

## 미산성 차아염소산수의 *S. mutans*와 *A. actinomycetemcomitans*에 대한 살균 효과

송지연<sup>1</sup> · 김지영<sup>2</sup> · 이경희<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>동서대학교 일반대학원 보건과학과 학생, <sup>2</sup>경남정보대학교 치위생과 교수, <sup>3\*</sup>동서대학교 치위생학과 교수

### Antimicrobial and Cell Viability Measurement of Hypochlorous Acid against *Streptococcus. mutans* and *Aggregatibacter. actinomycetemcomitans*

Song Jiyeon<sup>1</sup> · Kim Jiyoung<sup>2</sup> · Lee Kyunghee<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Dental Health Sciences, Graduate School of Dongseo University, Student

<sup>2</sup>Dept. of Dental Hygiene, Kyungnam College of Information & Technology, Professor

<sup>1,3\*</sup>Dept. of Dental Hygiene, Dongseo University, Professor

#### Abstract

**Purpose** : Hypochlorous acid (HOCl), a major inorganic bactericidal compound of innate immunity, is effective against a broad range of microorganisms. In particular, HOCl is well-known as a non-antibiotic antimicrobial substance. However, effects of HOCl as an antimicrobial agent are still needed to study these functions against various specific type of microorganisms. In this study, we investigated the antimicrobial effect of hypochlorous acid (HOCl) in *S. mutans* and *A. actinomycetemcomitans* to cause dental caries and periodontal disease. Experiments were conducted to observe whether HOCl become effective replacement of disinfectant.

**Methods** : To observe antimicrobial effect of HOCl, stabilized HOCl is prepared in the form of a physiologically balanced solution in pre-conditioned and post-conditioned HOCl solution. As a control, commercially available disinfectant MAXCLEAN was used as positive control. Moreover, *S. mutans* and *A. actinomycetemcomitans* distribution in gargin, filtered tap water, and culture media. Cell viability were measured by viable cell count methods and disk diffusion test.

**Results** : Our results showed that treatment of HOCl have no effect against antimicrobial effect compare to control group especially gargin in disk diffusion test. HOCl tended to reduced viability against *S. mutans* in group of post-conditioned than pre-conditioned of HOCl solution however, there was no significant difference as well as no effect in *A. actinomycetemcomitans*.

**Conclusion** : HOCl showed tendency to reduce viability against *S. mutans* in group of post-conditioned of HOCl solution and no effect of antimicrobial effect. Although HOCl is well known as effective against a broad range of microorganisms, HOCl seems to have diversity following type of species to be used as antimicrobial drug following our results. Therefore, it is necessary to be rigidly controlled and regulated in using HOCl solution clinically.

**Key Words** : dental clinic, hypochlorous acid, HOCL, oral bacteria, oral gargling

\*교신저자 : 이경희, kyhee@dongseo.ac.kr

논문접수일 : 2019년 3월 16일 | 수정일 : 2019년 4월 16일 | 게재승인일 : 2019년 4월 26일

※ 이 논문은 2019년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(NRF-2016R1D1A3B2008194).

## I. 서론

인간의 수명이 점차 늘어나면서 현대인들은 건강에 대한 관심이 증가하고 있다. 특히, 구강 관련 질환이 전신 건강과 밀접한 관련성을 가진다고 보고되면서, 전신건강 증진을 위한 중요한 조건 중 하나인 구강 건강에 대한 관심 또한 높아지고 있다(Jeon 등, 2016). 구강 질환으로 인한 치아 상실은 심혈관질환의 발생과 동맥경화를 일으킬 수 있을 뿐만 아니라, 치주질환은 임신 부작용, 골다공증, 뇌졸중, 호흡기질환, 만성 신장질환, 및 당뇨병 등과 같은 전신질환과도 밀접한 관련성이 있다(Jung 등, 2015; Lee, 2016; Lee & Do, 2017; Won & Ha, 2014). 따라서 대부분의 사람들이 앓고 있는 구강질환은 우리 신체에서 독립된 질환이 아닌 전신건강과 밀접한 관계를 이루고 있으므로, 구강질환과 전신질환은 통합적이고 포괄적으로 관리되어야 한다(Kang & Yul, 2015). 구강 내에는 수많은 미생물들이 존재하며, 성인의 약 75 % 이상에서 발생하는 치아우식증과 치주질환은 구강 미생물과 밀접하게 연관되어져 있다(Park, 2013). 구강질환 중 치아우식증을 일으키는 대표적인 미생물로는 *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* 등이 있다. 특히, *S. mutans* 는 치면 세균막 형성에 영향을 미치고, 당 대사 과정에서 유기산을 생성하여 산성 환경을 만들어 내는 역할을 한다(Choi & Kang, 2017). 또한, 치주질환을 일으키는 대표적인 미생물로는 급진성 치주염을 유발하는 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*와 *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*로 알려져 있다(Son 등, 2006). *A. actinomycetemcomitans*는 급성·만성 치주염과 공격성 치주염 발병에 밀접한 연관이 있다고 알려져 있으며, 대부분의 치주질환 환자에게 나타나는 치주질환 원인균이다(Park 등, 2016). 또한, 이 균은 백혈구 독소(leukotoxin)를 생산하여 사람의 백혈구를 사멸시킨다고 알려져 있다(Yu & Hwang, 2017).

