

다양한 은-화합물이 첨가된 의치상 레진의 칸디다균에 대한 항균 특성 및 물성에 관한 연구

¹계명대학교 의과대학 치과학교실

²경북대학교 치의학전문대학원 치과보철학교실

¹남기영 · ²이청희

Study of antifungal and physical properties of denture acrylic base incorporated with silver

¹Ki-Young Nam DDS, MSD, Phd., ²Cheong-Hee Lee DDS, MSD, Phd.

¹Department of Dentistry, College of Medicine, Keimyung University, 194 Dongsan-dong, Jung-gu, Daegu 700-712, Korea

²Department of Prosthodontics, School of Dentistry, Kyungpook National University, Samduk-dong, Jung-gu, Daegu 700-412, Korea

The purpose of this study was to evaluate antifungal effect against *Candida albicans* and physical characteristics of silver (Ag)-contained denture acrylic base. The heat-polymerized denture acrylic (Vertex-RS[®], Dentimex, Zeist, Holland) specimens, with 4 different incorporated patterns of silver as Ag nano-particles (Ag⁰), AgNO₃, Ag⁰-chitosan and AgNO₃-chitosan, were fabricated with the concentrations of 0.2, 1.0 and 5.0 % of Ag. When compared with control (0 % Ag) after 24-hour incubation, significant reduced colony forming unit was found in 1.0 % (33.7~56.5 %) and 5.0% (69.0~76.3 %) on modified Ag-denture base acrylic (p < 0.01). There were extremely low release of silver ions (Ag⁺) from Ag-denture acrylic as compared with initial amount of silver incorporated. Physical characteristics of Ag-denture acrylic were clinically reliable in flexural strength, conversion rate and surface examination on SEM except in color stability.

Key Words : Antifungal effect, denture acrylic resin, Silver

1. 서 론

의치상 재료인 PMMA (polymethyl methacrylate) 레진은 심미적 양호성과 낮은 흡수 및 용해도 그리고 인체에 대한 무독성의 성질을 가지며 비교적 정확한 재현성과 더불어 조작 및 수리가 간단하여 의치상 생체 재료로 널리 사용되어 왔다. 그러나 중량체와 단량체의 중합으로 인한 의치상내에 기포가

발생할 수 있으며 이러한 기공과 더불어 의치 인상면의 표면거침성은 세균부착을 용이하게 하여 구강 미생물들에 의한 군락이 쉽게 형성되어 대표적 구강점막질환 중 하나인 의치구내염 (denture stomatitis)을 유발할 수 있다 (Fenlon 등, 1998; Chandra 등, 2001). 의치구내염은 의치장착자의 지지점막에 발생하는 만성 염증성 변화로 다양한 병인인자들을 가지나 주로 칸디다 (*Candida*) 균주와 관련된 의치

구내염이 가장 흔한 형태이며 *Candida albicans*가 주 원인균으로 알려져 있고 (Nikawa 등, 1992) 11~67% (Arendorf와 Walker, 1987), 25~42.4% (McNally 등, 1999) 의 발병빈도를 가진다. 이 균주는 의치상 표면에 직접 또는 점액성 세균막 (biofilm) 으로 부착되어 항생제에 대한 낮은 감수성을 가지며 발병된 의치구내염은 치료 후에도 비교적 재발률이 높은 것으로 알려져 있다. Barbeau 등 (2003) 은 의치구내염의 예방을 위해서 구강위생증진, 의치 소독 및 장착 습관 조절 등이 매우 중요하다고 하였으나 대개 노인들의 구강위생능력은 신체적, 동기적으로 저하되어있고 특히 거동이 제한된 노인에게서 올바른 의치관리능력을 기대하기 더욱 힘들며 국소적, 전신적 항균제 등의 치료는 전신적 질환을 가진 환자들인 경우 약물의 중복 및 과다복용의 문제점을 가진다. 항균제를 투여한 의치상의 경우 약제들의 조기 방출, 내성, 비용 그리고 그 성과는 제한적으로 보고되었고 (Nikawa 등, 1997) 따라서 의치 장착률이 높은 노인들에 대한 구강위생증진 효과, 반복적인 항진균제 약물치료로 인한 내성 및 약물 과다 복용 후유증 감소 그리고 원천적인 의치구내염의 예방을 위한 내재적 항균성을 가진 의치상레진 재료의 개발이 필요하냐에 대한 연구는 아직 드문 편이다.

최근 항생제 남용으로 인한 내성과 치료비용 증가를 극복하기 위한 천연 무기 항균 물질에 대한 연구가 진행되고 있으며 그 중에서도 은 (Silver) 은 낮은 세포독성 및 높은 조직친화성, 그리고 휘발 또는 분해가 일어나지 않는 안정성을 가진 무기계 항균물질로 예로부터 널리 사용되어 왔으며 항생제나 소독제의 내성 등의 부작용을 대체 할 유용한 물질로 최근 다시 각광을 받고 있다. 은 이온 (Ag^+) 의 항균기전은 일반적으로 효소의 -SH기와 반응하여 S-Ag를 생성하거나 미생물의 세포질 막에 있는 칼륨 이온 (K^+) 을 방출시킴으로써 미생물을 불활성화 시킨다고 알려져 있으며 (Samuel과 Guggenbichler, 2004) 미생물의 유전자 (DNA) 에 존재하는 염기와 반응하여 미생물의 세포분열을 방해하는 기전도 제시되고 있는데 (Russell과 Hugo, 1994) 최근에는 키토산 (chitosan), 구리 (copper), 과산화수소 등과 같은 항균물질과의 병행으로 인한 상승효과

또한 연구되고 있다 (Yi 등, 2003). 한편, 용액 상태에서만 존재하는 은 이온의 응용확대를 위해 고체 입자 상태로 사용가능한 은 나노 (Ag^0 , silver nano-particle) 를 이용한 제품 개발 및 항균성에 대한 활발한 연구가 진행되고 있는데 Sondi와 Sondi (2004) 는 은 나노입자가 미생물 주위를 둘러싸면서 세포벽 구성물과 반응함으로써 세포막을 손상시켜 미생물을 불활성화 시킨다고 보고하였고 보다 명확한 항균성능 및 특성에 대한 연구는 현재 진행되고 있으며 귀금속인 은의 미량 가공화로 인한 비용 절감과 상용화 가능 그리고 은 금속, 은 분말에 비해 표면적을 극대화 시킬 수 있는 장점이 있다.

