

국내 시판 일부 구강 양치액의 *Streptococcus mutans* 바이오필름 형성 억제 효과

이은송^{1,2,3}, 강시목^{1,2,3}, 김은우¹, 권호근^{1,2,3}, 김백일^{1,2,3}

¹연세대학교 치과대학 예방치과학교실, ²구강악안면조직재생연구센터, ³두뇌한국21 연세치과과학사업단

Inhibitory effects of several commercial oral rinses on *Streptococcus mutans* biofilm formation

Eun-Song Lee^{1,2,3}, Si-mook Kang^{1,2,3}, Eunu Kim¹, Ho-Keun Kwon^{1,2,3}, Baek-Il Kim^{1,2,3}

¹Department of Preventive Dentistry & Public Oral Health, College of Dentistry, Yonsei University, ²Research Center for Orofacial Hard Tissue Regeneration, ³Brain Korea 21 Project

Objectives. The aim of this *in vitro* study was to evaluate the inhibitory effects of several commercially available antibacterial oral rinses on *S. mutans* biofilm formation.

Methods. In this study, four commercial oral rinses produced in Korea containing different antibacterial substances (benzethonium chloride, cetylpyridinium chloride, chlorhexidine, and essential oil) were selected for assessment. Sterile distilled water and 0.1% chlorhexidine solution were used as a negative and a positive control, respectively. The planktonic *S. mutans* (10^7 CFU/ml) was mixed with the experimental oral rinses for 1 minute and the live cells were counted as a colonies forming unit (CFU). Also, the antibacterial effect of oral rinses were tested by a *S. mutans* biofilm model with the artificial saliva, THYE medium, and hydroxyapatite (HA) discs. The *S. mutans* biofilm was formed on an HA disc coated with artificial saliva for 64 hours. The medium was replaced every 24 hours, and the cultured biofilm was treated with each oral rinse for either 1 or 5 minutes, 3 times a day for two days. Also, the number of live cells in the biofilm were counted and denoted as CFU.

Results. All four commercial oral rinses elicited significant antibacterial effects on planktonic *S. mutans*, showing more than 99% of CFU reduction. However, only Hexamedine oral rinse primarily composed of chlorhexidine exhibited a significant antibacterial effect on *S. mutans* biofilm.

Conclusions. The antibacterial effects of the commercial oral rinses were less pronounced in biofilm than in the planktonic cells, and they varied among different products.

Key Words: biofilm, inhibitory effect, oral rinses, *Streptococcus mutans*

색인: 구강 양치액, 바이오필름, 항균 효과, *Streptococcus mutans*

투고일자: 2011. 6. 30, 심사일자: 2011. 7. 4, 게재확정일자: 2011. 9. 22

책임저자: 김백일, 연세대학교 치과대학 예방치과학교실, (120-752) 서울시 서대문구 성산로 250

Tel: 02-2228-3070, Fax: 02-392-2926, E-mail: drkbi@yuhs.ac

*본 연구는 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(R13-2003-013-05002-0).

서론

치면세균막은 치아 표면에 형성되는 대표적인 바이오 필름이다. 구강 내 미생물이 치면에 부착하여 세포외 기질을 생산함과 동시에 동종 또는 이종 세포 간 결합을 구성함으로써 구조적으로 안정된 치면세균막을 형성한다. 이렇게 형성된 구강 내 치면세균막은 물리적으로 두꺼운 층을 형성하는 세포외 기질에 의해 외부 물질의 침투가 어렵고, 세포 간 상호작용을 통해 유전적 변이를 유발하여 부유 세균에 비해 항생제를 비롯한 항균 물질에 대한 저항성이 증가하게 된다^{1,2}). 이러한 특성 때문에 치면세균막을 관리하는 것은 쉽지 않고, 이로 인해 유발되는 대표적인 구강 질환인 치아우식증과 치은염 및 치주염을 예방하는 것도 어려워진다³).

일반적으로 고농도의 당 섭취, 불충분한 구강 위생 관리, 유전적 요인, 면역체계의 변화 등으로 인해 구강 내 환경이 변화하면서 치면세균막 내 세균의 상태와 구성이 변화한다. 즉, 효과적인 구강 위생 관리가 이루어지지 않아 병원성 상태의 치면세균막이 침착되면 치아우식증과 치은염이 유발될 수 있다⁴). 치면세균막의 침착 정도와 성숙 정도가 치은염의 심도와 관련성이 있기 때문에 구강 질환의 예방을 위해서는 치면세균막의 지속적인 관리와 적절한 구강 위생 상태를 유지하는 것이 중요하다⁵).

