

치근관 내 편성 혐기성 세균에 대한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 항균효과

이원주 · 박호원 · 신일식* · 이주현 · 서현우

강릉대학교 치과대학 소아치과학교실, 구강과학연구소, *강릉대학교 해양생명공학부 식품미생물학교실

국문초록

치근단 감염 시 물리적인 작용으로 증상이 완화되지 않을 때, 근관 내 세균을 제거하기 위해 항균성을 지닌 소독제나 세척제가 필요하다. 천연항균제에 대한 관심이 증가하면서 여러 연구들에 의해 고추냉이 추출물의 구성 성분 중 하나인 allyl isothiocyanate에 대한 항균성이 밝혀졌다.

이에 본 연구에서는 근관내 감염시 자주 발견되는 세균들 중 편성혐기성 세균인 *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella nigrescence*, 그리고 항생제에 내성이 커서 항균 작용 실험 시 대조군으로 자주 사용되는 *Clostridium perfringens*에 대한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 항균효과를 알아보고, 대표적인 항균제인 클로르헥시딘과 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 본 연구에 사용된 3종의 편성 혐기성 세균에 대한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 최소 억제 농도는 평균 87-470 ppm, 최소 살균 농도는 평균 156-625 ppm으로 *F. nucleatum*에 대해 가장 강한 항균효과를 나타내었으며, 항균제에 저항성이 큰 *C. perfringens*에도 항균효과를 나타내었다.
2. 본 연구에 사용된 3종의 편성 혐기성 세균에 대한 클로르헥시딘의 최소억제 농도는 평균 3.12-6.25 ppm, 최소 살균 농도는 평균 10.94 ppm이었다.
3. 서양산 고추냉이 뿌리 추출물은 87-470 ppm의 농도에서 3.12-6.25 ppm의 클로르헥시딘과 비슷한 세균성장 억제 효과를 가지며 156-625 ppm의 서양산 고추냉이 뿌리 추출물은 10.94 ppm의 클로르헥시딘과 비슷한 살균 효과를 보였다.

주요어 : 고추냉이, 천연 추출물, Allyl isothiocyanate(AIT), 편성 혐기성 세균, 클로르헥시딘, 항균 효과

I. 서 론

치근단 병소를 일으키는 치수 질환의 발생에는 미생물이 중요한 역할을 하며, 대부분의 근관 감염은 혼합 감염으로 감염 진행 경과에 따라 세균 분포의 변화는 일정한 양상을 나타낸다¹⁾. 즉 감염 초기에는 통성 세균인 streptococci나 enterococci등이 주로 나타나지만 치수가 괴사되면 근관이 혐기적으로 변하며 치근단 부위에서는 혐기성 세균이 크게 증가한다²⁾. 괴사된 치수 조직 내에는 혐기성 세균이 전체 배양 분리균의 70-95%를 차지한다고 한다. 이들 혐기성 세균은 악취, 동통, 누공을 형성하기도 하며 지속적인 임상 증상이 있는 경우 만성 치근단 질환을 악화시키기도 한다³⁾.

근관 내 존재하는 여러 세균들 중에서 몇몇 종들은 치근단 염증과 골 파괴를 일으키는데 특히, *Prevotella sp.*, *Porphyromonas*

sp., *Fusobacterium sp.* 및 *Peptostrepto-coccus sp.*는 치근단 병소와 아주 밀접한 관련이 있다⁴⁾.

Chu 등⁵⁾은 치근단에 병소가 있는 근관 내에서 치수 노출의 유무에 따라 미생물을 분리하였는데 *Prevotella sp.*는 치수가 노출된 근관 내에서 유의성 있게 더 많았으며 *Fusobacterium nucleatum*과 *Propionibacterium acne*는 치수가 노출되지 않은 근관에서 유의성 있게 더 많이 검출되었다. 김 등⁶⁾의 연구에 의하면 감염 근관에서 *P. nigrescens*의 이환율은 33.3%였지만, 동통, 종창, 누공 등의 임상 증상이 있는 곳에서는 50.0%의 이환율을 보였다. Gomes 등⁷⁾은 감염 근관 내 세균 분포에 관한 연구에서 동통이나 동통의 기왕력이 있거나 타진 반응과 같은 급성 증상이 그림 혐기성 세균 종들과 관련이 있으며, 특히 *Prevotella sp.*, *Porphyromonas sp.*, *Fusobacterium sp.* 등이 많은 관련성을 나타낸다고 하였다.

교신저자 : 박 호 원

강원도 강릉시 지변동 123번지 / 강릉대학교 치과대학 소아청소년치과학교실 033-640-3157 / pedo@kangnung.ac.kr

원고접수일: 2008년 11월 10일 / 원고최종수정일: 2009년 02월 11일 / 원고채택일: 2009년 03월 06일

감염된 치근관을 치료하는데 일차적인 목표는 근관 내 존재하는 여러 세균들을 제거하는 것이다. 근관내 세균은 주로 신경치료 시 사용되는 파일의 물리적인 작용과 여러 가지 근관 세척제에 의해 그 수가 감소된다. 그러나 일반적인 치료로 감염이 사라지지 않거나 동통이나 근관 내 지속적인 삼출이 일어날 때는 근관 내 세균을 없애기 위해 항균성을 지닌 제제가 필요하다⁸⁾.