은을 투여한 경질체의 항균효과연구로 Slawson 등 (1992) 은 플라스틱표면에 군집하는 세균이나 진균에 대항하는 은의 활성을 보고하였고 Samuel과 Guggenbichler (2004) 는 은이 함유된 중심정맥 삽관 (central venous catheter) 의 항균성을, Fu 등 (2006) 은 항균막 (film) 제조에서 은-키토산 투여 시 상승된 항균효과를 보고하는 등 여러 학문 분야에서 은 첨가 복합체의 항균특성에 대한 연구가 진행되어 왔으나 치과생체재료학 분야에서 은이 첨가된 의치상레진에 대한 항균성 및 물성에 관한 연구는 아직 보고되지 않았다.

본 연구에서는 의치상레진에 은을 질산은, 은 나노입자 그리고 상승효과를 위한 키토산 병행 첨가의 여러 형태로 첨가한 후 의치구내염 주 원인균인 *Candida albicans* 에 대한 항균특성과 은 첨가에 따른 의치상 재료의 물성을 평가함으로써 항균 의치상레진 재료 개발과 그 상용화 가능성을 타진하는데 있다.

II. 재료 및 방법

1) 실험재료 및 시편제작

(1) 질산은 ($AgNO_3$) 및 은 나노 정제

0.1 M $AgNO_3$ 수용액 500 ml를 통상적으로 제조하였고 은 나노는 여기에 안정제인 PVP (PolyN-vinyl-2-pyrrolidone)를 5 %의 농도로 isopropyl 알코올에 녹여 전체 부피가 500 ml로 만든 다음, 두

용액을 혼합한 후 1시간 동안 아르곤 (Ar) 가스로 용액 내 산소 (O₂) 를 제거한 다음 20 K Gy의 ⁶⁰Co 감마선으로 처리하여 제조하였다 (이철재 등, 2007).

(2) 은-의치상레진 시편제작

실험 시편용으로 제작할 의치상 재료로 PMMA계 열중합 의치상레진인 Vertex-RS[®] (Dentimex, Zeist, Holland) 을 사용하였다. 의치상레진에 첨가될 은의 최종농도를 0.2 % (약 2,000 ppm), 1.0 % (약 10,000ppm) 그리고 5.0 % (약 50,000 ppm) 로 설정한 후 은 투여방법으로 먼저 레진 액 (monomer) 에 질산은 용액과 은 나노용액을 부피 비 1:1 로 각각 섞어서 혼합 용액으로 제조한 다음, 레진 분말 (polymer) 과 무게 비 3 : 1.3 으로 혼합하였고 키토산을 추가하는 경우 분말, 키토산 분말, 혼합용액을 3.0 : 0.1 : 1.5의 무게 비로 혼합하였다. 군 설정은 은 나노를 첨가한 I 군, 질산은을 첨가한 II군, 은 나노와 키토산을 첨가한 III군 그리고 질산은과 키토산을 첨가한 IV군으로 각각 설정하고 은을 첨가 하지 않은 대조군 등 총 5 개 군으로 분류하였다 (Table 1). 항균 효과 및 물성 분석에 사용할 시편 규격으로 10mm × 20mm × 2.5mm (항균 및 용출 실험) 과 65 mm × 10 mm × 2.5 mm (굽힘 강도, 중합율, 색조 안정성 실험)로 나누어 테플론 (teflon)과 금속 몰드를 이용하여 제작하였고 제조사 지시대로 가열 중합한 다음 연마를 시행하였다.

2) 항균 실험 및 은 이온 용출 계측

(1) 세균 배양 및 초기 생균수 측정

Candida albicans (ATCC; American Type Culture Collection, 66027) 를 평판 배지 (Sabouraud agar

plate) 상에서 30 ℃에서 24 시간 동안 균일하고 안정된 배양을 위해 강도 7의 회전식 배양을 시행하였고 초기 투여 생균수 측정을 위하여 균 혼탁액 (fungal suspensions) 을 분광기 (Milton Roy spectronic 20D⁺, spectrophotometer, USA) 에서 600nm, 흡광도 (optical density) 1.0으로 조정된 다음, 완충용액 (phosphate buffer solution) 으로 단계 희석 (serial dilution) 된 균 배양액을 평판 계수법 (spread method) 을 시행하여 37℃, 24시간 배양 후 초기 생균 수 (평균 2.3×10^7 CFU/ml) 를 측정하였다 (CFU: colony forming unit).

(2) 항균 실험 과정

잔류 단량체 (residual monomer) 제거를 위하여 각 시편들을 상온에서 증류수에 3일간 보관한 후, 항균 실험 직전 75 % 알코올에 1시간 침적시켰고 무균 증류수를 이용하여 1시간동안 초음파 세척 (Branson 2200, Danbury, USA) 을 시행한 다음, 최종적으로 24 시간 동안 EO (ethylene oxide) gas 소독을 시행하였다. 멸균된 시편 (군 당 5개) 을 24-well dish에 넣고 시편위에 희석된 칸디다 균액 100 μ l 씩 접종 후 습윤 상태 하에서 24시간, 37℃ 조건으로 배양하고 균 성장 양상을 도말 평판법 (streaking agar plate)으로 확인하였다. 항균효과는 단위 당 군락 균 수 (CFU)의 증감으로 판단하였고 3번의 독립된 연속실험을 시행한 후 그 평균값을 구하였다.

(3) 은 이온 용출량 계측

은-의치상레진 복합체로부터 용출되는 은 이온의 양을 측정하기 위하여 각 실험 시편 (군 당 5개) 을 100 ml 멸균 증류수에 넣고 shaking Incubator (JEIO Tech., SI-600R, Seoul, Korea) 에서 37℃,

Table 1. Classification of groups according to the type and concentration of Ag incorporated.

Group	Type of Ag incorporated	Weight ratio	Concentration of Ag
Control	Polymer : Monomer	3.0 : 1.3	0 %
I	Polymer : (Monomer +Ag ⁰)	3.0 : 1.3	0.2, 1.0, 5.0 %
II	Polymer : (Monomer +AgNO ₃)	3.0 : 1.3	
III	Polymer : Chitosan : (Monomer +Ag ⁰)	3.0 : 0.1 : 1.5	
IV	Polymer : Chitosan : (Monomer +AgNO ₃)	3.0 : 0.1 : 1.5	

130 rpm의 조건으로 24 시간동안 용출된 액을 회수한 다음, 원자흡광광도계 (Atomic Absorption Spectrophotometer; Perkin-Elmer, Analyst 100, Wisconsin, USA) 를 이용하여 정량하고 용출된 은 이온의 농도를 비교 분석하였다.

