

치과 보철 재료 표면에서 MnO_2 -diatom microbubbler의 세균막 제거 효과 연구: *In vitro* study

이은혁¹ · 서용범² · 권호범¹ · 임영준¹ · 공현준² · 김명주^{1*}

¹서울대학교 치의학대학원 치과보철학교실, ²일리노이대학 화학 및 생물분자공학과

The biofilm removal effect of MnO_2 -diatom microbubbler from the dental prosthetic surfaces: *In vitro* study

Eun-Hyuk Lee¹, Yongbeom Seo², Ho-Bum Kwon¹, Young-Jun Yim¹, Hyunjoon Kong², Myung-Joo Kim^{1*}

¹Department of Prosthodontics, School of Dentistry, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea

²Department of Chemical and Biomolecular Engineering, University of Illinois, Urbana-Champaign, Urbana, IL, USA

Purpose: The aim of this study is to evaluate the effectiveness of MnO_2 -diatom microbubbler (DM) on the surface of prosthetic materials as a mouthwash by comparing the biofilm removal effect with those previously used as a mouthwash in dental clinic. **Materials and methods:** DM was fabricated by doping manganese dioxide nanosheets to the diatom cylinder surface. Scanning electron microscopy (SEM) was used to observe the morphology of DM and to analyze the composition of doped MnO_2 . Stereomicroscope was used to observe the reaction of DM in 3% hydrogen peroxide. Non-precious metal alloys, zirconia and resin specimens were prepared to evaluate the effect of biofilm removal on the surface of prosthetic materials. And then *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis* biofilms were formed on the specimens. When 3% hydrogen peroxide solution and DM were treated on the biofilms, the decontamination effect was compared with chlorhexidine gluconate and 3% hydrogen peroxide solution by crystal violet staining. **Results:** Manganese dioxide was found on the surface of the diatom cylinder, and it was found to produce bubble of oxygen gas when added to 3% hydrogen peroxide. For all materials used in the experiments, biofilms of the DM-treated groups got effectively removed compared to the groups used with chlorhexidine gluconate or 3% hydrogen peroxide alone. **Conclusion:** MnO_2 -diatom microbubbler can remove bacterial membranes on the surface of prosthetic materials more effectively than conventional mouthwashes. (*J Korean Acad Prosthodont* 2020;58:14-22)

Keywords: Dental plaque; Hydrogen peroxide; MnO_2 -diatom microbubbler; Mouthwash; Oral hygiene

서론

구강 위생 관리가 제대로 이루어 지지 않는다면 구강 내에 존재하는 세균들이 치아나 보철물 표면에 침착되어 세균막을 형성하게 되어 치아우식이나 치주질환의 원인이 될 수 있다.¹ 이를 방지하기 위해 적절한 구강 위생 관리와 치태 관리가 필요한데, 기

계적 방법과 화학적 방법으로 분류할 수 있다.^{2,3}

일반적으로 칫솔이나 보조적인 도구를 이용하는 기계적인 치태 관리 방법이 사용되는데, 이러한 치태 관리 방법은 개인 차이가 심하고, 치태의 제거가 불완전하다는 한계가 있어 화학적 치태 관리법을 함께 사용하는 것이 권장된다.^{4,5} 기계적인 방법을 통해 물리적으로 구강 내 세균을 제거하는 것이 가장 기본적인

*Corresponding Author: Myung-Joo Kim

Department of Prosthodontics, School of Dentistry, Seoul National University

101, Daehak-ro, Jongno-gu, Seoul 03080, Republic of Korea

+82 (0)2 2072 2661; e-mail, silk1@snu.ac.kr

Article history: Received September 16, 2019 / Last Revision October 1, 2019 / Accepted October 7, 2019

© 2020 The Korean Academy of Prosthodontics

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

※ This study was supported by grant no 01-2019-0013 from the SNUDH Research Fund.

방법이지만, 이 방법만으로 불충분한 환경과 조건이 있을 수 있기 때문에 구강세정제(mouthwashes)와 같은 화학적 방법을 사용하여 더 나은 효과를 얻을 수 있다.⁶ 따라서 칫솔이나 보조적 도구를 사용하는 방법과 함께 화학적 방법을 부가적으로 사용한다면 치아우식이나 치주 질환과 같은 구강 질환을 더 효과적으로 예방할 수 있다.^{7,8}

구강세정제는 다양한 종류가 소개되어 사용되고 있다. 이 중 클로르헥시딘 글루코네이트(chlorhexidine gluconate)는 1970년대 처음으로 항세균 효과가 있다고 발표된 이래 효과적이고 안정적으로 치태를 제거하는 재료로 현재 가장 일반적으로 사용되는 구강세정제 중 하나이지만,⁹⁻¹² 장기간 사용 시 치아나 연조직의 변색, 미각 이상 등의 부작용을 유발하므로 다른 효과적인 구강세정제의 개발이 필요하다.^{13,14}

최근 재료학 분야에서 MnO_2 -diatom microbubbler (DM)라는 재료가 소개되었는데, 치태 제거 및 구강위생 위치에 대한 해결책이 될 수 있을 것으로 기대되는 특징들을 갖고 있다.¹⁵ 이 재료는 제한된 공간의 세균막을 제거하기 위해 만들어진 미세 입자로, 원통 형태의 규조류 실리카에 이산화망간(MnO_2) 나노 시트를 도핑하여 만들었다. 이렇게 만든 DM을 3% 과산화수소에 일정 농도로 잘 섞은 용액을 세균막이 생성된 부위에 도포하였을 때, 과산화수소에서 DM은 지속적으로 산소 가스 기포를 생성하며 이를 동력으로 하여 스스로 운동성을 가지고 움직이고, 세균막의 세포 외 고분자 물질(Extracellular polymeric substance)을 관통하여 그 안에 미세 기포를 계속 생성하며 세균을 효과적으로 제거할 수 있다고 보고되었다. 폴리디메틸실록산(polydimethylsiloxane) 기질 표면에 *Escherichia coli*를 감염시키고 3% 과산화수소수만으로 처리하였을 때 30분 뒤 약 80% 세균막이 그대로 남아있었으나, 3% 과산화수소수와 DM을 함께 처리하였을 때 모든 세균막이 제거되었다고 보고되었다.