1980년대 중반까지, camphorated paramonochlorophenol이나 formocresol 같은 강한 근관 내 소독제가 널리 사용되었으나 이들은 결합 조직에 해로운 효과를 보였고⁹⁾, calcium hydroxide는 우수한 생물학적 항균 작용을 나타내어, 감염 근관 내 약제로는 최근까지 calcium hydroxide가 선택되고 있다¹⁰⁾. 그러나 항균력에 관한 연구에서 calcium hydroxide가 일부 세균에서는 그 효과가 감소된다고 하였으며, 단기간 적용 시에는 효과가 없다고 한다¹¹⁾.

가장 널리 쓰이는 근관 세척제로 Sodium hypochlorite (NaOCl)가 있다. NaOCl은 수십 년간 근관치료에서 사용되었으며, 근관 내에서 박멸하기 어려운 *Enterococcus sp.*, *Actinomyces sp.*, *Candida sp.* 등에 대해서도 효과적이다¹²⁾. 근관 치료에서 NaOCl은 0.5-5.25%까지 다양한 농도로 사용되나 고농도로 사용 시 조직 용해 능력은 높아지지만 괴사된 조직과 생활 조직 모두를 용해하므로 항상 바람직한 것은 아니다¹³⁾. 또한 NaOCl은 치주와 치근단 조직에 자극을 주어 근관치료에서 높은 농도의 NaOCl이 치근단 밖으로 빠져 나간 경우, 염증 반응으로 심각한 조직 괴사나 동통, 부종, 감각 이상 등이 올 수 있다¹⁴⁾.

클로르헥시딘(Chlorhexidine digluconate, CHX)도 근관 내 세척제로 치과영역에서 널리 쓰이는 화학적 항균제이다. 이 약제는 그람 음성, 양성 균에 효과적인 넓은 항균 범위를 가지며 오래 지속되는 항균효과 때문에 근관 치료 분야에서 사용되게 되었다¹⁵⁾. 특히, 수산화칼슘과 함께 사용 시 편성 혐기성 세균에 대한 항균 효과가 우수하다고 한다¹⁶⁾. 그러나 장기간 사용 시 미각 이상이나 작열감이 나타날 수 있으며, 근관 내 세척제로서 아직 NaOCl에 비해 임상적인 장점이 밝혀지지 않았다¹⁷⁾.

최근 천연 제제에 대한 관심이 증가되어 마늘, 양파, 육두구 및 정향 등과 같은 각종 향신료로부터 추출한 성분들의 항균력에 대한 보고가 있으며, 펙틴분해물, 유기산, 지방산등이 천연 항균성 물질로 보고된 바 있다¹⁸⁾.

고추냉이는 십자화과에 속하는 숙근성 반음지 식물로 우리나라 자생종인 *Wasabia koreana* Nakai와 일본이 원산지인 *Wasabia japonica* Matsum, 그리고 서양산 고추냉이인 Horseradish (*Armoracia rusticana*)로 분류되어 있다¹⁹⁾. 고추냉이는 생선의 비린내를 없애기 위한 향신료로 널리 이용되고 있는데, glucosinolate 화합물의 일종인 sinigrin이 myrosinase에 의해 가수분해되어 isothiocyanates(ITCs)가 생성되면서 향미를 가지게 된다¹⁹⁾. 여러 가지의 ITCs 화합물들이 미생물의 성장 억제 효과를 가지고 있는데, ITCs의 주성분은 allyl isothiocyanate(AIT)이며 고추냉이에서 추출된 정유(essen-

tial oil)의 대부분을 차지하고 있다²⁰⁾.

고추냉이에 함유된 ITCs 화합물의 미생물 성장 억제 효과에 대한 많은 연구 결과들이 보고되고 있는데 구강 내 총치 유발 세균에 대한 ITCs 화합물의 항균 효과도 보고되고 있다²¹⁾.

이미 유 등²²⁾에 의해 구강 내 호기성 세균, 효모, 곰팡이, 통성 혐기성 세균에 대한 ITCs 화합물의 항균성은 증명되었으나 근관 내 병소를 일으키는 주 원인균인 편성 혐기성 세균(obligate anaerobes)에 관한 연구는 미흡하다.

이에 본 연구에서는 고추냉이를 근관 내 소독제로 개발하기 위한 기초자료를 마련하기 위해 근관 내 편성 혐기성 세균에 대한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 항균효과를 알아보고자 하였다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 연구 재료

1.1 시료

서양산 고추냉이 뿌리 분말은 서양 와사비(Horseradish, *Armoracia rusticana*) 분말(Biocoats Co. Korea)을 구입하여 사용하였으며, 항균 효과의 비교를 위해서 0.1% 클로르헥시딘(헥사메딘, Bukwang Co., Korea)을 사용하였다. 서양산 고추냉이 뿌리 추출물 중의 AIT 농도 측정 시, AIT 표준용액(Fluka Co., Germany)과 헥산(Showa Co., Japan)을 이용하였다^{22,23)}.