3) 물성실험

(1) 중합 전환율 (Degree of conversion)

중합 전환율 측정은 라만 분광기 (Jobin-Yvon Horiva HR 800 monochromator, Tokyo, Japan) 와 CCD 3000(V) detector[®] (Horiva, Tokyo, Japan), 그리고 Labspec 4.01 software[®] (Horiva, Tokyo, Japan) 를 이용하여 탄소 이중결합 (C=C) 과 탄소 산소 이중결합 (C=O) 의 진폭 (peak) 높이를 측정하여 계산하였으며 아르곤이온 레이저 ($\lambda = 632.8$ nm) 를 자극 원 (excitation source) 으로 사용하고 이때 레이저 강도는 15 mW, 공 초점 (confocal) 의 크기는 400 μ m로 각각 설정하였다. 은-의치상레진 시편 및 대조군의 중합 전환율은 각 시편의 $\nu(\text{C}=\text{C})$ (1637 cm^{-1}) 와 $\nu(\text{C}=\text{O})$ (1724 cm^{-1})의 진폭 높이 (peak height) 를 이용하여 비교하였으며 사용된 식은 아래와 같다.

$$\text{중합전환율 (\%)} = \left[1 - \frac{C=C \text{ Peak Height}}{C=O \text{ Peak Height}} \right] \times 100$$

(2) 3점 굽힘 강도 측정 (Flexural strength)

실험 시편을 테플론과 금속 몰드를 이용하여 65 mm $\times$ 10 mm $\times$ 2.5 mm (Council on dental materials and devices, 1975) 의 크기로 제조사의 지시대로 중합한 시편을 각 군 당 5 개 씩 제작하고 만능시험기 (Model 4200, Instron Inc., Canton, USA)를 이용하여 지점간 거리인 50 mm 중앙부에 1 mm/min의 하중속도로 시편이 파괴될 때까지의 하중(F)을 측정하여 아래 식으로 굽힘 강도(σ : MPa)의 값을 계산하였다.

$$\sigma = \frac{3Fl}{2bh^2}$$

F : 비례한계 하에서의 하중 (Newton), l : 지점간 거리 (50 mm), b : 시편의 폭 (10 mm), h : 시편의 두께

(2.5 mm)

(3) 은 첨가에 따른 의치상레진의 색조 변화

은이 첨가된 의치상레진의 색조변화를 평가하기 위해 은이 첨가되지 않은 대조군을 기준으로 색차 비교를 시행하였다. 측정기기로 분광광도계 (spectrophotometer: Color-reader[®] Minolta CR-10, Osaka, Japan) 를 사용하였으며 각 시편에서 임의의 세 지점의 수치를 한 지점 당 3 회씩 측정한 후 그 평균값을 명도 지수 L^* , 적색채도인 a^* , 황색채도인 b^* 로 각각 표현하고 CIELAB scale로 이용하여 아래 공식에 의해 대조군과의 색차를 나타내는 ΔE^* 값을 산출하였고 ΔE^* 가 2.0 이하인 경우 임상적 적용이 가능한 것으로 판단하였다(O' Brien 등, 1990).

$$\Delta E^* = \{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2\}^{\frac{1}{2}}$$

$$\Delta L^* = L_1 - L_0, \Delta a^* = a_1 - a_0, \Delta b^* = b_1 - b_0$$

L_1, a_1, b_1 : 은이 첨가된 군

L_0, a_0, b_0 : 은이 첨가되지 않은 대조군

(4) 표면상태 및 기공도 변화관찰

은을 첨가한 실험군과 대조군 시편간의 표면 다공성 차이를 관찰하기 위해 전자현미경 (scanning electron microscope: Hitachi, S-4200, Tokyo, Japan) 으로 관찰하였다 (Magnification $\times$ 10,000).

4) 통계

은 첨가에 따른 시편의 대조군과의 물성 및 항균성의 유의차를 검정하기 위해 일원ANOVA로 통계 처리하고 사 후 비교를 위해 Student t-test를 수행하였으며 모든 통계는 99.9 %의 유의수준으로 검정되었다 ($p < 0.01$).

III. 결 과

1. 은-의치상레진의 항균 효과와 은 이온 용출량

시편 상에서 24 시간 접촉상태로 배양 된 칸디다균의 평균 생균수 및 증식양상은 1.0 %, 5.0 % 의 은 첨가 농도에서 각각 대조군에 대한 유의성 있는 군 감소가 나타났으며 ($p < 0.01$) 군 사별

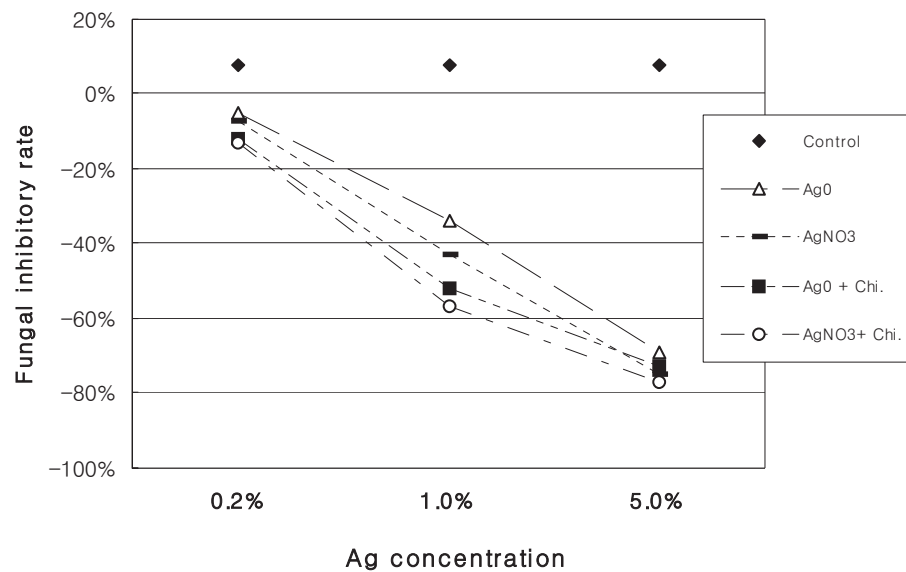


Fig. 1. Reduction rate of viable cell of *Candida albicans* according to the amount and types of silver incorporated.

Table 2. The Ag^+ elution and antifungal effect of modified denture acrylic base with 0.2 % Ag concentration.

Group	Concentration of Ag^+ eluted(ppm)	Colony count ($\text{CFU} \times 10^5/\text{ml}$) (Initial viable cell: 2.32×10^7)	Inhibitory rate(%)
Control	Non detective	242 ± 8.8	+8.6
I	0.037 ± 0.008^a	222 ± 6.8	-4.4
II	0.081 ± 0.012^b	216 ± 11.2	-6.9
III	0.055 ± 0.015^a	207 ± 17.8	-11.8
IV	0.086 ± 0.014^b	202 ± 22.3	-13.0

The different letter is statistically significant among the groups ($p < 0.01$).

