

피톤치드 처리 후의 잔존 구강 세균이 *Pr. intermedia*에 미치는 영향

경희대학교 치의학전문대학원 구강내과학교실¹, 경희대학교 구강생물학연구소²

박재봉¹ · 어규식¹ · 전양현¹ · 홍정표^{1,2}

본 연구는 편백 피톤치드에 의해 사멸되지 않는 구강상주균을 분리하고, 이 분리된 세균이 구강 병인균에 대하여 어떠한 영향을 미치는지를 관찰함으로써 편백 피톤치드에 구강 내 세균에 대한 지속적인 이차적 효과를 구명한 실험적 연구이다. 이에 정상인 타액 내의 구강상주균에 1%의 편백 피톤치드를 첨가하여 사멸되지 않고 생존한 200개의 잔존 세균을 분리하고 이들이 치주질환과 구취의 중요한 원인균인 *Pr. intermedia*에 대한 억제효과를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 선택된 200개의 잔존 세균 중, 148개(74.0%)가 *Pr. intermedia*를 억제하였다.
2. 선택한 200개의 잔존 세균은 *Streptococcus salivarius*가 109개(54.5%)로 가장 많이 나타났고, *Streptococcus sanguinis*가 25개(12.5%), *Streptococcus mitis*가 15개(7.5%)로 나타났다.
3. *Pr. intermedia*를 억제하는 148개의 잔존 세균 중, *Streptococcus salivarius*가 85.3%(93/109), *Streptococcus sanguinis*가 64.0%(16/25), *Streptococcus mitis*가 54.3%(8/15), *Streptococcus parasanguinis*가 66.7%(6/9), *Streptococcus alactolyticus*가 100%(8/8)로 나타났다.

따라서 타액 내에서 편백 피톤치드에 저항하는 구강 상주균은 *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis* 등으로 나타났으며, 이는 치주질환을 일으키고 구취를 발생시키는 대표적 균주인 *Pr. intermedia*에 대하여 세균 억제효과를 가지고 있었다.

따라서 피톤치드는 구강 내 유해균을 억제할 수 있고, 잔존하는 구강 상주균과 함께 구강 내 유해균을 억제함으로써 지속적으로 이차적인 효과를 나타냄으로써 치주질환과 구취발생을 예방할 수 있어, 구강 환경 개선을 위한 임상적 근거가 마련될 수 있을 것으로 생각된다.

주제어: 피톤치드, 16S rDNA sequencing, *Pr. intermedia*

I. 서 론

구강 내에 존재하는 많은 세균들은 치주질환의 중요한 원인이 되는데, 이 질환을 예방하거나 진행을 억

제하기 위해서는 치태, 즉 세균을 제거하는 것이 필수적이다. 치태세균을 제거하기 위해서는 칫솔질이나 치실사용 등과 같은 기계적, 물리적인 방법을 사용하거나 항생제나 구강세정제 등을 사용하는 화학적인 방법이 있는데, 현실적으로 칫솔질에 의한 물리적인 치태제거를 재차 강조한다는 것은 새로운 일이 아니며 그리 실효성도 높지 못하고 화학적인 방법만으로 치태세균을 효과적으로 제거하기에는 한계가 있을 것으로 보인다. 그러나 치태의 세균은 타액에 존재하기 때문에 화학제재를 사용하여 타액 내의 병인균을 사멸하거나 활성을 억제시킬 수 있다면 결과적으로 치태를 조절할 수 있게 되기 때문에 물리적 방법과 병행하

교신저자 : 홍정표
서울시 동대문구 회기동 1번지
경희대학교 치의학전문대학원 구강내과학교실, 구강생물학연구소
전화: 02-958-9358
Fax: 02-968-2043
E-mail: unicomfort@khu.ac.kr

원고접수일: 2009-03-23
심사완료일: 2009-04-30

여 화학제제를 적극적으로 사용하는 것이 필요하며 이를 개발하는 것은 매우 중요한 과제가 아닌가 생각한다.

구강세균을 억제하기 위하여 사용되는 화학제제는 대부분 항균 목적으로 사용되는 항생제인데, 항생제는 인체에 위해작용을 일으킬 수 있으며 내성균의 출현 및 균교대증과 같은 부작용을 일으킬 수 있기 때문에 구강감염질환의 예방이나 구강세균의 지속적인 억제를 위한 치료목적으로는 장기간 사용할 수 없다. 또한 항생제 이외의 강력한 화학제제를 구강세정제 내에 포함시켜 사용할 수도 있으나 강력한 만큼 병원균뿐만 아니라 구강 상주균까지도 제거될 가능성도 커지게 된다. 따라서 구강세정제의 용도로 화학제제를 사용할 경우에는 구강환경의 항상성을 유지하기 위한 구강 상주균에 대한 고려가 있어야 하며, 이러한 이유에서 합성 화학제제보다는 구강 상주균을 가능하면 건강하게 유지시킨 채로 병원균만을 억제시킬 수 있는 천연 추출물의 활용이 최근에 대두되고 있는 것이다.^{1,2)}

구강 내에는 약 500여종의 세균이 존재하며,³⁾ 이들 중 대부분은 구강 상주균으로서, 정상 구강점막의 면역기능을 높이고 병원균의 침입과 정착을 방해함으로써 구강의 항상성과 건강을 유지하는 중요한 역할을 하기 때문이다.⁴⁾

수목은 태양의 빛에너지를 이용하여 광합성 작용을 함으로써 이산화탄소와 물로부터 탄수화물을 만들고 산소를 방출하며, 2차적으로 피톤치드와 같은 성분을 생산하여 수목 자신을 보호한다.⁵⁾ 예를 들어, 피톤치드 성분은 다른 식물에 대한 성장저해작용, 곤충이나 동물로부터 줄기나 잎을 보호하기 위한 섭식저해작용, 곤충이나 미생물에 대하여 기피, 유인, 살충작용을 하거나 병원균에 감염되지 않도록 살균작용⁶⁻⁸⁾ 등을 하는 대립화합물질(allelochemical)이다.

이에 의한 작용을 타감(他感)작용 즉 알레로파시(allelopathy)라고 하는데,⁹⁾ 식물 자신에 의하여 배출되는 이러한 유기화합물은 환경조절에 중요한 역할을 하여, 자기 영역 안에서의 다른 생물의 생존을 억제한다.

피톤치드는 깊은 산속에 같은 종류의 나무가 많이 밀집된 지역에서 쉽게 냄새를 통해 접할 수 있으며, wood essential oil¹⁰⁾이라고도 명명되어 지고 있다. 피톤치드의 양은 수종에 따라 차이가 있어, 잡목이나 활엽수보다는 소나무, 잣나무, 편백나무 같은 침엽수에서 훨씬 많이 발생되는데 이러한 식물을 수증기증류하

거나 압축하여 얻는 추출액인 정유(essential oil)가 일상생활에서 주로 사용되고 있다.^{11,12)} 피톤치드는 휘발성 화합물로서 terpene계열이 주성분이며, 이 휘발성분들은 식물 종류에 따라 수십 종에서 많은 것들은 200여 종에 달하며 주성분인 terpene/terpenoid을 비롯하여 phenolics, alkaloid, phenylpropane, acetogenin, steroid 등의 유기화합물로 구성되어 있다.¹¹⁻¹³⁾

이미 다양한 식물에서 추출되는 피톤치드는 여러 가지 미생물에 대하여 광범위한 항균효과가 있는 것으로 보고되고 있다.¹⁴⁻²⁰⁾ 치아우식증이나 치주질환, 기타 구강감염질환의 원인균들에 대한 식물 추출물이나 정유의 항균효과를 관찰하는 연구가 활발히 이루어지면서 이들 질환을 예방하거나 진행을 억제하는 목적으로 사용할 수 있는 항균제 후보 물질들이 지속적으로 보고되고 있으나¹⁹⁻²⁴⁾ 건강한 사람의 구강 상주균의 효과에 대한 연구는 미미한 편이다.