1.2 항균성 물질의 추출

서양산 고추냉이에서 항균성 물질을 추출하기 위해 증류수를 이용하였다. 고추냉이 분말 200 g과 증류수 550 ml를 혼합한 후, AIT 생산을 최대로 하기 위하여 rotary evaporator(NE-1, Tokyo Rikakikai Co., Japan)에서 40℃로 120분 간 유지시켰다. 그 후 120℃의 oil bath(C-WHT, Changshin scientific Co., Korea)에서 120분 간 증류시키고, 추출액 50 ml를 분획한 후 원심 분리하여 획득한 oil의 AIT 농도를 측정하였다^{22,23)}.

1.3 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 AIT 함량 분석

추출한 액의 AIT 농도 측정을 위해 추출물 1 ml를 헥산(hexane) 1 ml와 혼합한 후, 60℃ 항온 수조(RW-3025G shaking water bath, Jeio Tech Co., Korea)에서 1시간 동안 가열하였다. 이를 다시 실온으로 냉각하고, 헥산층 1 μl를 가스 크로마토그래프로 분석하였다. FID(flame ionization detector)가 부착된 GC(HP 6890 series, Hewlett Packard Development Co., USA)로 AIT 농도를 측정하였으며, column은 HP-Innowax capillary column (30 m × 0.32 mm, 0.5 μm film thickness, Agilent Technologies, Inc., USA)을 사용하였다. Injection port와 FID의 온도는 각각 250℃, 260℃였으며, carrier gas는 질소(Nitrogen)를 사용하였다^{22,23)}.

AIT 표준용액의 농도별 가스 크로마토그래프 결과를 수식화하여 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 AIT 함량을 적정하였으며, 그 결과 추출물은 약 600,670.97±1,370.26ppm의 AIT를 함유하고 있었다(Fig. 1). 본 실험에서는 이 추출물에 멸균 배지를 가하여 double dilution법으로 희석하여 사용하였다^{22,23)}.

1.4 사용균주 및 배지

항균 효과를 측정하기 위하여 사용된 표준 균주는 근관 내 감염 시 빈번하게 검출되는 편성 혐기성 세균인 *Prevotella nigrescens* KCTC 5407와 *Fusobacterium nucleatum* KCTC 5103, 항균성 실험에서 대조균으로 널리 사용되는 *Clostridium perfringens* KCTC 3269로 한국생명공학연구원 유전자은행(KCTC, Korea)으로부터 분양받아 사용하였다. 배지는 reinforced clostridial medium (RCM, Difco, USA)과 reinforced clostridial medium agar (RCM agar, Oxoid, USA)에 5% sheep blood (RCM blood agar)를 섞어 사용하였다.

순수한 균주를 얻기 위해 분양 받은 균을 멸균된 reinforced clostridial medium 10ml가 들어 있는 screw capped tube(16×160 mm)에 넣고, AnaeroGen™(Oxoid Ltd, UK)으로 혐기성 상태를 만든 플라스틱 상자(AnaeroPack Rectangular Jar™, Mitsubishi gas chemical Co, Japan)안에 균이 들어있는 튜브를 넣어 CO₂ 배양기에서 37℃하에 48시간 배양하였다. 이 때 상자 내 혐기성 상태를 확인하기 위한 지시약으로 BBL™(Dry Anaerobic Indicator Strips, Becton Dickinson and Company Sparks, USA)을 사용하여 파란색에서 하얀색으로 변하는 것을 확인하였다.

배양된 용액을 한 백금이 취하여 RCM blood agar에 도말한 후, 다시 혐기성 상자에 넣어 37℃에서 48시간 동안 배양하였다.

평판 배지에서 배양된 세균 중 독립 colony를 취하여 RCM blood agar에 도말하여 다시 배양하였다. 배양된 세균을 RCM 10 ml가 들어있는 screw capped tube에 넣어 혐기성 상자에서 37℃하에 48시간 배양한 후, 이 세균 배양액 500 μl와 Glycerol 500 μl를 eppendorf tube에 담아 혼합하여 이후의 실험에 사용할 때까지 -70℃에 보관하였다.

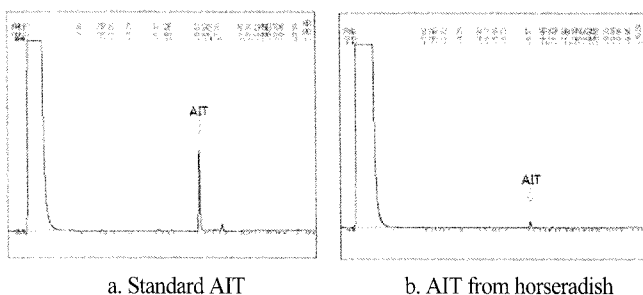


Fig. 1. Gas Chromatogram of standard AIT and AIT extracted from horseradish(*Armoracia rusticana*) root.