미생물에 의한 구강질환 예방을 위한 가장 일반적인 구강관리 방법은 칫솔질이며, 이는 구강 내 치면세균막을 제거하고 억제한다. 하지만, 칫솔질과 같은 물리적인 방법만으로 치면세균막을 제거하기 어려운 환경이나 조건에서는 구강세정제를 사용하여 추가적인 효과를 기대

할 수 있다(You 등, 2017). 구강세정제는 구강 내 세균 활성을 억제하고 염증 소견이 있는 부위에는 소염작용을 통하여 구강 질환을 억제 및 예방하는데 도움을 준다(Youn 등, 2017). 구강세정제는 의약품으로 분류가 되어있어 주변에서 손쉽게 접할 수 있고, 휴대와 사용이 간편하여 일반적인 사용이 점차 증가하고 있다(Choi 등, 2012). 하지만 우리가 손쉽게 접할 수 있는 대부분의 구강 세정제에는 세틸피리디늄클로라이드(cetylpyridinium chloride, CPC)라는 방부제 성분인 인공화학 합성물질을 포함하고 있다(Song 등, 2013). 이러한 인공화학 합성물질이 포함된 구강세정제를 장기간 사용하게 되면 오히려 구강생태계를 해칠 수 있으며(Lee와 Choi, 2006), 장기간 사용에 따른 정상 세균총의 균형이 깨어지면서 구강 캔디다증 및 구강암을 유발할 수 있다. 이에 가장 이상적인 구강세정제라고 할 수 있는 기준은 정상 세균총을 제외한 구강 질환을 일으키는 원인균들과 구취를 유발하는 여러 세균들에 대해 선택적인 항균 효과를 나타내며 인체와 구강주위조직에 독성이 없어야 한다(Kim 등, 2015). 최근에는 장기간 사용해도 구강건조증과 같은 구강 내 부작용이 적은 천연 구강세정제를 개발하기 위한 연구들이 활발하게 진행되고 있다(Jae 등, 2011; Jeon 등, 2016).

차아염소산은 체내에서 활성화된 호중구 내에서 골수 세포형과산화효소(myeloperoxidase, MPO)에 의해 생성되고 각종 일반 세균에 대해 항균효과를 지니고 있으며, 체내 실험에서 100  $\mu$  M 이상의 농도에서는 세포독성을 나타내지만 그 이하의 농도에서는 유의한 세포독성을 가지지 않는다(Kim 등, 2011). 차아염소산수는 식품에 접촉이 가능하고 승인된 식품 표면 소독제로 미국 환경보호청으로부터 등록 되었으며(Chander 등, 2012), 전해조에서 전기분해를 통해 만들어지고 유효염소 농도는 20~30 ppm, pH 5.0~6.5의 미산성에서 식물 병원균들에 대한 살균 효과가 높다. 또한 어패류에서 발생하는 장염 비브리오균들이 미산성 차아염소산수(Hypochlorous acid, HOCL)에 강력한 살균 효과가 있는 것으로 보고되었다(Kim 등, 2015; Song 등, 2013). 이러한 미산성 차아염소산수의 식품 세정에 대한 살균 효과가 알려지면서, 최근에는 의료분야에서 응용되고 있다(Lee, 2016). 이 용액은 소량의 염 용액을 전기 분해하여 자동으로 생성되기 때

문에 항상 일정한 농도의 용액을 준비할 수 있고, 효과적인 농도로 점막에 사용되어도 안전하다고 보고되었다(Ozaki 등, 2012). 그 중 차아염소산수는 제 1차 세계 대전 중에 나트륨 하이포클로리트(Dakin 용액)의 희석 및 산성화에 의해 개발된 비 항생제 항균 용액이다(Castillo 등, 2015). 이에 최근 치과임상에서도 미산성 차아염소산수는 가벼운 산성을 띄고 있어 치주염 치료를 위한 제제로 사용되고 있으며, 세균막으로 오염된 임플란트 표면을 세정하는데 효과적이라고 보고되었다(Chen 등, 2016). 특히 국내 연구들에서는 미산성 차아염소산수가 치아우식증에 대해 높은 항균력을 가지고 있어 양치 용액으로 이용 시 구강 질환 예방 가능성이 있다고 보고하였으나(Park, 2013), 국외 연구에서 Castillo 등(2015)은 대부분의 구강 미생물들은 차아염소산수 농도가 250 ppm 이하일 때, 아무 처리를 하지 않은 대조군과 큰 차이가 없다는 연구결과를 보고하였다. 이는 현재 대부분의 국내 치과임상에서 사용되고 있는 20~30 ppm 정도의 미산성 차아염소산수 농도와는 현저한 차이를 보였다.

이에 본 연구는 치과 임상에서 사용되고 있는 차아염소산수의 항균 효과에 있어서 치아우식 관련 균과 치주 질환 관련 균의 항균 정도를 확인하고자 하였다. 또한 차아염소산수의 보관 기간에 따른 항균 효과의 차이를

시판용 구강세정제의 항균 효과와 비교하여 미산성 차아염소산수가 구강 세정 용액으로써 대체 사용 가능 한 지 여부를 알아보려고 실험을 진행하였다.

## II. 연구방법

### 1. 실험 용액과 배양조건

#### 1) 균주

치아우식질환을 일으키는 원인균인 *S. mutans* (KCTC 3065)는 Bacto™ brain heart infusion (Difco, USA) 액체 배지에서 배양 후 실험에 사용하였고, 생균수 측정을 위하여 BHI agar 고체배지(Difco, USA)를 사용하였다. 치주질환을 일으키는 원인균인 *A. actinomycetemcomitans* (KCTC 2581)는 32 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 호기상태에서 columbia broth (MB cell, Korea)로 배양하여 활성화 시킨 후 실험을 진행하였고, 생균수 및 생육저해환 측정을 위해 5 % sheep blood(시너지이노베이션, 한국)가 들어있는 고체배지(MB cell, Korea)를 사용하였다. 각 균주는 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)로부터 분양받아 2회 계대 배양 후 실험에 사용하였다(Table 1).