치면세균막 관리를 위해 기본적으로 다양한 물리적 방법이 활용되고 있다. 그러나 전문가적 방법은 일시적이기 때문에 오랜 기간 동안 관리를 지속하고 유지하는 데 어려움이 있다. 그리고 물리적 자가 관리 방법 중 대표적인 칫솔질은 많은 연구에서 그 효과가 입증되었지만, 그 방법에 대해 정확히 교육한다 하더라도 수행자의 손기술이나 의존도, 동기부여 정도의 차이에 따라 치면세균막 제거 효과가 다를 수 있다⁶). 이러한 점을 보완하기 위해 화학적 치면세균막 관리 방법을 사용하는데, 특히 구강 양치액은 사용이 쉽고 간편하여 누구든지 무리 없이 사용할 수 있다는 장점이 있다. 또한 물리적 방법으로 치면세균막과 치은염을 적당한 수준으로 유지할 수 없는 환자들에게는 더욱 효과적이다. 6개월 동안 수행된 선행 임상연구들을 정리한 결과, 다양한 종류의 항균 물질을 포함하는 구강 양치액을 사용한 후 최대 61%의 치면세균막 감소 효과, 43%의 치은염 감소 효과를 보였다⁶). 이처럼 다양한

종류의 항균 물질을 주성분으로 하는 구강 양치액이 치면세균막, 치은염 감소에 효과적이라는 사실이 선행 연구들을 통해 입증되면서⁷) 그 사용이 점차 증가하고 있으며, 계속적으로 치면세균막 감소에 대해 효과적인 항균 물질을 개발하려는 노력들이 이루어지고 있다.

구강 양치액에 사용되는 항균 물질은 치면세균막의 형성을 억제하여 지속적인 관리가 가능하도록 효과적으로 고안되어야 한다⁸). 이를 위해서는 항균 물질이 치면세균막 형성 초기 단계에서 미생물의 부착과 집락화를 억제하는 것 뿐 만 아니라 성숙단계에서 치면세균막 내부로 침투하여 작용하는 것이 중요하다. 그러나 바이오 필름의 특성 상 항균 물질이 치면세균막의 일부 또는 전체적으로 도달하여 활성을 나타내는 것은 쉽지 않다⁹). 이와 같은 관점에서 구강 질환 예방을 목적으로 한 항균 물질의 효과를 평가하기 위해서는 부유 세균보다 구강 질환의 직접적인 원인이 되는 치면세균막에 대한 평가가 반드시 필요하다. 그래서 최근에는 임상 전 단계에서 항균력을 더욱 예측력 있게 평가하기 위해 바이오필름 모델을 개발하고 이를 활용하고 있다⁹).

외국에서는 다양한 종류의 시판 구강 양치액의 치면세균막에 대한 항균 효과를 평가해 왔으며 그 효과가 실험실 및 임상 시험에서도 입증되어 왔다. 클로르헥시딘, 에센셜 오일, 불화 아민, 불화 주석 등을 주성분으로 하는 시판 제품들을 평가한 결과, 각 제품들의 치면세균막에 대한 항균 효과가 다양하게 나타났다^{6,7,10}). 한편, 국내 시판 제품의 경우는 이러한 평가가 많지 않은 실정이며 이는 국내에서는 구강 양치액의 사용이 일반적이지 않고, 구강 양치액에 대한 일반인들의 인식도 구강 질환의 적극적인 예방이라기보다는 단순히 일시적인 구취제거, 심미 효과를 보기 위한 수준에 머무르고 있기 때문이다^{11,12}). 본 연구에서는 실제로 치면세균막이 형성, 성숙되는 동안 구강 양치액을 사용하는 상황을 반영한 *S. mutans* 바이오필름 모델을 활용하여 국내 시판 중인 일부 구강 양치액의 바이오필름 형성 억제 효과를 비교, 분석하고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구재료

1.1. 실험 양치액: 실험에 사용한 구강 양치액은 국내에서 시판되고 있는 제품 중 각각 다른 항균 활성 물질을

Table 1. Details of test oral rinses formulations

Groups	Manufacturers	Antibacterial agents	Concentration (%)
Distilled water	—	*	0
Garglin (mild)	Dong-A	Cetylpyridinium chloride	0.05
Caregargle	Hanmi	Benzethonium chloride	0.01
Hexamedine	Bukwang	Chlorhexidine digluconate	0.1
Listerine (Coolmint)	Johnson & Johnson	Essential oil (Eucalyptol, Thymol, Menthol, Methyl alicylate)	0.256
0.1% Chlorhexidine solution	—	Chlorhexidine digluconate	0.1

*Not included in solution.

주성분으로 하는 4종(수입제품 1종, 국내제품 3종)을 선정하였다. 양치액 속 주요 항균 성분으로 양이온성 항균 물질 중 4급 암모늄 화합물인 Cetylpyridinium chloride (CPC)와 Benzethonium chloride (BTC)를 포함하는 2종과 클로르헥시딘을 포함하는 1종, 비이온성 항균 물질인 에센셜 오일을 포함하는 1종을 선정하였다. 양성 대조군으로는 실험실에서 직접 클로르헥시딘(Chlorhexidine digluconate, sigma, USA)을 증류수에 0.1% 농도로 첨가하여 제조한 실험용액을 사용하였고, 음성 대조군으로는 멸균된 증류수를 사용하였다. 각 제품의 주요 항균 활성물질의 종류와 함량은 다음과 같다(Table 1).