DM은 치과 재료에 대해 세균막 제거 효과가 아직 보고되지 않았고, 이전 논문에서 사용된 세균은 *E. coli*로 구강 질환과 관련성이 떨어진다. 본 연구에서는 DM의 치과 분야의 응용을 위해 치과 보철물 재료로 자주 사용되는 금속, 지르코니아, 레진을 대상으로 치주질환을 유발하는 혐기성 세균인 *Porphyromonas*

*gingivalis*와 치아 우식을 유발하는 호기성 세균인 *Streptococcus mutans*의 세균막을 형성한 뒤 기존에 구강세정제로 사용되어 온 클로르헥시딘 글루코네이트와 3% 과산화수소수, 그리고 새롭게 고안된 DM의 세균막 제거 효과를 비교 분석하였다.

재료 및 방법

이번 연구에서 세균막 제거 효과를 확인하고자 하는 MnO_2 -diatom microbubbler를 제작하기 위해 (3-aminopropyl) triethoxysilane (APTES, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)와 반응하여 아민기로 치환된 규조류 입자를 준비하였다. 온도계, 환류 응축기, N_2 가스관이 장착된 3구 둥근 바닥 플라스크 내에 60 mL의 톨루엔을 담고, 여기에 2 g의 규조류 입자를 넣었다. 증류수 0.6 mL를 혼합물에 첨가하고 실온에서 2시간 동안 섞었다. 이어서, 3.4 mL의 APTES를 혼합물에 첨가하고, 이를 60°C에서 6시간 동안 환류시켰다. 이후 혼합물을 냉각시키고 톨루엔, 2-프로판올 및 증류수로 3회 세척하였다. 이렇게 얻은 샘플을 진공 건조기 내에서 2일 동안 건조시켰다. 마지막으로, 0.1 g의 아민치환 규조류를 1 mL의 50 mM 과망간산칼륨($KMnO_4$, Sigma-Aldrich) 용액에 첨가하고 실온에서 30분 동안 초음파 처리하였다. 이어서, 샘플을 여과하고 증류수 및 에탄올로 3회 세척하였다. 얻어진 샘플은 60°C에서 하루 동안 오븐에서 건조시켰다.

과산화수소수에서 DM의 반응을 시각적으로 보기 위해 실체 현미경(Leica S6D, Leica, Wetzlar, Germany)을 이용하였다. 24-well tissue culture plate에 DM 5 mg을 넣고 증류수 1 mL를 넣어준 대조군과 3% 과산화수소수를 넣은 실험군을 0, 30, 60, 90, 120초에 촬영하여 비교하였다. DM의 주사전자 현미경(SEM) 이미지는 Phenom ProX (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 15kV로 촬영하였다. 실험에 사용된 시편은 직경 10 mm, 두께 2 mm의 원판 형태로 제작하였고 사용한 재료는 지르코니아, 레진, 비귀금속 합금이다. 시편의 디자인은 Meshmixer (Autodesk research, New York, NY, USA)를 이용하였고 (Fig. 1A), 이 소프트웨어를 이용하여 만든 STL 형식의 파일을 이용하여 원판 형태의 시편을 밀링

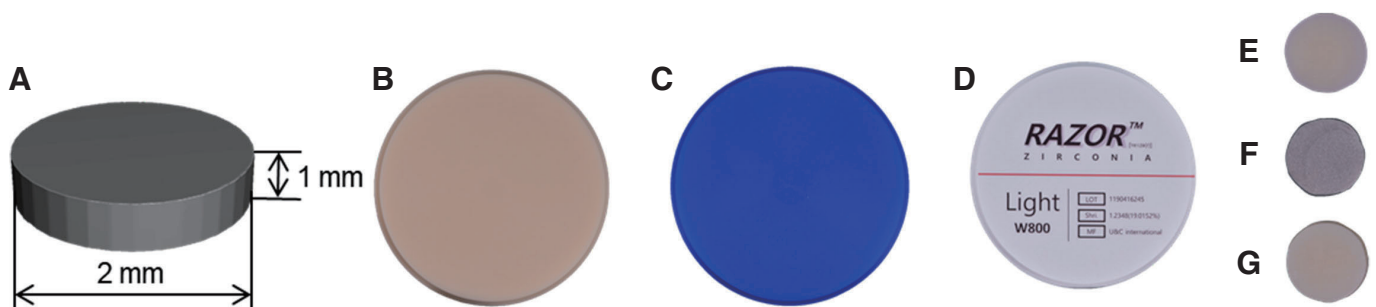


Fig. 1. Disk specimens used in experiments. (A) 3D stl file designed to produce disk shaped specimens, (B) Polymethyl methacrylate block, (C) Casting wax block, (D) Zirconia block, (E) Polymethyl methacrylate disk, (F) Metal disk, (G) Zirconia disk.

기(DEG-5X100, Arum, Frankfurt, Germany)로 제작하였다. 레진 시편은 polymethyl methacrylate (PMMA) 블록(Monolayer PMMA block, Huge, Shanghai, China)을 밀링하여 제작하였고 (Fig. 1B, 1E), 비귀금속 합금 시편은 왁스 블록(Casting wax, Huge, Shanghai, China)을 밀링한 원판형 납형을 매몰 및 주조하여 제작하였다 (Fig. 1C, 1F). 주조에 사용된 금속은 금속도재판 제작에 사용되는 니켈-크롬 합금이었다(Bellabond plus, Bego, Bremen, Germany). 지르코니아 시편은 지르코니아 블록(Razor zirconia, UNC, Seoul, Korea)을 밀링하여 제작하였다 (Fig. 1D, 1G).

시편에 세균막 배양을 용이하게 할 수 있도록 타액으로 시편을 코팅하였다. 식사 및 잇솔질 1시간 30분 후부터 비자극성 타액을 채취하고 원심분리기를 돌린 뒤(10 min, 4°C and 12,000 rpm) 상층액을 남겼다. 이 상층액을 1:1의 비율로 phosphate buffered saline (PBS; pH = 7.4)와 희석하고, 0.2 µm Minisart syringe filter (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Germany)를 이용하여 필터링하였다. 각 시편을 24-well tissue culture plate에 넣고 필터링이 완료된 타액을 300 µL씩 넣어주고 37°C 온도에서 4시간 동안 코팅을 진행하였다.