Table 1. Bacterial stains used in this study and their media, culture condition

Strains	Culture condition	Media	Straining properties
<i>Streptococcus mutans</i> / KCTC 3065	32 °C / 5 % CO <sub>2</sub>	Bacto™ Brain Heart Infusion / Difco™ Brain Heart Infusion Agar	Gram positive
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> / KCTC 2581	32 °C / 5 % CO <sub>2</sub>	Columbia Broth / Columbia Blood Agar with Sheep blood	Gram negative

#### 2) 실험균

실험균으로 사용된 미산성 차아염소산수는 크게 3가지로 분류하였다. 기계에서 제조된 미산성 차아염소산수 용액(덴탈큐브, (주)세진바이오텍, 한국)의 pH는 5.0~6.5, 유효염소농도는 20~30 ppm의 조건으로 제조된 용액이

며, 미산성 차아염소산수 용액의 치과 장비 내 정체된 시간에 따른 효과를 확인하고자 월요일 진료 전 하루 이상 정체되어 있었던 용액(진료 전, pre)과 하루 종일 진료 후 바로 제조된 용액(진료 후, post)을 사용하였다. 또한, 시중에 판매되는 정제된 차아염소산수 소독제

(MAXCLEAN, (주)동서이엠에스, 한국)를 사용하였다. 시중에 판매되는 정제된 소독제 MAXCLEAN의 경우 pH는 4.5~6.8, 유효염소농도는 0.007 ppm이었다.

3) 대조군

미산성 차아염소산수의 효능을 비교하기 위해서 각각의 균에 대한 대조군을 선정하여 비교 및 관찰하였다. *S. mutans*의 경우, 구강 청결제인 가그린(가그린, (주)동아제약, 한국), 주사기 필터(DISMIC-25CS, ADVENTEC, 일본)를 이용하여 박테리아를 제거한 수돗물, 구강 미생물을 키우는 배양액을 대조군으로 비교 및 관찰하였다. *A. actinomycetemcomitans*의 경우, 가그린과 구강 미생물 배양액을 대조군으로 관찰하였다.

2. 연구 방법

1) 디스크 확산법(disk diffusion test)

Park 등(2013)의 연구 방법에 따라 본 연구의 디스크 확산법은 실험균주에 대한 미산성 차아염소산수의 항균 효과를 측정하기 위해서 *S. mutans*의 경우  $2 \times 10^5$  CFU/ml의 농도로 희석하여 BHI agar plate에 100  $\mu$  l씩 도말하였다. 실험에 사용된 디스크의 크기는 penicillin의 경우 지름 0.6 cm, penicillin을 제외한 용액의 경우 0.7 cm를 사용하였다. *A. actinomycetemcomitans*의 경우  $1 \times 10^4$  CFU/ml의 농도로 희석하여 Columbia Blood Agar plate에 100  $\mu$  l씩 도말하였다. 미산성 차아염소산수 진료 전, 진료 후, 수돗물, Penicillin, 가그린 및 MAXCLEAN을 사용하였다. 각 실험용액으로 적신 paper disc를 균을 도말한 agar plate에 올려 *S. mutans*의 경우 24시간, *A. actinomycetemcomitans*의 경우 48시간 동안 배양한 후 나타난 생육저해환(clear zone)을 측정하였다.

2) 생균수 측정

각각의 실험 용액들을 100  $\mu$  l씩 96 well plate에 분주하고, 각각의 실험 균주 *S. mutans* ( $2 \times 10^5$  CFU/ml), *A. actinomycetemcomitans* ( $1 \times 10^5$  CFU/ml)를 100  $\mu$  l씩 접종하여, 24시간 배양한 후 agar 배지에 100  $\mu$  l를 분주하여 도포하였다. *S. mutans*의 경우 24시간, *A. actinomycetemcomitans*

의 경우 48시간 동안 배양한 후 생균수를 측정하였다.

3) 흡광도 측정(Optical density)

미산성 차아염소산수의 구강 미생물 성장억제 정도를 확인하기 위해서 흡광도(OD)를 측정하였다. 실험 용액인 미산성 차아염소산수와 가그린, 수돗물은 원액을 사용하였다. 96 well plate에 각각의 실험 용액을 0.1 ml씩 분주하였고, BHI 액체 배지에서 배양된 *S. mutans* ( $2 \times 10^5$  CFU/ml)와 Columbia 액체 배지에서 배양된 *A. actinomycetemcomitans* ( $1 \times 10^5$  CFU/ml)를 각각 0.1 ml씩 접종하여 각 well이 0.2ml가 되도록 하였다. 96 well plate를 32  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기(Bionex, 비전, 한국)에서 24시간 배양한 뒤 Microplate Photometer(Multiskan™ FC microplate Photometer, Thermo Scientific™, USA)를 이용하여 파장 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 통계분석

실험결과와 통계분석은 SPSS 통계프로그램 24(SPSS Inc., Chicago, U.S.A)를 이용하여 실험 군들의 평균과 표준편차를 산출하고, one-way ANOVA를 통해 Scheffe, Tukey 사후검정을 이용하여 각 실험 용액별 다중비교와 동질비교를 시행하였다.

III. 결과

1. 치아우식균(*S. mutans*)

1) 치아우식균에 대한 생육저해환 측정

광범위하게 사용되고 있는 미산성 차아염소산수의 원액 3종과 비교 용액 2종, 항생제 1종을 paper disc에 묻혀 치아우식증 유발균에 대한 항 미생물 작용을 확인하고자 생육저해환 측정을 하였다(Table 2). 가그린의 경우 4.0 $\pm$ 0.6 mm 생육이 저해되었고, 항생제 penicillin의 경우 6.3 $\pm$ 0.6 mm 생육이 저해되었다(p<.01). 즉, 양치 가글액인 가그린은 치아우식균에 대하여 유의미 하게 높은 항균효과를 보였으나 임상 및 시판용 미산성 차아염소산

수 용액들에서는 항균 효과가 관찰되지 않았다(Fig 1).