1.2. 실험 균주: 실험에 사용한 균주는 *S. mutans* ATCC 25175를 한국생명공학연구원 생물자원센터로부터 분양받아 사용하였다. 분양받은 균주는 10% glycerol을 이용하여 Deep freezer (-80°C)에 보관하여 동결보존하였다. 동결보존된 균주를 BHI (Brain Heart Infusion, Difco Co., USA) 액체 배지에서 37°C , 10% CO_2 조건에서 전 배양시켜 대수증식기의 균을 실험에 사용하였다.

2. 연구방법

2.1. 부유 상태의 *S. mutans*에 대한 항균 효과 평가: BHI 액체 배지에 전배양하여 10^7 CFU/ml이 되도록 조정된 *S. mutans* $100\ \mu\text{l}$ 를 각각의 실험 양치액 $900\ \mu\text{l}$ 에 혼합하여 1분 동안 처치한 뒤, 혼합 용액 $100\ \mu\text{l}$ 를 다단계 희석($10^{-1} \sim 10^{-5}$)하여 BHI 고체 배지에 도말하였다. 37°C , 10% CO_2 조건에서 48시간 동안 배양한 뒤 나타나는 세균 집락수 (Colony Forming Unit, CFU)를 측정하였다. 이와 같은 과정을 총 4회 반복하였다.

2.2. *S. mutans* 바이오필름 형성 억제 효과 평가

2.2.1. *S. mutans* 바이오필름 형성: *S. mutans* 바이오필름을 형성시키기 위해 Guggenheim 등⁹⁾이 제시한 바이오필름 모델을 변형시켜 사용하였다. 이 방법은 Hydroxyapatite (HA) 디스크와 24 well cell culture plate를 이용하는 것으로, 10.6 mm, 높이 1.3 mm의 균일한 원형 HA 디스크를 제작하여 실험에 사용하였다. 디스크 표면에 획득피막의 형성을 유도하기 위하여 1 ml의 인공타액에 멸균된 HA 디스크를 37°C 에서 4시간 동안 침적시킨 후, 멸균된 증류수에 헹구어 여분의 타액을 제거하였다. 실험에 사용한 인공타액은 증류수 2,000 ml에 gastric mucin 4.4 g, NaCl 0.762 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.426 g, KH_2PO_4 1.476 g, KCl 2.22 g을 용해시킨 후 pH를 6.8로 조절하여 제조하였다.

인공타액과 THYE배지(Todd Hewitt Broth 36.4 g/L, Yeast Extract 8 g/L, Sucrose 15 g/L)를 각각 $800\ \mu\text{l}$ 씩 1 : 1 비율로 혼합한 용액(1.6 ml)에 획득피막이 형성된 HA 디스크를 침적시키고 2×10^7 CFU/ml이 되도록 배양된 *S. mutans* $200\ \mu\text{l}$ 를 접종하여 37°C , 10% CO_2 조건에서 바이오필름의 형성을 유도하였다. 균 접종 후 16시간, 40시간 경과 후에 HA 디스크를 새로운 타액-배지 혼합용액 1.6 ml에 교체하여 침적시켰다. 최종적으로 64시간 동안 바이오필름을 성숙시켰다.

2.2.2. 실험 양치액 처치: 균 접종 후 16시간 동안 HA 디스크의 표면에 바이오필름을 형성시킨 후, 실제 구강 양치액을 사용하는 상황을 모사하여 2일 동안 4시간 간격으로 1분간 하루 3회 양치액을 처치하였다. 새로운 24 well cell culture plate에 각 실험 양치액을 1 ml씩 넣고, HA 디스크를 일정 시간 동안 양치액에 침적시켜 처치하였다. 그 후 1 ml의 멸균된 증류수에 3회 세척하여 여분의 양치액과 느슨하게 부착된 균을 제거하여 디스크 표

면에 단단히 부착된 바이오필름에 대한 효과 평가가 가능하도록 하였다. 처치 후 세척한 디스크를 타액-배지 혼합용액에 다시 옮긴 후 재배양하였다. 균 접종 후 16, 20, 24, 40, 44, 48시간째에 이와 같은 처치 과정을 반복하였고, 16, 40시간째에는 이와 동시에 타액-배지 혼합용액을 교체하였다. 48시간째 모든 실험 양치액의 처치 과정이 끝나고 추가로 16시간 동안 37°C, 10% CO₂ 조건에서 배양시켜 바이오필름의 재성장을 유도하였다(Table 2).

2.2.3. 바이오필름 내 *S. mutans* 생균 수 측정; HA 디스크에 형성된 바이오필름 내 균체량을 측정하기 위해 최종적으로 바이오필름이 형성된 HA 디스크를 멸균된 증류수에 세척하여 표면에 낙하하거나 느슨하게 부착된 균들을 제거하였다. 다음으로 1 ml의 증류수에 넣어 초음파처리(Sonication)하여 HA 디스크 표면에 부착되어 있는 바이오필름 상태의 균을 부유시킨 뒤 충분히 교반하였다. 부유 상태의 균을 다단계 희석(10⁻³~10⁻⁵)하여 BHI agar배지에 도말하였다. 37°C, 10% CO₂ 조건에서 48시간 동안 배양한 후에 나타나는 CFU를 측정하여 최종 CFU/ml를 계산하였다. 이와 같은 모든 과정은 총 5회에 걸쳐서 반복 수행하였다.