이에 본 논문에서는 정상인의 건강한 타액에 편백 피톤치드를 첨가하고 최후까지 저항하는 세균을 분리함으로써 구강 상주균에 대한 피톤치드의 영향을 관찰하려 하였고, 또한 이들 잔존 미생물이 치주질환과 구취의 중요한 원인균인 *Prevotella intermedia* 에 어떠한 영향을 미치는지를 검색함으로써, 피톤치드의 구강 상주균과 유해균에 대한 상호 관련 효과를 규명하고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

실험재료로는 임의로 선발한 건강한 성인 20명의 전타액(whole saliva)을 채취하여 사용하였으며, 항균 실험에 사용한 피톤치드는 편백나무(*Chamaecyparis obtusa* Sieb. et Zucc.)에서 추출한 정유로서 (주)SH제약에서 구입하여 사용하였다 (SH HINOKITIOL®). 실험에 사용한 균주는 치주질환 시 수직적인 골흡수에 관여하는 치주감염균으로 G(-) 혐기성 병원균인 *Prevotella intermedia*^{25,26)}의 균주 ATCC 25611을 선택하였다. 실험균주를 배양한 액체배지는 Tryptic soy broth (TSB; Difco)에 hemin (5 μ g/ml)과 vitamin K1 (0.2 μ g/ml)을 첨가하여 사용하였으며, 한천배지는 동일한 조성의 액체배지에 1.5% agar-agar와 5% 면양적혈구를 첨가하여 사용하였다.

2. 실험방법

1) 피톤치드 적용 후 전타액 내 생존균 배양

구강질환이 없는 25~30세의 건강한 남자 피검자 20명을 대상으로 타액을 수집하였다. 각 피검자로부터 자연 상태에서의 전타액(whole saliva) 3ml을 채취한 직후 이를 3개의 microcentrifuge tube에 무균적으로 1ml씩 분주하였고, 이 중 1개 tube는 생리식염수에 1:10으로 단계 희석하였다. 그 후 TSB 혈액한천배지에 $10^1 \sim 10^{11}$ 까지 단계 희석된 타액을 $100\mu\text{l}$ 씩 도말한 다음 37°C 에서 혐기적($85\% \text{N}_2$, $10\% \text{CO}_2$, $5\% \text{H}_2$)으로 4~5일간 배양하였다.

나머지 2개의 tube에는 피톤치드를 최종농도 1%가 되도록 각각 첨가하고 1개 tube는 15분, 또 다른 tube는 30분간 37°C 에서 혐기상태로 정치시켰다. 정치 후, 생리식염수에 다시 1:10으로 단계 희석한 다음 $100\mu\text{l}$ 씩 TSB 혈액한천배지에 도말하고, 37°C 에서 혐기적($85\% \text{N}_2$, $10\% \text{CO}_2$, $5\% \text{H}_2$)으로 4~5일 동안 배양하였다.

배양 후 1% 피톤치드에 생존한 타액 세균은 한천배지 상에 집락을 형성하였고 이들 집락 중에서 일부를 선택하여 균동정과 *Pr. intermedia*에 대한 억제효과를 관찰하기 위해 사용하였다. 즉 1% 피톤치드를 30분간 처리하고 나서 피검자의 희석 타액 샘플을 도말하여 10개의 집락이 형성된 배지가 있을 때는 10개 모두를 취하였고, 10개의 집락이 형성되지 않은 경우에는 10개 보다 다소 많은 집락이 형성된 같은 피검자의 배지를 선택하여 이들 집락 중에서 무작위로 10개의 집락을 취하여 실험하였다.

2) 생존 구강상주균의 동정

세균이 성장하면서 생성하는 대사산물 또는 균체 효소의 반응에 의해 GP card 내의 각 well 내부의 형광물질인 4MU (4-Methyl Umbelliferone) 또는 7AMC (7-Amino Methyl Coumarine)의 형광도가 감소 또는 증가하는 원리를 이용한 Vitek Sytem (bioMérieux Vitek Inc., SA, Marcy-I'Etoile, France)을 사용하여 균동정을 시행하였다.

우선, 혈액한천배지에 형성된 집락을 계대배양하여 다른 세균이 오염되지 않은 1개의 순수 집락(pure culture)임을 확인하였다. 적정 시간(18-24시간) 배양된 신선한 집락을 멸균 식염수($0.45\text{-}0.5\% \text{NaCl}$, pH

5.0-7.2)에 부유시켜 MacFarland 표준 탁도0.5가 되도록 균 부유액을 만들었다. 사용할 GP카드를 미리 냉장고에서 꺼내어 실온에 30분간 정치시켰다. 균 부유액과 동정-GP card(ID-GP)를 Vitek Sytem에 장착하고 24시간 후 결과를 확인하였다. 즉, Vitek Sytem의 Fluorescence Optical System은 15분마다 카드를 24시간 reading하여 대사산물 또는 균체 효소반응으로 나타난 형광도를 측정하였고 VITEK2 전용 프로그램은 이 형광도의 측정치를 분석하여 세균을 동정하였다. 동정을 위한 검사항목은 다음과 같았다: D-amygdalin, phosphatidylinositol phospholipase C, D-xylose, arginine dihydrolase 1, b-galactosidase, a-glucosidase, Ala-Phe-Pro acylamidase, cyclo-dextrin, L-aspartate acrylamidase, b-galactopyranosidase, a-mannosidase, phosphatase, leucine acrylamidase, L-proline acrylamidase, b-glucoronidase, a-galactosidase, L-pyrrolidonyl-acrylamidase, b-glucuronidase, tyrosine acrylamidase, D-sorbitol, urease, polymyxin B resistance, D-galactose, D-ribose, L-lactate alkalization, lactose, N-acetyl-D-glucosamine, D-maltose, bacitracin resistance, novobiocin resistance, growth in 6.5% NaCl, D-mannitol, D-mannose, methyl-B-D-glucopyranoside, pullulan, D-raffinose, 0/129 resistance, salicin, saccharose/sucrose, D-trehalose, arginine dihydrolase 2, optochin resistance.

3) Antibacterial effect의 확인

배양된 각 *Pr. intermedia* ATCC 25611을 새로운 TSB 혈액한천배지 상에 거리를 둔 2개의 줄로 접종하였다. 한편 타액 샘플에서 분리한 균주를 TSB 혈액한천배지에 배양한 다음 백금이를 사용하여 각 *Pr. intermedia* 접종선과 직각으로 교차하도록 5개 균주를 적당한 간격으로 접종하였다. 이와 같이 1개 TSB 혈액한천배지 당 총 10개의 분리균주를 접종한 다음 혐기적($85\% \text{N}_2$, $10\% \text{CO}_2$, $5\% \text{H}_2$)으로 48시간 배양하였다. 배양 후 분리균주의 접종선과 교차하는 자리에서 분리균주는 증식하여 뚜렷한 집락을 관찰할 수 있지만 *Pr. intermedia*의 집락은 형성되지 않았을 경우 분리균주는 *Pr. intermedia*에 대한 억제효과가 있는 것으로 판단하였다.

