광도 값은 완만하게 증가되는 것을 알 수 있다.

Concise™ 과 5wt%의 AP7필러가 들어간 경우에는 흡광도 값이 대조군과 큰 차이가 없었다. 이는 Fig. 9에서 보듯이 아무것도 들어있지 않은 대조군과 Concise™ 과 5wt%의 AP7필러가 들어간 경우 모두 고체배지에서 많은 S. mutans가 증식한 것을 알 수 있다.

이와는 반대되는 결과로 AP7 필러만 들어있는 배지에서는 S. mutans가 거의 증식하지 않은 것을 관찰할 수 있다.

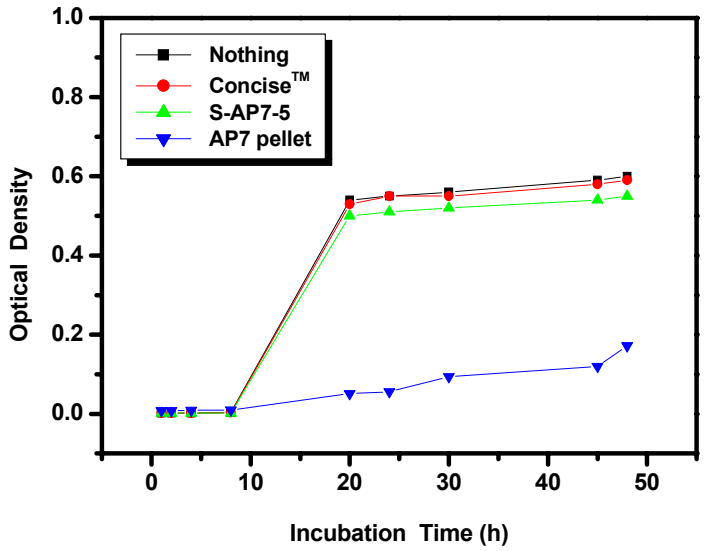
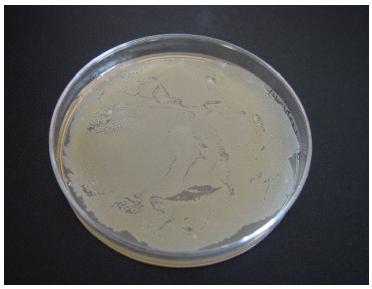


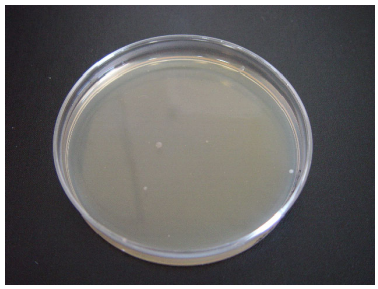
Fig. 8. Optical density of S. mutans in BHI broth incubated in the presence of (a) nothing (b) Concise™ only (c) S-AP7-5 (d) AP7 only: Initial bacterial concentration in BHI broth is $1X10^2$ cfu /㎖, 5wt% of specimen was added into 20㎖ BHI Broth.

(a) nothing

(B) Concise™



(c) S-AP7-5



(d) AP7 only

Fig. 9. Colony images on BHI agar plates incubated in the presence of (a) nothing (b)Concise™ only (c) S-AP7-5 (d) AP7 only.

2. 항균필러의 용출물이 갖는 항균력

Fig. 10은 각각 다른 양의 AP7 용출액을 균이 들어 있는 배지에 넣고 시간에 따라 각각의 흡광도 값을 측정한 결과이다. 여기에서 보듯이 각각 다른 양의 AP7 필러의 용출액에서 만든 액체배지의 흡광도 값은 서로 큰 차이가 없었다. 이는 제작된 항균 치면열구전색재의 항균작용은 대부분 필러자체 성분의 용출에 의한 것이 아니라는 것을 알 수 있다.

