

시각적 염색 방법을 이용한 마우스워시의 구강균에 대한 항균효과 확인

박태훈[†] · 조정훈 · 성영은 · 조준철 · 신계호

(주)아모레퍼시픽 기술연구원

(2013년 10월 22일 접수, 2013년 11월 11일 수정, 2013년 12월 24일 채택)

Antimicrobial Effect of Mouthwash against *Streptococcus mutans* by Visual Staining Method

Taehun Park[†], Jeong Hun Cho, Youngeun Sung, Jun-Cheol Cho, and Kyeho Shin

Amorepacific Corporation R&D Center, 314-1 Bora-dong, Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do 446-729, Korea

(Received October 22, 2013; Revised November 11, 2013; Accepted December 24, 2013)

요약: 충치는 사람의 구강질환 중 가장 흔한 질환으로 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)균이 초기 충치를 형성하는데 매우 중요한 역할을 담당한다. *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)는 대표적인 구취 유발균으로 구취 형성에 중요한 휘발성 황화합물을 생성하는데 관여한다. 치주질환은 치은결체조직과 치조골의 파괴를 유발하여 치아의 상실을 초래할 수 있는 만성 염증성 질환으로 *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*)가 원인 균이다. 이번 연구에서는 cetylpyridinium chloride (CPC), sodium fluoride (NaF), 녹차 추출액, 솔잎 추출액을 유효성분으로 하는 마우스워시 제품을 사용하여 *S. mutans* 균을 포함, 구강질환 균으로 널리 알려진 *P. gingivalis*, *P. intermedia* 대해 항균 효과를 확인하고자 하였다. 그 결과 시험균의 경우 *S. mutans*, *P. gingivalis*에 대해 30 s 내에 4.00 Log, 4.68 Log의 사멸력을 확인하였고, *P. intermedia*의 경우 30 s 2.40 Log, 60 s 2.70 Log 사멸력을 확인하였다. 또한 Dentocult SM Strip mutans (SM Strip) 염색방법을 적용하여 *S. mutans* 균의 감소여부를 시각적 자료로 쉽게 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과를 통해 CPC, NaF, 녹차 추출액, 솔잎 추출액을 포함한 마우스워시 제품은 구강균 사멸을 통해 충치 및 구취와 같은 구강질환 예방에 효과가 있을 것으로 기대한다.

Abstract: Dental caries are one of the most common oral diseases and *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) plays an important role in the initiation and progression of dental caries. Oral malodor is primarily the result of microbial metabolism such as *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) that produce volatile sulfur compounds (VSCs), causing oral malodor. *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) is known as typical periodontopathic bacteria, and periodontal disease is chronic inflammatory disease that leads to damage of gingival connective tissue and alveolar bone, eventually loss of teeth. In this study, we investigated antimicrobial effect of mouthwash containing cetylpyridinium chloride (CPC), sodium fluoride (NaF), green tea water extract and pine needles water extract against cariogenic and periodontopathic bacteria such as *S. mutans*, *P. gingivalis* and *P. intermedia*. As a result, the reduction ratios of *S. mutans* and *P. gingivalis* were 4.00 Log and 4.68 Log reduction for 30 s, and *P. intermedia* were 2.40 Log reduction for 30 s and 2.70 Log reduction for 60 s. Dentocult SM Strip mutans (SM Strip) provides easy detection of visual data showing a significant inhibition on *S. mutans*. In conclusion, we expected that mouthwash containing CPC, NaF, green tea water extract and pine needles water extract could help preventing the dental disease like dental caries and oral malodor.