Table 3. The Ag^+ elution and antifungal effect of modified denture acrylic base with 1.0 % Ag concentration.

Group	Concentration of Ag^+ eluted(ppm)	Colony count ($\text{CFU} \times 10^5/\text{ml}$) (Initial viable cell: 2.32×10^7)	Inhibitory rate(%)
Control	Non detective	242 ± 8.8^a	+8.6
I	0.098 ± 0.017	$154 \pm 15.2^{b,c}$	-33.7
II	0.104 ± 0.012	133 ± 34.5^b	-42.7
III	0.107 ± 0.038	113 ± 22.4^b	-51.3
IV	0.102 ± 0.025	$101 \pm 11.0^{b,d}$	-56.5

The different letter is statistically significant among the groups ($p < 0.01$).

Table 4. The Ag^+ elution and antifungal effect of modified denture acrylic base with 5.0% Ag concentration.

Group	Concentration of Ag^+ eluted(ppm)	Colony count ($\text{CFU} \times 10^5/\text{ml}$) (Initial viable cell: 2.32×10^7)	Inhibitory rate(%)
Control	Non detective	242 ± 8.8^a	+8.6
I	0.246 ± 0.017	72 ± 20.2^b	-69.0
II	0.387 ± 0.082	61 ± 22.6^b	-75.0
III	0.362 ± 0.098	58 ± 17.3^b	-73.8
IV	0.356 ± 0.105	55 ± 31.5^b	-76.3

The different letter is statistically significant among the groups ($p < 0.01$).

(sterilization) 효과보다는 균 증식을 억제시키는 경향이 관찰되었으나 (Fig. 1) 0.2 % 은 첨가 농도에서 대조군과의 통계적 유의성은 나타나지 않았다 ($p > 0.01$) (Table 2). 1.0 % 농도 시편의 경우 질산은-키토산 함유 시편 (IV군) 에서 가장 높은 억제효과 (56.5 %) 가 나타났고 은 나노 투여 시편 (I군, 33.7 %) 보다 유의성 있는 감소율을 보였으나 ($p < 0.01$) 다른 군 (II, III군)과의 통계적 차이는 나타나지 않았다 (Table 3). 5.0 % 은 첨가 농도 시 1.0 % 첨가보다 전반적으로 향상된 칸디다 균 감소율을 나타내었고 (Fig. 2) 질산은-키토산 투여 군에서 78.7 %의 가장 높은 균 감소율을 보였으나 군 간의 통

계적 유의성은 나타나지 않았다 ($p > 0.01$) (Table 4).

은 첨가 농도에 따른 각 군의 Ag^+ 용출량은 첨가 농도에 비례하여 증가되는 경향을 나타내었으나 초기 은 첨가농도 (2000~50,000 ppm)에 비하여 극소량의 값 (최대치 $0.387 \text{ ppm} \pm 0.082$) 이 계측되었으며 농도별 군 간의 용출량은 0.2 % 농도 투여 시 질산은 첨가 계열인 II군과 IV군에서 은 나노를 첨가한 I군과 III군 계열보다 유의성 있게 높은 것으로 나타났으나 ($p < 0.01$) 1.0 %, 5.0 % 농도에서 군 간의 유의한 차이는 나타나지 않았다 ($p > 0.01$) (Table 2~4).

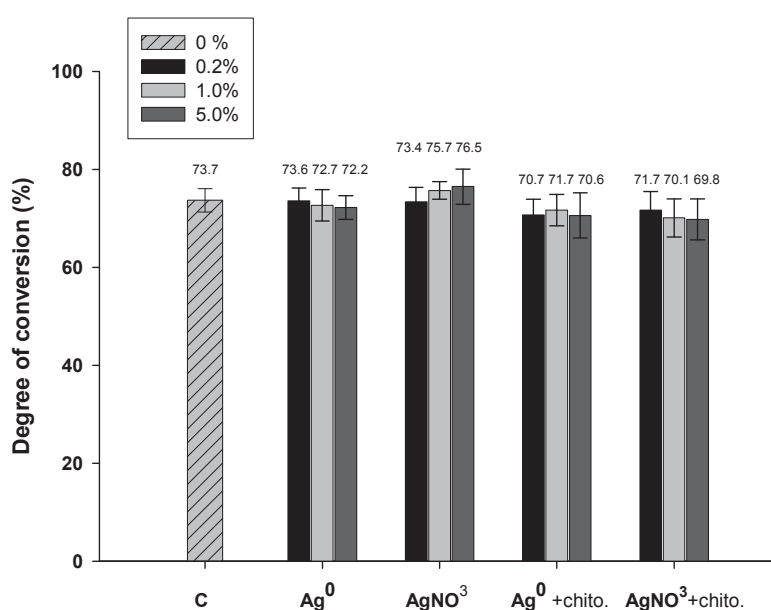


Fig. 2. Degree of conversion of various Ag-denture acrylic specimen compared with control (%).

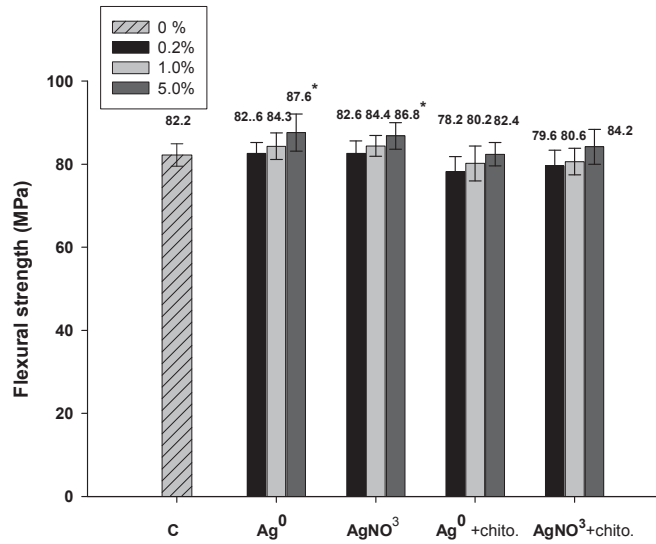


Fig. 3. Flexural strength (MPa) of various Ag-denture acrylic specimens. ;

* means statistically significant compared with control ($p < 0.01$).