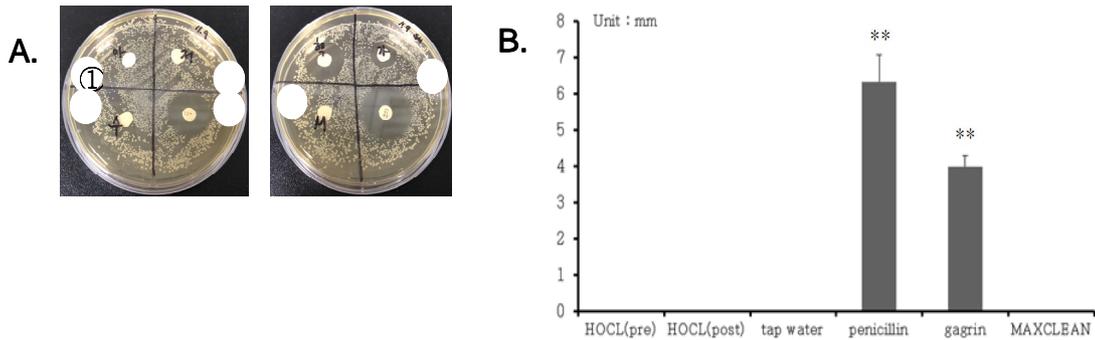


Fig 1. A: Representative photograph showed the clear zone of *S. mutans* according to each solution treatment (① HOCL(pre), ② HOCL(post), ③ Tap water, ④ Penicillin, ⑤ Gagrin, ⑥ MAXCLEAN). B: Comparison of clear zone to all groups in *S. mutans*. \*\* $p < .01$  compared with HOCL(pre) group; one-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* comparison.

## 2) 치아우식균에 대한 생균수 측정

미산성 차아염소산수의 생균수 측정 결과, 진료 전 용액 생균수는 7.3 log CFU/ml, 진료 후 용액 처리 시 생균수는 6.4 log CFU/ml, MAXCLEAN 생균수는 6.7 log CFU/ml로 진료 전 용액에서 비교적 높은 세균수가 관찰되어 진료 전 용액에 비해 진료 후 용액처리에서 생균수가 줄어드는 양상을 보였다. 가그린 처리 시 치아우식균이 거의 관찰되지 않았으며, 수돗물의 경우 6.7 log CFU/ml, BHI 배양액인 대조군은 7.1 log CFU/ml로 확인되었다. 따라서 시판용 가그린의 경우 유의미하게 높은 항균효과를 보였으며( $p=0.01$ ), 미산성 차아염소산수의 경우 항균효과는 미미하지만 오래 머물러 있는 진료 전 용액에 비해 바로 생성되는 진료 후 용액에서 치아우식균의 세균 수가 감소함을 보였다(Fig 2).

## 2. 치주균(*A. actinomycetemcomitans*)

### 1) 치주균에 대한 생육저해율 측정

치주질환 유발균에 대한 항 미생물 활성을 측정하기 위하여 미산성 차아염소산수의 원액 3종과 비교 용액 2종, 항생제 1종을 paper disc에 묻혀 생육저해율을 관찰하였다(Table 3). 가그린의 경우 2.1±1.1 mm 생육이 저해

되었고, penicillin의 경우 15.6±1.1 mm로 세균성장이 저해되었다. 가그린은 치아우식균에 비해 낮은 항균 효과를 보였으며, penicillin의 경우 치주질환균인 *A. actinomycetemcomitans*에서 보다 높은 항균효과를 보였다(Fig 3)( $p < .01$ ).

### 2) 치주균에 대한 생균수 측정

치주균에 대한 생균수 측정결과, 미산성 차아염소산수의 진료 전 용액에서는 8.8 log CFU/ml의 세균수가 관찰되었으나 진료 후 용액에서는 8.6 log CFU/ml의 세균수가 관찰되어 치주균에서는 미산성 차아염소산수의 진료 전과 진료 후 용액에서 비슷한 세균성장 억제 양상을 확인하였다. 또한 시판용 미산성 차아염소산수인 MAXCLEAN의 경우 8.7 log CFU/ml로 임상에서 사용되는 용액들과 비슷한 양상이 관찰되었다. 또한 Columbia 배양액만 사용한 대조군에서 생균수는 8.8 log CFU/ml로 확인되었다. 반면, 가그린의 경우 생균수가 거의 관찰되지 않아 치주균에 대해서 높은 항균 효과를 확인하였다( $p=0.08$ ). 즉, 치주균에 대한 생균수 측정에서 시판 및 임상에서 사용되는 미산성 차아염소산수는 대조군과 유사하게 치주균에 대하여 거의 세균억제 효과를 보이지 못하는 것으로 관찰되었다(Fig 4).