2. 연구 방법

2.1 항균 활성 측정 시험

2.1.1 서양산 고추냉이 뿌리 추출물 사용균

서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 항균력을 평가하기 위해 disk paper method를 사용하였다. 각 균주를 전배양하여 640 nm (V530 UV/VIS spectrophotometer, Jasco, Japan) 파장에 대한 흡광도(A640)가 0.700-0.800으로 일정하게 현탁된 배양액 100 μl를 RCM blood 평판 배지에 분주한 후, 멸균된 spreader를 사용하여 균일하게 도말하였다. 멸균된 직경 10 mm filter paper disk (Whatman No.2)에 AIT 농도 10,000 ppm인 서양산 고추냉이 뿌리 추출물을 30 μl씩 흡수시킨 후 각 균주가 도말된 배지에 밀착시켜혐기성 상자에 넣은 후, 37℃의 5% CO₂ 세균배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 disk 주변에 형성된 투명환 (clear zone)의 유무로 항균 효과 여부를 확인하였다.

2.1.2 클로르헥시딘 사용균

서양산 고추냉이 뿌리 추출물 사용균과 동일한 방법으로 각 균주에 대한 1000 ppm의 클로르헥시딘의 항균 활성을 확인하였다.

2.2 최소억제농도 (minimum inhibitory concentration, MIC) 측정

2.2.1 서양산 고추냉이 뿌리 추출물 사용균

멸균된 96-well flat-bottom microplate (Greiner bio-one, Germany)의 각 well에 600,000 ppm의 서양산 고추냉이 뿌리 추출물을 RCM 멸균 배지로 단계 희석(5,000, 2,500, 1,250, 625, 312, 156, 78, 39, 19, 9.5 ppm)하여 100 μl씩 분주하고, 흡광도 0.700-0.800에 생균수가 1.5×10⁶CFU/ml로 일정하게 현탁된 각각의 균주를 5 μl씩 분주한 후, 혐기성 상자에 넣어 37℃의 5% CO₂ 세균배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 배양 후, 각 균주의 증식 유무를 micro plate reader (OD: 660nm, EL800, Bio-Tek Instrument Inc., USA)를 사용하여 측정하였다.

2.2.2 클로르헥시딘 사용균

서양산 고추냉이 뿌리 추출물 사용균과 동일한 방법으로 각 균주에 대한 클로르헥시딘의 최소억제농도를 측정하였다. 클로르헥시딘은 1,000 ppm를 원액으로 멸균배지에 단계 희석(400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78 ppm)하여 사용하였다.

2.3 최소살균농도 (minimum bactericidal concentration, MBC) 측정

2.3.1 서양산 고추냉이 뿌리 추출물 사용군

MBC의 측정에는 Bamba 등²⁴⁾의 방법을 사용하였다. MIC 측정 후 증식이 관찰되지 않은 배양액을 한 백금이 취하여 RCM blood 평판배지에 도말한 후, 혐기성 상자에 넣어 37℃에서 48 시간 동안 배양하여 증식유무를 확인하였다.

2.3.2 클로르헥시딘 사용군

서양산 고추냉이 뿌리 추출물 사용군과 동일한 방법으로 각 균주에 대한 클로르헥시딘의 최소 살균 농도를 측정하였다.

모든 실험에서 동일한 실험을 4회 반복하여 평균과 표준편차를 산정하였다.

Ⅲ. 연구 결과

1. 항균 활성 측정 결과

서양산 고추냉이 뿌리 추출물과 클로르헥시딘은 모든 표준 균주에서 paper disk 주위로 투명한(clear zone)을 형성하였으며, 이 결과로 서양산 고추냉이 뿌리 추출물과 클로르헥시딘은 혐기성 세균에 항균 활성이 있음을 확인하였다. Fig. 2는 *F. nucleatum*이 클로르헥시딘과 서양산 고추냉이 뿌리 추출물을 분주한 paper disk 주위로 자라지 않은 모습을 보여주고 있다.

2. 최소억제농도(MIC)

2.1 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 MIC

각 혐기성 세균에 대한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 MIC는 Table 1과 같다. 시험 대상균주의 MIC는 78-625 ppm이었으며, *C. perfringens*의 MIC가 468.5 ppm으로 가장 높았으며, *P. nigrescens*는 136.5 ppm, *F. nucleatum*은 87.75 ppm의 순으로 평균 MIC값을 나타내었다.

2.2 클로르헥시딘의 MIC

각 혐기성 세균에 대한 클로르헥시딘 MIC의 평균 및 표준 편차는 Table 1과 같다. *C. perfringens*는 6.25 ppm, *P. ni-*

*grescens*는 5.47 ppm, *F. nucleatum*은 3.13 ppm의 평균 MIC값을 나타내었다.

3. 최소살균농도(MBC)

3.1 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 MBC

각 혐기성 세균에 대한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 MBC를 측정한 결과는 Table 2와 같다. 각 세균마다 MBC에 차이는 있었지만 총 4회의 실험에서 156-625 ppm의 MBC 값을 나타내었다. 각 세균에 대한 평균 MBC 값은 *C. perfringens*는 625 ppm, *P. nigrescens*는 390.25 ppm, *F. nucleatum*은 156 ppm으로 나타났다.