2. 은-의치상레진의 물성

1) 중합 전환율

대조군의 중합율 (평균 73.7 %) 과 비교할 때 키토산을 병행 첨가한 III, IV 군에서 상대적으로 낮은 수치 (69.8~71.7 %) 가 측정되었으며 II 군의 5.0 % 질산은을 투여한 시편에서 가장 높은 중합율 수치 (76.5 %)를 나타내었으나 전반적으로 은 투여에 따른 시편의 중합 전환율은 대조군과 유의한 차이가 나타나지 않았다 ($p > 0.01$) (Fig. 2).

2) 3점 굽힘 강도

3점 굽힘 강도에 대한 결과 및 통계를 Fig. 3 에 나타내었다. 5.0 % 은 나노 및 질산은을 첨가한 시편에서

각각 87.6, 86.8 MPa 의 강도를 나타내어 대조군의 평균 굽힘 강도 (82.2 MPa) 보다 유의성 있는 높은 강도를 보였고 ($p < 0.01$), 0.2 % 은 나노와 키토산 첨가 시편에서 78.2 MPa 의 가장 낮은 강도가 측정되었으나 대조군과의 통계적 유의성은 나타나지 않았다 ($p > 0.01$).

3) 색조 변화

은이 첨가된 모든 시편에서 대조군에 대한 색조 변화가 관찰되었다. 모든 은 첨가 군들의 대조군과의 색차는 임상적 기준 (ΔE^* ; 2.0) 수치를 훨씬 초과하였으며 은 첨가 농도가 증가 할수록 색조차이가 증가하였고 키토산분말을 첨가한 경우 첨가하지 않은 경우보다 색조안정성이 더욱 저하되는 것으로 나타났다 (Table 5).

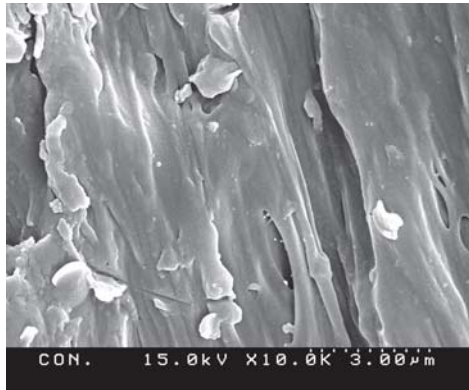
Table 5. Color difference (ΔE^*) of Ag-acrylic denture compared with control.

Group	Ag concentration	Color difference(ΔE^*) compared to control		
		0.2 %	1.0 %	5.0 %
I		8.44	11.03	15.3
II		8.38	11.01	14.9
III		9.02	13.27	17.3
IV		9.16	13.34	16.9

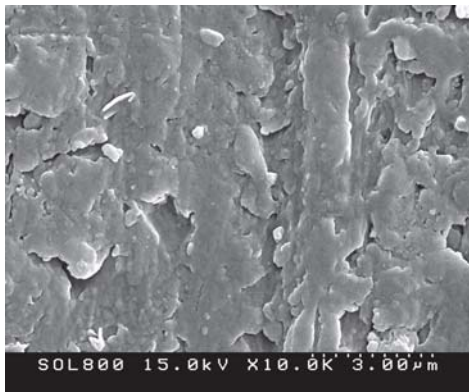
The borderline of clinical acceptability of ΔE^* is 2.0.

4) 실험 시편 표면의 주사현미경 관찰

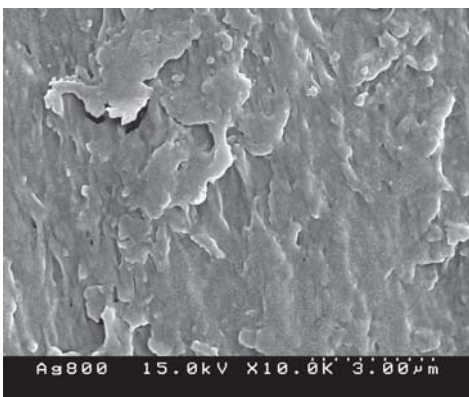
은-의치상레진 시편들의 표면 양상을 전자현미경 ($\times 10,000$) 으로 관찰하여 대조군과 비교한 결과 약간의 표면 거칠기의 차이가 육안적으로 관찰되나 특이한 기포증가나 표면이상 등의 소견은 나타나지 않았다 (Fig. 4).



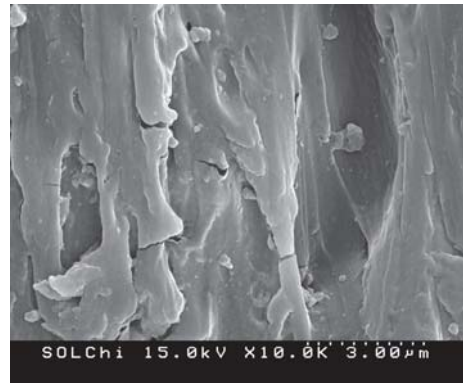
(a) Control



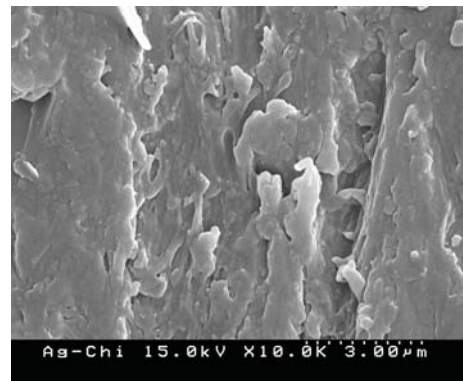
(b) Ag^0 (silver nano-particle)



(c) $AgNO_3$



(d) Ag^0 + chitosan



(e) $AgNO_3$ +chitosan

Fig. 4. SEM pictures of 5.0 % Ag-incorporated denture acrylic with control (Original magnification $\times 10,000$).