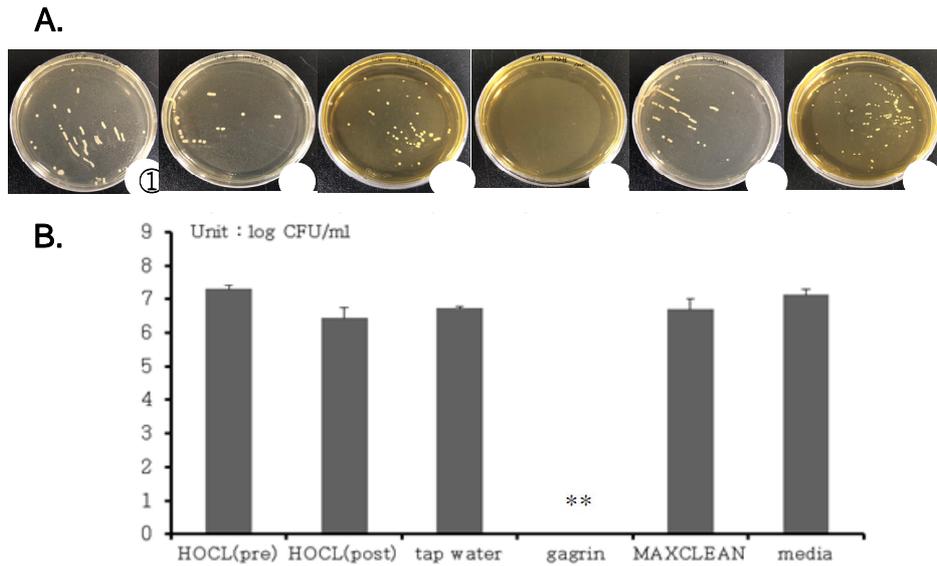


Fig 2. A: Representative photograph of culture dishes for all groups (① HOCL(pre), ② HOCL(post), ③ Tap water, ④ Gagrín, ⑤ MAXCLEAN, ⑥ Media). B: Comparison of viable cell counts with all groups in *S. mutans*. \*\* $p < .01$  compared with HOCL(pre) group; one-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* comparison.

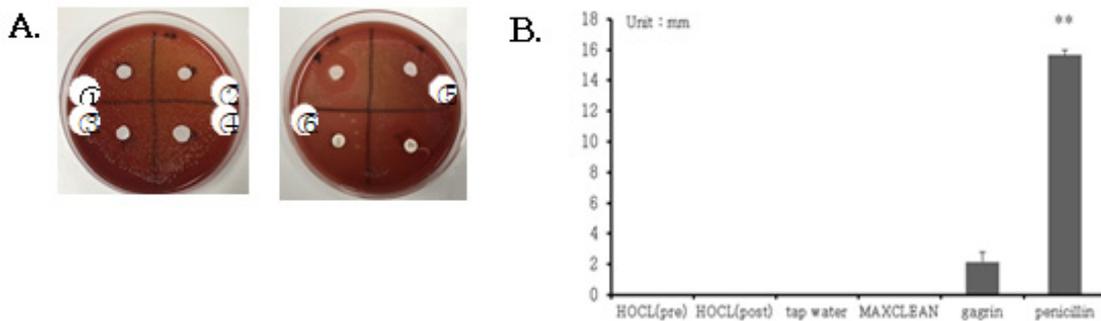


Fig 3. A: Representative photograph showed the clear zone of *A. actinomycetemcomitans* according to each solution treatment (①: HOCL(pre), ②: HOCL(post), ③: tap water, ④: MAXCLEAN, ⑤: gagrín, ⑥: penicillin). B: Comparison of clear zone to all groups in *A. actinomycetemcomitans*. \*\* $p < .01$  compared with HOCL (pre) group; one-way ANOVA followed by Scheffe's *post-hoc* comparison.

### 3. 흡광도 측정

#### 1) *Streptococcus mutans*

치아우식증 유발균에 대한 미산성 차아염소산수 3종, 가그린, 수돗물, BHI 배지의 흡광도를 측정하였다. 흡광도 측정결과, 미산성 차아염소산수의 진료 전 용액은

0.721 mg/ml, 진료 후 용액에서는 0.400 mg/ml, MAXCLEAN 0.356 mg/ml로 관찰되어 진료 전 용액보다는 진료 후 용액과 MAXCLEAN에서 통계적 유의미성을 보이지 않지만 비교적 세균억제 작용이 일부 이루어지는 것으로 관찰되었다. 반면 가그린에서는 0.040 mg/ml로 확인되어 유의미하게 높은 세균 성장억제 효과를 보

였다. 수돗물의 경우 0.730 mg/ml로 관찰되었다. 이에 가그린은 임상 및 시판용 미산성 차아염소산수에 비해 *S.*

*mutans*에 대한 세균성장 억제 효과가 높은 것으로 나타난다(Fig 5A)( $p < .05$ ).

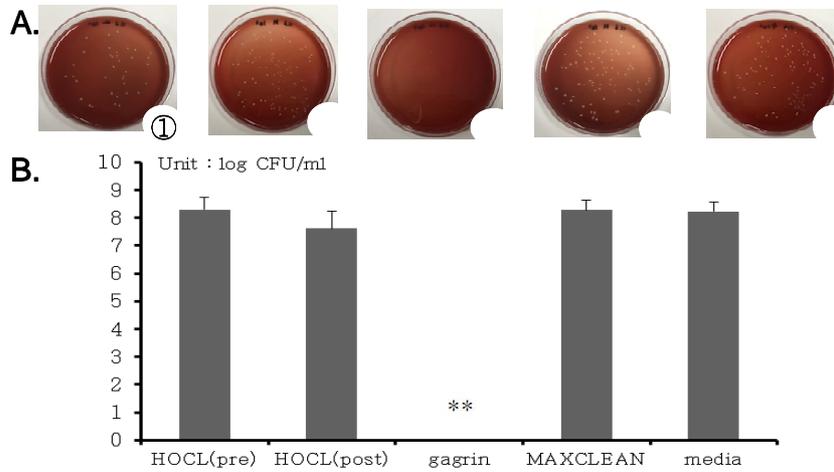


Fig 4. A: Representative photograph of culture dishes for all groups (① HOCL(pre), ② HOCL(post), ③ Gagrin, ④ MAXCLEAN, ⑤ Media). B: Comparison of viable cell count with all groups in *A. actinomycetemcomitans*. \*\* $p < .01$ , HOCL (pre) vs each experimental groups; one-way ANOVA followed by Scheffe' s *post-hoc* comparison.

2) *A. actinomycetemcomitans*

치주질환 유발균에 대한 흡광도 측정 시, 미산성 차아염소산수의 진료 전 용액에서는 0.084 mg/ml, 진료 후 용액에서는 0.078 mg/ml, MAXCLEAN 용액에서는 0.048

mg/ml, 가그린은 0.044 mg/ml 흡광도가 확인되었다. 대조군인 배양액에서는 0.066 mg/ml 관찰되었다(Fig 5B)( $p > .05$ ).