III. 실험결과

1. 피검자별 생존균주의 동정결과

타액에 1% 피톤치드를 처리한 20개의 표본에서 분리된 세균들을 각각 임의로 10개의 집락을 채택하여 동정한 200개의 세균 중 109개(54.5%)가 *Streptococcus salivarius*로 가장 많이 나타났고, *Streptococcus sanguinis*가 25개(12.5%), *Streptococcus mitis*가 15개(7.5%)로 나타났다. 이외에도 *Streptococcus parasanguinis*가 9개(4.0%), *Streptococcus oralis*와

*Streptococcus alactolyticus*가 각각 8개씩(4.0%), *Streptococcus vestibularis*가 7개(3.5%), *Streptococcus sp.*가 4개(2.0%), *Streptococcus cricetus*가 2개(1.0%) 나타났다. 또한 *Kocuria kristinae*, *Kocuria rosea*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus warneri*, *Streptococcus zooepidemicus*, *Streptococcus ovis*, *Streptococcus intermedius*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Gemella (Streptococcus) morbillorum*, *Gardnerella vaginalis* 등이 각각 1개(0.5%)씩 나타났다.(Table 1,2)

Table 1. Distribution of the isolates from the saliva treated with 1% phytoncide

Bacterial species isolated	No. of isolates(%)
<i>Streptococcus salivarius</i>	109(54.5)
<i>Streptococcus sanguinis</i>	25(12.5)
<i>Streptococcus mitis</i>	15(7.5)
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	9(4.0)
<i>Streptococcus oralis</i>	8(4.0)
<i>Streptococcus alactolyticus</i>	8(4.0)
<i>Streptococcus vestibularis</i>	7(3.5)
<i>Streptococcus sp.</i>	4(2.0)
<i>Streptococcus cricetus</i>	2(1.0)
<i>Kocuria kristinae</i>	1(0.5)
<i>Kocuria rosea</i>	1(0.5)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1(0.5)
<i>Staphylococcus simulans</i>	1(0.5)
<i>Staphylococcus warneri</i>	1(0.5)
<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	1(0.5)
<i>Streptococcus ovis</i>	1(0.5)
<i>Streptococcus intermedius</i>	1(0.5)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1(0.5)
<i>Gemella (Streptococcus) morbillorum</i>	1(0.5)
<i>Gardnerella vaginalis</i>	1(0.5)
ND	2(1.0)
	200(100)

ND; not determined

Table 2. Distribution in each subject of bacterial species isolated from the saliva treated with 1% phytoncide

Subjects	Bacterial species isolated	No. of isolates(%)
1	<i>Streptococcus salivarius</i>	5/10(50)
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	3/10(30)
	<i>Streptococcus alactolyticus</i>	2/10(20)
2	<i>Streptococcus salivarius</i>	10/10(100)
3	<i>Streptococcus salivarius</i>	8/10(80)
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	1(10)
	<i>Streptococcus alactolyticus</i>	1(10)
4	<i>Streptococcus salivarius</i>	7/10(70)
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	1/10(20)
	<i>Streptococcus vestibularis</i>	1/10(10)
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1/10(10)
5	<i>Streptococcus salivarius</i>	6/10(60)
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	4/10(40)
6	<i>Streptococcus salivarius</i>	8/10(40)
	<i>Streptococcus vestibularis</i>	2/10(20)
7	<i>Streptococcus mitis</i>	5/10(50)
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	1/10(10)
	<i>Staphylococcus warneri</i>	1/10(10)
	<i>Kocuria (Micrococcus) rosea</i>	1/10(10)
	<i>Streptococcus</i> sp.	1/10(10)
	ND	1/10(10)
8	<i>Streptococcus salivarius</i>	3/10(50)
	<i>Streptococcus vestibularis</i>	2/10(20)
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	2/10(30)
	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	2/10(10)
	<i>Streptococcus alactolyticus</i>	1/10(10)
9	<i>Streptococcus mitis</i>	4/10(40)
	<i>Streptococcus salivarius</i>	2/10(20)
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1/10(10)
	<i>Staphylococcus simulans</i>	1/10(10)
	<i>Streptococcus oralis</i>	1/10(10)
	<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	1/10(10)
10	<i>Streptococcus salivarius</i>	9/10(90)
	<i>Streptococcus</i> sp.	1/10(10)
11	<i>Streptococcus salivarius</i>	8/10(80)
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	2/10(20)

Table 2. Continued

Subjects	Bacterial species isolated	No. of isolates(%)
12	<i>Streptococcus salivarius</i>	9/10(90)
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	1/10(10)
13	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	4/10(40)
	<i>Streptococcus alactolyticus</i>	3/10(30)
	<i>Streptococcus oralis</i>	2/10(10)
	<i>Streptococcus mitis</i>	1/10(10)
14	<i>Streptococcus sanguinis</i>	3/10(30)
	<i>Streptococcus salivarius</i>	3/10(30)
	<i>Streptococcus</i> sp.	2/10(20)
	<i>Streptococcus cricetus</i>	1/10(10)
	ND	1/10(10)
15	<i>Streptococcus salivarius</i>	5/10(40)
	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	3/10(30)
	<i>Streptococcus oralis</i>	1/10(10)
	<i>Streptococcus ovis</i>	1/10(10)
16	<i>Streptococcus salivarius</i>	10/10(100)
17	<i>Streptococcus salivarius</i>	8/10(80)
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	1/10(10)
	<i>Kocuria (Micrococcus) kristinae</i>	1/10(10)
18	<i>Streptococcus sanguinis</i>	4/10(40)
	<i>Streptococcus oralis</i>	1/10(30)
	<i>Streptococcus intermedius</i>	1/10(10)
	<i>Gemella (Streptococcus) morbillorum</i>	1/10(10)
	<i>Streptococcus cricetus</i>	1/10(10)
	<i>Streptococcus salivarius</i>	1/10(10)
	<i>Streptococcus mitis</i>	1/10(10)
19	<i>Streptococcus salivarius</i>	5/10(50)
	<i>Streptococcus vestibularis</i>	2/10(20)
	<i>Streptococcus alactolyticus</i>	1/10(10)
	<i>Streptococcus mitis</i>	1/10(10)
20	<i>Streptococcus sanguinis</i>	1/10(10)
	<i>Streptococcus oralis</i>	3/10(30)
	<i>Streptococcus mitis</i>	3/10(30)
	<i>Streptococcus salivarius</i>	2/10(20)
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	1/10(10)
	<i>Gardnerella vaginalis</i>	1/10(10)

ND; not determined

Table 3. Comparison of bacterial species isolates from phytoncide-treated saliva for *Pr. intermedia*-inhibiting activity