타액을 코팅한 시편에 *P. gingivalis* (ATCC 33277)와 *S. mutans* (ATCC 25175)를 각각 배양하여 세균막을 형성하였다. 시편 표면에 *P. gingivalis* 세균막을 형성하는 과정은 Sánchez 등이 기술한 방법에 따라 진행하였다.¹⁶ *P. gingivalis*를 5.0 mg/L의 hemin (Sigma, St. Louis, MO, USA)과 5.0 ml/L의 vitamin K (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 포함한 brain-heart infusion (BHI) (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) 배지에서 37°C 온도의 혐기 챔버 내에서 배양하였다(10% H_2 , 10% CO_2 , and balance N_2). *S. mutans*는 Tryptic soy broth (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) 배지에 넣어 37°C 온도의 호기성 환경에서 배양하였다. 37°C에서 4시간 동안 타액을 코팅하고 2 mL의 PBS 용액으로 세척한 24-well tissue culture plate 안에 들어있는 각각의 시편에 1×10^7 colony forming units (CFU)의 세균을 1 mL씩 접종하였다. 이후 이를 *P. gingivalis*는 혐기 챔

버 내에서, *S. mutans*는 호기성 환경에서 48시간 배양하였다. 세균막 배양 후, 1 mL PBS 용액으로 각 시편을 세척한 뒤 새로운 24-well tissue culture plate로 옮겨주었다. 각 시편은 재료별로 5개의 군으로 나눠 실험을 진행하였다. (1) 배지만 포함하고 세균막을 형성하지 않은 군, (2) PBS로 세척한 군 (PBS group, 대조군), (3) 0.12% 클로르헥시딘 글루코네이트 용액을 처리한 군 (CHX group), (4) 3% 과산화수소수를 처리한 군 (H_2O_2 group), (5) 3% 과산화수소수에 5 mg/mL의 DM을 넣어준 군 (H_2O_2 + DM group). 각 시편은 2분간 처리 후 1 mL PBS 용액으로 2회 세척 후 새로운 24-well tissue culture plate로 옮겨주었다.

각 처리 및 세척 후 세균막 제거 효과를 확인하기 위해 시편 표면에 남아있는 세균막을 crystal violet으로 염색하는 실험을 진행하였다. 시편이 들어있는 well에 1% crystal violet (Junsei chemical, Tokyo, Japan) 용액 1 mL를 넣고 빛이 차단된 환경에서 10분간 표면에 남아있는 세균막을 염색하였다. 염색 후 PBS 용액으로 3회 세척하였고, 새로운 24-well tissue culture plate로 옮겨 1 L의 acetone-alcohol (20:80, vol/vol) 용액을 이용해 탈염색하였다. 이 탈염색된 용액의 흡광도를 595 nm 파장에서 Absorbance Microplatereader (Epoch 2, Bio-Tek, Winooski, VT, USA)로 측정하였다.

Crystal violet 세균막 염색 실험을 통해 PBS로 세척한 대조군과 각각의 실험군(CHX, H_2O_2 , H_2O_2 + DM group)의 평균 비교를 위해 one-way ANOVA를 이용하였다. 두 군 사이에서 통계학적으로 유의한 차이가 있는지 여부는 Tukey's test로 검정하였다. 검정에 사용된 프로그램은 Prism 8 (GraphPad, San Diego, CA, USA)이다.

결과

1. MnO_2 -diatom microbubbler의 제작 및 성질

이 실험에 사용된 구조류 입자는 표면에 평균 직경 500 nm의 구멍이 형성되어 있는 속이 빈 원통 형태로, 이 원통은 직경 10 µm, 길이 18 µm였다 (Fig. 2). 먼저 이 구조류 입자는

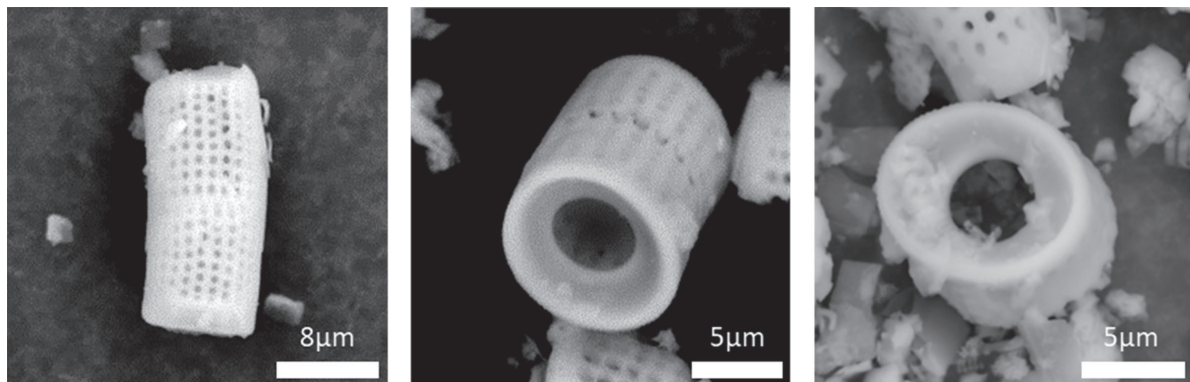


Fig. 2. SEM images of the MnO_2 -diatom microbubblers.

Table 1. Atomic percentages of MnO₂-diatom microbubblers

	DM 1	DM 2	DM 3	Mean \pm SD
Si	17.6	16.1	14.9	16.2 \pm 1.1
Mn	0.9	0.7	0.6	0.7 \pm 0.1
Others	81.6	83.2	84.5	83.1 \pm 1.2

DM 1, DM 2 and DM 3 represent three different MnO₂-diatom microbubblers used for atomic percentage analysis.

(3-aminopropyl) triethoxysilane (APTES)에 의해 활성화 되었고, 과망간산칼륨(KMnO₂)을 환원시켜 아민-치환 구조류에 이산화망간 나노 시트를 도핑 시켰다. 주사전자현미경을 통한 원소 분석 결과를 보면 원통형의 구조류 표면에 망간 성분이 확인되었다 (Table 1).