3.2 클로르헥시딘의 MBC

각 세균에 대한 클로르헥시딘의 MBC를 측정한 결과는 Table 2와 같으며, MIC는 각 세균마다 차이가 있었으나 MBC의 평균은 모든 세균에서 10.94 ppm을 나타냈다.

Ⅳ. 총괄 및 고찰

십자화과에 속하는 모든 식물들의 구성 성분인 allyl isothiocyanate(AIT)는 액체나 기체 상태 모두에서 강한 항균효과를 나타내며 고추냉이에서 추출된 정유(essential oil)중에 약 80%를 차지하고 있다^{20,25)}.

AIT의 작용 기전은 정확하게 알려져 있지는 않지만 AIT가 단백질 구조를 변화시키고 세균의 대사기능에 영향을 준다는 연구 등이 있다. Kawakishi와 Kaneto^{26,27)}는 산화된 glutathione이 disulfide bond에서 AIT에 의해 잘려나간다는 것을 보여주었으며, Kojima와 Ogawa²⁸⁾는 AIT가 효모의 산소 섭취(oxygen uptake)를 방해한다고 하였다.

Lin 등²⁹⁾은 AIT의 항균 작용이 어떻게 일어나는지 알기 위해 세포막과 세포벽 그리고 리보솜에 작용하는 각각의 항생제 살균 효과를 AIT와 비교하였다. 그 결과 생균수와 효소의 활성, 세포 내 투과도 등을 통해 AIT가 세포막에 작용하는 항생제와 항균 작용 양상이 가장 유사하다는 것을 밝혔다.

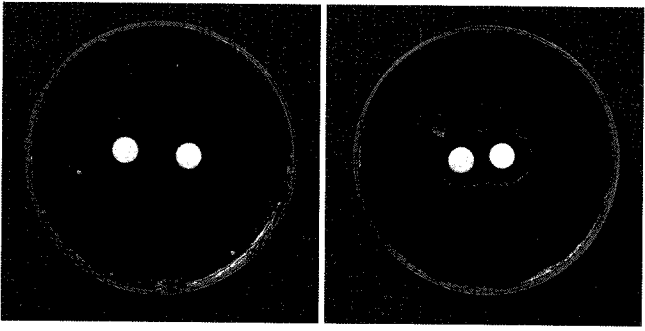


Fig. 2. Antimicrobial activity of horseradish extract and chlorhexidine against *F. nucleatum*.

Table 1. MIC values of horseradish root extracts and chlorhexidine against obligate anaerobes

strains	horseradish root extracts (ppm)	chlorhexidine (ppm)
<i>C. perfringens</i>	468.0 ±180.7	6.25 ±0.00
<i>P. nigrescens</i>	136.5 ±39.0	5.47 ±1.56
<i>F. nucleatum</i>	87.8 ±49.0	3.12 ±0.00

Table 2. MBC values of horseradish root extracts and chlorhexidine against obligate anaerobes

strains	horseradish root extracts (ppm)	chlorhexidine (ppm)
<i>C. perfringens</i>	625 ±0	10.94 ±3.12
<i>P. nigrescens</i>	390 ±156	10.94 ±9.37
<i>F. nucleatum</i>	156 ±0	10.94 ±9.37

이번 연구에서는 disk paper method를 이용하여 편성 혐기성 세균에 대한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물과 클로르헥시딘의 항균활성을 알아보았는데, 두 실험군 모두 주위로 투명환을 형성하여 편성 혐기성 세균에 대한 항균 효과가 있음을 확인하였다. 그러나 두 군 사이에 투명환의 형태와 세균의 성장 양상에 차이를 보였는데 유 등²²⁾과 김 등²³⁾의 실험에서와 같이 클로르헥시딘은 환의 경계가 분명한 반면, 서양산 고추냉이 뿌리 추출물은 환의 경계가 불분명하였으며 세균의 성장 양상도 클로르헥시딘에 비해 성긴 형태였다. 이것은 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 휘발성으로 인해 디스크에서 떨어져 있는 부분의 세균까지 영향을 받은 결과이다²⁰⁾.