2.3. 통계분석: 각 실험 양치액의 바이오필름 형성 억제 효과 비교를 위해 통계분석용 통계 패키지 프로그램 PASW 18.0 (SPSS Inc., USA)을 이용하여 Kruskal-Wallis 분석을 시행하였고, 유의한 차이를 확인하기 위해 유의수준을 보정한 Dunn procedure를 시행하여 사후분석을 하였다.

연구성적

1. 부유 상태의 *S. mutans*에 대한 항균 효과 평가
 생균수를 측정하여 부유 상태의 *S. mutans*에 대한 항균

효과를 평가한 결과, 증류수를 처치한 대조군과 비교하였을 때 5종의 모든 구강 양치액군에서 99% 이상의 항균 효과가 나타났고 통계적으로 유의한 차이가 나타났다(p < 0.01, Table 3).

2. *S. mutans* 바이오필름 형성 억제 효과 평가

항균 물질을 포함하는 구강 양치액의 *S. mutans* 바이오필름의 형성 억제 효과를 평가한 결과는 제품별로 각각 다른 수준으로 나타났다. 양치액을 1분 동안 처치한 경우, 항균 활성 물질로 클로르헥시딘을 함유한 제품인 헥사메딘과 양성대조군으로 사용된 0.1% 클로르헥시딘 실험제조용액에서 음성 대조군에 비해 각각 약 43%, 68% 바이오필름 형성이 억제되었고 통계적으로 유의한 효과가 나타났다(p < 0.01)(Table 4). 그러나 나머지 제품들의 경우는 음성대조군과 비교하였을 때, 통계적으로 유의한 수준의 바이오필름 형성 억제 효과를 확인할 수는 없었다. 특히 4급 암모늄 화합물 중에서 BTC를 주성분으로 하는 제품인 케어가글에서는 증류수 군에 비해 효과가 전혀 나타나지 않았고, CPC를 주성분으로 하는 양치액의 경우는 음성대조군에 비해 바이오필름의 형성 억제 효과가 2%에 불과하였다. 양치액을 5분 동안 처치한 경우, 헥사메딘과 0.1% 클로르헥시딘 실험제조용액 군에서는 측정 가능한 범위에서 바이오필름 내 생균이 측정되지 않았다(Table 4). 또한 리스테린과 헥사메딘, 0.1% 클로르헥시딘 실험제조용액을 처치한 군에서 바이오필름 형성 억제 효과가 유의하게 나타났다(p < 0.01, Table 4).

양치액의 처치시간에 따른 결과를 비교해보면, 1분 동안 처치한 경우보다 5분 동안 처치한 경우 제품별로 헥사

Table 2. Experimental procedures according to time lapse

Time point (hr)	Procedures
-4	Pellicle coating
0	<i>S. mutans</i> inoculation
16	Oral rinse Treatment, Medium+Saliva change
20	Oral rinse Treatment
24	Oral rinse Treatment
40	Oral rinse Treatment, Medium+Saliva change
44	Oral rinse Treatment
48	Oral rinse Treatment
64	Biofilm harvest

Table 3. Antibacterial effects of oral rinses on planktonic *S. mutans* (Unit: Log₁₀ CFU/ml)

Groups	Median (min-max)
Distilled water	6.95 (5.82-7.79) ^a
Garglin (mild)	1.15 (<DL-1.30) ^b
Caregargle	1.30 (1-1.95) ^b
Listerine (Coolmint)	<DL ^b
Hexamedine	<DL ^b
0.1% Chlorhexidine solution	<DL ^b

^{a,b}The same characters are not significant by Dunn procedure at α=0.01.

DL: detection limit, detection limit was 10 CFU/ml.

Table 4. Antibiofilm effects of oral rinses on the viability of *S. mutans* in biofilm (Unit: Log₁₀ CFU/ml)

Groups	1 min. treatment	5 min. treatment
Distilled water	7.57 (7.42-8.18) ^a	8.06 (7.71-8.51) ^a
Garglin (mild)	7.41 (6.93-7.48) ^a	7.24 (6.96-7.98) ^a
Caregargle	7.94 (7.60-8.05) ^a	7.59 (7.24-7.93) ^a
Listerine (Coolmint)	7.14 (6.87-7.51) ^a	6.65 (6.61-6.93) ^c
Hexamedine	4.30 (3.24-4.71) ^b	<DL ^b
0.1% Chlorhexidine solution	2.45 (2.40-2.81) ^c	<DL ^b

All values are medians (min~max).

^{a,b,c}The same characters are not significant by Dunn procedure at $\alpha=0.01$.

DL: detection limit, detection limit was 10 CFU/ml.