IV. 고 찰

의치 구내염의 발생은 기본적으로 의치라는 경질체 표면과 긴밀히 연관되어 있으며 여러 연구에서 플라스틱 인공보철물, 혈관도관 및 의치상 표면과 같은 경질체 표면에서의 세균부착이 보고되었고 (Hans와 Hendrich, 1986 ; Samaranayake 등, 1986) 의치구내염의 주 유발균인 칸디다균의 경우 세포벽 구성요소의 변이로 인한 세포면의 소수성으로 인하여 의치상 레진과 같은 불활성 폴리머 표면에 쉽게 부착할 수 있다 (Minagi, 1985). 일반적으로 의치구내염의 치료로 전신적인 항생 요법 (Nystatin, Miconazole) 이 시행될 수 있으나 특히 플라스틱 표면의 세균막 (biofilm) 을 제거하기 위해서는 고용량이 요구되고 이러한 세균막 형성과 관련된 칸

다다 염증과 같은 만성 질환의 경우 항생 요법으로서의 근본적인 치료 한계성이 존재한다. 따라서 만성질환이환율이 높은 의치사용 노인환자인 경우 내재적 항균성을 가진 의치상레진의 개발은 구강위생 증진과 의치구내염의 예방에 큰 도움을 줄 수 있을 것이다 (Moskona와 Kaplan, 1995). 최근 항생제 남용으로 인한 내성과 약물 치료비용 증가를 극복하기 위한 새로운 항생물질개발에 대한 연구가 진행되고 있으며 천연 무기 항균물질인 은을 이용한 항균 복합체 연구는 이러한 맥락 중의 하나라고 사료된다.

타액 흐름과 세균 영양소가 제한되는 의치 인상면과 점막사이에 칸디다균과 같이 세균막을 형성하는 형태를 재현하기 위하여 본 실험에서는 dwell dish 내의 시편 상에 소량의 희석균주 (100 μ)를 직접 접종한 후 배양된 생균수의 증감을 도말 평판법으로 계측하였는데 이 방법은 다량의 세균 혼탁액 (planktonic phase) 내에 시편을 침수시켜 시편의 항균력을 평가하는 방법과 비교할 때 세균이 항생물질에 대하여 상대적으로 더 낮은 감수성을 가지므로 (Baehni와 Takeuchi, 2003) 보다 실제적인 은-의치상레진의 항균력 평가가 가능하다.

항균 실험 결과에서 의치상 레진상의 진균부착을 효과적으로 억제하기 위해서는 최소 1.0 %의 은이 투여되어야하는 것으로 나타났으며 김 등 (2005)은 이온과의 비교를 통한 나노 은 입자의 대장균 (E-coli)에 대한 항균 특성 연구에서 은 이온이 은 나노입자의 항균효과보다 약 20 배 높은 것으로 보고하였으나 본 실험에서 의치상레진에 투여된 질산은과 은 나노간의 항균효과 및 특성차이는 유의성 있게 관찰되지 않았다. 다만, 1.0 % 은 투여 농도에서 질산은과 키토산분말을 병행 첨가한 경우 은 나노 단독 첨가 시편보다 유의한 증식 억제효과가 나타났는데 천연 항생물질로 알려진 키토산은 은 이온과 은 나노에 대한 안정된 배위자 (ligand) 역할을 하며 키토산의 아미노군이 두 물질을 공유결합 (coordination interaction)시켜 킬레이트 (chelate)화 시키므로 은과의 복합 투여 시 항균력을 상승시킨다 (Huang 등, 2004).

PMMA의 acrylate는 금속이온과의 적절한 화학결합을 이루며 단일용기 반응 (in situ)에서 은 이온

이 중합과정을 통하여 PMMA 폴리머와 화학 결합되어 비록 은 이온의 활동은 억제되나 시간이 경과함에 따라 폴리머는 은 이온의 은 입자로의 전환을 용이하게 하며 일반적으로 금속나노입자가 폴리머에 침착 시 금속이온의 집괴화 (agglomeration)나 침전을 방지하여 고른 분포를 가능하게 한다 (Singh와 Khanna, 2007). 본 연구에서 의치상 레진에 투여된 초기 은 농도 (1000~50,000 ppm)에 비해 용출된 은 이온의 값은 최고 0.387 ppm 인 극소량으로 나타났고 시편의 은 이온 용출 농도와 항균력은 비례하지 않았는데 0.2 % 농도의 경우 질산은 투여 계열 (II, IV 군)은 은 나노 계열 투여 군 (I, III 군)보다 용출량이 유의성 있게 많았음에도 불구하고 항균능력에는 유의한 차이가 없었고 1.0 % 농도의 경우 모든 시편들의 용출농도는 유의한 차이가 없었으나 질산은-키토산 투여 군은 은 나노 투여 군 보다 유의성 있는 높은 항균력을 나타내었다. 본 항균 및 용출 실험과 유사한 양상을 보인 연구를 고찰하면 Yoshida 등 (1999)은 은이 첨가된 수복용 레진의 S. mutans 균 억제효과가 극소량의 은 이온 용출 하에서 언어질 수 있다고 하였고 Imazato 등 (2003)도 MDPB (Methacryloyloxydodecylpyridinium bromide)를 첨가한 수복용 레진에서의 균 성장 억제효과는 첨가 무기물의 유리에 의한 항균작용보다 필러 표면에 고정된 무기 분자와의 직접 접촉에 의한 효과라고 보고하였는데 본 실험의 은-의치상 레진도 극소량의 은 이온을 용출하는 내재적, 영구적 항균의치상재료의 성격을 가진다고 사료된다. 그러나 은을 함유한 물체의 항균작용기전은 아직 충분히 규명되지는 않았으며 Kaouri 등 (1994)은 은의 이화작용 (catabolism)으로 공기 중 또는 수중의 빛 에너지나 수분의 작용으로 전환 발생된 활성산소 (active oxygen)가 세균의 구조 손상을 이르게 한다고 하였고 (oligodynamic action of silver) 구조물 내 고정된 은의 세균과의 직접접촉이 세균막을 파괴하며 이는 자유 살균 은 이온의 기전과 유사하다고 보고하였다 (Imazato 등, 2003).