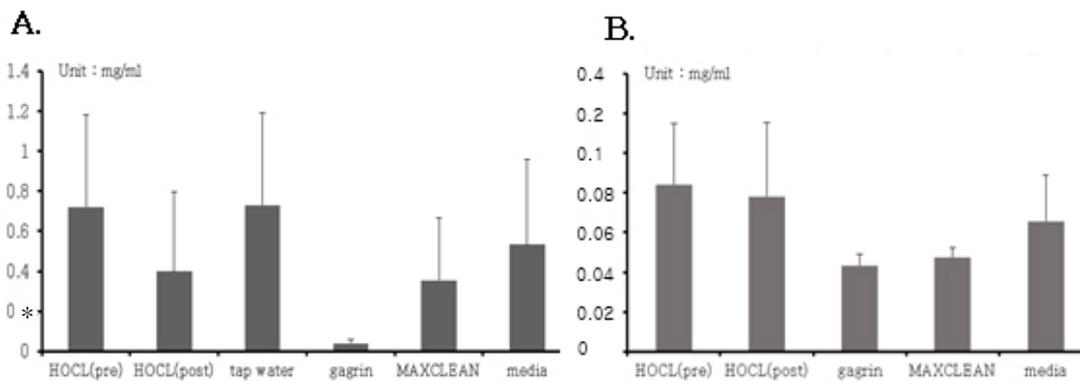


Fig 5. A: Comparison of optical density value with different groups in *S. mutans* according to solution. \* $p < .05$  compared with HOCL(pre) group; one-way ANOVA followed by Tukey' s *post-hoc* comparison. B: Comparison of optical density value with different groups in *A. actinomycetemcomitans*.

#### IV. 고 찰

본 연구는 구강 내 미생물의 억제를 위해 인공화학 합성물질이 함유된 구강세정제를 대체할 수 있는 용액을 탐색하여 구강세정제로써 활용 가능성을 확인하고자 현재 병원에서 사용 중인 미산성 차아염소산수를 이용하여 치아우식증 및 치주질환의 대표적인 균에 대한 항균 효과를 관찰하였다. 또한 미산성 차아염소산수의 구강세정제로써 대체 사용 가능성 여부를 확인하고자 다른 시판용 구강세정제처럼 용액 생성 후 보관기간에 따른 용액의 효과를 관찰하였다.

디스크 확산법 결과 본 연구의 가그린과 항생제에서는 구강 미생물에 대한 살균 효과를 보이는 반면 미산성 차아염소산수에서는 항균 효과를 관찰할 수 없었으며, 관찰된 *S. mutans*에 대한 성장억제에서 미산성 차아염소산수가 주말동안 정체되어져 있던 진료 전 용액과 비교하여 당일 바로 생성된 진료 후 용액에서 세균 억제 효과를 보였다. 이는 차아염소산수의 성분에는 유효염소가 염소가스( $Cl_2$ ), 차아염소산, 하이포아염소산 이온( $OCl^-$ ) 등과 같은 형태로 존재하고 있고, 이 성분들로 인해 세균 및 미생물들의 성장을 억제시키지만, 공기 접촉이 가능한 상태에서 장기간 보관할 경우 미산성 차아염소산수의 성분이 물로 분해되고 염소가스가 증발되어 살균 효과가 사라진다는 연구결과와 유사하다(Cao 등, 2009). 또한, 미산성 차아염소산수의 진료 전 용액과 수돗물의 생균수를 비교하였을 때 진료 전 용액의 생균수가 많이 관찰되는 것으로 보아, 미산성 차아염소산수의 장기간 공기 노출 시 용액의 효과가 저하될 것으로 사료된다.

본 연구에서는 미산성 차아염소산수의 *S. mutans*에 대한 유의미한 살균 효과를 거의 확인하지 못하였으며, 이는 Kim 등(2011)의 차아염소산은 유효염소농도가 100  $\mu$  M이상의 농도에서는 세포독성을 가질 수 있지만, 유효염소농도 3.5 ppm인 저농도 차아염소산의 세포독성 실험 결과 2시간 이후에도 형태학적 변화는 나타나지 않고 강한 살균 효과를 나타낸다는 연구 결과와 상반된 결과를 보였다. 미산성 차아염소산수는 식품 분야에서 식재료 살균 및 소독의 효과가 높은 것으로 알려져 병·의원에서도 소독제로 활용되기 시작하였고, 현재 치과에서도

구강 미생물의 사멸 효과가 높은 것으로 알려져 소독제 뿐만 아니라 치과 유니트 체어 내 배관에도 사용되고 있다. 또한, Park 등(2013)은 구강 내 미생물 8종에서 미산성 차아염소산수의 최소억제농도(MIC)가 최대 0.015 mg/ml로 Listerine의 최대 0.3125 mg/ml보다 낮은 결과를 관찰함으로써 항균 효과를 보고하여 본 연구결과와 차이를 보였다. 하지만 낮은 농도에서 효과적이라는 국내 여러 연구결과와는 달리 Castillo 등(2015)은 차아염소산수의 유효염소농도가 250 ppm일 때 *S. mutans*에서는 아무 처리를 하지 않은 대조군과 차이가 없는 것으로 보고하였고, 유효염소농도 500 ppm일 때 0.2 % Chlorhexidine과 유사한 살균 효과를 나타낸다는 연구결과는 본 연구결과와 유사하다.