메딘(57%), 리스테린(11%), 케어가글(10%), 가그린(7%)의 순서로 바이오필름의 형성 억제 효과가 증가했다.

고안

구강 양치액을 사용하는 것은 대표적인 화학적 치면세균막 조절 방법의 하나로서 일반인이 쉽고 편리하게 수행할 수 있는 자가 치면세균막 관리 방법이다. 구강 양치액 속 항균 활성 물질을 통해 치면세균막을 지속적으로 조절하고 관리하면 양대 구강 질환인 치아우식증과 치주염을 예방할 수 있다. 또한 전 세계적으로 구강 양치액의 사용이 증가하면서 치면세균막에 효과적인 새로운 항균 양치액 개발도 증가하고 있다.

구강질환을 예방하기 위해 구강 내 부유 세균 수를 일시적으로 줄여주는 것보다는 바이오필름의 형성을 억제시켜 구강 내 환경을 지속적으로 유지하고 관리하는 것이 더욱 중요하다는 관점에서 치면세균막에 대한 평가가 필요하다¹⁾. 따라서 본 연구에서는 바이오필름 모델을 활용하여 국내에서 현재 시판되고 있는 구강 양치액 중 각각 다른 종류의 항균 활성 물질을 주성분으로 하는 구강 양치액 4종을 선정하여 부유 세균 및 바이오필름에 대해 어느 정도의 효과가 있는지를 임상 단계 이전에 실험실 상에서 평가하였다.

평가 결과, 부유 세균 모델 평가에서는 모든 군에서 99% 이상의 항균 효과가 나타났다. 그러나 바이오필름 모델 평가에서는 클로르헥시딘을 포함하는 군들을 제외하고 다른 군에서는 통계적으로 유의한 항균 효과를 확인할 수 없었다. 이를 통해 바이오필름의 항균 저항성을

다시 한 번 확인하였고, 항균 물질이 부유 세균과 바이오필름 내 세균에 작용하는 기전이 다를 수 있었다⁴⁾. Shani 등¹³⁾의 연구에서도 *S. sobrinus* 바이오필름의 형성을 억제하는데 부유세균에서보다 클로르헥시딘의 농도가 약 300배 더 필요함을 확인하였다. 이는 부유 세균이 치아 표면에 부착하여 바이오필름을 형성하게 되면 세균의 표현형이 변화하고, 세균을 둘러싸고 보호막으로써 작용하는 기질의 특성 때문에 항균물질에 대한 감수성이 감소하기 때문인 것으로 알려져 있다¹⁾.

본 연구 결과에 따르면 국내 제품 중 클로르헥시딘을 함유하는 양치액이 바이오필름 형성 억제 효과가 가장 높았다. 이 제품은 0.1%의 클로르헥시딘을 함유하고 있으며 국내에서 처방용 구강 양치액으로 사용되고 있다. 클로르헥시딘은 전 세계적으로 가장 널리 사용되고 있는 항균 제제 중 하나로서 다양한 분야에서 사용되고 있으며, 특히 구강 내 세균에 대해 항균력이 높아 치면세균막, 치은염 감소에 효과적이라는 사실이 여러 연구들을 통해서 확실히 입증되었다¹²⁾. 본 연구 결과와 마찬가지로 Shapiro 등¹⁰⁾은 5가지 균종으로 구성된 바이오필름을 이용해서 12종의 시판 구강 양치액의 항균 효과를 평가한 결과, 0.12% 클로르헥시딘을 함유하는 양치액이 리스테린보다 더 효과적이라는 결과를 보고했다. 또한 Brex 등¹⁴⁾에 의하면, 3주간의 임상연구 결과 클로르헥시딘이 에센셜 오일을 주성분으로 하는 리스테린과 불화아민을 포함하는 Meridol보다 효과적으로 바이오필름에 침투하여 치면세균막 억제 효과가 가장 뛰어난 것으로 보고하였다. 6개월간의 임상연구를 종합하여 분석한 결과, 주성분으로 0.12% 클로르헥시딘이 함유된 제품들이 에센셜 오일, CPC가 주성분인 제품들에 비해서 치면세균막, 치은염 억제 효과가 높은 것으로 나타났다⁷⁾. 본 연구에서 실험 양치액 간의 상대적인 효과에 대한 경향은 선행 연구들과 유사하였으나, 대조군에 대한 억제 효과가 비교적 적게 나타났다. 이는 균종 또는 균수에 따라 항균 물질에 대한 바이오필름의 저항성에 차이가 있는 것과 같이, 연구 방법 상의 차이로 인해 나타나는 결과로 사료된다¹⁵⁾.