은-의치상레진의 항균성과 더불어 물성 평가는 임상적 적용 여부에 필요한 요소로서 본 연구에서는 중합 전환율, 3점 굽힘 강도 그리고 표면 상태

등을 대조군과 비교, 분석하였고 그 결과에서 임상 적용에 대한 적절한 물성을 나타내었다. 중합 전환을 측정에 사용된 Raman 분석법은 물질이 방출 또는 흡수하는 빛의 스펙트럼을 계측하는 장치로 스펙트럼선을 분석해 구성 물질의 성분과 운동 상태, 온도 등을 파악하는 것으로 적외선 분광기 (FT-IR) 보다 진폭의 겹침이 적고 더 정확한 정량 분석이 가능하며 시료 중의 수분의 영향에 의한 방해물 적게 받는 장점이 있으며 본 실험에서는 단량체의 구조식에서 탄소 이중결합 ($C=C$) 이 존재하나 100 % 중합 시 $C=C$ 가 존재하지 않게 되고 탄소와 산소의 이중결합 ($C=O$) 또한 변화가 없게 되므로 $C=C$ 결합과 $C=O$ 결합의 진폭 높이를 측정하여 시편들의 중합 전환율을 계산하였다. 열중합레진의 굽힘 강도의 경우 ISO규격 (ISO 1567) 은 최소 65 MPa 이상으로 규정하고 있는 데 본 실험에서 의치상 레진에 투여된 은의 여러 농도들은 굽힘 강도에 부정적 영향을 주지 않은 것으로 나타났고 오히려 5.0 % 은 나노와 질산은이 첨가된 시편의 경우 대조군보다 유의성 있는 강도증가가 나타났는데 무기 은의 첨가가 의치상레진의 기계적 성질을 보다 강화시킨 것으로 사료된다. 은과 키토산 분말을 병행 첨가한 계열에서 대조군보다 약간 낮은 굽힘 강도가 나타났는데 통상적으로 제조사가 아크릴릭 레진의 분말액비를 정할 때 다양한 물성을 만족시키는 최적의 비를 정하게 되는데 본 실험에서 분말 형태로 첨가된 키토산이 분말액비에 대해 영향을 준 것으로 생각되나 통계적 유의성은 나타나지 않았다. 중합과정상의 의치상 레진의 기포 발생은 오랫동안 문제점으로 지적되었고 많은 양의 기포는 제작된 의치의 물성저하와 세균 부착을 용이하게 하는 데 전자현미경 ($\times 10,000$) 상 하에서 관찰된 은-의치상 레진 시편들의 표면 양상은 대조군과의 비교 시 약간의 표면 거칠기의 차이가 육안적으로 관찰되나 첨가 물질로 인한 현저한 기포증가나 표면 이상 등의 소견은 나타나지 않았다 (Fig. 4).

은이 첨가된 물체의 변색은 은의 산화반응의 결과이며 가장 흔한 단점으로 알려져 있으며 본 실험에서도 은-의치상레진의 임상적용의 부정적 변수로 색조 불안정성이 관찰되었다. 임상적 기준 (ΔE^*) 을 고려 시 대조군과의 색조차이 (ΔE^*) 는 8.44에

서 13.34로 나타났으며 은 농도 증가 시 색차가 증가하였고 키토산 첨가 시 색조안정성은 더욱 저하되었다. ΔE^* 수치의 평가 및 해석에 대한 연구로 O' Brien 등 (1990) 은 ΔE^* 가 1이하인 경우 나안으로 식별할 수 없고 2 이하인 경우 임상적 적용이 가능하며 Crispson 등(1991)과 Wozniak (1987) 는 ΔE^* 값이 2이상인 경우 식별가능한 색의 변화가 존재한다고 보고하였는데 본 항균실험의 결과를 고려할 때 의치상레진에 보다 많은 은 용량을 투여 시 증진된 항균효과는 기대되나 이에 따른 색조 차이 증가는 심미성문제를 야기할 수 있다. 의치상레진의 조직인상면에 선별적으로 적용할 수 있는 침상용 레진에 은 첨가는 항균효과 및 색조 변화문제를 보완시킬 수 있을 것으로 사료되는데 이에 대한 추가적인 항균특성 과 물성연구는 필요할 것이다.

본 연구의 은-의치상레진의 특성은 미량의 항균 물질 (Ag^+)을 용출하면서 내재적인 정균력과 적절한 물성을 가지는 항균체의 기능을 가지며 칸디다 의치구내염의 예방에 효과적인 것으로 나타났다. 항균력 평가에서 비록 100 % 균 사멸 (biocidal) 효과는 나타나지 않았지만 여러 연구들에서 은이 대장균과 같은 원균 (prokaryotic) 미생물에 대한 감수성은 높으나 (Zhao 와 Stevens, 1998 ; Spadaro 등, 1974) 칸디다와 같은 진균 (eukaryotic) 미생물에는 상대적으로 낮다는 점과 (Rungby 등, 1987) 초기 투여 균주형태의 고 농도 접촉 및 일시적 집중성을 고려할 때 칸디다균의 증식 억제효과 및 항균 의치상으로서 의의를 가진 것으로 사료된다. 의치 보철물에 있어서 살균성이 아닌 정균성은 내성이나 정상균주보호, 부작용 감소의 측면에서 오히려 바람직할 수 있으나 의치를 장기간 사용하는 경우 비록 미량의 은 이온 용출 하에서도 은피증 (argyria) 이나 정상균주 위해작용 (Petering, 1976 ; Ramage 등, 2001) 에 대한 장기간의 임상실험도 차 후 필요하리라 사료된다.

V. 결 론

이 연구에서는 은이 포함된 의치상 레진의 *Candida albicans* 에 대한 항균효과 및 물성을 평가하였다. 열중합레진 (Vertex-RS[®], Dentimex, Zeist, Holland)

에 대한 은 투여 형태로서 은 나노 첨가 군, 질산 은 첨가 군, 은 나노와 키토산을 첨가한 군 그리고 질산은과 키토산을 첨가한 군으로 설정하였고 투여 농도로 0.2 %, 1.0 % 그리고 5.0 % 등으로 구분하고 은을 첨가 하지 않은 대조군 등 총 5 개 군으로 설정하였다. 실험실에서 배양된 *Candida albicans* (ATCC 66027) 희석 균액 100 μ 를 시편 상에 접종하고 24시간 배양 후 도말 평판법으로 생균수를 측정하였으며 은 이온 용출량도 아울러 측정하였다. 물성 평가로서 중합전환율, 3점 굽힘 강도, 색조안정성 그리고 주사전자현미경으로 표면상태 검사 등을 각각 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 대조군에 대한 유의성 있는 군 감소율은 은 첨가 농도 1.0 % 에서 33.7~56.5 %, 5.0 % 에서 69.0~76.3 % 로 나타났으나 ($p < 0.01$) 0.2 % 투여 농도에서 억제효과는 나타나지 않았다 ($p > 0.01$).
2. 은 첨가 양상에 따른 항균 효과는 1.0 % 첨가 농도 시 질산은-키토산 함유군이 은 나노입자 함유군보다 유의성 있는 감소율을 보였으나 ($p < 0.01$) 다른 군과의 통계적 차이는 나타나지 않았고 5.0% 농도에서 투여 양상에 대한 통계적 유의성은 나타나지 않았다($p > 0.01$).
3. 은 이온 용출량은 첨가된 은 농도에 따라 증가하는 경향을 나타내었으나 초기 은 첨가농도에 비하여 극소량의 값이 측정되었고 0.2 % 농도 시 질산 은, 질산은과 키토산 병행 첨가 군에서는 은 나노, 은 나노와 키토산 병행 첨가 군보다 유의성 있게 높은 것으로 나타났으나 ($p < 0.01$), 1.0 %, 5.0 % 첨가 농도에서 군 간의 유의한 차이는 나타나지 않았다.
4. 중합전환율과 3점 굽힘 강도실험에서 은-의치상 레진 시편은 적절한 물성 수치를 나타내었으나 색조 변화에서는 모든 은-의치상 레진 시편들과 대조군간의 색차가 임상적 적용기준 한계 (ΔE^* : 2.0) 를 초과하였다.
5. 본 연구를 통하여 은 나노가 첨가된 의치상 레진의 칸디다 균주에 대한 항균 기능과 적합한 물성 결과를 도출 할 수 있었으나 명확한 임상적 적용을 위하여 색조 변화의 개선과 보다 장기적인 항균 효과에 대한 실험, 그리고 생체 적

합성을 위한 세포 독성 및 내성 등의 많은 연구들도 필요하리라 사료된다.