Keywords: Dental caries, Mouthwash, Streptococci mutans, Antimicrobial effect, Dentocult SM Strip mutans

[†] 주 저자 (e-mail: huny802@amorepacific.com)

1. 서 론

충치는 대표적인 감염성 질환 중 하나로 치아에 존재하는 많은 구강세균에 의해 나타난다. *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)는 치아 표면에 형성된 프라그에서 활발히 성장하여 그 개체수를 늘린다. 당질을 영양 공급원으로 대사하여 산을 생성하고 이를 통해 치아를 부식시켜 결국 충치를 발생시킨다[1,2]. 충치가 세균에 의한 것이라는 사실은 germ free animal 실험을 통해 증명되었다. 충치의 원인이 되는 설탕을 많이 주어도 germ free animal의 경우는 충치가 생기지 않기 때문이다[3]. 구강 내에 존재하는 수 많은 미생물 중 충치 유발에 가장 중요한 세균은 *Streptococcus spp.*로 알려져 있고 그중 *S. mutans*가 초기 바이오필름 형성에 관여하여 대표적인 충치균으로 많이 연구되고 있다.

구취는 구강이나 비강을 통해 나오는 악취를 말하며[4] 적어도 50%의 사람들이 만성적인 구취 증상으로 고통 받고 있다. 그들의 절반 정도는 개인의 불편함이나 사회적 난처함과 같은 심각한 문제를 경험하고 있으며 사회생활을 영위하는데 어려움을 호소할 정도로 구취는 중대한 문제점으로 대두되고 있다[5]. 구취의 원인으로 중요한 것은 구강 내 미생물이 타액 또는 조직단백질을 분해하고 아미노산을 분해하는 과정에서 생성되는 암모니아 휘발성 황화합물들이다. *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)는 구취를 유발하는데 중요한 휘발성 황화합물을 생성하는 구강균으로 알려져 있다[6-8].

치주질환은 치은결체조직과 치조골의 파괴를 유발하여 치아의 상실을 초래할 수 있는 만성 염증성 질환이다. 치주 질환의 직접적인 원인은 치은연하에 서식하는 몇몇 그람음성 혐기성 세균이다[9]. *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*)는 성인성 치주염 환자의 치주낭 내에 우세하게 존재하는 치주질환 주요 병원균주 중의 하나이다[10,11].

구강청결제에 많이 사용되는 cetylpyridinium chloride (CPC)의 경우 구강균에 대한 그 효과가 널리 알려져 있고 sodium fluoride (NaF)는 불소막을 형성하여 치아표면을 보호하고 충치를 예방한다고 알려져 있다[12].

이번 연구에서는 CPC와 NaF 외 천연추출물(녹차추출액, 솔잎추출액)을 함유한 마우스위시 제품이 구강

질환의 원인이 되는 *S. mutans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*에 대해 항균력을 나타내는지 확인하고자 하였다. 기존의 미생물 사멸력을 확인하는 방법으로는 plate counting으로 균수를 확인하는 것으로 그쳤으나 Dentocult SM Strip mutans (SM Strip) 염색방법을 적용하여 사멸력에 대한 시각적 효과를 확보하고 마우스위시 제품 사용을 통한 충치와 구취 예방에 대한 효과를 간접적으로 검토하고자 하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. 실험 재료 및 시약

마우스위시는 잇몸 질환 예방 송염 마우스위시(아모레퍼시픽, Korea) (이하 마우스위시)를 사용하여 구강균에 대한 항균력을 평가하였다. 실험에 사용된 마우스위시는 유효성분으로 CPC (Zeeland Chemicals, American Samoa), NaF (Merk, USA), 녹차 추출액 (Bioland, Korea), 솔잎 추출액(Bioland, Korea)을 함유하여 제작하였다(Table 1). 미생물 배양을 위한 배지로서 brain heart infusion (BHI) (Difco, USA), agar (Difco, USA)를 사용하였고, 중화제로 D/E neutralizing broth (Difco, USA)을 구입하여 사용하였다. 그리고 *S. mutans* 염색을 위해 SM strip (Orion Diagnostica, Finland) 제품을 사용하였다. 혐기성균의 배양과 평가는 혐기 조건이 충족된 bactron anaerobic chamber I-2 (Shel Lab, USA) 내에서 진행되었다. 모든 실험 재료 및 시약과 실험자는 멸균 상태를 유지하였다.