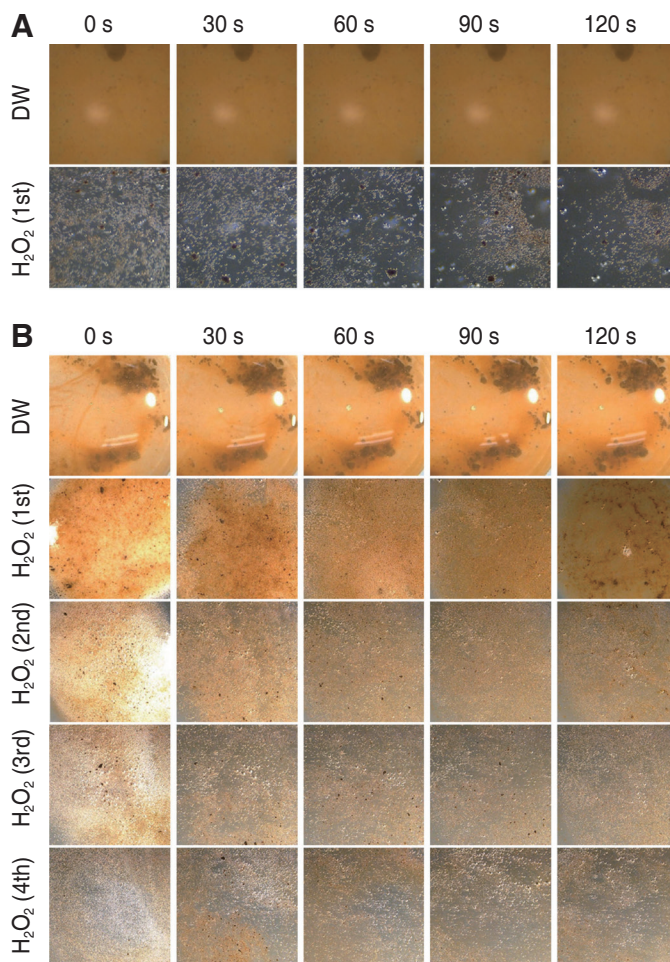


Fig. 3. Time-lapse images of the microbubbles. (A) DMs with distilled water (DW) and 3% H₂O₂ solution (\times 6.3). (B) DMs with DW and H₂O₂ solution in 1st, 2nd, 3rd and 4th cycles at 2 minute intervals (\times 40). Mixing DMs with H₂O₂ solution created a lot of microbubbles at first, but the amount gradually decreased over time. If H₂O₂ solution is added again, microbubbles were generated violently. But the amount decreased as the number of times is repeated.

DM을 증류수에 넣으면 아무런 반응이 일어나지 않지만, 3% 과산화수소수에 넣으면 산소 기체 방울이 만들어지는 것을 볼 수 있다 (Fig. 3A). 반응이 시작되고 시간이 지나면 산소 기체 발생이 줄어들게 된다. 여기에 3% 과산화수소수를 다시 넣어주면 다시 산소 기체 발생이 증가하였다가 시간이 지남에 따라 감소하게 된다 (Fig. 3B). 3% 과산화수소수를 추가로 넣어줄 때마다 산소 기체 발생량이 증가하지만 횟수를 반복할수록 반응이 점점 약해지는 것을 볼 수 있다.

2. 세균막 제거 효과

구강세정제로 기존에 사용되던 CHX와 3% 과산화수소수, 그리고 새롭게 고안한 방법인 DM의 세균막 제거 효과를 알아보기 위해 세균막을 crystal violet으로 염색하여 흡광도를 측정해 그 효과를 비교하는 실험을 진행하였다.

금속, 지르코니아, PMMA 레진 시편에 *P. gingivalis* 세균막을 형성하고 2분간 각각의 처리를 시행하였을 때 CHX group과 H₂O₂ group에서 남아있는 세균막은 PBS로만 세척한 대조군과 비교하여 유의미한 차이가 없었다 (Fig. 4, Table 2). 그러나 DM을 3% 과산화수소수 용액과 함께 처리한 H₂O₂ + DM group에서는 모든 종류의 시편에서 통계적으로 유의미한 세균막 제거 효과를 보였다 (Metal: $P < .05$, Zirconia: $P < .0001$, PMMA: $P < .0001$). 또한 모든 재료에서 3% 과산화수소수와 DM을 함께 처리해준 군이 3% 과산화수소수만 처리해준 군보다 통계적으로 유의미하게 세균막을 많이 제거하였다 (Metal: $P < .01$, Zirconia: $P < .0001$, PMMA: $P < .0001$).

*S. mutans*를 대상으로 한 실험에서도 모든 재료의 시편에서 CHX, H₂O₂를 처리한 실험군의 경우 PBS로 세척한 대조군과 유의미한 차이를 보이지 않았으나 (Fig. 5, Table 3), DM과 3% 과산화수소수를 함께 처리한 경우 대조군과 비교하여 유의미하게 적은 세균막이 남아 있음을 볼 수 있었다 (Metal: $P < .0001$, Zirconia: $P < .0001$, PMMA: $P < .0001$). 그리고 모든 재료에서 3% 과산화수소수와 DM을 함께 처리해준 경우가 3% 과산화수소수만 처리해준 경우보다 세균막이 유의미하게 적게 남아있었다 (Metal: $P < .005$, Zirconia: $P < .0001$, PMMA: $P < .0001$).

고찰

구강건강관리는 저작 능력과 영양섭취, 그리고 전신건강과도 관련이 있기 때문에 개인의 삶의 질에 영향을 주게 된다.^{17,18} 치아우식이나 치주질환 등의 다양한 이유로 치아의 손상이나 상실을 경험하게 된 환자는 구강 내에 보철물을 장착하게 되며, 구강건강관리를 위해 자연치아 뿐만 아니라 이러한 보철물의 치태 관리 역시 중요하다. 보철물의 장착이 치태 지수나 치은 건강 등에 영향을 줄 수 있고,¹⁹ 치태 관리가 잘 이루어지지 못했을 때 보철물 자체의 실패를 증가시키는 원인이 되기도 한다.²⁰ 최근 치과 임상에서 금속, PMMA 레진, 지르코니아 등 다양한 재료가 사용