또한 본 연구 결과 클로르헥시딘 0.1%를 주성분으로 하는 국내 상품인 헥사메딘은 실험실에서 제조된 0.1% 클로르헥시딘 용액보다 바이오필름 형성 억제 효과가 유의하게 낮았다. 클로르헥시딘은 양이온의 성질을 갖

기 때문에, 제조 공정에서 포함되는 다른 성분의 음이온들과 쉽게 결합할 수 있다. 그러므로 이러한 요인들에 의해서 클로르헥시딘 구강 양치액의 활성이 억제되어 항균력이 떨어질 수 있다¹⁶⁾. Shapiro 등¹⁰⁾의 연구 결과에 의하면, 같은 함량의 클로르헥시딘을 주성분으로 하는 구강 양치액이라도 제품에 따라 바이오필름에 대한 항균 효과가 각각 다르게 나타났다. 본 연구에서 평가한 제품인 헥사메딘의 경우도 제조 과정에서 첨가된 다른 성분의 영향으로 같은 함량의 클로르헥시딘 실험제조용액에 비해 항균 효과가 상대적으로 낮게 나타난 것으로 사료된다.

한편 4급 암모늄 화합물인 BTC나 CPC를 포함하는 제품의 경우, 부유 세균에 대한 항균 효과는 다른 제품과 유사한 수준으로 대조군에 비해 유의한 효과가 있었으나 바이오필름에 대해서는 그렇지 않았다. 특히 BTC를 주성분으로 하는 제품은 부유 세균의 일시적 사멸효과는 생균수를 측정하여 계산한 결과 99.9%였으나, 1분간 처치 시 바이오필름 형성 억제 효과는 전혀 나타나지 않았다. 그러므로 BTC를 주성분으로 하는 해당 시판 양치액은 바이오필름 기질에 대한 침투력이 떨어져서 이미 형성된 바이오필름에 대해서는 억제 효과가 없는 것으로 사료된다. 따라서 본 제품의 경우 구강 내에서 1분 이하로 사용한다면 바이오필름 형성 억제 효과보다는 부유 상태의 구강 내 유해 세균을 제거하거나 상주 균수를 일시적으로 감소시키는 목적에 국한하여 사용해야 할 것이다. 또한 선행 연구에서 CPC를 주성분으로 하는 구강 양치액의 바이오필름에 대한 평가 결과에 의하면, 클로르헥시딘과 에센셜 오일을 주성분으로 하는 제품에 비해 상대적으로 항균 효과가 낮은 것으로 알려져 있다⁶⁾. Systematic review 연구 결과, 클로르헥시딘과 에센셜 오일의 치면세균막, 치은염 감소 효과에 대한 명확한 근거를 입증할 수 있지만, CPC의 경우는 확실한 결론을 내릴 수 없다고 하였다⁷⁾. 비록 CPC는 다른 물질에 비해 항균 효과는 떨어지지만 클로르헥시딘과 비교할 때 상대적으로 착색과 같은 부작용이 적고 자극적이지 않아 소비자들의 사용 편의성이 높다는 장점이 있다. 현재 국내에서 시판되고 있는 15종의 제품 중에서 CPC를 주된 항균 성분으로 사용하는 제품이 5개로써 전체 제품 중 1/3 가량을 차지하고 있다. 또한 국내 제품들은 초창기부터 구강 질환을 예방하기 위해 강력한 항균력에 근거를 둔 제품

을 개발하기보다는 소비자의 사용 편의감이나 구취제거와 같은 미용적인 측면에서 제품개발을 집중해왔다. 그 결과 국내 양치액 시장은 해외 선진국 시장과 비교할 때 뛰어난 항균력을 보유한 새로운 물질의 개발 등이 상대적으로 취약한 실정이다.

CPC, BTC도 클로르헥시딘과 같이 양이온성 물질로서 치약에 포함된 음이온 계면 활성제인 SLS (Sodium lauryl sulfate)와 반응하여 불활성화되어 항균력이 떨어지는 것으로 알려져 있다. Witt 등¹⁷⁾의 연구 결과에 의하면, 불소 함유 치약을 사용하여 칫솔질을 한 직후 바로 0.07% CPC를 함유한 구강 양치액으로 양치하는 것보다는 칫솔질을 하고 나서 60분 후에 CPC 구강 양치액을 사용하는 것이 더 유의한 항균 효과가 있었다. 이러한 원리와 마찬가지로 제조 공정상 첨가되는 다양한 성분들로 인하여 양이온성 물질 고유의 이온성 활성기가 불활성화되어 항균 효과가 낮아지는 것으로 추측된다. 따라서 양이온성 항균 구강 양치액의 이러한 특성을 감안한다면 항균력 저해를 최소화하기 위해 칫솔질 후 최소 30분에서 2시간 이후에 구강 양치액을 사용하는 것이 권장된다¹⁸⁾.

또한 양치액의 항균력은 제품의 유효기간이나 보관-조건에 따라라도 달라질 수 있다¹⁹⁾. 예를 들어 제조 후 시간이 경과할수록 불소치약 내 불소 이온 함량이 감소하는 것과 마찬가지로 양치액 속 항균물질도 그 특성에 따라 시간이 경과할수록 활성이 감소하여 효과가 낮아질 수 있다. 또한 보관 온도나 장소 등 보관 상태-조건은 항균 물질의 안정화에 영향을 주기 때문에 항균력을 변화시킬 수 있는 요인이 된다¹⁹⁾. 그러므로 제품 내 포함된 항균 물질의 활성이 이와 같은 요인들에 따라 변화할 수 있으므로 제조사에서는 이에 대한 고려가 필요할 것이다.