Bacterial species isolated	No. of isolates inhibiting <i>Pr. intermedia</i> (%)
<i>Streptococcus salivarius</i>	93/109(85.3)
<i>Streptococcus sanguinis</i>	16/25(64.0)
<i>Streptococcus mitis</i>	8/15(53.3)
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	6/9(66.7)
<i>Streptococcus oralis</i>	0/8(00.0)
<i>Streptococcus alactolyticus</i>	8/8(100.0)
<i>Streptococcus vestibularis</i>	6/7(85.7)
<i>Streptococcus sp.</i>	4/4(100.0)
<i>Streptococcus cricetus</i>	0/2(00.0)
<i>Kocuria kristinae</i>	1/1(100.0)
<i>Kocuria rosea</i>	0/1(00.0)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1/1(100.0)
<i>Staphylococcus simulans</i>	1/1(100.0)
<i>Staphylococcus warneri</i>	0/1(00.0)
<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	1/1(100.0)
<i>Streptococcus ovis</i>	1/1(100.0)
<i>Streptococcus intermedius</i>	0/1(00.0)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1/1(100.0)
<i>Gemella (Streptococcus) morbillorum</i>	0/1(00.0)
<i>Gardnerella vaginalis</i>	0/1(00.0)
ND	0/2(00.0)
	148/200(74.0)

ND; not determined

2) 생존균주의 *Pr. intermedia*에 대한 억제효과
 선택된 200개의 잔존 세균 중, 148개(74.0%)가 *Pr. intermedia*를 억제하였는데, *Pr. intermedia*를 억제하는 148개의 잔존 세균 중, *Streptococcus salivarius*가 85.3%(93/109), *Streptococcus sanguinis*가 64.0%(16/25), *Streptococcus mitis*가 54.3%(8/15), *Streptococcus parasanguinis*가 66.7%(6/9), *Streptococcus*

*alactolyticus*가 100%(8/8), *Streptococcus vestibularis*가 85.7%(6/7), *Streptococcus sp.*가 100%(4/4), *Kocuria kristinae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus simulans*, *Streptococcus zooepidemicus*, *Streptococcus ovis*, *Leuconostoc mesenteroides*는 모두 100%(1/1)로 나타났다.(Table 3,4)

Table 4. *Pr. intermedia*-inhibiting bacterial isolates from the phytoncide-treated saliva in each subject

Subjects	Bacterial species	No. of isolates inhibiting <i>Pr. intermedia</i> (%)
1	<i>Streptococcus salivarius</i>	5/5(100.0)
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	3/3(100.0)
	<i>Streptococcus alactolyticus</i>	2/2(100.0)
2	<i>Streptococcus salivarius</i>	10/10(100.0)
3	<i>Streptococcus salivarius</i>	5/8 (62.5)
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	1/1(100.0)
	<i>Streptococcus alactolyticus</i>	1/1(100.0)
4	<i>Streptococcus salivarius</i>	7/7 (100.0)
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	1/1 (100.0)
	<i>Streptococcus vestibularis</i>	1/1 (100.0)
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1/1 (100.0)
5	<i>Streptococcus salivarius</i>	5/6 (83.0)
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	3/4 (75.0)
6	<i>Streptococcus salivarius</i>	8/8 (100)
	<i>Streptococcus vestibularis</i>	2/2 (100)
7	<i>Streptococcus mitis</i>	3/5 (60.0)
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	0/1 (0.0)
	<i>Staphylococcus warneri</i>	0/1 (0.0)
	<i>Kocuria (Micrococcus) rosea</i>	0/1 (0.0)
	<i>Streptococcus</i> sp.	1/1 (100)
	ND	0/1 (0.0)
8	<i>Streptococcus salivarius</i>	1/3 (33.3)
	<i>Streptococcus vestibularis</i>	2/2 (100.0)
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	2/2 (100.0)
	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	1/2 (50.0)
	<i>Streptococcus alactolyticus</i>	1/1 (100.0)
9	<i>Streptococcus mitis</i>	4/4 (100.0)
	<i>Streptococcus salivarius</i>	2/2 (100.0)
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1/1 (100.0)
	<i>Staphylococcus simulans</i>	1/1 (100.0)
	<i>Streptococcus oralis</i>	0/1 (0.0)
	<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	1/1 (100.0)
10	<i>Streptococcus salivarius</i>	6/9 (66.7)
	<i>Streptococcus</i> sp.	1/1 (100.0)
11	<i>Streptococcus salivarius</i>	8/8 (100.0)
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	0/2 (0.0)

Table. 4. Continued

Subjects	Bacterial species	No. of isolates inhibiting <i>Pr. intermedia</i> (%)
12	<i>Streptococcus salivarius</i>	7/9 (77.8)
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	1/1 (100.0)
13	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	2/4 (50.0)
	<i>Streptococcus alactolyticus</i>	3/3 (100.0)
	<i>Streptococcus oralis</i>	0/2 (0.0)
	<i>Streptococcus mitis</i>	0/1 (0.0)
14	<i>Streptococcus sanguinis</i>	2/3 (66.7)
	<i>Streptococcus salivarius</i>	3/3 (100.0)
	<i>Streptococcus</i> sp.	2/2 (100.0)
	<i>Streptococcus cricetus</i>	0/1 (0.0)
	ND	0/1 (0.0)
15	<i>Streptococcus salivarius</i>	5/5 (100.0)
	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	3/3 (100.0)
	<i>Streptococcus oralis</i>	0/1 (0.0)
	<i>Streptococcus ovis</i>	1/1 (100.0)
16	<i>Streptococcus salivarius</i>	9/10 (90.0)
	<i>Streptococcus salivarius</i>	8/8 (100.0)
17	<i>Streptococcus sanguinis</i>	1/1 (100.)
	<i>Kocuria (Micrococcus) kristinae</i>	1/1 (100.0)
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	0/4 (0.0)
18	<i>Streptococcus oralis</i>	0/1 (0.0)
	<i>Streptococcus intermedius</i>	0/1 (0.0)
	<i>Gemella (Streptococcus) morbillorum</i>	0/1 (0.0)
	<i>Streptococcus cricetus</i>	0/1 (0.0)
	<i>Streptococcus salivarius</i>	0/1 (0.0)
	<i>Streptococcus mitis</i>	0/1 (0.0)
	<i>Streptococcus salivarius</i>	3/5 (60.0)
19	<i>Streptococcus vestibularis</i>	1/2 (50.0)
	<i>Streptococcus alactolyticus</i>	1/1 (100.0)
	<i>Streptococcus mitis</i>	0/1 (0.0)
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	1/1 (100.0)
	<i>Streptococcus oralis</i>	0/3 (0.0)
20	<i>Streptococcus mitis</i>	1/3 (33.3)
	<i>Streptococcus salivarius</i>	1/2 (50.0)
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	1/1 (100.0)
	<i>Gardnerella vaginalis</i>	0/1 (0.0)

ND; not determined

IV. 총괄 및 고안

타액은 물리적으로 언어, 저작, 연하 운동 시, 윤향 작용을 할 뿐 만아니라 세균, 백혈구, 조직 및 음식물 잔사를 삼킬 수 있게 하여 위장 내에서 세균과 유해물질이 불활성화 되도록 한다.²⁵⁾ 타액 내에는 최소한 500여종의 세균이 있으나 병원성 세균은 소수에 불과하고 세균 중 99%가 무해하다.²⁶⁾ 이들의 대부분은 구강 상주균으로서, 병원성 세균이 구강 내에 정착하는 것을 방해할 뿐만 아니라 면역계의 형성과 건강한 선천성면역반응을 유도하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