본 연구의 흡광도 측정에서 *A. actinomycetemcomitans* 균에서는 차이가 없었지만 *S. mutans*에서 진료 후 용액이 진료 전 용액에 비해 낮은 흡광도 측정값을 보여 하루 이상 보관된 미산성 차아염소산수 용액보다는 생성된 지 얼마 되지 않은 용액을 사용하는 것이 세균 억제에 효과적일 것으로 사료된다. 따라서 본 연구 결과 유효염소농도가 낮은 미산성 차아염소산수는 살균보다 가벼운 소독에 가까운 효과를 나타낼 것으로 생각된다. 또한 주말 또는 용액의 첫 사용 시 유니트 체어 내에 고여 있는 용액을 제거한 후 사용하고, 분무기 또는 뚜껑을 여닫으며 사용하는 용기에 들어있는 잔여 용액도 교체하여 사용하는 것이 소독 효과를 높일 것으로 사료된다. 구강세정제는 구강 보조용품으로 구강 내 세균 및 미생물을 억제하고 구강 위생을 높이는 데 효과적으로 사용되고 있으나 구강세정제의 장기간 사용은 과도한 세정 효과로 인해 구강 내 상주하고 있어야 하는 유익한 균들마저 살균하여 또 다른 질환으로 이환시킬 수 있다. Lee 등(2009)은 천연물질로 이루어진 essential oil이 구강 내 *A. actinomycetemcomitans* 와 *S. mutans*에서 유의미한 구강 내 미생물 사멸 효과를 보인다고 보고하였고, 이와 유사하게 본 연구결과를 바탕으로 미산성 차아염소산수는 살균 효과는 미미하지만 인공화학물질이 첨가되지 않아 장기 사용 시 인체에 무해하고 구강 내 정상 세균총을 변화시킬 만큼 강한 소독 효과를 보이지 않아 임상에서 소독의 개념으로 가벼운 구강세정제로 대체 사용 가능한 물질이라 생각된다.

본 연구결과에서는 미산성 차아염소산수가 치아우식증 및 치주질환을 유발하는 구강 내 미생물의 살균 측면에서는 유의미한 결과를 관찰할 수 없었지만, 진료 후 바로 생성된 미산성 차아염소산수는 *S. mutans* 균의 성장을 억제하는 경향이 관찰되었다. 또한 미산성 차아염소산수의 보관 기간에 관한 연구결과 진료 전 장기 보관된 용액보다는 진료 후 바로 생성되는 용액에서 세균 억제 효과 경향을 보여 치아우식증 이환률이 높은 아동기나 청소년기, 장애인 등을 대상으로 가벼운 구강세정제로써 지속적으로 사용 시 치아우식증 예방 효과를 가져올 것으로 사료된다. 그러나 치주질환 유발 균에 대한 효과는 시판되고 있는 구강세정제에 비해 현저하게 낮은 소독 효과를 보여 구강세정제로써의 대체 사용은 어려울 것으로 보인다. 미산성 차아염소산수의 살균 관련 유효염소농도에 있어서 국내·외 연구에서 차이를 보이므로, 추후 보다 명확한 유효염소 농도별 측정 및 비교 연구들이 필요할 것으로 사료된다. 또한 미산성 차아염소산수의 장기간 보관에 따른 세정 효과 유지를 위한 임상적 응용연구도 필요할 것으로 사료된다.

## V. 결론

살균 효과가 높고 인체에 무해하다고 알려진 미산성 차아염소산수의 구강세정제로써 대체 사용 가능성을 알아보고, 미산성 차아염소산수의 보관 기간에 따른 구강 내 질환을 일으키는 미생물에 대한 항균효과를 디스크 확산법, 흡광도 측정, 생균 수 측정하여 아래와 같은 결과를 확인하였다.

1. 디스크 확산법에서 임상 및 시판용 미산성 차아염소산수는 *S. mutans* 와 *A. actinomycetemcomitans* 에 유의미한 효과가 없었으나, *S. mutans* 균의 경우 가그린 용액에서 유의미한 세균성장 억제 효과를 관찰하였다.
2. 생균 수 측정결과 *S. mutans* 의 경우 미산성 차아염소산수 진료 전 용액, 진료 후 용액, 수돗물, MAXCLEAN,

BHI배지 순으로 7.3, 6.4, 6.7, 6.7, 7.1 log CFU/ml 의 세균수가 관찰되었고, *A. actinomycetemcomitans* 의 경우 미산성 차아염소산수 진료 전 용액, 진료 후 용액, Columbia배지, MAXCLEAN 순으로 8.8, 8.6, 8.8, 8.7 log CFU/ml의 세균수를 확인하였다. 두 균 모두에서 미산성 차아염소산수의 경우 세균들에 대해 비교적 낮은 항균 효과가 나타났으며, 구강 양치액인 가그린 용액에서 치아우식균과 치주질환 균 모두에서 유의미하게 높은 살균 효과를 보였다.

3. 흡광도 측정 시 *S. mutans* 의 경우 미산성 차아염소산수 진료 전 용액, 진료 후 용액, 수돗물, 가그린, MAXCLEAN, BHI배지 순으로 0.721, 0.400, 0.730, 0.040, 0.356, 0.533 mg/ml로 관찰되었다. *A. actinomycetemcomitans* 에서는 미산성 차아염소산수 진료 전 용액, 진료 후 용액, 가그린, MAXCLEAN, Columbia배지 순으로 0.084, 0.078, 0.044, 0.048, 0.066 mg/ml로 관찰되었으나 통계적으로 유의미한 차이가 없었다.