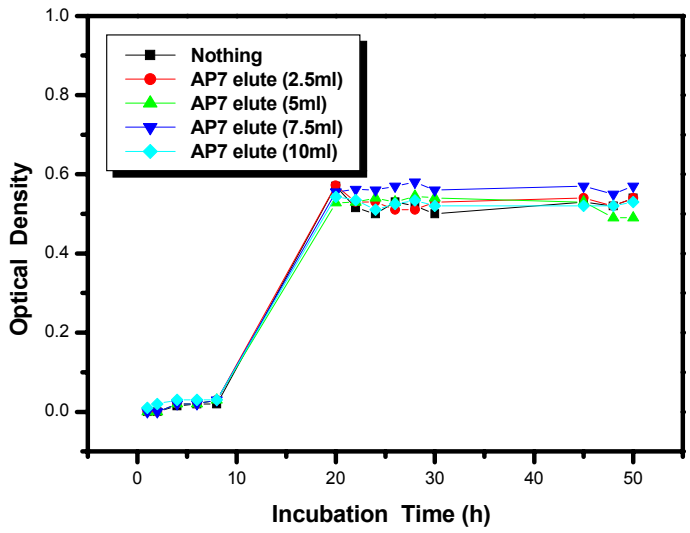
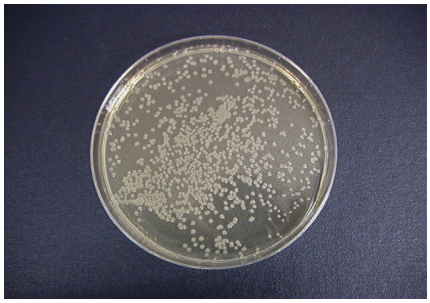


Fig. 10. Optical density of S. mutans in BHI broth incubated in the presence of (a) nothing, (b) Concise™ only, (c) S-AP7-0.5, (d) AP7-1, (e) AP7-2, (f) AP7-5. Initial bacterial concentration in BHI broth is $1X10^2$ cfu/㎖; 12.5-50% of AP7 elute was added in BHI broth.

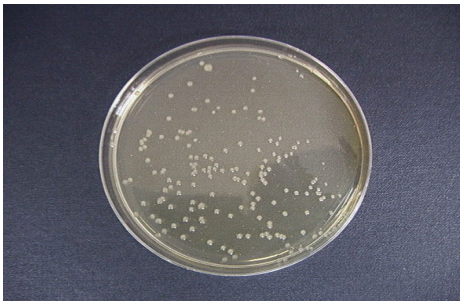
3. 필름 밀착법에 의한 AP7의 세균억제능력

Fig. 11은 필름 밀착법을 통해서 24시간 배양된 S .mutans를 아가 고체배지에서 배양시킨 사진이다.
Concise™, S-AP7-1, S-AP7-2, S-AP7-5순서로 세균의 증식이 억제된 것을 알 수 있다.

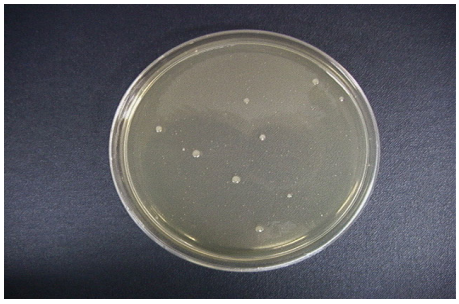
(a) Concise™



(b) S-AP7-1



(c) S-AP7-2



(d) S-AP7-5

Fig. 11. Inhibitory effect of sealants incorporating different amount of AP7.

5. 세포독성

본 연구에서 사용된 항균 필러(AP7) 자체의 세포독성 측정 결과, Table 3에서 볼 수 있듯이 세포 탈색지수와 사멸지수가 0으로 측정되었다. 따라서, 반응지수도 0/0으로 나타났다. 또한 AP7을 치면열구전색재에 첨가하여 제조한 후 세포독성을 측정한 결과 역시 탈색지수와 사멸지수가 0으로 측정되어 반응지수 또한 0/0이었다. 따라서, 본 연구에서 제조된 항균 필러를 포함한 치면열구전색재의 세포독성은 없는 것으로 판명되었다. Fig. 12에서는 배양세포에 의한 한천중층 시험을 통해 얻은 세포독성 평가 사진을 나타내었다.