그러나 구강 상주균 중 특정 미생물 군이 증식하면 구강 내 질환이 발병하기도 하는데, 대표적인 구강감염성 질환인 치아우식증과 치주질환을 비롯하여 치수 및 치근단 감염, 구강안면 조직 또는 악골 감염 등, 구강 악안면 영역에서 일어나는 대부분의 질환이 입안에 항상 존재하는 미생물에 의하여 감염되는 것이다.²⁵⁾

이러한 유해성 구강 세균에는 mutans streptococci, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, spirochetes, *Candida albicans* 등이 있는데, 이들이 유해균으로 전환되는 데에는, 즉 기회감염(opportunistic infection)을 유발하는 데에는 촉발인자가 관여하고, 이로 인해 유해균이 우세해져 구강질환이 야기된다.¹⁾

성인의 70~80%가 경험하고 있는 성인형(만성) 치주염은 성인에서 가장 빈발하는 질환으로 치아상실을 초래하는 중요한 질환이다. 치주염과 관련된 가장 중요한 세균군을 red complex라고 부르는데, 여기에는 *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* 및 *Treponema denticola*가 포함되고,²⁷⁾ 그 다음으로 중요한 세균군(orange complex)에는 *Fusobacterium nucleatum/periodonticum subspecies*와 *Pr. intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Peptostreptococcus micros*가 포함된다. 본 실험에서는 두 번째 세균군에 해당하는 *Pr. intermedia*를 대상으로 실험하였는데, 그 이유는 *Pr. intermedia*가 red complex에 비해 비교적 관심이 적은 대상이지만, *Pr. intermedia*가 red complex와 마찬가지로 치주염 원인균으로서 중요할 뿐만 아니라 치주조직의 파괴정도가 큰 치주병소일수록 더 많이 출현하는 것으로 보고되고 있기 때문이다.²⁸⁾ 더욱이 최근 연구에 따르면 치태시료 채취, 생균 배양, 균동정의 순서로 이루어지는 고전적인 세균종 출현을 조사방법에서는 *Pr. intermedia*의 치주염 병

소 출현율이 낮게 나타나지만 생균 배양이 필요 없고 고전적인 세균종 출현을 조사방법보다 더 정확하게 균을 정량적으로 측정할 수 있는 quantitative real-time PCR 방법으로 조사하였을 때는 오히려 치주병소에서 치주염과 관련해서는 가장 많이, 가장 의미 있게 증가하는 세균종으로 밝혀지고 있기 때문이다.^{29,30)}

*Pr. intermedia*는 그람음성 혐기성 간균으로 수직적인 치조골흡수에 관여하는 치주감염균으로 *P. gingivalis*와 집합체를 이룬다고 보고되어있다. *Pr. intermedia*는 원래 *Bacteroides* genus(속) 내에 속했으며, 주로 치은열에 서식하는 균으로서, 가끔 치은염이나 입과 관련된 화농성 병소에서도 분리된다. *P. intermedia*는 혈액한천에 배양 시 아포를 형성하지 않고 약 1.25 mm의 둥글고 반투명하며 불룩한 균집락을 형성하고, 2~21일 배양하면 흑색색소를 생성한다. 생화학적으로 lactose는 발효하지 않으나, glucose와 sucrose 발효능이 있고, Indole과 lipase, 전분 가수분해에는 양성이지만 catalase에는 음성이며 6.5%-NaCl이나 20%-bile로 성장이 억제된다. 항생제 vancomycin(5 μ g)과 kanamycin(1000 μ g)에 내성을 보이며 colistin(10 μ g)에 감수성이 있고, 30~50%정도의 균주가 β -lactamase를 생산한다.³¹⁾ 한편 *Pr. intermedia*는 치주인대세포를 자극하여 matrix metalloproteinase-9를 생산하여 치주조직 파괴에 참여한다.³²⁾

다양한 구강감염질환을 예방하거나 치료하기 위해서는 구강 내의 유해균들을 억제하거나 제거할 수 있다면 가능하리라고 생각되는데, 고전적으로는 클로르헥시딘(chlorhexidine)과 같은 화학제재를 사용하기도 한다. 그러나 클로르헥시딘은 세균의 활동을 억제하고 치면에 장시간 작용할 수 있기 때문에 효율적으로 치태를 억제시킬 수는 있으나, 장기간 사용 시 구강 상주균의 균형을 깨뜨리는 부작용을 초래할 수 있어 최근에는 항균물질을 가지고 있는 천연물질들이 주목을 끌고 있다.³³⁾

모든 식물의 추출물은 그 구성 성분의 80%가 항균력을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 피톤치드(phytoncide)는 고등식물이 생산하여 미생물의 생육에 미치는 물질, 즉 항균물질 또는 식물성 살균소로 알려져 있으며,¹⁸⁾ 용어도 '식물'(Phyto)과 '죽이다'(Cide)를 뜻하는 그리스어의 합성어로서, 1930년 레닌그라드 대학의 B.P. Tokin 교수에 의하여 처음으로 명명되었다.³⁴⁾ 식물은 자체의 2차 대사산물을 이용하여 주변의

다른 식물 또는 세균류를 포함한 각종 미생물에 스트레스를 주는데, 이러한 스트레스는 방어기작으로 주변의 식물과 미생물을 억제하여,³⁵⁾ 식물 생존과 적응에 중요한 역할을 하게 된다.³⁶⁾ 이와 같이 식물이 화학물질을 생성하여 주위로 방산함으로써 다른 식물들에게 직, 간접적으로 해를 입히는 것을 알레로파시(allelopathy)라고 하는데,³⁷⁾ 알레로파시 효과에 관여하는 화학물질, 즉 주성분이 terpene이고, 그 외에 phenolics, alkaloid, phenylpropane, acetogenin, steroid 등을 함유한 휘발성(방향성)의 allelochemicals는 증기, 압축, 추출 등의 방법으로 정유(essential oil)의 형태로 정제할 수 있다.¹²⁾

수목별 피톤치드의 양은 활엽수보다는 침엽수에서 훨씬 많이 발생되며, 그 중에서도 소나무와 잣나무, 편백나무에 다량 존재하는 것으로 알려져 있다.³⁴⁾ 편백나무는 측백나무과에 속하는 나무로 일본이 원산지인데, 우리나라의 남부지방에 도입된 후 성공적으로 생육하여 우리의 나무가 된 침엽수로서, 편백 피톤치드는 그 효능이 다른 피톤치드에 비하여 월등한 것으로 알려져 있다.³⁸⁾ 편백나무의 피톤치드의 전신적 효과를 살펴보면 스트레스 완화작용, 강력한 항균작용, 소취작용 및 유해물질의 중화, 진정작용과 쾌적효과, 알레르기 및 피부질환의 개선, 면역기능증대 등이 있다.³⁴⁾

김 등³⁹⁾은 *P. gingivalis*에 대한 편백 피톤치드의 항균효과를 관찰한 결과, *P. gingivalis*는 편백 피톤치드가 0.008%만 존재해도 성장이 억제되며 0.01% 농도면 완전히 사멸되는 것으로 나타났다. 이는 *P. gingivalis* 주변에 산화물질이 축적될 때 이 산화물질의 독성을 중화시켜줄 수 있는 능력이 떨어지기 때문인데, 이런 억제효과가 *P. gingivalis*에 대한 피톤치드의 항균기전의 일부를 설명할 수 있는 것이다. 또한 박 등⁴⁰⁾은 편백 피톤치드를 사용했을 때 입냄새를 제거하는 데 큰 효과가 있다고 발표하였는데, 입냄새는 *P. gingivalis*를 비롯한 다양한 치주질환 원인균 등에 의하여 sulfide가 발생되기 때문에 생기는 것으로 볼 때,⁴¹⁾ 박 등의 연구결과는 피톤치드의 다양한 세균에 대한 항균효과를 암시하는 것이다.