서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 혐기성 세균에 대한 항균성 실험 결과, *F. nucleatum*은 87.75 ppm, *P. nigrescens*는 136.5 ppm, *C. perfringens*는 468.5 ppm의 평균 MIC를 나타내었다. 평균 MBC는 *F. nucleatum*은 156 ppm, *P. nigrescens*는 390.25 ppm, *C. perfringens*는 625 ppm으로 나타났다. *F. nucleatum*이 AIT에 대해 가장 낮은 MIC와 MBC 값을 가지므로 AIT에 대해 가장 큰 감수성을 보였으며, *P. nigrescens*와 *C. perfringens*이 그 다음 순이었다. 예상대로 항균성 실험을 위한 대조균으로 사용된 *C. perfringens*가 가장 큰 MIC와 MBC 값을 나타내었다. AIT의 편성 혐기성 세균에 대한 항균 효과를 보고하는 실험이 거의 없어서 직접적인 비교는 어렵지만 유 등²²⁾의 구강내 세균에 대한 AIT의 항균력 실험에서 대부분의 통성 혐기성 세균에 대한 MIC가 125-500 ppm을 나타내었는데, 이는 이번 실험과 비슷한 결과로 AIT에 대한 편성 혐기성 세균의 감수성이 통성 혐기성 세균과 비슷함을 나타내었다. 구강내 미생물은 아니지만 박 등¹⁹⁾은 대부분의 병원성 미생물에 대한 AIT의 MIC는 50 ppm 내외이며 MBC는 200-3000 ppm이라고 보고한 바 있는데, 이번 실험에 사용된 구강내 편성 혐기성 세균도 이와 비슷한 값들을 나타내었다. 클로르헥시딘에서는 평균 MIC가 *F. nucleatum*은 3.12 ppm, *P. nigrescens*는 5.47 ppm, *C. perfringens*는 6.25 ppm을 나타내었으며, 평균 MBC는 모든 세균에서 10.94 ppm을 나타내었다. Ferreira 등³¹⁾은 본 실험에서 사용된 세 가지 세균과 동일한 세균에 대한 클로르헥시딘의 항균 활성을 측정된 결과 MIC는 0.3-9.7 ppm, MBC는 0.6-19.5 ppm이라고 보고하였는데, 본 실험의 결과도 이 범위 안에 있는 값이었다.

많은 연구에서 스테인레스 스틸, NiTi 중 어떤 기구가 사용되더라도 기계적 근관 형성만으로는 충분히 근관내의 세균을 제거할 수 없다고 보고된 바 있다³²⁾. 세균을 박멸하기 위해 근관 세척이 필요하며, 이상적인 근관 세척액은 세균박멸, 괴사된 조직의 용해, 윤활 작용, 상아질 도말층의 제거 등이 가능하면서 건강한 조직에 무해해야 한다³³⁾. 본 실험을 통해 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 편성 혐기성 세균에 대한 항균력을 확인하였으며, 근관내 세척제로 이용될 수 있는 또 다른 특징은 AIT의 휘발성이다. Formocresol, camphorated phenol, iodine potassium iodide 등이 증기(vapor)를 발생하며 이 증기가 살

균 효과가 있는 것으로 알려지며 근관소독제로 사용되기도 했다³⁴⁾. 실험을 통해 재확인한 AIT의 휘발성은 복잡한 근관내에서 일반 세척제로는 제거하기 힘든 부근관내에 있는 세균에 항균 효과를 미칠 수 있는 가능성을 제시한다.

이번 연구는 다음과 같은 몇 가지 한계점을 가지고 있다. 첫째, 본 연구에서는 편성 혐기성 세균의 배양 시간이 길며, 산소에 노출되는 시간 등에 의해 *Fusobacteria sp.*와 *Prevotella sp.*, 그리고 항생제 실험에서 큰 저항성으로 대조균으로 자주 쓰이는 *C. perfringens*만 실험에 사용되었다. 근관내 감염은 다균성인 것을 고려해볼 때 Actinobacteria나 Spirochaetes, Proteobacteria 등의 더 많은 편성 혐기성 균에 대한 항균 효과를 평가할 필요가 있다.

둘째, 본 연구에서는 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 항균 효과를 알아보기 위해 표준 균주를 이용하였다. 임 등³⁵⁾은 녹차 추출물이 갖는 세균 성장 억제 효과에 있어서 표준 균주와 임상에서 분리된 균주 사이에 차이가 있다고 보고하였다. 따라서 감염된 근관내에서 직접 분리해낸 편성 혐기성 세균에 대한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 항균 효과에 대한 평가도 이루어져야 하겠다.

셋째, 본 실험은 혐기성 배양기를 이용하여 절대적인 혐기 상태를 만들지 못하고, 짧은 시간이지만 세균이 산소에 노출되어 이것이 실험 결과에 조금이나마 영향을 미쳤으리라 생각된다. 앞으로는 산소 노출을 배제한 완전한 혐기 상태에서의 실험이 필요할 것이다.

넷째, 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 근관내 세척제나 소독제로의 사용을 위해서는 세균에 대한 항균력 뿐만 아니라, 세포독성, 조직의 용해 능력에 대한 평가가 더 필요하며, 클로르헥시딘 뿐만 아니라 NaOCl이나 수산화칼슘과 같은 다른 약제와의 비교 실험 또한 필요할 것이다.

이런 한계점에도 불구하고 이번 실험은 구강내 편성 혐기성 세균을 대상으로 고추냉이 뿌리 추출물의 효과를 평가한 점에서 의의가 있다. 클로르헥시딘과 비교 시 편성 혐기성 세균에 대한 고추냉이 뿌리 추출물의 항균력에는 큰 차이가 없음을 밝혔으며 혐기성 세균에 대한 항균력을 확인함으로써 추후 고추냉이 뿌리 추출물을 이용한 근관내 세척제 또는 소독제 개발의 토대가 될 것이다.