2.2. 실험 균주

본 실험에서는 구강질환의 대표적인 충치 원인균, 구취 유발균, 치주질환 유발균을 배양하여 사용하였다. *S. mutans* (KCTC 3065), *P. gingivalis* (KCTC 5352), *P. intermedia* (KCTC 3692) 등 3종을 한국미생물자원센터로부터 분양 받아 사용했으며, 마우스위시의 사멸력 시각화를 위하여서는 *S. mutans*를 사용하였다.

2.3. 유효성분의 항균력 평가

실험에 사용된 마우스위시 내 유효성분의 항균력을 측정하기 위해 최소저해농도 평가법(minimum inhibitory concentration test, MIC test)을 실시하였다. CPC와 NaF는 0.1%, 녹차 추출액과 솔잎 추출액은 8%를 초기 농

Table 1. Formulation of Major Active Ingredients in Mouthwash

Active ingredient	Concentration (%)	
	Test	Control 1
Green tea water extract	0.04	-
Pine needles water extract	0.04	-
CPC	0.05	-
NaF	0.03	-
Flavourings	0.10	0.10
Excipients	10.00	10.00
Methyl paraben	0.10	0.10
DI water	Up to 100%	Up to 100%

도로 96-well plate에 분주하고 이를 1/2 serial dilution 하였다. 실험 균주인 *S. mutans*를 BHI에 접종하여 35 °C에서 24 h 배양한 후 초기 세균 수가 최종 1.0×10^6 CFU/mL이 되도록 조정하여 각 well에 배양균을 접종하고 48 h 동안 35 °C incubator에서 정지 배양하였다. 각 유효성분의 농도별 구강균의 성장을 확인하기 위하여 탁도 육안평가 및 현미경 관찰로 MIC를 결정하였다.

유효성분간 시너지 또는 첨가 효과가 있는지 확인하기 네 가지 성분을 모두 혼합한 용액(혼합 1)과, 항균력이 나타나지 않은 농도의 CPC에 천연추출물을 혼합한 용액(혼합 2)과 항균력이 나타나지 않은 농도의 NaF에 천연추출물을 혼합한 용액(혼합 3)에 대해 MIC를 측정하였다.

2.4. 구강균 사멸력 측정

실험 균주인 *S. mutans*를 BHI에 접종하여 35 °C에서 24 h 배양한 후 초기 세균 수가 최종 1.0×10^6 CFU/mL이 되도록 조정하여 시험에 사용하였다. 제공된 마우스위시 원액을 시험균으로 사용하였고, 마우스위시에 처방된 CPC, NaF, 녹차 추출액, 솔잎 추출액 등의 유효성분 이외에 보존제인 methyl paraben 0.1%에 의하여 구강균 사멸을 유도되는지 확인하기 위하여 상기 유효성분을 처방하지 않은 마우스위시를 대조군 1로, BHI를 대조군 2로 분류하였다. 시험 용액에 준비된 시험 균주를 접종하고 혼합 후 상온에서 30 s, 60 s 간격으로 시험관액을 추출하였고, 각각의 세균 수를 측정하여 초기 세균 수에 대한 세균 감소율을 Log 값으로 확인하였다. 초기 세균 수는 멸균 생리식염수를 시험 균주에 접종한

직후의 세균 수로 간주하였다. 모든 실험의 최초 희석 단계에서는 D/E neutralizing broth를 이용하여 중화시키는 과정을 거쳤으며, 배지에서 균이 증식한 경우, 배지상의 균 수에 희석 배수를 곱하여 최종 균 수를 산출하였다. 배지에서 균이 증식하지 않은 경우는 중화단계에서 고려된 희석 배수를 곱하여 『10 미만(< 10)』으로 표시하였다. 모든 단계의 세균 수 측정은 BHI agar를 사용하였다.

2.5. 균 생존율 및 사멸력 계산

생균 수 계산은 [식1], 세균 감소율은 [식2]에 따라 계산하였다.