정 등⁴²⁾은 편백 피톤치드를 구강세균에 농도별, 시간별로 처리 한 후 잔존하는 피톤치드에 저항력을 가지고 있는 구강세균들을 16S rRNA sequence로 동정하여 규명하였으며, 이들 잔존세균이 치주질환의 중요한 원인균인 *P. gingivalis*에 대하여 항균효과가 있다는 것을 보고한 바 있는데, 본 연구에서는 편백 피톤치드에 저항력을 가지고 있는 구강세균을 Vitek System

의 Fluorescence Optical System를 이용하여 동정하였다. 치주염의 중요한 원인균이며, 상아세관 내로 침투되지 않거나 침투가 되더라도 그 깊이가 매우 제한되며,⁴³⁾ 치은연하 치태에 비하여 타액 내에 많은 수가 존재하는⁴⁴⁾ *Pr. intermedia*에 대하여 이들 피톤치드에 저항하는 세균들이 억제효과를 가지고 있는지를 in vitro 실험으로 관찰하였다.

타액에 1% 피톤치드를 처리한 20개의 표본에서 분리된 세균들을 각각 임의로 10개의 집락을 채택하여 동정한 200개의 세균 중 109개로 54.5%를 차지하는 *S. salivarius*가 가장 많이 나타났고, *S. sanguinis*가 25개로 12.5%, *S. mitis*가 15개로 7.5% 나타났으며, 이외에도 *S. parasanguinis*, *S. oralis*와 *S. alactolyticus*, *S. vestibularis*, *Streptococcus* sp., *S. cricetus*가 소수 나타났다. 또한 *K. kristinae*, *K. rosea*, *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. warneri*, *S. zooepidemicus*, *S. ovis*, *S. intermedius*, *L. mesenteroides*, *G. morbillorum*, *G. vaginalis*등이 각각 1개씩 나타났다.

타액에 존재하는 세균들은 설배에서 주로 유래되는데 타액과 설배에서 가장 많이 발견되는 구강상주 세균종은 *S. salivarius*이다.⁴⁵⁾ *S. sanguinis* 역시 구강에 존재하는 가장 많은 상주 세균종의 하나이며 *mutans streptococci*나 *lactobacilli*와 다르게 치아가 건전할 수록 더 많이 나타난다.⁴⁶⁾ 본 연구에서 피톤치드 처리 후 타액에 가장 많이 생존하는 세균들도 이 두 세균종에 속하는 것으로 나타났다. 이외에도 피톤치드 처리 후 타액 내에 생존하는 *S. mitis*, *S. parasanguinis*, *S. oralis*, *S. alactolyticus*, *S. vestibularis* 등도 구강에서 자주 발견되는 상주균으로 알려져 있다.⁴⁷⁾ 따라서 피톤치드에 생존하는 세균종은 타액 또는 구강 내에 많이 존재하는 세균의 출현율을 반영하는 것으로 생각되며, 구강 상주 세균들은 구강조직에 유해한 세균들에 대해 억제효과를 발휘함으로써 구강의 건강을 유지하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 판단된다. 피톤치드를 사용했을 때 구강 유해균에 대해서는 강한 항균효과를 보이지만³⁹⁾ 구강 상주 세균에 대해서는 상대적으로 피톤치드의 항균효과가 뚜렷하게 발휘되지 않는다는 사실은 피톤치드를 구강환경친화적으로 사용할 수 있다는 측면에서 매우 임상적으로 유용한 항균제제라고 할 수 있다.

본 논문에서 생존균주의 *Pr. intermedia*에 대한 항균효과는 선택된 200개의 잔존 세균 중, 74.0%인 148개가 *Pr. intermedia*를 억제하였던 것으로 나타났는데, 이는 피톤치드가 1차적으로 타액 내의 구강 병원균을

억제 내지는 살균시키며, 2차적으로도 피톤치드에 저항하는 구강 상주균에 의하여 구강 병인균을 억제시킴으로써 보다 효율적인 항균작용을 하고 있다는 것을 알 수 있었다.

148개의 잔존 세균 중 *Pr. intermedia*를 억제하는 세균은 *S. salivarius*가 가장 많아 109개 중 93개로 85.3%의 살균력을 가지고 있었으며, *S. sanguinis*가 25개 중 16개로 64.0%의 살균력을, *S. alactolyticus*가 8개 중 8개 모두에서 100%의 살균력을, *S. mitis*가 15개 중 8개로 54.3%의 살균력을, *S. parasanguinis*가 9개 중 6개로 66.7%의 살균력을, *S. vestibularis*가 7개 중 6개로 85.7%의 살균력을 보였으며, 수가 그리 많지는 않지만 *Streptococcus* sp.가 4개 모두에서, *K. kristinae*, *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. zooepidemicus*, *S. ovis*, *L. mesenteroides*가 1개씩 모두에서 100%의 살균력을 보였다. 이 또한 피톤치드 처리 후의 잔존 세균이 *Pr. intermedia*를 억제함으로써 피톤치드가 구강 건강, 특히 치주질환을 예방하거나 치료하는데 큰 역할을 할 수 있을 것으로 생각한다.

Morikawa 등⁴⁸⁾은 화농성 치주병원균에 대한 PCR 실험에서 *T. denticola*, *P. gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Pr. intermedia*, *T. forsythia* 등의 5개의 화농성 치주병원균과 *S. sanguinis*와 *S. salivarius*의 두 개의 비치주병성 세균을 대상으로 실험하였는데, 이들 사이의 상관관계에 대해서는 관심의 대상이 되고 있다. 이에 대해 Van Hoogmoed 등⁴⁹⁾이 *S. sanguinis*와 *S. crista*, *S. salivarius*, *S. mitis*, *Actinomyces naeslundii*, *Haemophilus parainfluenzae* 등은 치주 병인균인 *P. gingivalis* ATCC 33277와 *P. intermedia* ATCC 49046, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718에 대한 잠재적인 길항인자로 평가된다고 한 보고와 Lévesque 등⁵⁰⁾의 치주질환과 관련된 세균이 *S. salivarius*과 응결될 수 있는지를 관찰한 실험에서 *S. salivarius*는 *F. nucleatum*과 *P. gingivalis*, *Pr. intermedia*를 응결시키는 것으로 나타났으며, 특히 fimbria가 있는 *S. salivarius*만이 *P. intermedia*와 응결할 수 있었다고 한 보고를 바탕으로 볼 때, 이는 *S. salivarius*의 구조물이 특수한 상호작용을 하고 있다는 것을 암시하고 있을 뿐 만 아니라 본 논문의 결과를 설명할 수 있는 근거가 될 수 있을 것으로 생각한다.