Table 3. Zone-index, lysis-index and response-index of sealants as a function of amounts of AP7

	Zone index	Lysis index	Response index
양 성	2	2	2/2
음성(증류수)	0	0	0/0
A7(용출물)	0	0	0/0
Concise™	0	0	0/0
S-AP7-1	0	0	0/0
S-AP7-2	0	0	0/0
S-AP7-5	0	0	0/0

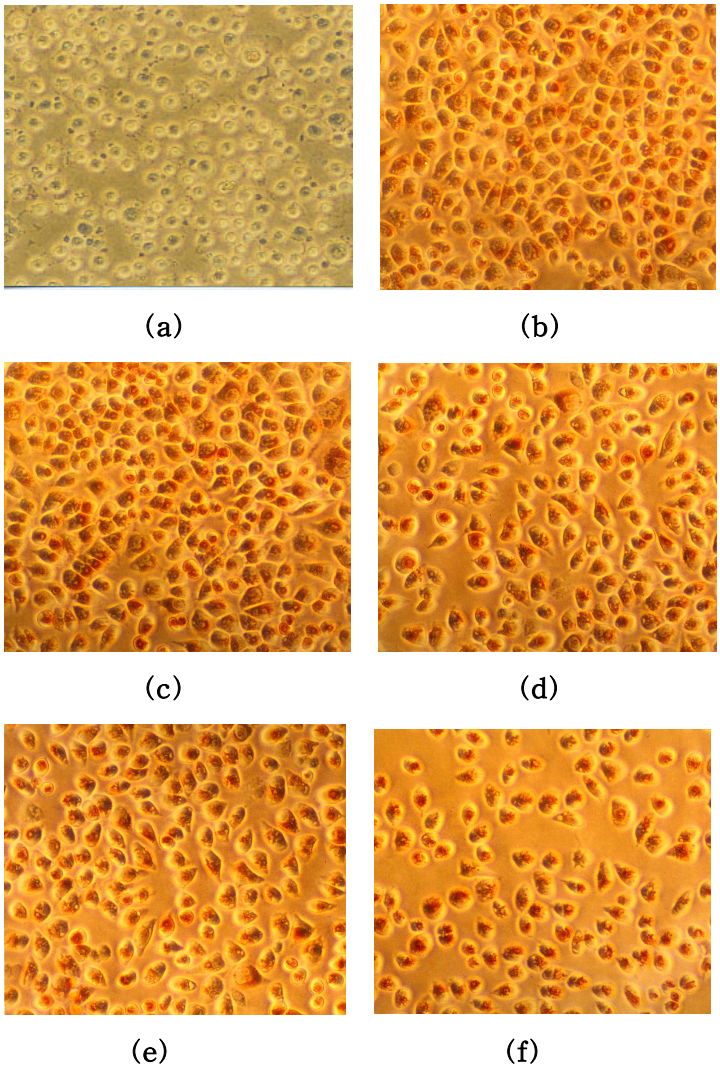


Fig. 12. Cell toxicity images of (a) positive control (b) negative control, (c) Concise™,, (d) S-AP7-1, (e) S-AP7-2, and (f) S-AP7-5.

Ⅳ. 총괄 및 고찰

치아우식증은 S. mutans에 의해서 발생하는 구강내의 감염성 질환으로, S. mutans가 구강내에서 서식 또는 증식하기 위해서는 구강의 경조직이나 연조직에 부착될 수 있어야한다. 또 이렇게 부착된 미생물은 인체의 방어기전에 저항하면서 구강조직에 집락화를 이룸으로써 인체에 감염을 유발시켜 결과적으로 질병을 유발시키는 것이다.