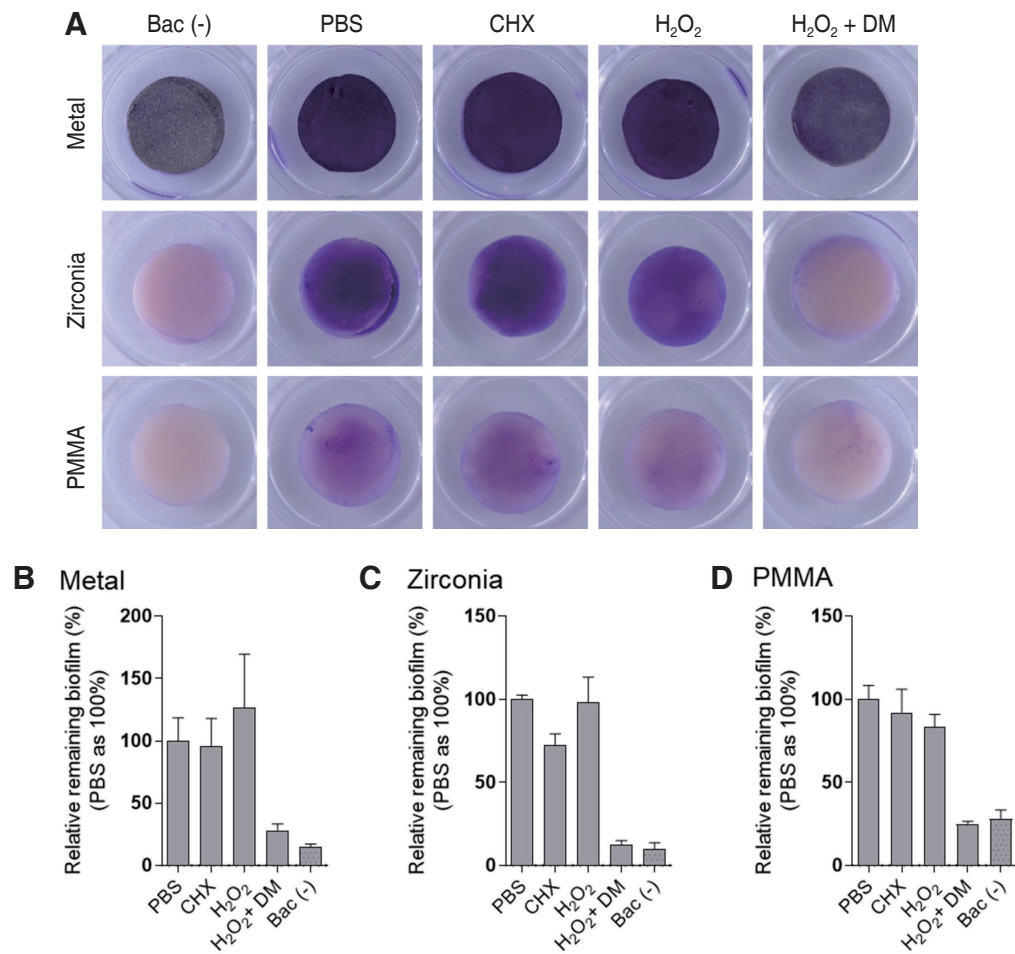


Fig. 4. Biofilm (*P. gingivalis*) removal efficiency experiment. (A) Images of remaining biofilms stained with crystal violet after each treatment for 2 min. (B - D) The amount of remaining biofilms on the disks made of metal, zirconia and PMMA after treatments. In all materials, only $H_2O_2 + DM$ group showed significantly lower amount of remaining biofilm compared to PBS group.

Table 2. Biofilm (*P. gingivalis*) removal efficiency experiment tested by Tukey's multiple comparison test

		Mean Diff.	Significant	Summary	Adjusted <i>P</i> value
Metal	PBS vs. CHX	3.962	No	ns	1.000
	PBS vs. H_2O_2	-26.900	No	ns	.626
	PBS vs. $H_2O_2 + DM$	71.730	Yes	*	.023
	H_2O_2 vs. $H_2O_2 + DM$	98.630	Yes	**	.003
	Bac (-) vs. $H_2O_2 + DM$	-13.110	No	ns	.953
Zirconia	PBS vs. CHX	27.400	Yes	*	.010
	PBS vs. H_2O_2	1.937	No	ns	.998
	PBS vs. $H_2O_2 + DM$	87.690	Yes	****	< .0001
	H_2O_2 vs. $H_2O_2 + DM$	85.750	Yes	****	< .0001
	Bac (-) vs. $H_2O_2 + DM$	-2.272	No	ns	.996
PMMA	PBS vs. CHX	7.830	No	ns	.778
	PBS vs. H_2O_2	16.760	No	ns	.176
	PBS vs. $H_2O_2 + DM$	75.140	Yes	****	< .0001
	H_2O_2 vs. $H_2O_2 + DM$	58.380	Yes	****	< .0001
	Bac (-) vs. $H_2O_2 + DM$	3.228	No	ns	.988

ns: not significant, *: $P < .05$, **: $P < .01$, ***: $P < .005$, ****: $P < .0001$.