[식1] 생균 수(N) = 집락 수 \times 희석액의 희석 배수

[식2] 세균 감소율 = $\text{Log} \frac{A}{B}$

A : 초기 균 수

B : 실험 시간(30 s, 60 s) 후 균 수

2.6. 구강균 사멸력의 시각화

SM strip의 bacitracin disc를 개봉하고, selective culture broth에 15 min 담지하여 *S. mutans*만을 배양할 수 있는 선택 배지를 준비를 하였다. 시험균으로서 마우스위시를, 대조군으로서 BHI broth를 vial에 넣고, *S. mutans* 1×10^6 CFU/mL의 농도가 되도록 접종하였다. 그 후 round-tipped strip을 각 vial에 넣고 1 min 대기 후 bacitracin이 잘 섞이도록 vial을 천천히 흔들어 주고 뚜껑을 닫은 채로 48 h 동안, 35 °C incubator에서 배양하였다. 배양 후 round-tipped strip 표면의 색 변화를

Table 2. Inhibitory Activity of Active Ingredients in Mouthwash against *S. mutans* (NI: No increase)

Active ingredient	MIC (ppm)
	<i>S. mutans</i>
Green tea water extract	20,000
Pine needles water extract	80,000
CPC	7.812
NaF	62.50
Mixture 1	1.953
Mixture 2	NI
Mixture 3	NI

관찰하여 *S. mutans*의 사멸 여부를 육안 관찰하였다.

2.7. 통계

구강균에 대한 마우스워시의 사멸력 평가는 각 4회씩 반복하였고, 관찰 및 계산된 균 수의 Log 값을 통계분석 프로그램인 SPSS 12.0K를 사용하였다. 시험액 처리에 따른 변화를 측정하기 위하여 평균값, 표준오차 등을 계산하였고, 통계 처리는 independent *t*-test를 실시하여 통계적 유의 수준은 1%로 설정(즉 *p*-value < 0.01이면 통계적으로 유의)하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 구강균에 대한 유효성분의 항균력 측정 결과

MIC 평가법을 이용하여 유효성분인 CPC, NaF, 녹차추출액, 솔잎추출액의 *S. mutans*에 대한 항균력은 다음과 같이 Table 2에 나타내었다.

CPC의 경우 7.812 ppm에서 항균력을 확인하였고 NaF는 62.50 ppm, 녹차 추출액은 20000 ppm, 솔잎추출액은 80000 ppm에서 항균력을 확인하였다. 또한 CPC, NaF, 녹차추출액과 솔잎추출액 혼합액에 대해 추가 MIC 평가를 진행하였다. 혼합 1 용액의 경우 *S. mutans*에 대해 1.953 ppm으로 매우 우수한 항균력을 나타내었다. 위 MIC 결과를 바탕으로 항균력을 나타내지 않는 CPC 1.95 ppm에 천연추출물 8000 ppm 첨가한 것을 혼합 2, NaF 15.6 ppm에 천연추출물 8000 ppm 첨가한 용액을 혼합 3 용액으로 설정하여 균 성장 여부를 측정한 결과 두 용액 모두 균 성장이 억제된 것을 확인하였다. 이는 각각의 성분들에 대한 첨가 효과 때문이라 생각된다.

3.2. 구강균에 대한 마우스워시 제품의 사멸력 측정 결과

CPC, NaF, 천연추출물(녹차추출액, 솔잎추출액)을 유효성분으로 하는 마우스워시 제품의 구강질환 균 *S. mutans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*에 대한 사멸력은 Figure 1과 같았다.

시험균은 *S. mutans*에 대해 30 s에서 4.00 Log, 60 s에서 4.18 Log reduction을 보였고, *P. gingivalis*에 대해 30 s에서 4.68 Log, 60 s에서 4.76 Log reduction을 보였다. 또한 *P. intermedia*에 대해 30 s에서 2.40 Log, 60 s에서 2.70 Log reduction을 보였다.

유효성분이 포함되지 않고 methyl paraben 0.1%가 함유된 대조군 1의 경우 *S. mutans*에 대해 30 s에서 0.20 Log, 60 s에서 0.28 Log reduction을 나타내었고, *P. gingivalis*에 대해 30 s에서 0.23 Log, 60 s에서 0.26 Log, *P. intermedia*에서는 30 s에서 0.02 Log, 60 s에서 0.11 Log reduction을 나타내었다.