참고문헌

- 김지연, 김성은, 김제은, 이종찬, 윤제용 (2005). 은 이온과의 비교를 통한 나노 은 입자의 항균 특성 연구. *대한환경공학회지* 27:771-775.
- 이철재, 김동엽, 김병소 (2007). 은나노 입자가 침착된 활성탄의 항균특성에 관한 연구. *대한공업화학회지* 18(4):396-399.
- Arendorf TM, Walker DM (1987). Denture stomatitis: a review. *J Oral Rehabil* 14:217-227.
- Baehni PC, Takeuchi Y (2003). Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases. *Oral Dis* 9:23-29.
- Barbeau J, Seguin J, Goulet JP, de Koninck L, Avon SL, Lalonde B (2003). Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol & Endod* 95:51-59.
- Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, Ghannoum MA (2001). Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res* 80(3):903-908.
- Council on dental materials and devices (1975). Revised American Dental Association Specification No.12 for dental base polymers in reports of councils and bureaus. *JADA* 90: 451-458.
- Crispin BJ, Hewlett E, Seghi R (1991). Relative color stability of ceramic stains subjected to glazing temperatures. *J Prosthet Dent* 66:20-23.
- Fenlon MR, Sherriff M, Walter JD (1998). Factors associated with presence of denture related stomatitis in complete denture wearers: a preliminary investigation. *Euro J Prosth Res Dent* 6:145-147.
- Fu Jinhong, Ji Jian, Fan Dezeng, Shen Jiacong (2006). Construction of antibacterial multi-

- layer films containing nanosilver via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan-silver ions complex. *J biomedical materials research part A* DOI 10.1002/jbm.a 665-674.
- Hans FM, Hendrich KF (1986). Candida vegetations on silicone voice prosthesis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 112:321-325.
- Huang HZ, Yuan Q, Yang XR (2004). Preparation and characterization of metal-chitosan nanocomposites. *Colloids Surf B* 39:31-37.
- Imazato S, Ebi N, Takahashi U, Kaneko T, Ebisu S, Russel RRB (2003). Antibacterial activity of bactericide-immobilized filler for resin-based restoratives. *Biomaterials* 24:3605-3609.
- Kaouri H, Manabe Y, Yamada Y (1994). Mode of bacterial action of zirconium phosphate cements containing silver ions in the crystal structure. *J Antibact Antifung Agents* 22:595-601.
- Minagi S, Miyake Y, Inagaki K, Tsuru H (1985). Hydrophobic interaction in Candida albicans and Candida tropicalis adherence to various denture base resin materials. *Infect. Immun* Jan:11-14.
- McNally L, Gosney MA, Doherty U et al (1999). The orodental status of a group of elderly in-patients: a preliminary assessment. *Gerodontology* 16:81-84.
- Moskona D, Kaplan I (1995). Oral health and treatment needs in a non-institutionalized elderly population: experience of a dental school associated geriatric clinic. *Gerodontology* 25:304-310.
- Nikawa H, Iwanaga H, Kameda M, Hamada T (1992). In vitro evaluation of Candida albicans adherence to soft denture-lining materials. *J Prosthet Dent* 68:804-809.
- Nikawa H, Yamamoto T, Hamada T, Rahardjo MB, Murata H, Nakadono S (1997). Antifungal effect of zeolite-incorporated tissues conditioner against Candida albicans growth and/or acid production. *J oral rehabil* 24:350-357.
- O' Brien WJ, Groh CL, Boenke KM (1990). A new, small-color-difference equation for dental shades. *J Dent Res* 69:1762-1764.
- Petering HG (1976). Pharmacology and toxicology of heavy metals: silver. *Pharmacol Therapeut* 1:127-130.
- Ramage G, Vande Walle K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL (2001). Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of Candida albicans biofilms. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* 45:2475-2479.
- Rungby J, Ellermann-Eriksen S, Danscher G (1987). Effects of selenium on toxicity and ultrastructural localization of silver in cultured macrophages. *Arch Toxicol* 61:40-45.
- Russell AD, Hugo WB (1994). Antimicrobial activity and action of silver. *Prog Med Chem* 31: 351-370.
- Samaranayake LP, McCortie J, MacFarlane TW (1980). Factors affecting the in-vitro adherence of Candida albicans to acrylic surfaces. *Arch Oral Biol* 25:611-615.
- Samuel U, Guggenbichler JP (2004). Prevention of catheter-related infections: The potential of a new nano-silver impregnated catheter. *Int J Antimicrob Agents* 23:75-78.
- Singh N, Khanna PK (2007) In situ synthesis of silver nano-particles in polymethylmethacrylate. *Materials chemistry and physics* 104:367-372.
- Slawson RM, Van Dyke MI, Lee H, Trevors JT (1992). Germanium and silver resistance, accumulation and toxicity in microorganisms. *Plasmid-determined metal resistance: A collection of reviews* 27:72-79.
- Sondi I, Sondi BS (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for gram-negative bacteria *J colloid and interface science* 275:177-182.
- Spadaro JA, Berger TJ, Barranco SD, Chapin SE, Becker RO (1974). Antibacterial effects of silver electrodes with weak direct current. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* 6(5):

- 637-642.
- Wozniak WT (1987). Proposed guidelines for the acceptance program for dental shade guides. *ADA* Chicago p1-2.
- Yi Y, Wang YT, Liu H (2003). Preparation of new crosslinked chitosan with crown ether and their adsorption for silver ion for antibacterial activities. *Carbohydr Polym* 53:425-430.
- Yoshida K, Tanagawa M, Atsuta M (1999). Characterization and inhibitory effect of antibacterial dental resin composites incorporating silver-supported materials. *J Biomed Mater Res* 47:516-522.
- Zhao GJ, Stevens SE (1998). Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion. *Biometals* 11:27-32.