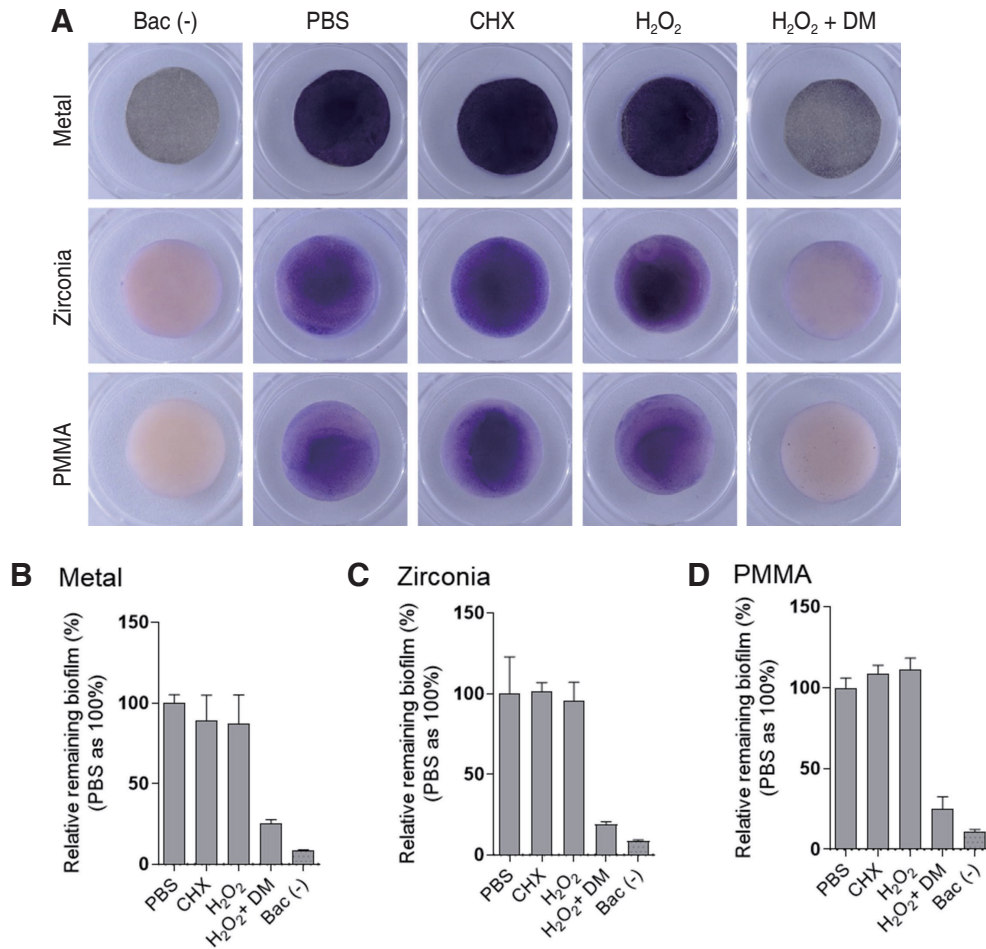


Fig. 5. Biofilm (*S. mutans*) removal efficiency experiment. (A) Images of remaining biofilms stained with crystal violet after each treatment for 2 min. (B - D) The amount of remaining biofilms on the disks made of metal, zirconia and PMMA after treatments. In all materials, only $H_2O_2 + DM$ group showed significantly lower amount of remaining biofilm compared to PBS group.

Table 3. Biofilm (*S. mutans*) removal efficiency experiment tested by Tukey's multiple comparison test

		Mean Diff.	Significant	Summary	Adjusted <i>P</i> value
Metal	PBS vs. CHX	10.930	No	ns	.742
	PBS vs. H_2O_2	12.870	No	ns	.622
	PBS vs. $H_2O_2 + DM$	74.800	Yes	****	< .0001
	H_2O_2 vs. $H_2O_2 + DM$	61.920	Yes	***	.000
	Bac (-) vs. $H_2O_2 + DM$	-16.520	No	ns	.405
Zirconia	PBS vs. CHX	-1.224	No	ns	> .9999
	PBS vs. H_2O_2	4.174	No	ns	.991
	PBS vs. $H_2O_2 + DM$	80.900	Yes	****	< .0001
	H_2O_2 vs. $H_2O_2 + DM$	76.730	Yes	****	< .0001
	Bac (-) vs. $H_2O_2 + DM$	-10.450	No	ns	.805
PMMA	PBS vs. CHX	-8.499	No	ns	.442
	PBS vs. H_2O_2	-11.040	No	ns	.224
	PBS vs. $H_2O_2 + DM$	74.780	Yes	****	< .0001
	H_2O_2 vs. $H_2O_2 + DM$	85.820	Yes	****	< .0001
	Bac (-) vs. $H_2O_2 + DM$	-14.090	No	ns	.088

ns: not significant, *: $P < .05$, **: $P < .01$, ***: $P < .005$, ****: $P < .0001$.

되고 있는데, 각종 재료 표면에 형성된 세균막을 효과적으로 제거할 수 있는 방법에 대한 연구가 환자의 구강건강관리 능력을 높이기 위해 필요하다.

일반적으로 치태를 제거하기 위해 사용되는 방법은 치약을 이용한 칫솔질이다. 그러나 이는 개인의 역량에 영향을 많이 받는다. 실제로 클로르헥시딘 글루코네이트와 같은 구강세정제를 기계적인 방법과 함께 사용한다면 항치태 작용을 높일 수 있고, 치주 건강에도 도움이 된다고 보고되었다.^{21,22}

이번 실험에서 비교군으로 선택된 기존에 사용되던 구강세정제 성분으로 선택된 클로르헥시딘 글루코네이트는 임상에서 흔하게 사용되고 있으며 치태 억제 및 항균 효과를 갖는 것으로 알려져 있다. 국소적인 부작용을 줄이기 위해 0.12% 또는 0.2% 농도가 권장되며,^{10,23} 장기간의 임상실험을 통해 치태와 치은 염증 감소 효과가 확인되었다.²⁴ 또 다른 구강세정제 비교군 성분으로 선택된 과산화수소수는 수산화 라디칼의 생성으로 세균을 죽이는 기능이 있다고 알려져 있다.^{25,26}

한편 화학적인 방법이 세균막의 세균을 제거하는 데에 충분한 효과를 내지 못한다는 지적도 있다. 세균막의 보호작용에 의해 화학적인 약품의 성분이 세균막 내부로 침투하지 못하고, 이로 인해 그 효과가 크게 떨어진다는 것이다.^{27,28} 실제로 이번 연구에서 진행된 실험 결과를 보면 클로르헥시딘 글루코네이트를 처리한 군과 3% 과산화수소수를 처리한 군이 PBS를 처리한 대조군과 비교하였을 때 세균막 제거에 의미있는 효과를 나타내지 못하였다.

하지만 DM을 3% 과산화수소수와 함께 사용한 군은 대조군과 비교하였을 때 남아있는 세균막의 양이 통계적으로 유의미하게 줄어든 것을 볼 수 있었다. 이는 기존의 화학적 약제가 세균막의 방어 작용에 의해 그 내부에 있는 세균에 영향을 미치지 못했던 문제를 해결했기 때문인 것으로 생각해볼 수 있다. 과산화수소가 이산화망간의 촉매작용에 의해 물과 산소 기체를 만들게 되고 이렇게 만들어진 산소 기체가 규조류 표면의 작은 구멍을 통해 원통 내부로 모이게 된다. 원통 내부에 모인 산소 기체가 압력을 형성하게 되고, 결국 산소 기체 방울을 분출하게 되며 규조류 미세 입자는 추진력을 갖고 이동하게 된다. 3% 과산화수소수 내에서 DM의 이동 속도는 $60 \mu\text{m/s}$ 라고 알려져 있다.¹⁵ 이러한 원리로 규조류 미세입자들이 세균막을 침투하게 되고 그 내부에서 계속하여 산소 방울을 분출하며 이동하게 된다. 규조류 미세입자들에 의해 세포 외 고분자 물질이 파괴된 세균막 내부로 과산화수소도 더 잘 침투할 수 있게 되기 때문에 3% 과산화수소수 단독으로 처리한 비교군보다 DM을 3% 과산화수소수와 함께 처리한 군에서 더 효과적으로 세균막을 제거할 수 있었다.