또한 건강한 사람의 건강한 치주조직에서 관찰되는 Gram (+) 종인 *S. mitis*와 *S. sanguinis* (*sanguis*)⁵¹⁾가

본 실험에서 피톤치드에 저항력을 가지며, 이들이 치주병 유발균인 *Pr. intermedia*를 억제한다는 것은 특별한 의미가 있을 것으로 생각된다.

피톤치드로 처리한 타액에 생존하는 세균의 대부분이 구강 상주균이면서 치주질환의 원인균을 억제한다는 것은 생태학적으로 매우 고무적인 일이라 할 수 있으며, 아직 *S. salivarius*가 *P. intermedia*를 억제한다는 발표된 직접적인 연구보고는 없으나, 특히 생존균주 중에서 가장 많이 나타난 *S. salivarius*의 억제효과는 의미 있는 발견이라고 생각된다.

따라서 *S. salivarius*가 구강 상주균이면서 구강 유해균을 억제할 수 있다는 것은 구강건강을 증진시키는 프로바이오틱 목적으로 볼 때 인체에 매우 유익한 방향으로 사용이 가능해 보인다. 숙주에 이롭게 작용하는 세균의 작용을 프로바이오틱 효과라 하는데, 그 예로 *Bifidobacterium lactis*와 *S. thermophilus*는 장기간 사용하더라도 인체에 안전하다는 것이 입증되고 있는 반면,⁵²⁾ *S. salivarius*와 *S. sanguinis*, *S. alactolyticus*, *S. mitis* 등의 세균이 구강에서 프로바이오틱 효과가 있는 것이 증명되지는 않았지만 유산균이 장내에서 이롭게 작용하는 것처럼 이들이 구강 내에서 이롭게 작용한다면, 구강건강과 전신건강을 위해 보존되는 것이 필요하리라고 생각한다. 따라서 편백 피톤치드를 항균목적으로 사용하였을 때 유해 구강세균은 사멸하지만 *S. salivarius* 등의 잔존세균들은 사멸하지 않고, 오히려 생존하는 *P. intermedia*와 같은 유해균을 부가적으로 억제할 수 있기 때문에 편백 피톤치드의 사용은 구강감염질환의 예방과 치료, 예후 관리에 효과적일 것으로 판단된다.

V. 결 론

본 연구는 편백 피톤치드에 의해 사멸되지 않는 구강상주균을 분리하고, 이 분리된 세균이 구강 병인균에 대하여 어떠한 영향을 미치는지를 관찰함으로써 편백 피톤치드에 구강 내 세균에 대한 지속적인 이차적 효과를 구명한 실험적 연구이다. 이에 정상인 타액 내의 구강상주균에 1%의 편백 피톤치드를 첨가하여 사멸되지 않고 생존한 200개의 잔존 세균을 분리하고 이들이 치주질환과 구취의 중요한 원인균인 *Pr. intermedia*에 대한 억제효과를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 선택된 200개의 잔존 세균 중, 148개(74.0%)가 *Pr.*

*intermedia*를 억제하였다.

2. 선택한 200개의 잔존 세균은 *Streptococcus salivarius*가 109개(54.5%)로 가장 많이 나타났고, *Streptococcus sanguinis*가 25개(12.5%), *Streptococcus mitis*가 15개(7.5%)로 나타났다.
3. *Pr. intermedia*를 억제하는 148개의 잔존 세균 중, *Streptococcus salivarius*가 85.3%(93/109), *Streptococcus sanguinis*가 64.0%(16/25), *Streptococcus mitis*가 54.3%(8/15), *Streptococcus parasanguinis*가 66.7%(6/9), *Streptococcus alactolyticus*가 100%(8/8)로 나타났다.

따라서 타액 내에서 편백 피톤치드에 저항하는 구강 상주균은 *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis* 등으로 나타났으며, 이는 치주질환을 일으키고 구취를 발생시키는 대표적 균주인 *Pr. intermedia*에 대하여 세균 억제효과를 가지고 있었다.

따라서 피톤치드는 구강 내 유해균을 억제할 수 있고, 잔존하는 구강 상주균과 함께 구강 내 유해균을 억제함으로써 지속적이고 이차적인 효과를 나타냄으로써 치주질환과 구취발생을 예방할 수 있어, 구강 환경 개선을 위한 임상적 근거가 마련될 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Welsh C. Complementary therapies in hospice care: touch with oils—a pertinent part of holistic care. *Am J hospice Palliat Care* 1997;14(1):42-44.
2. Lis-Balchin M. Essential oils and aromatherapy: their modern role in healing. *J R Soc Health* 1977; 117:324-329.
3. Papanou PN. Population studies of microbial ecology in periodontal health and disease. *Ann Periodontol* 2002;7:54-61.
4. 신금백. Peroxidase System 제제를 이용한 구강건조증의 치료. 타액과 타액선 토론회 1995; 55-58.
5. Muller CH. Allelopathy as a factor in ecological process. *Vegetation* 1969;18:348-357.
6. Gocho S. Antibacterial action of aroma compounds in vapor state. *Int J Antimicrob Agents* 1991;19:329-334.
7. Gocho S. The factors affecting antibacterial action of FDA vapor. *Int J Antimicrob Agents* 1991;19:389-393.
8. 谷田員光克, 大平辰朗. 바이오아스 變換計劃研究報告. 農林水産技術會義 1990;24:36.
9. Rice EL. Allelopathy. 2nd ed., USA, 1984, Academic Press Inc., pp. 79-110.
10. Li Q, Nakadai A, Matsushima H et al. Phytoncides (wood essential oils) induce human natural killer cell activity. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2006;28: 319-333.
11. 강하영, 오종환. 침엽수 침엽 정유의 방향성 이용적성. *임업연보* 1994;49:177-185.
12. 강하영, 이성숙, 최인규. 침엽수 수엽 정유의 항균성에 관한 연구. *한국임산에너지학회지* 1993;13:71-77.
13. Whittaker RH, Feeny PP. Allelochemicals, chemical interactions between species. *Science* 1971;171:757-770.
14. Haagen-Smit AJ. The essential oils. Vol.1, USA, 1960, Van Nostrand company Inc., pp 77-83.
15. 高橋信孝, 丸茂晋吾, 大岳 望. 生理活性天然物化學. 第2版, 日本, 1981, 東京大學出版會, pp 99-116.
16. Rudman P. The causes of natural durability in timber(9), the antifungal activity of heartwood extractives in wood substrate. *Holzforchung* 1962;16:74-77.
17. Rudman P. The causes of natural durability in timber(11), some tests on fungi toxicity of wood extractives and related compounds. *Holzforchung* 1963;17:54-57.
18. 강하영. 수목 추출 성분의 생화학적 역할. *목재공학* 1994;22:5-11.
19. Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, Honma K, Okuda K, Kato T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:61-64.
20. Schoenknecht FD, Sabath LD, Thornsberry C. Susceptibility tests: special tests. In Lennette EH, Balows A, Hausler WJ Jr, Shadomy HJ. *Manual of Clinical Microbiology*. 4th, Washington DC, 1985, American Society for Microbiology, pp1000-1008.
21. Alviano WS, Mendonca-Filho RR, Alviano DS et al. Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20:101-105.
22. Cha JD, Jeong MR, Jeong SI et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Artemisia scoparia* and *A. capillaris*. *Planta Med* 2005;71:186-190.
23. Cha JD, Jeong MR, Choi HJ et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia lavandulaefolia*. *Planta Med* 2005;71:575-577.