이상의 과정 중 어느 한 단계에서라도 억제나 방해가 되면 질병으로 발전하지 않는다. 즉, 감염의 억제를 위해서는 직접적으로 미생물을 살균하는 방법을 사용할 수도 있으나 감염의 첫 단계인 미생물의 부착을 억제하거나 방해하여도 감염은 효과적으로 예방될 수 있다.

이 과정의 첫 단계로 치태의 형성을 억제하거나 제거하는 가장 효과적인 방법은 칫솔질이다. 경제적인 측면이나 시간적인 측면에서 칫솔질이 가장 효과적인 방법임에도 불구하고 아이들이나 장애인들에게서 칫솔질에 의한 충분한 치태의 제거를 기대하기에는 그 어려움이 있으므로 이를 극복하기 위해서 다양한 종류의 화학적 제재나 항균제 등을 이용해서 그 효과를 보고자 많은 노력이 있었다. 특히 증가하는 심미적 관심으로 심미수복재료에서 이런 향균성질을 갖는 재료를 개발하기위해서 많은 노력이 이루어졌다. 항균력은 균을 완전히 사멸시키는 방법과 균 증식을 억제하는 크게 두 가지 방법으로 나눌 수 있다. 균을 완전히 사멸하는 것이 효과성에서는 가장 뛰어날 수 있을지는 모르나, 구강 내 존재하는 다른 정상 균총을 죽이지 않기 위해서는 특정 세균에 선택적으로 작용할 수 있는 항균력을 나타내는 재료가 가장 이상적이다.

균 증식을 억제하는 방법에는 균의 대사과정에서 억제 하는 것도 가능하겠지만 치태나 일부 미생물의 부착을 감소 또는 방지시키려는 방법도 있다. 특히 최근에는 미생물이 치아의 표면이나 구강점막에 부착하여서 집락화를 이루는 과정에 대한 분자생물학적 연구들에 의해 새로운 사실들이 밝혀지고 있다. 즉, 구강세균의 부착은 치아표면을 싸고 있는 피막내의 특정 단백질과의 결합에 의해 얻어지는 것이다. S. mutans는 glycosyltransferase를 분비하여서 자당에서 비수용성인 glucan을 합성하는데 관여하는데 이 단백질에 세균들이 부착을 하여서 치태를 형성하게 된다(Hamada와 Slade, 1980). 따라서 구강질환을 예방할

수 있는 근본적인 방법은 세균의 부착을 억제하는 방법일 것이다. 또한 복합레진이나 치면열구전색재는 장기간 타액이라는 구강내에의 환경에 노출되는데 재료의 물리적 성질에 중요한 물흡수도나 용해도는 임상적으로 그 의미가 매우 크다. 특히 복합레진의 단점중의 하나인 마모 저항성은 많은 노력에도 불구하고 정확한 기전을 확립하지는 못하였지만 마모와 관련된 여러 가지 인자중 수복물 내의 표면하 분해가 하나의 인자로 고려되고 있다. 또한 수복레진의 특성과 구강내에 노출된 시간에 따라 그 분해층의 두께가 다르고, 이러한 분해층은 응력을 받는 부분과 응력을 받지 않은 부분 모두에서 관찰되어 기계적인 응력만이 표면하 분해에 영향을 주는 것이 아니라고 보고하였다(Syafiuddin 등, 1997). 물흡수도는 접촉각이 클수록 감소하고 조성에 있어서 수산화기가 중요한 역할을 하므로 조성상 수산화기가 없는 레진에서 접촉각이 크고 물 흡수성이 작다.

본 연구에서는 치면열구전색재에 항균필러인 AP7을 다양한 함량으로 첨가하여서 새로운 수복용 항균 치면열구전색재를 제조하여서 실험군으로 하고 Concise™를 대조군으로 하여서 항균성을 확인하였고, 이 항균성이 균의 사멸에 의한 것 인지 아니면 균증식의 억제에 의한 것인지를 확인하였으며 마지막으로 세포독성을 살펴보왔다.