유효성분과 methyl paraben이 모두 포함되지 않은 대조군 2의 경우 *S. mutans*에 대해 30 s에서 0.06 Log, 60 s에서 0.19 Log reduction을 나타내었고, *P. gingivalis*에 대해 30 s에서 0.07 Log, 60 s에서 0.12 Log, *P. intermedia*에서는 30 s에서 0.02 Log, 60 s에서 0.01 Log reduction을 나타내었다.

대조군 1과 2를 구분하여 평가한 이유는 제품에 함유된 방부제가 균 감소율에 영향을 줄 수 있기 때문이며 대조군 1의 경우 전체적으로 대조군 2에 비해 균 감소율 수치가 낮은 것은 0.1% methyl paraben의 함유 여부에 따른 영향인 것으로 생각된다. 유효성분이 포함된 마우스워시의 경우 대조군 1, 2 대비 *S. mutans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*에 대한 사멸력이 매우 우수한 것을 확인하였다. 일반적으로 구강청결제의 사용

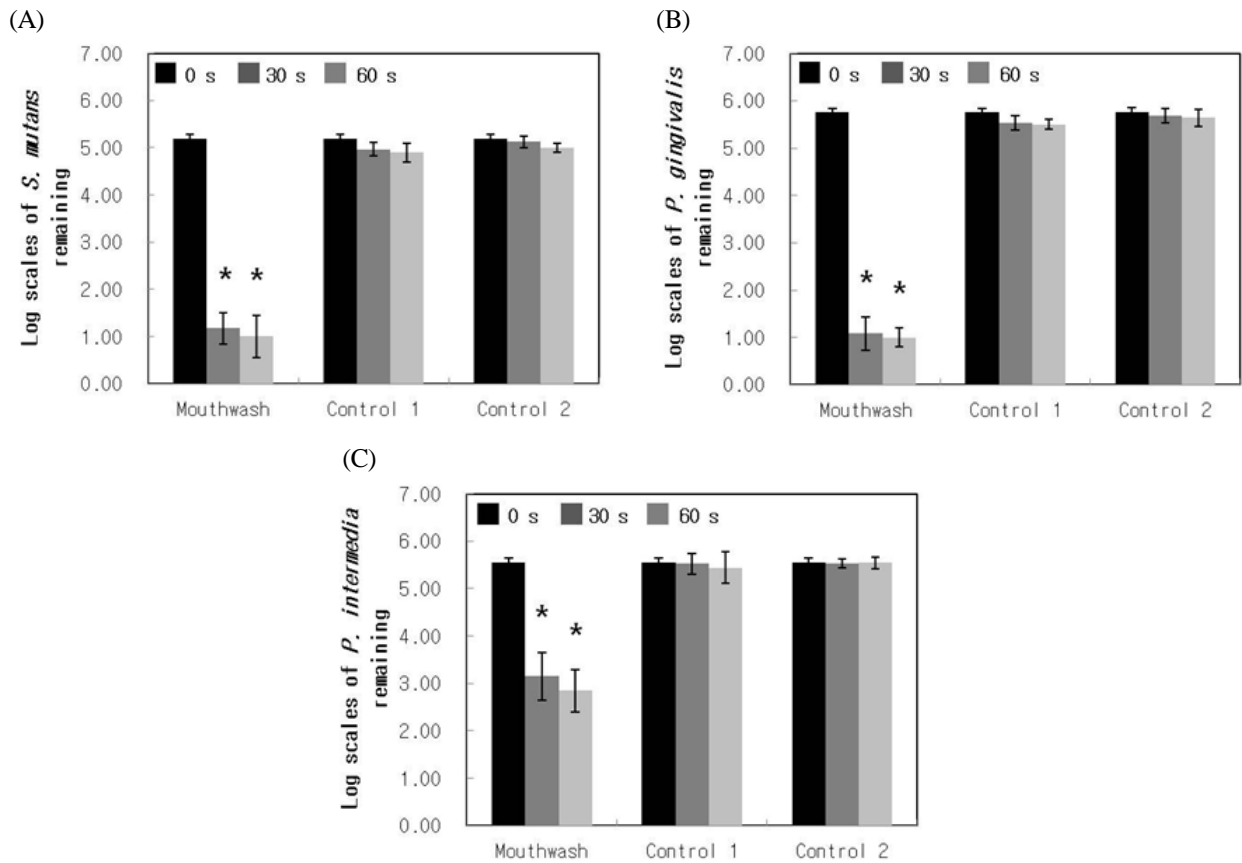


Figure 1. The inhibition activity of mouthwash against (A) *S. mutans*, (B) *P. gingivalis*, (C) *P. intermedia* at the point of 0 s, 30 s and 60 s. Data are expressed as mean \pm S.E., N = 4, * $p < 0.01$.

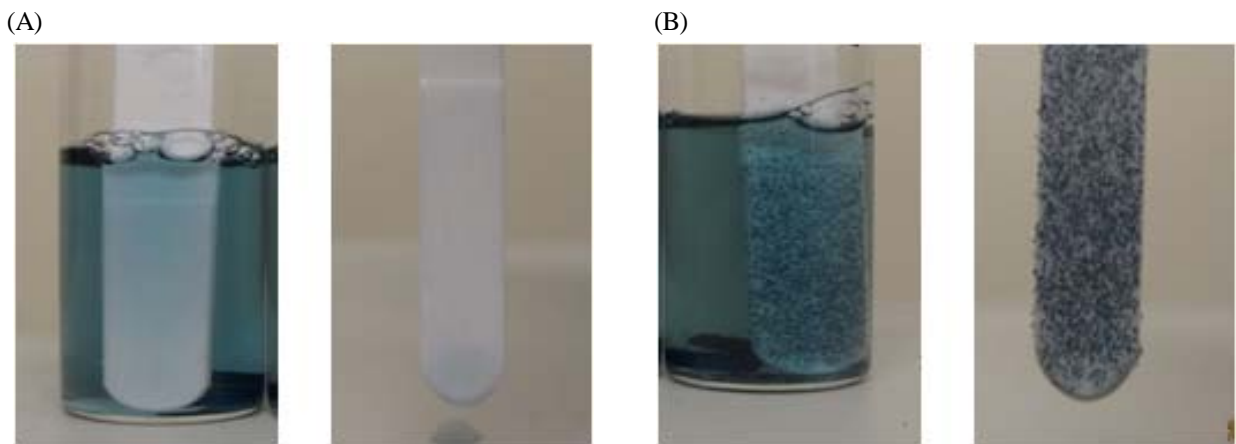