본 연구결과 미산성 차아염소산수는 치아우식 및 치주질환 유발균에 대하여 유의미한 살균 효과를 보이지 않지만, 미생물의 활성을 억제하는 가벼운 소독 효과를 나타내는 것으로 관찰되었다. 특히 *S. mutans* 균에 더 높은 소독효과가 관찰되어 치아우식관련 임상치료 시 가벼운 구강세정제로 활용가능하며, 또한 장기사용이 가능하므로 구강 양치 시 수돗물의 대체 사용으로 구강 내 치아우식 유발균에 대한 가벼운 구강 소독 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

## 참고문헌

- Castillo DM, Castillo Y, Delgadillo NA, et al(2015). Viability and effects on bacterial proteins by oral rinses with hypochlorous acid as active ingredient. Braz Dent J, 26(5), 519-524.
- Cao W, Zhu ZW, Shi ZX, et al(2009). Efficiency of

- slightly acidic electrolyzed water for inactivation of *Salmonella enteritidis* and its contaminated shell eggs. *Int J Food Microbiol*, 130(2), 88-93.
- Chander Y, Johnson T, Goyal SM, et al(2012). Antiviral activity of Ecasol against feline calicivirus, a surrogate of human norovirus. *J Infect Public Health*, 5(6), 420-424.
- Chen CJ, Chen CC, Ding SJ(2016). Effectiveness of hypochlorous acid to reduce the biofilms on titanium alloy surfaces in vitro. *Int J Mol Sci*, 17(7), 1-12.
- Choi YR, Kang MK(2017). Antibacterial effect of tea tree on *Streptococcus mutans*. *J Korean Soc Dent Hyg*, 17(4), 613-620.
- Choi HJ, Lee HJ, Jeong SS, et al(2012). Effect of mouthrinse with low pH on the surface microhardness of artificial carious enamel. *J Korean Acad Oral Health*, 36(3), 161-166.
- Jae MH, Chang KW, Ma DS(2011). The effects of origanum oil, red ginseng extract, and green tea extract on oral microorganisms and volatile sulfur compounds. *J Korean Acad Oral Health*, 35(4), 396-404.
- Jeon JH, Kwon JA, Nam JM, et al(2016). Comparison of oral health related characteristics between a long-term patients and general population. *J Korean Soc Dent Hyg*, 16(1), 11-18.
- Jung YJ, Cho MH, Moon DH(2015). Influencing factors to dental caries and periodontal diseases in Korean adults. *J Korean Soc Dent Hyg*, 15(1), 47-54.
- Kang HJ, Yul BC(2015). Relationship between metabolic syndrome and oral diseases in the middle aged and elderly people. *J Korean Soc Dent Hyg*, 15(6), 947-961.
- Kim BJ, Kim YH, Jang TY(2011). The safety of low concentration hypochlorous acid as an oral gargle solution and its anti-microbial effects. *Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg*, 54(6), 403-407.
- Kim JH, Ji CS, Jung BM, et al(2015). Effect of mouthwash containing sun-dried salt on gingivitis and halitosis. *Oral Biol Res*, 39(2), 120-126.
- Kim HY, Choi JK, Shin IS(2015). Bactericidal effects of hypochlorous acid water against *Vibrio parahaemolyticus* contaminated on raw fish and shellfish. *Korean J Food Sci Technol*, 47(6), 719-724.
- Lee DH(2016). Evaluation of anti-microbial effects of slightly acidic hypochlorous acid produced by a portable electrolysis device. Graduate school of Konkuk University, Republic of Korea, Doctoral dissertation.
- Lee ES, Do KY(2017). Relationship between periodontal disease and chronic kidney disease: A systematic review of cohort studies. *J Dent Hyg Sci*, 17(2), 160-167.
- Lee KH(2016). Health and oral health factors related to hypertension in Korean elderly: Analysis of data from the fifth Korea national health and nutrition examination survey(KNHANES 2014). *J Korean Soc Dent Hyg*, 16(5), 709-716.
- Lee SH, Choi BK(2006). Antibacterial effect of electrolyzed water on oral bacteria. *J Microbiol*, 44(4), 417-422.
- Lee SY, Kim JG, Baik BJ, et al(2009). Antimicrobial effect of essential oils on oral bacteria. *J Korean Acad Pediatr Dent*, 36(1), 1-11.
- Ozaki M, Ohshima T, Mukumoto M, et al(2012). A study for biofilm removing and antimicrobial effects by microbubbled tap water and other functional water, electrolyzed hypochlorite water and ozonated water. *Dent Mater J*, 31(4), 662-668.
- Park SN, Jeong SJ, Jeong MJ, et al(2013). Then effect of commercially available mouth rinsing solution and alkaline ionized water on the oral bacteria. *J Den Hyg Sci*, 13(2), 213-221.
- Park OJ, Kwon YK, Yun CH, et al(2016). Augmented osteoclastogenesis from committed osteoclast precursors by periodontopathic bacteria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology and Biotechnology*, 44(4), 557-562.
- Park YK(2013). Antimicrobial effect of slightly acidic electrolyzed water on oral microorganisms. *J Korean Acad Oral Health*, 37(4), 187-193.
- Son KW, Kwon YH, Park JB, et al(2006). The distribution of red complex of implant sulcus. *J Periodontal Implant*

- Sci, 36(1), 211-221.
- Song JY, Kim NR, Nam MH, et al(2013). Fungicidal effect of slightly acidic hypochlorous water against phytopathogenic fungi. The Korean Journal of Mycology, 41(4), 274-279.
- Won JH, Ha MN(2014). An association of periodontitis and diabetes. J Dent Hyg Sci, 14(2), 107-113.
- Yu KJ, Hwang JH(2017). Study on oral periodontal pathogens distribution and risk factors in college students. J Korean Soc Dent Hyg, 17(1), 77-87.
- You MS, Lee SY, Ma DS(2017). In vitro antimicrobial activity of different mouthwashes available in Korea. J Korean Acad Oral Health, 41(3), 188-193.
- Youn SH, Han JS, Kim AJ(2017). Antioxidant and antibacterial activities of mouthwash prepared with acacia flower, gray salt, and pine resin turpentine. Asian J Beauty Cosmeto, 15(2), 160-168.