V. 결 론

근관내 감염은 여러 미생물이 관여하는 혼합 감염으로 혐기성 세균이 주를 이룬다. 본 연구에서는 서양산 고추냉이 뿌리 추출물을 이용하여 근관내 세척제를 개발하기 위한 기초 자료를 제공하기 위해 근관내 편성 혐기성 세균에 대한 항균 효과를 알아보고 이를 구강용 항균제인 클로르헥시딘의 항균 효과와 비교하였다.

1. 본 연구에서 사용된 3종(*Prevotella nigrescens* KCTC 5407, *Fusobacterium nucleatum* KCTC 5103,

Clostridium perfringens KCTC 3269)의 편성 혐기성 세균에 대한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 최소 억제 농도는 평균 87-470 ppm, 최소 살균 농도는 평균 156-625 ppm으로 *F. nucleatum*에 대해 가장 강한 항균 활성을 나타내었으며, 항균제에 저항성이 큰 *C. perfringens*에도 항균 활성을 나타내었다.

2. 본 연구에 사용된 3종의 편성 혐기성 세균에 대한 클로르헥시딘의 최소 억제 농도는 평균 3.12-6.25 ppm, 최소 살균 농도는 평균 10.94 ppm을 나타내었다.
3. 서양산 고추냉이 뿌리 추출물은 87-470 ppm의 농도에서 3.12-6.25 ppm의 클로르헥시딘과 비슷한 세균 성장 억제 효과를 가지며 156-625 ppm의 서양산 고추냉이 뿌리 추출물은 10.94 ppm의 클로르헥시딘과 비슷한 살균 효과를 보였다.

본 실험의 결과는 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 추후 근관 내 세척제나 소독제로의 개발 가능성을 보여주며 임상에서 사용 시 농도 결정에 있어 도움이 될 것이다.

참고문헌

1. Brook I, Frazier EH, Gher ME : Aerobic and anaerobic microbiology of periapical abscess. *Oral Microbiol Immunol*, 6:123-125, 1991.
2. Haapasalo M : Black-pigmented gram-negative anaerobes in endodontic infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 6:213-218, 1993.
3. Winkelhoff V, Steenbergen TJM, Kippuw N, et al. : The role of black-pigmented *Bacteroides* in human oral infections. *J Clin Periodontol*, 15:145-155, 1998.
4. Sundqvist G : Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 78:522-530, 1994.
5. Chu FC, Tsang CS, Chow TW, et al. : Identification of cultivable microorganisms from primary endodontic infection with exposed and unexposed pulp space. *J Endod*, 31:424-429, 2005.
6. 김승운, 최호영, 박상혁 등 : 근관감염세균의 분포에 관한 연구. *대한치과보존학회지*, 28:303-313, 2003.
7. Gomes BP, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, et al. : Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol*, 19:71-76, 2004.
8. Ferreira FB, Ferreira AL, Gomes BP, et al. : Resolution of persistent periapical infection by endodontic surgery. *Int Endod J*, 37:61-69, 2004.
9. Chang YC, Tai KW, Chou LS, et al. : Effect of camphorated paramonochlorophenol via the root canal.

Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 51:637-642, 1981.

10. Holland R, Souza V, Nery MJ, et al. : Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod*, 25:161-166, 1999.
11. Sjögren U, Figdor D, Spangberg L, et al. : The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J*, 24:119-125, 1991.
12. Haapasalo M, Udnaes T, Endal U : Persistent, recurrent, and acquired infection of the root canal system post-treatment. *Endodon Topics*, 6:29-34, 2004.
13. Yesilsoy C, Whitaker E, Cleveland D, et al. : Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants. *J Endodon*, 21:513-515, 1995.
14. Omid M, Donald J, Robert E : Anatomy of sodium hypochlorite accidents. *Clinical techniques in endodontics*, October:1-6:2007.
15. Souza-Filho FJ, Soares Ade J, Vianna ME : Antimicrobial effect and pH of chlorhexidine gel and calcium hydroxide alone and associated with other materials. *Braz Dent J*, 19:28-33, 2008.
16. Podbielski A, Spahr A, Haller B : Additive antimicrobial activity of calcium hydroxide and chlorhexidine on common endodontic bacterial pathogens. *J Endodon*, 29:340-345, 2003.
17. Stephen C, Kenneth MH : *Pathways of the Pulp*, 신홍인티네셔널, 서울, 319, 2007.
18. 양지영, 한종훈, 강현록 등 : 겨자, 계피, 산초, 고추냉이의 항균성 효과. *한국 식품 위생 안정성 학회지*, 16:37-40, 2001.
19. 박운영, 조문수, 박신 등 : 고추냉이 부위별 Sinigrin 함량과 추출액의 항균 활성. *한국 원예 과학 기술지*, 24: 480-487, 2006.
20. 이성우, 서정식, 김석동 등 : 고추냉이 부위별 Allyl-isothiocyanate 함량. *한국 약용 작물 학회지*, 42:281-285, 1997.
21. Masuda H, Inoue T, Kobayashi Y : Anticaries effect of Wasabi components. *ACS symposium series*, 859: 142-153, 2003.
22. 유난영, 박호원, 이주현 등 : 구강내 미생물에 대한 서양산 고추냉이(*Amoracia rusticana*)뿌리 추출물의 항균효과. *대한소아치과학회지*, 33: 447-456, 2006.
23. 김혜경, 박호원, 신일식 등 : 치태에서 분리된 Strepto-