본 연구에서 처치시간에 따른 결과를 통해, 양치액의 처치시간이 길어질수록 바이오필름 형성 억제 효과가 더 크다는 사실을 알 수 있었다. 권 등¹¹⁾은 *S. mutans*와 *S. sobrinus* 바이오필름 모델을 활용한 연구에서 양치액의 접촉시간이 길수록 바이오필름이 효과적으로 감소된다고 보고하였다. 양치액 접촉시간이 길어질수록 초기 부착단계에서는 더 많은 세균을 사멸시킬 수 있고 성숙 단계에서는 항균 물질이 바이오필름의 기질을 침투하여 기질 내부의 세균에 항균물질이 직접 도달하여 작용하는 것이 가능해지기 때문에 항균효과가 더 크게 나타난다고 볼 수 있다. 특히 클로르헥시딘을 주성분으로 하는

군에서는 1분 처치 결과와 5분 처치 결과의 형성 억제 정도의 차이가 약 57%로 가장 컸다. 클로르헥시딘은 즉각적인 살균 효과보다는 바이오필름 내부 구조에 분자가 결합하는 작용 기전에 의해 더 강력한 항균 작용을 나타내는데²⁰⁾, 다른 항균 물질에 비해 클로르헥시딘 분자가 바이오필름 표면에 결합하여 내부의 세균에 작용하기에 접촉시간의 영향력이 큼을 알 수 있다. 이러한 작용은 클로르헥시딘의 항균 효과를 증가시키는 특징인 클로르헥시딘 분자의 결합에 의한 침투력과 잔존력과의 연관성이 있다고 볼 수 있다.

본 연구에서 활용한 바이오필름 모델에서는 실험 과정 중 양치액 처치 과정뿐만 아니라 바이오필름을 부유시키기 직전단계에서 증류수로 행구는 과정을 통해 여분의 양치액을 제거함과 동시에 바이오필름 표면에 느슨하게 부착된 부유 세균을 탈락시키는 방법을 사용했다. 이로써 부유 상태의 세균은 제외하고 HA 디스크 표면에 단단히 부착된 바이오필름에 대한 효능 평가가 가능하다고 사료된다. 또한 기존의 연구에서 바이오필름을 성숙시킨 후에 최종적으로 1회 양치액을 처치하여 이미 성숙된 바이오필름의 제거 효과만을 평가했던 것과는 달리, 본 연구에서는 바이오필름을 성숙시키는 과정 중에 실제 구강 양치액을 사용하는 상황을 모사하여 2일 동안 4시간 간격으로 하루 3회 양치액을 처치하였다. 구강 질환을 예방하기 위해 치면세균막의 지속적인 관리와 적절한 구강 위생 상태를 유지하는 것이 중요하다는 관점에서 이러한 평가방법이 좀 더 실제적이라고 볼 수 있다.

이와 같이 본 연구에서 활용한 바이오필름 모델은 치면세균막의 형성 억제 효과를 평가하기 위해 적합한 모델이었지만, 실제 구강 내 존재하는 바이오필름 내 균 종과 구성을 모두 재현해내지 못한 점과 실제 구강 양치액을 사용하는 경우 효과를 증대시킬 수 있는 내재적인 요인들을 충분히 반영하지 못한 실험실 연구로서의 한계점은 있다. 따라서 본 연구의 결과를 일반화하는데 한계가 있기 때문에 다양한 분석기법을 적용하여 이를 보완하고 바이오필름 형성 단계에 따라 항균 물질이 어떤 작용기전으로 활성을 나타내는지 확인해 볼 필요가 있겠다.

본 연구를 통해 치면세균막을 지속적으로 관리할 수 있는 구강 양치액을 개발하기 위해서는 부유 세균보다 바이오필름에 대한 평가가 필요함을 알 수 있었다. 또한 구강 양치액에 첨가되는 항균 물질 외에 다른 구성 성분

들에 따라 항균력에 변화가 있는지 여부를 확인하고, 국내 제품들도 향후에는 바이오필름에 대해 항균력이 더욱 강화된 새로운 제품들을 개발할 필요성이 있음을 확인할 수 있었다.

결론

본 연구는 각각 다른 종류의 항균 물질을 주성분으로 하는 국내 시판 구강 양치액을 선정하여 부유 상태의 *S. mutans*에 대한 항균 효과와 *S. mutans* 바이오필름 형성 억제 효과를 비교 평가하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 실험 양치액을 1분간 처치하여 부유 상태의 *S. mutans*에 대한 항균 효과를 평가한 결과, 모든 군에서 99% 이상의 항균력을 나타냈다. *S. mutans* 바이오필름에 대한 평가 결과, 직접 제조한 0.1% 클로르헥시딘 실험제 조용액과 0.1% 클로르헥시딘을 주성분으로 하는 제품군에서만 통계적으로 유의하게 바이오필름 형성 억제 효과가 나타났다.