24. Chung JY, Choo JH, Lee MH, Hwang JK. Anticariogenic activity of macelignan isolated from *Myristica fragrans* (nutmeg) against *Streptococcus mutans*. *Phytomedicine* 2006;13:261-266.
25. 김각균. 구강질환에 대한 타액의 면역기능. 타액과 타액선 토론회 1995;38-41.
26. Rosan B, Lamont RJ. Dental plaque formation. *Microbes Infect* 2000;2:1599-1607.
27. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998;25:134-144.
28. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 1996;11:266-273
29. Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Savelkoul PHM. The additional value of real-time PCR in the quantitative detection of periodontal pathogens. *J Clin Periodontol* 2006;33:427-433.
30. Boutaga K, Savelkoul PHM, Winkel EG, van Winkelhoff AJ. Comparison of subgingival bacterial sampling with oral lavage for detection and quantification of periodontal pathogens by real-time polymerase chain reaction. *J Periodontol* 2007;78:79-86.
31. 김수성, 해경임. 칫솔후 발생한 *Prevotella intermedia/nigrescens*에 의한 중격동염 대응외지 2000;33:440-444.
32. Guan SM, Shu L, Fu SM, Liu B, Xu XL, Wu JZ. *Prevotella intermedia* induces matrix metalloproteinase-9 expression in human periodontal ligament cells. *FEMS Microbiol Lett.* 2008;283(1):47-53.
33. Cox SD, Mann CM, Marham JL. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Microbiol* 2000;88:170-175.
34. 이종한. 피부감염모낭층에 대한 피톤치드의 역할. 중앙대학교 학위논문 2005:19-21.
35. Lovett JV, Ryuntyu MY, Liu DL. Allelopathy Chemical communication and plant defense. *J Chem Ecol* 1989;15:1193-1202.
36. Patrick ZA. Allelopathy mechanism and their exploitation for biological control. *Anandian J Plant Pathol* 1986;8:225-228.
37. Wink M. Plant breeding, importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Ther Appl Gen* 1988;75:225-233.
38. 강하영. 피톤치드의 비밀. 역사넷 2003:15-20.
39. 김선규, 신미경, 어규식, 이진용, 홍정표, 전양현. *P. gingivalis*에 대한 피톤치드의 항균효과. 대한구강내과학회지 2007;32:137-150.
40. 박재봉, 어규식, 전양현, 이진용, 홍정표. 피톤치드의 입냄새 제거효과. 대한구강내과학회지 2007;32:151-156.
41. Nakano Y, Yoshimura M, Koga T. Methyl mercaptan production by periodontal bacteria. *Int Dent J* 2002;52(Suppl 3):217-220.
42. 정성희, 어규식, 전양현, 홍정표. 피톤치드 처리 후 구강내 잔존 *S. thermophilus*의 *P. gingivalis*에 대한 효과. 대한구강내과학회지 2009;34:계재예정
43. Berkiten M, Okar I, Berkiten R. In vitro study of the penetration of *Streptococcus sanguis* and *Prevotella intermedia* strains into human dentinal tubules. *J Endod.* 2000 Apr;26(4):236-9.
44. Darout IA, Albandar JM, Skaug N. Correlations between bacterial levels in autologous subgingival plaque and saliva of adult Sudanese. *Clin Oral Investig.* 2002 Dec;6(4):210-6.
45. Danser MM, Gomez SM, Van der Weijden GA. Tongue coating and tongue brushing: a literature review. *Int J Dent Hyg* 2003;1:151-158.
46. Ruby J, Barbeau J. The buccale puzzle: The symbiotic nature of endogenous infections of the oral cavity. *Can J Infect Dis* 2002;13:34-41.
47. Facklam R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Microbiol Rev* 2002;15:613-630.
48. Morikawa M, Chiba T, Tomii N et al. Comparative analysis of putative periodontopathic bacteria by multiplex polymerase chain reaction. *J Periodontal Res.* 2008 Jun;43(3):268-74.
49. Van Hoogmoed CG, Geertsema-Doornbusch GI, Teughels W, Quirynen M, Busscher HJ, Van der Mei HC. Reduction of periodontal pathogens adhesion by antagonistic strains. *Oral Microbiol Immunol.* 2008 Feb;23(1):43-8.
50. Lévesque C, Lamothe J, Frenette M. Coaggregation of *Streptococcus salivarius* with periodontopathogens: evidence for involvement of fimbriae in the interaction with *Prevotella intermedia*. *Oral Microbiol Immunol.* 2003 Oct;18(5):333-7.
51. Ali RW, Johannessen AC, Dahlén G, Socransky SS, Skaug N. Comparison of the subgingival microbiota of periodontally healthy and diseased adults in northern Cameroon. *J Clin Periodontol.* 1997 Nov;24(11):830-5.
52. Saavedra JM, Abi-Hanna A, Moore N, Yolken RH. Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: tolerance and safety. *Am J Clin Nutr* 2004;79:261-267.

- ABSTRACT -

Effect of Maintained Microorganisms against to The Phytoncide on *Pr. intermedia*

Jae-Bong Park¹, D.M.D.,M.S.D., Q-Schick Auh¹, D.M.D.,M.S.D.,Ph.D,
Yang-Hyun Chun¹, D.M.D.,M.S.D.,Ph.D., Jung-Pyo Hong^{1,2}, D.M.D.,M.S.D.,Ph.D

Department of Oral Medicine, School of Dentistry, Kyung Hee University¹
Institute of Oral biology, School of Dentistry, Kyung Hee University²

The present study was performed to observe the effect of phytoncide on oral normal microflora and the inhibitory effect of the surviving resident oral bacteria on *Pr. intermedia*. In this study, saliva from each of 20 healthy subjects was treated with 1% phytoncide from Japanese Hinoki (*Chamaecyparis obtusa* Sieb. et Zucc.). Surviving salivary bacteria were isolated on blood agar plates and identified by 16S rDNA sequencing. In order to select inhibitory isolates against *Pr. intermedia*, the isolates from the phytoncide-treated saliva were cultured with *Pr. intermedia*.

The results were as follows:

1. Among the 200 surviving resident oral bacterium, 148(74.0%) bacterium inhibit the growth of *Pr. intermedia* on blood agar plates.
2. The 200 surviving resident oral bacterium were 109 *Streptococcus salivarius*(54.5%), 25 *Streptococcus sanguinis*(12.5%), 15 *Streptococcus mitis*(7.5%).
3. Among the 148 bacteria which inhibit *Pr. intermedia*, *Streptococcus salivarius* was 85.3%(93/109), *Streptococcus sanguinis* was 64.0%(16/25), *Streptococcus mitis* was 54.3%(8/15), *Streptococcus parasanguinis* was 66.7%(6/9), and *Streptococcus Alactolyticus* was 100%(8/8).

Taken together, among the surviving resident oral bacterium, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis* were mainly observed to inhibit *Pr. intermedia*. and they may exert an additional inhibitory activity against the periodontopathic bacterium. Therefore, phytoncide can be used for preventing and ceasing the progress of periodontal disease and halitosis, and thus is expect to promote oral health.

Key words: Phytoncide, 16S rDNA sequencing, *Pr. intermedia*