- coccus mutans에 대한 서양산 고추냉이(Amoracia rusticana) 뿌리 추출물의 항균효과. 대한소아치과학회지, 35:225-233, 2008.
24. Bamba H, Kondo Y, Wong RM, et al. : Evaluation of an assay method of the susceptibility of antimicrobial agents using a 96-well flat-bottom microplate and a microplate reader. Am J Gastroenterol, 92:659-664, 1997.
 25. Hitomi Kumagai : Analysis of volatile components in essential oil of upland wasabi and their inhibitory effects on platelet aggregation. Biosci. Biotech. Biochem, 58:2131-2135, 1994.
 26. Kawakishi S, Kaneko T : Interaction of oxidized glutathione with allyl isothiocyanate. Phytochemistry, 24: 715-718, 1985.
 27. Kawakishi S, Kaneko T : Interaction of proteins with allyl isothiocyanate. J. Agric. Food Chem, 35:85-88, 1987.
 28. Kojima M, Ogawa K : Studies on the effect of iosthiocyanates and their analogues on microorganisms: (I) effect of isothiocyanates on the oxygen uptake of yeasts, J. Ferment. Technol, 49:740-746, 1971.
 29. Lin CM, Preston JF 3rd, Wei CI : Antibacterial mechanism of allyl isothiocyanate. J Food Prot, 63:727-734, 2000.
 30. Pascal J, Delaquis, Peter L : Antimicrobial activity of gaseous allyl isothiocyanate. J Food Prot, 60:943-947, 1997.
 31. Ferreira CM, da Silva Rosa OP, Torres SA : Activity of endodontic antibacterial agents against selected anaerobic bacteria. Braz Dent J, 13:118-122, 2002.
 32. Stephen C, Kenneth MH : Pathways of the Pulp, 신홍인터내셔널, 서울, 318, 2007.
 33. William JN, Mohamed IF, Bradford RJ, et al. : Antimicrobial effect of triclosan and triclosan with Gantrez on five common endodontic pathogens. J Endod, 33:1239-1242, 2007.
 34. 임성삼 : 임상근관치료학 (2판). 의치학사, 서울, 160-162, 1999.
 35. 임성훈, 서정순, 윤영주 등 : 녹차 및 결명자 추출물의 교정용 브라켓과 치면 사이의 경계부에서 분리된 mutans streptococci에 대한 항균 작용. 대한치과교정학회지, 33:381-389, 2003.

Abstract

THE ANTIMICROBIAL EFFECT OF HORSERADISH (*ARMORACIA RUSTICANA*) ROOT EXTRACTS AGAINST OBLIGATE ANAEROBES IN ROOT CANAL

Won-Ju Lee, Ho-Won Park, Il-Sik Shin*, Ju-Hyun Lee, Hyun-Woo Seo

*Department of Pediatric Dentistry, Oral Science Research Center, College of Dentistry,
Faculty of Marine Food Science & Technology, Kangnung National University

When the symptom of periapical infection is not released by mechanical instrumentation, anti-microbial agents including antibiotics become necessary in order to remove microorganisms from the root canal. Since anti-microbial agents of natural origins are currently popular, more natural remedies are being sought out. As it turns out, it is well known isothiocyanates (ITCs) in horseradish root extract have anti-microbial activity from many studies.

In this research, anti-microbial effects of horseradish root extract and chlorhexidine, a typical anti-microbial agent, were investigated and compared against two kinds of obligate anaerobes, *Fusobacterium nucleatum* and *Prevotella nigrescens*, that are often discovered in infected root canal, and *Clostridium perfringens*, which is resistant to antibiotics and frequently used as a control strain for antibacterial studies

1. The MIC and MBC of horseradish root extract were ranged from 87 to 470 ppm and from 156 to 625 ppm against three kinds of obligate anaerobes, respectively. Horseradish root extract showed the strongest anti-bacterial activity (MBC, 156 ppm) against *F. nucleatum* and also showed anti-bacterial activity against antibiotic resistant obligate anaerobes, *C. perfringens*.
2. The MIC and MBC of chlorhexidine were ranged from 3.12 to 6.25 ppm and 10.94 ppm against three kinds of obligate anaerobes, respectively.
3. The MIC with 87-470 ppm of horseradish root extract has the same growth inhibiting effect as the one of 3.12-6.25 ppm of chlorhexidine. Likewise, the MBC with 156-625 ppm of horseradish has the similar bactericidal effect as 10.94 ppm of chlorhexidine.

Key words : Horseradish(*Armoracia rusticana*), Natural extract, Allyl isothiocyanate(AIT), Obligate anaerobes, Chlorhexidine, Antibacterial effect