항균제가 함유된 치과재료에서 항균제가 방출되는 기전은 용해와 확산이며, 대부분의 재료에서 burst effect를 보인다(Young 등, 1996). 즉, 처음 24시간에 가장 많은 양이 방출되었다가 그 이후에는 급격히 감소하여서 일정량을 유지하게 되는 현상이다.

Concise™ 그리고 5wt%의 AP7필러가 들어간 경우인 S-AP7-5를 액체배지에 넣고 S. mutans를 배양한 결과 흡광도 값이 거의 비슷하게 나타났다. 단지 AP7필러만 첨가한 경우에만 흡광도 값이 현저히 낮게 나타났다. 이는 AP7필러만 첨가한 경우에서 항균효과가 가장 강하게 나타났다는 것을 의미하며 50시간 후에도 흡광도 값이 거의 처음과 비슷했었다. 이와는 다르게 나머지 경우에서는 약 20시간까지는 급속하게 흡광도 값의 증가가 있었으며 그 후엔 거의 일정하였다. 이 항균효과가 AP7필러의 용출에 의한 것인지를 알기 위해서 용출물에 대해서 균을 배양한 후 이들의 흡광도 값을 측정하였다. 대조군이나 나머지 모든 경우에서 차이가 거의 없는 것으로 결과가 나타났으므로, 항균효과는 항균제의 방출에 의한 것이기 보다는 균의 부착이 억제되어서 일어난 즉 균의 증식이

억제된 것으로 추정하였다. 그래서 필름밀착법에 의한 균의 배양을 실시한 후 결과를 관찰하니 Concise™ 만 사용한 경우에서보다 필러가 함유된 경우에서 균의 군락화가 훨씬 적었고 또, AP7필러의 함유량이 증가할수록 군락의 수가 훨씬 적었다. 이는 우리가 이번 연구에서 사용한 AP7필러의 항균기전이 용해와 확산에 의한 항균재의 용출에 의한것이기 보다는 이 필러가 세균이 실런트에 부착하는 것을 방해해서 균의 증식을 억제한다는 것을 알았다. 이 필러의 구조식이나 화학식을 알았더라도 좀더 생화학적으로 균의 부착이 억제되는 메카니즘을 추론해볼 수 있었겠으나 아직 특허된 상태이므로 이를 이번 실험에서는 배제시켰다. 세포독성 시험은 재료의 전반적인 생물학적 친화성을 평가하기에는 한계가 있지만 재현성이 높고 비교적 간단하며 검사과정을 표준화하기 쉽고 단기간 동안 저렴한 비용으로 정량적인 결과를 얻을 수 있어 치과재료의 생물학적 평가에서 표준적격심사(standard screening procedure)로 요구되고 있으며 특히 새로 개발된 재료에 대한 생물학적 친화성의 평가에는 필수라 할 수 있다 (Browne 등, 1979).

치과재료의 세포독성 시험에는 여러 방법이 있는데 그 중 한천중층시험법은 막투과도의 변화에 근거한 방법으로 재료로부터 직접 방출되는 성분의 급성 세포 독성을 발견하기 위한 방법이다. 세포배양으로 얻은 결과는 실제 사용에서 얻은 결과를 완전히 재현할 수는 없으나, Hensten-Pettersen 등 (1977)은 여러 세포독성 측정방법 중 한천중층시험법이 독성을 비교적 정확히 평가할 수 있는 방법이라고 하였다. 재료의 생물학적 친화성은 물리적 성질에 못지않게 중요한 성질로서 장기적 임상적 유용성에 중요한 기여를 한다. 따라서 새로운 재료의 생체적합성 시험은 필수적이고 그중 초기시험은 더욱 필요하다고 할 수 있다. 세포독성시험의 결과에는 여러 요소가 영향을 미치며 세포의 유형, 재료의 물리적 성상, 세포와 재료가 접촉하는 방법 및 세포손상을 측정하는 방법에 따라서도 다르게 나타나고, 재료를 추출하는 방법(시간, 온도, 유형), 시편의 표면적과 추출배지의 부피비, 세포-재료 접촉유형에 따라서도 오류를 유발할 수 있어서 여러 연구자들의 연구 결과를 상호비교하기 어렵다(Hensten-Pettersen 등, 1977, 1988)