기존의 기계적인 방법은 치질이나 수복물의 손상 없이 좁은 공간에 작용하기 어렵다는 한계가 있었다.²⁹ DM은 좁은 틈에서도 효과적으로 세균막을 제거할 수 있는 것으로 보고되었고,¹⁵ 구강세정제로 활용 시 이러한 문제를 효과적으로 해결할 수 있을 것으로 기대된다. 과산화수소수가 세포에 미치는 영향으로 인해 안전성의 문제를 우려할 수 있다. 물론 고농도의 과산화수소수

를 장시간 구강 내에 적용하는 것은 세포 손상 등 문제를 일으킬 수 있으나, 이번 실험에 사용된 3% 농도의 과산화수소수는 안전하게 구강 내에 적용할 수 있는 농도로 알려져 있다.³⁰

본 실험에 사용된 *S. mutans*는 호기성 세균으로 산성 물질을 통해 치아우식을 유발하는 세균이며,³¹ *P. gingivalis*는 혐기성 세균으로 단백질을 분해하며 치주질환이나 임플란트주위염 등의 원인균이다.^{32,33} 때문에 *P. gingivalis*와 *S. mutans*는 구강세정제의 효과를 검증하는 연구에 자주 사용되어왔고, DM은 이 두 세균 모두에서 다른 기존의 구강세정제에 비해 우수한 세균막 제거 효과를 보였다.^{34,35} 세균막을 형성해주시지 않은 시편과 세균막에 DM과 3% 과산화수소수 혼합 용액을 2분간 처리한 실험군을 비교하였을 때를 보면 *P. gingivalis*와 *S. mutans*에서 모두 통계적으로 유의미한 차이가 없었다 (Table 2, Table 3). 즉 세균막을 형성하지 않은 시편과 비슷한 정도로 효과적인 세균막 제거 효과가 있었다.

이번 연구는 기존에 구강세정제로 사용되지 않았던 새로운 재료인 DM의 효과를 소개하고 그 가능성을 제시하는 것에 목적을 두었다. 실제 구강세정제로 사용되기까지 다양한 농도와 적용 시간에 따른 효과에 대한 추가 실험 및 세포 실험과 동물 실험을 통한 안정성 검증 등이 추후 더 필요할 것으로 생각된다.

결론

속이 빈 원통 형태의 규조류의 이산화망간 나노 시트가 성공적으로 도핑되었음을 확인하였다. 합성된 MnO_2 -diatom microbubblers를 3% 과산화수소수 용액과 함께 처리하였을 때 산소 기체 방울이 생성되었고, 세균막이 형성된 시편에 적용하였을 때 클로르헥시딘 글루코네이트나 과산화수소수에 비해 세균막을 더 효과적으로 제거하였다. 이 재료를 실제 구강세정제로 사용하기 위해서는 적용 농도와 시간에 따른 효과에 대한 추가 연구 및 안정성 검증이 더 필요할 것이다.

ORCID

Eun-Hyuk Lee <https://orcid.org/0000-0002-7018-7072>
 Ho-Beom Kwon <https://orcid.org/0000-0003-4973-7727>
 Young-Jun Lim <https://orcid.org/0000-0003-2504-9671>
 Hyunjoon Kong <https://orcid.org/0000-0003-4680-2968>
 Myung-Joo Kim <https://orcid.org/0000-0003-2020-5284>

References

1. Thomas JG, Nakaishi LA. Managing the complexity of a dynamic biofilm. J Am Dent Assoc 2006;137:10S-15S.
2. Slots J. Subgingival microflora and periodontal disease. J Clin Periodontol 1979;6:351-82.
3. Axelsson P, Lindhe J. The effect of a preventive programme