2. 실험 양치액의 처치시간에 따른 생균 수 측정 결과를 비교해보면, 1분 처치했을 때에 비해 5분 처치했을 때 바이오필름 형성 억제 효과가 약 23% 증가했다.

3. 동일한 클로르헥시딘을 주성분으로 하는 시판 양치액과 실험용 제조 용액의 바이오필름에 대한 평가 결과, 실험 제조용액이 유의하게 항균력이 높게 나타났다. 즉, 항균 물질의 함량이 같더라도 제조 시 첨가되는 성분들에 따라 주요 항균 물질의 활성에 변화가 나타날 수 있음을 확인할 수 있었다.

이상의 결과를 종합해보면, 국내 시판중인 일부 구강 양치액 중에서 클로르헥시딘이 주성분인 처방용 양치액 1종만이 통계적으로 유의한 수준으로 바이오필름을 억제하는 것으로 나타났다. 따라서 국내에서 구강질환의 예방을 목적으로 하는 구강 양치액의 사용을 증가시키기 위해서는 항균 물질의 특성 및 작용기전에 대해 충분히 이해하고 구강 질환 발생의 직접적인 원인이 되는 바이오필름, 즉 치면세균막에 더욱 효과적으로 작용할 수 있는 구강 양치액을 개발할 필요가 있다.

참고문헌

1. Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial com-

- munity-implications for health and disease. BMC Oral Health 2006;6(Suppl 1):S14.
2. Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm. Caries Res 2004;38(3):204-211.
 3. Jenkinson HF, Lamont RJ. Oral microbial communities in sickness and in health. Trends Microbiol 2005;13(12):589-595.
 4. Thomas JG, Nakaishi LA. Managing the complexity of a dynamic biofilm. J Am Dent Assoc 2006;137(Suppl):10S-15S.
 5. Greenstein G, Polson A. The role of local drug delivery in the management of periodontal diseases: a comprehensive review. J Periodontol 1998;69(5):507-520.
 6. Barnett ML. The role of therapeutic antimicrobial mouthrinses in clinical practice: control of supragingival plaque and gingivitis. J Am Dent Assoc 2003;134(6):699-704.
 7. Gunsolley JC. Clinical efficacy of antimicrobial mouthrinses. J Dent 2010;38(Suppl 1):S6-S10.
 8. Marsh PD. Controlling the oral biofilm with antimicrobials. J Dent 2010;38(Suppl 1):S11-S15.
 9. Guggenheim B, Guggenheim M, Gmur R, Giertsen E, Thurnheer T. Application of the Zürich biofilm model to problems of cariology. Caries Res 2004;38(3):212-222.
 10. Shapiro S, Giertsen E, Guggenheim B. An *in vitro* oral biofilm model for comparing the efficacy of antimicrobial mouthrinses. Caries Res 2002;36(2):93-100.
 11. 권영란, 이영수, 전재규, 한성규, 안재현, 장기완. 수중양치용액이 구강 내 *Streptococcus mutans*와 *Streptococcus sobrinus*의 생체막 형성에 미치는 영향. 대한구강보건학회지 2008;32(1):1-9.
 12. 송주희, 반석호, 김진범, 안재현, 김정철, 하원호. 국내 시판되는 수중 양치용액의 구강 내 미생물에 대한 항균효과. 대한구강보건학회지 2007;31(4):482-488.
 13. Shani S, Friedman M, Steinberg D. The anticariogenic effect of amine fluorides on *streptococcus sobrinus* and glucosyltransferase in biofilms. Caries Res 2000;34:260-267.
 14. Brex M, Netuschil L, Reichert B, Schreil G. Efficacy of Listerine, Meridol and chlorhexidine mouthrinses on plaque, gingivitis and plaque bacteria vitality. J Clin Periodontol 1990;17(5):292-297.
 15. Simoes M, Simoes LC, Vieira MJ. Species association increases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments. Water Res 2009;43(1):229-237.
 16. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. Clin Microbiol Rev 1999;12(1):147-179.
 17. Witt J, Bsoul S, He T, Gibb R, Dunavent J, Hamilton A. The effect of toothbrushing regimens on the plaque inhibitory properties of an experimental cetylpyridinium chloride mouthrinse. J Clin Periodontol 2006;33(10):737-742.
 18. Kolahi J, Soolari A. Rinsing with chlorhexidine gluconate solution after brushing and flossing teeth: a systematic review of effectiveness. Quintessence Int 2006;37(8):605-612.
 19. Vermerie N, Malbrunot C, Azar M, Arnaud P. Stability of nystatin in mouthrinses: effect of pH, temperature, concentration and colloidal silver addition, studied using an *in vitro* antifungal activity. Pharm World Sci 1997;19(4):197-201.
 20. Van der Bijl P, Dreyer WP. Chlorhexidine gluconate mouthrinse-further aspects concerning its chemical compatibility, stability and detection of potentially harmful degradation products. J Dent Assoc S Afr 1982;37(11):741-745.