본 연구에서 시험군과 대조군은 모두 세포독성이 없었다. 시험군과 대조군에서 세포독성이 거의 비슷한 것으로부터 AP7의 항균성분 방출로 인한 세포독

성이 거의 없는 것으로 판단된다. 그러나 다른 발표된 논문에서는 사용한 항균 성분이 세포독성을 나타낸 경우도 있다.

기존 치면열구전색재에 AP7을 첨가하여 항균 치면열구전색재를 제조하는데는 성공하였으나 그 기전을 알아내야 하는 연구가 더 필요하고 최고의 항균성과 기계적 성질을 갖는 가장 적절한 AP7 성분 함량을 알아내는데 좀더 연구가 필요하다.

Ⅵ. 결 론

변연누출 등에 의한 이차우식증을 예방하기 위하여 기존의 치면열구전색재 제품인 Concise™(3M Co., St. Paul., MN, U.S.A.)에 항균 필러(AP7)를 첨가하여 새로운 수복용 항균 치면열구전색재를 제조하였다. 이에 대한 생물학적 성질로서 항균력 실험을 하였다. 기존의 제품인 Concise™ 대조군과 비교 시험하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. S. mutans를 접종한 고체배지에 항균필러 AP7과 Concise™ 을 넣고 배양한 결과 Concise™은 항균성이 없었으며 AP7필러주위에는 세균억제대(Inhibitory zone)가 형성된 것을 확인할 수 있었다.

2. Concise™과 5wt%의 AP7필러를 함유한 Concise™, 그리고 AP7필러의 액체배지에서 S. mutans의 증식억제능력을 흡광도 값으로 평가하였다. AP7필러만 넣은 경우에서는 S. mutans의 증식이 현저히 억제되는 것을 알 수 있었다. 하지만 대조군에 비해서 Concise™과 5wt%의 AP7을 함유한 Concise™은 S. mutans의 증식억제능력의 차이가 거의 없었다.

3. 대조군과 2.5㎖, 5.0㎖, 7.5㎖, 10.0㎖의 AP7용출액을 넣고 흡광도 값을 측정한 결과 모든 경우에서 S. mutans의 증식억제효과가 거의 없었다. 이는 항균제 AP7의 용출에 의한 것만이 아니라는 것을 보여준다.

4. 필름밀착법에 의한 S. mutans의 증식억제실험 결과, Concise™에 첨가한 AP7 필러의 양이 증가할수록 항균작용은 더 강해지며 이는 균이 수복물에 부착되는 것이 억제됨을 의미한다.

5. 본 연구에서 사용된 항균 필러(AP7) 자체의 세포독성과 치면열구전색재의 세포독성 측정 결과, 세포 탈색지수와 사멸지수가 0으로 측정되어 반응지수가 0/0으로 나타났다. 또한 항균 필러를 치면열구전색재에 첨가하여 제조한 후 세포독성을 측정한 결과 역시 탈색지수와 사멸지수가 0으로 측정되

어 반응지수 또한 0/0이었다.

이상의 실험결과로부터 AP7을 첨가한 항균 치면열구전색재의 항균력은 AP-7의 함량이 증가함에 따라 증가하여 우수한 구강 항균력을 지닌 것으로 판명되었다. 결론적으로, 본 연구를 통해 기존의 치면열구전색재보다 우수한 항균 치면열구전색재가 제조되었음을 확인하였다.