Figure 2. Dentocult[®] SM strip mutans test. Round-tipped strip in selective culture vials during incubator from mouthwash (A), control (B). Each illustration on the right shows round-tipped strip without vials.

시간인 30 s ~ 60 s에서 구강균에 대한 감소를 확인하였기 때문에 제품 사용이 충치, 구취 및 치주질환과

같은 구강질환에 대해 예방 효과가 있을 것으로 기대된다.

3.3. Dentocult SM Strip mutans 염색을 통한 균 감소 확인 결과

SM strip은 평가 strip에 박테리아를 부착 생장시키고 특수 배양액을 통해 선택적 배양을 시킴으로서 쉽고 빠르게 *S. mutans* 변화를 확인할 수 있다. SM strip 염색법을 통해 CPC, NaF, 천연추출물(녹차추출액, 솔잎추출액)을 유효성분으로 하는 마우스위시의 항균력을 Figure 2와 같이 시각적으로 확인하였다.

대조군으로 사용한 BHI 배지에서는 round-tipped strip을 60 s 동안 노출하였을 경우 dark blue spot이 무수히 많이 염색되었다. 하지만, 시험군으로 사용한 마우스위시에서는 동일한 조건으로 노출하였을 때 round-tipped strip에는 아무것도 염색되지 않았다. 이는 대조군과 달리 시험군에서는 염색되지 않을 정도로 *S. mutans*가 사멸한 것을 의미하며 시각적으로 명확히 확인할 수 있었다.