- on dental plaque, gingivitis and caries in schoolchildren. Results after one and two years. *J Clin Periodontol* 1974;1:126-38.
4. McKendrick AJ, Barbenel MH, McHugh WD. The influence of time of examination, eating, smoking and frequency of brushing on the oral debris index. *J Periodontal Res* 1970;5:205-7.
 5. Binney A, Addy M, Newcombe RG. The effect of a number of commercial mouthrinses compared with toothpaste on plaque regrowth. *J Periodontol* 1992;63:839-42.
 6. Wu CD, Savitt ED. Evaluation of the safety and efficacy of over-the-counter oral hygiene products for the reduction and control of plaque and gingivitis. *Periodontol* 2000 2002;28:91-105.
 7. Gunsolley JC. Clinical efficacy of antimicrobial mouthrinses. *J Dent* 2010;38:S6-10.
 8. Barnett ML. The role of therapeutic antimicrobial mouthrinses in clinical practice: control of supragingival plaque and gingivitis. *J Am Dent Assoc* 2003;134:699-704.
 9. Loe H, Schiott CR. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *J Periodontal Res* 1970;5:79-83.
 10. Addy M, Jenkins S, Newcombe R. The effect of some chlorhexidine-containing mouthrinses on salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1991;18:90-3.
 11. Grossman E, Meckel AH, Isaacs RL, Ferretti GA, Sturzenberger OP, Bollmer BW, Moore DJ, Lijana RC, Manhart MD. A clinical comparison of antibacterial mouthrinses: effects of chlorhexidine, phenolics, and sanguinarine on dental plaque and gingivitis. *J Periodontol* 1989;60:435-40.
 12. Santos A. Evidence-based control of plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol* 2003;30:13-6.
 13. Scheie AA. Modes of action of currently known chemical antiplaque agents other than chlorhexidine. *J Dent Res* 1989;68:1609-16.
 14. Haskel E, Esquenasi J, Yussim L. Effects of subgingival chlorhexidine irrigation in chronic moderate periodontitis. *J Periodontol* 1986;57:305-10.
 15. Seo Y, Leong J, Park JD, Hong YT, Chu SH, Park C, Kim DH, Deng YH, Dushnov V, Soh J, Rogers S, Yang YY, Kong HJ. Diatom microbubbler for active biofilm removal in confined spaces. *ACS Appl Mater Interfaces* 2018;10:35685-92.
 16. Sánchez MC, Llama-Palacios A, Blanc V, León R, Herrera D, Sanz M. Structure, viability and bacterial kinetics of an *in vitro* biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota. *J Periodontal Res* 2011;46:252-60.
 17. Richmond S, Chestnutt I, Shennan J, Brown R. The relationship of medical and dental factors to perceived general and dental health. *Community Dent Oral Epidemiol* 2007;35:89-97.
 18. Locker D, Matear D, Lawrence H. General health status and changes in chewing ability in older Canadians over seven years. *J Public Health Dent* 2002;62:70-7.
 19. Valderhaug J, Birkeland JM. Periodontal conditions in patients 5 years following insertion of fixed prostheses. Pocket depth and loss of attachment. *J Oral Rehabil* 1976;3:237-43.
 20. Yoon JH, Park YB, Oh NS. Analysis of longevity and success rate of fixed, removable, and implant prostheses treated in Korea. *J Korean Acad Prosthodont* 2018;56:95-104.
 21. Mandel ID. Chemotherapeutic agents for controlling plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol* 1988;15:488-98.
 22. Chaves ES, Kornman KS, Manwell MA, Jones AA, Newbold DA, Wood RC. Mechanism of irrigation effects on gingivitis. *J Periodontol* 1994;65:1016-21.
 23. Segreto VA, Collins EM, Beiswanger BB, de La Rosa M, Isaacs RL, Lang NP, Mallatt ME, Meckel AH. A comparison of mouthrinses containing two concentrations of chlorhexidine. *J Periodontal Res* 1986;21:23-32.
 24. Grossman E, Reiter G, Sturzenberger OP, De La Rosa M, Dickinson TD, Flrretti GA, Ludlam GE, Meckel AH. Six-month study of the effects of a chlorhexidine mouthrinse on gingivitis in adults. *J Periodontal Res* 1986;21:33-43.
 25. Badwey JA, Karnovsky ML. Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. *Annu Rev Biochem* 1980;49:695-726.
 26. Clifford DP, Repine JE. Hydrogen peroxide mediated killing of bacteria. *Mol Cell Biochem* 1982;49:143-9.
 27. Brown MR, Gilbert P. Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. *J Appl Bacteriol* 1993;74:87S-97S.
 28. Dostie S, Alkadi LT, Owen G, Bi J, Shen Y, Haapasalo M, Larjava HS. Chemotherapeutic decontamination of dental implants colonized by mature multispecies oral biofilm. *J Clin Periodontol* 2017;44:403-9.
 29. Ikai H, Nakamura K, Shirato M, Kanno T, Iwasawa A, Sasaki K, Niwano Y, Kohno M. Photolysis of hydrogen peroxide, an effective disinfection system via hydroxyl radical formation. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:5086-91.
 30. Wennström JL, Heijl L, Dahlén G, Gröndahl K. Periodic subgingival antimicrobial irrigation of periodontal pockets (I). Clinical observations. *J Clin Periodontol* 1987;14:541-50.
 31. Featherstone JD. The science and practice of caries prevention. *J Am Dent Assoc* 2000;131:887-99.
 32. Mombelli A. Microbiology and antimicrobial therapy of peri-implantitis. *Periodontol* 2000 2002;28:177-89.
 33. Potempa J, Sroka A, Imamura T, Travis J. Gingipains, the major cysteine proteinases and virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*: structure, function and assembly of multidomain protein complexes. *Curr Protein Pept Sci* 2003;4:397-407.
 34. Ahrari F, Eslami N, Rajabi O, Ghazvini K, Barati S. The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* to colloidal solutions of different nanoparticles applied as mouthwashes. *Dent Res J (Isfahan)* 2015;12:44-9.
 35. Zahradnik RT, Magnusson I, Walker C, McDonnell E, Hillman CH, Hillman JD. Preliminary assessment of safety and effectiveness in humans of ProBiora3, a probiotic mouthwash. *J Appl Microbiol* 2009;107:682-90.

치과 보철 재료 표면에서 MnO_2 -diatom microbubbler의 세균막 제거 효과 연구: *In vitro* study

이은혁¹ · 서용범² · 권호범¹ · 임영준¹ · 공현준² · 김명주^{1*}

¹서울대학교 치의학대학원 치과보철학교실, ²일리노이대학 화학 및 생물분자공학과

목적: 본 연구의 목적은 보철 재료 표면에서 MnO_2 -diatom microbubbler (DM)의 세균막 제거 효과를 기존에 치과 임상에 구강세정제로 사용되고 있는 성분들과 비교하여 이 재료가 구강세정제로 사용될 수 있는 가능성을 평가하는 것이다.

재료 및 방법: 이산화망간 나노 시트가 도핑된 DM을 만들었고, 주사전자현미경(SEM)을 이용하여 형태에 대한 관찰 및 도핑된 MnO_2 의 성분 분석을 시행하였다. 3% 과산화수소수에서 DM의 반응을 시간에 따라 관찰하기 위해 실체 현미경을 이용하였다. 보철 재료 표면의 세균막 제거 효과를 평가하기 위해 비귀금속 합금, 지르코니아, 레진 시편을 제작하였고 치아우식의 원인균이며 호기성 세균인 *Streptococcus mutans*와 치주질환의 원인균이며 혐기성 세균인 *Porphyromonas gingivalis* 세균막을 각각 형성하였다. 형성된 세균막에 3% 과산화수소수와 DM을 처리하였을 때 세균막 제거 효과를 클로르헥시딘 글루코네이트와 3% 과산화수소수의 경우와 crystal violet 염색 실험을 통해 비교 평가하였다.

결과: 속이 빈 원통 형태의 구조물에 이산화망간 성분이 발견되었고, 3% 과산화수소수에서 기체를 만들어내는 것을 확인할 수 있었다. 실험에 이용된 모든 재료에서 DM을 처리한 군이 클로르헥시딘 글루코네이트나 3% 과산화수소수 단독으로 사용한 군에 비해 통계적으로 유의하게 세균막을 효과적으로 제거하였다.

결론: MnO_2 -diatom microbubbler는 보철 재료 표면의 세균막을 기존의 구강세정제 성분에 비해 더 효과적으로 제거할 수 있다. (*대한치과보철학회지* 2020;58:14-22)

주요단어: 치태; 과산화수소; MnO_2 -diatom microbubbler; 구강세정제; 구강위생

*교신저자: 김명주

03080 서울 종로구 대학로 101 서울대학교 치의학대학원 치과보철학교실

02 2072 2661: e-mail, silk1@snu.ac.kr

원고접수일: 2019년 9월 16일 / 원고최종수정일: 2019년 10월 1일 / 원고채택일: 2019년 10월 7일

© 2020 대한치과보철학회

CC 이 글은 크리에이티브 커먼즈 코리아 저작자표시-비영리 4.0 대한민국 라이선스에 따라 이용하실 수 있습니다.

※ 이 논문은 서울대학교치과병원 원내연구과제 연구비 지원에 의해 이루어진 것(과제번호01-2019-0013)임.