참고 문헌

신동훈, 권혁춘: 가시광선 중합에 따른 충전용 글래스아이오노머 시멘트의 물리적 성질에 관한 연구. *대한치과보존학회지* 17: 307-330, 1992.

Arends J, Christoffersen J: The nature of early caries lesionsin enamel. *J Dent Res* 65: 2-11, 1986.

Beeiweiss AS: Inhibition of colonization summary. Proceedings Microbial Aspects of Dental Caries. *SP Supp Microbiology Abstracts* 211, 425, 1976.

Brannstrom M: Communication between the oral cavity and the dental pulp associated with restorative treatment. *Oper Dent* 9: 57-68. 1984.

Browne RM, Tyas MJ: Biological testing of dental restorative materials in vitro-a review. *J Oral Rehabil* 6: 365-374, 1979.

Ferracane JL, Mitchem JC, Adey JD: Fluoride penetration into the hybrid layer from a dentin adhesive. *Am J Dent* 11:23-28, 1998.

Golberg J, Tanzer J, Munster E, Amara J, Birkhed D: cross-sectional clinical evaluation of recurrent caries, restoration of marginal integrity and oral hygiene status. *J Am Dent Assoc* 102: 653-656. 1981,

Hamada S, Slade HD: Biology, immunology and cariogenicity of Streptococcus mutans. Microbiol Rev 44: 331-384, 1980.

Hembree JH: In vitro microleakage of a new dental adhesive system. *J Prosthet Dent* 55: 442-445, 1986.

Hensten-Pettersen A, Helgeland K: Evaluation of biologic effects of dental materials using four different cell culture techniques. *Scand J Dent Res* 85: 291-296, 1977.

Hensten-Pettersen, A: Comparison of the methods available for assessing

cytotoxicity. *Int Endo J* 21: 89-99, 1988.

Imazato S, Imai T, Russel RRB: Antibacterial activity of cured dental resin incorporating the antibacterial mononer MDPB and an adhesion-pronoting nonomer. *J Biomed Mater Res* 39: 511-515, 1998.

Imazato S, Ebi N, Tarumi H, Russell RRB, Kaneko T, Ebisu S: Bactericidal activity and cytotoxicity of antibacterial monomer MDPB. *Biomaterials* 20(9): 899-903, 1999.

Jedrychowski JR, Caputo AA, Kerper S: Antibacterial and mechanical properties of retorative materials combined with chlorhexidines. *J Oral Rehabil* 10: 73-381, 1983.

Kudou Y, Obara K, Kawashima T, Kubota M, Abe S, Endo T, Komatsu M, Okuda R: Addition of antibacterial agents to MMA-TBB dentin bonding systems - influence on tensile bone strength and antibacterial effect. *Dent Mater J* 19: 65-74, 2000.

Margolis HC, Moreno EC, Murphy BJ: Effect of low levels of fluoride in solution on enamel demineralization in vitro. *J Dent Res* 65: 23-29, 1986.

Norman PW, Robert RW, Rosen S: Essential Dental Microbiology. Appleton & Lange U.S.A, 1991.-6Marsh Antimicrobial strategies in the prevention of dental caries. *Caries Res* 27: 72-76, 1993.

Rawls HR, Zimmerman BF: Fluoride-exchanging resins for caries protection. *Caries Res* 17: 32-43, 1983.

Ribeiro J, Ericson D: In vitro antibacterial effect of chlorhexidine added to glass-ionomer cements. *Scand J Dent Res* 99: 3-540, 1991.

Ripa LW: The current status of pit and fissure sealants; a review. *J Can Dent Assoc* 51: 367-380, 1985

Skjöland KKR: Plaque accumulation on different dental filling materials. *Scand J Dent Res* 81: 538-542. 1973.

Swartz ML, Phillips RW: Long term F release from glass ionomer cement. *J Dent Res* 63: 158-160, 1984.