4. 결 론

최근 위생에 대한 사람들의 전반적인 의식수준이 높아지면서 구강청결제품에 대한 관심이 많아지고 시장 또한 점차 성장하고 있다.

충치와 치주질환 및 구취를 예방하기 위한 가장 기본적인 방법은 양치질이다. 하지만 바쁜 생활패턴과 양치질의 경우 칫솔이 닿지 않는 부위가 존재하기 때문에 부가적인 보조방법에 대한 필요성이 제기되었으며 현재 구강청결액과 같은 마우스위시 제품을 활용하여 구강 위생을 케어하고 있다. 본 연구에서는 대표적인 충치 유발균, *S. mutans*, 구취유발균, *P. gingivalis* 그리고 치주질환 균, *P. intermedia*에 대해 평가를 하였으며 구강청결제에 많이 사용하는 CPC와 불소를 포함 천연추출물(녹차추출액, 솔잎추출액) 원료가 함유된 마우스위시 제품을 사용한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

CPC, NaF는 구강균에 대해 매우 우수한 항균력을 가지고 있고 녹차추출액과 솔잎추출액을 첨가할 경우 그 효과가 일정부분 향상되는 것을 확인하였다. 유효성분이 포함된 마우스위시 제품은 *S. mutans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* 세 가지 구강균에 대해 30 s에 4.00 Log reduction 이상의 균 감소율을 나타내어 우수한 사멸력을 확인할 수 있었으며 이는 SM strip 염색법을

통해 시각적으로 재확인 할 수 있었다. 즉, 마우스위시의 사용은 충치와 구취 그리고 치주질환 예방에 효과가 있다는 것을 간접적으로 확인하였다.

Reference

1. N. Hamada and T. Takehara, Virulence factors for *Streptococcus mutans* and dental caries prevention, *J. Dent. Res.*, **63** (1984).
2. W. J. Loesche, J. Rowan, L. H. Straffon, and P. J. Loos, Association of *Streptococcus mutans* with human dental decay, *Infect. Immun.*, **11**, 1252 (1975).
3. G. J. Tortora, B. R. Funke, and C. L. Case, Microbiology: An introduction, ed. Person Education Inc., Benjamin Cummings, Sanfrancisco (2007).
4. J. Tonzetich, Production and origin of oral malodor, A review of mechanisms and methods of analysis, *J. Periodontol.*, **48**, 13 (1997).
5. A. Bosy, Oral Malodor: Philosophical and practical aspects, *J. Can. Dent. Assoc.*, **63**, 196 (1997).
6. Y. Nakano, M. Yoshimura, and T. Koga, Correlation between oral malodor and periodontal bacteria, *Microbes Infect.*, **4**, 679 (2002).
7. L. A. Ximenez-Fyvie, A. D. Haffajee, and S. S. Socransky, Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis, *J. Clin. Periodontol.*, **27**, 648 (2000).
8. R. J. Lamont and H. F. Jenkinson, Life below the gum line: Pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 1244 (1998).
9. J. J. Zambon, Periodontal diseases: microbial factor, *Ann. Periodontol.*, **1**, 879 (1996).
10. J. Slots, L. Bragd, M. Wikstrom, and G. Dahlen, The occurrence of actinobacillus actinomycetemcomitans, bacteroides gingivalis and bacteroides intermedius in destructive periodontal disease in adults, *J. Clin. Periodontol.*, **13**, 570 (1986).

11. A. C. R. Tanner, C. Haffer, G. T. Bratthall, R. A. Visconti, and S. S. Socransky, A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man, *J. Clin. Periodontol.*, **6**, 278 (1979).
12. R. Yates, N. West, M. Addy, and I. Marlow, The effects of a potassium citrate, cetylpyridinium chloride, sodium fluoride mouthrinse on dentine hypersensitivity, plaque and gingivitis, *J. Clin. Periodontol.*, **25**, 813 (1998).