Syafiuddin T, Hisamitsu H, Toko T, Igarashi T, Goto N, Fujishima A, Miyazaki T: In vitro inhibition of caries around a resin composite restoration containing antibacterial filler. *Biomaterials* 18: 1051-1057, 1997.

Takemura K, Sakamoto Y, Staninec M Kobyashi M, Suehiro K, Tsuchitani Y: Antibacterial activity of a Bis-GMA based composite resin and antibacterial activity of a Bis-GMA based composite resin and antibacterial effect of chlorhexidine incorporation. *Jpn J Conserv Dent* 26: 540-547, 1983

Tanagawa M, Yoshida K, Matsumoto S, Yamada T, Atsuta M: Inhibitory effect of antibacterial resin composite against Streptococcus mutans. *Caries Res* 33: 366-371, 1999.

Toda Y, Moro I, Koda T: Ultrastructure of extracellular polysaccharides produced by serotype c Streptococcus mutans. J Dent Res 66: 1364-1369, 1987

Yoshida K, Tanagawa M, Matsumoto S, Yamada T, Atsuta M: Antibacterial activity of resin composites with silver-containing materials. *Eur J Oral Sci* 107: 290-296, 1999.

Yoshida K, Tanagawa M, Atsuta M: Characterization and inhibitory effect effect of antibacterial dental resin composites incorporating silver-supported materials. *J Biomed Mater Res* 47:516-522, 1999.

Young A, von der Fehr FR, Sonju T, Nordbo H: Fluoride release and uptake in vitro from a composite resin and two orthodontic adhesives. *Acta Odontol Scand* 54: 223-228, 1996.

Abstract

The inhibitory effect of light-cured pit & fissure sealant incorporating antibacterial filler against S. mutans

Hyuk-Joon Jee, D,D,S.,
Department of Dentistry
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Byung-Jae Choi, D.D.S., M.S., Ph.D.)

To prevent the secondary caries caused by microleakage, the antibacterial filler (AP7) was added to the conventional pit & fissure sealant (Concise™ 3M Co., St. Paul., MN, U.S.A.) to produce a new antibacterial pit & fissure sealant. The experimental groups were compared with the conventional sealant of biological property of the antibacterial ability.

The results were as follows :

1. After incubating S. mutans in agar plates with AP7 and Concise™, Concise™ itself showed no antibacterial activity whereas the inhibitory zone was observed around the AP7 filler.

2. The growth inhibition of S. mutans was evaluated by the optical density of the culture media with Concise™, Concise™ incorporating 5wt% of AP7 and AP7, respectively. The growth of S. mutans was strongly inhibited in AP7. In contrast, Concise™ and Concise™ incorporating 5wt% of AP7 showed no remarkable difference in the growth inhibition.

3. After addition of 2.5㎖, 5.0㎖, 7.5㎖ and 10.0㎖ of the AP7 elute into the culture media, the optical density was measured. There was no critical

difference compared to the control group. It revealed that the inhibitory effect of AP7 was not only affected by elute alone.

4. As the result of film adhesion method, the increase of AP7 added to Concise^{TM} enforced the antibacterial activity, which means the attachment of bacteria to restoration was inhibited.

5. When the cytotoxic effects of the antibacterial filler(AP7) and that of the fissure sealant were measured, the reaction index appeared to be 0/0 as the cellulous discoloration index and the lysis index were 0, respectively. The measurement of the cytotoxic effect on new product formed by adding antibacterial filler to the fissure sealant revealed that the response index appeared to be 0 once again, discoloration index and the lysis index being 0.

This study showed the antibacterial ability increased as AP7 content increased. Therefore, it was proved that the antibacterial fissure sealant introduced in this study had an excellent oral antibacterial ability. In conclusion, the system developed in the study enhanced the antibacterial ability of the conventional pit & fissure sealant and further research would be needed to discover the antibacterial mechanism and the appropriate AP7 content for the most effective antibacterial activity.

Key words : antibacterial filler, pit & fissure sealant, optical density, antibacterial ability, elute