

은 나노입자가 첨가된 의치 조직조절재의 항균특성 및 세포독성에 관한 연구

남기영

계명대학교 의과대학 치과학교실

Antimicrobial Effect and Cytotoxicity of Experimental Tissue Conditioner Containing Silver Nanoparticles

Ki-Young Nam

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

(Received: May 7, 2012; Revised: May 14, 2012; Accepted: May 16, 2012)

ABSTRACT

The aim of this study was to develop a new antimicrobial tissue conditioner containing silver nanoparticles (Ag^0) and to evaluate its biological performance. Samples of tissue conditioner (Coe-soft, GC cooperation, Tokyo, Japan) containing Ag^0 with the concentrations of 0 (control), 0.1, 0.5, 1.0, 2.0% were fabricated as 20 x 2.0 (diameter x thickness) mm in size for present experiments. In antimicrobial assay, samples were placed on separate culture plate and microbial suspensions (180 μ L) of three tested strains (Staphylococcus aureus, Candida albicans and Escherichia coli) were inoculated. Microbial growth was verified at 24 hours and extended to 72 hours and the antimicrobial effects of samples were evaluated as a percentage of viable cells in withdrawn suspension (100 μ L). The borderline of the antimicrobial effect was determined at 99.9 % of microbial reduction. To test the cytotoxicity of the modified tissue conditioner loaded with Ag^0 , the extracts from experimental samples were prepared according to concentration of Ag^0 (0, 0.1, 0.5, 1.0, and 2.0%) and incubated at 2, 8, 24 and 72 hours. The cytotoxic effects of the extracts to cultured human gingival fibroblast (HGF) were measured by MTT assay. Samples combined with 0.5, 1.0 and 2.0% Ag^0 displayed bactericidal effect against three tested strains in 24 and 72 hour incubation time without statistical difference between two incubating periods ($p > 0.01$). While 0, 0.1 and 0.5% Ag^0 showed no cytotoxic effect at all of incubating times, significantly high cytotoxic effect (less than 25% cell viability) was revealed at 2.0% Ag^0 in 24 and 72 hours respectively ($p < 0.01$) and significantly moderate cytotoxic effect (between 25-50% cell viability) was observed at 1.0% Ag^0 in 24 and 72 hours respectively and 2.0% at 8 hours ($p < 0.01$). Within the limitation of this study in vitro, the results suggest that 0.5% Ag^0 loaded tissue conditioner could be a possible candidate for a novel antimicrobial tissue conditioner with uncompromised cytotoxicity.

KEY WORDS: Antimicrobial effect, tissue conditioner, cytotoxicity, silver nanoparticles

서론

의치 조직조절재 (tissue conditioner)는 의치상 하부와

지지조직 사이의 완충을 부여하여 구강점막에 가해지는 압력을 완화시켜 손상된 구강점막 치치 및 회복에 중요한 치과보철용 생체재료로서 임상에 널리 적용되고 있다. 조직조절재의 필요물성들로 높은 체적안정성, 영구적인 탄성, 적절한 찢김 저항 등이 있으나 무엇보다도 이 재료가 구강조직에 직접 접촉되어 사용된다는 점에서 세균균락에

* 교신저자 : 대구광역시 중구 달성로 216 계명대학교 의과대학 치과학교실, 남기영

Tel : 053-250-7807, E-mail : nkyp@dsmc.or.kr

대한 저항과 생체적합성이 필연적으로 요구된다. 비록 조직조절재가 7일 이내의 비교적 단기간으로 구강 내에 적용되더라도 (Welker, 1977) 저작압, 작용시간경과에 따라 구성 성분 중 에탄올, 가소제 (plasticizer) 등의 소실 그리고 재료자체의 변성으로 인한 물성변화를 겪게 되고 또한 거친 재료표면에 의한 세균 군락형성가능의 단점을 가질 수 있으며 (Ozdemir 등, 2009) 의치판리가 불량하거나 전신적 면역력이 저하된 경우 세균의 저장소 역할을 할 수 있게 되어 칸디다균과 연관된 의치성 구내염, 포도상 구균에 의한 인두와 상기도 감염 등의 합병증이 유발 될 수 있다 (Marsh 등, 1992). 따라서 올바른 조직조절재의 위생관리를 통한 세균군락 예방이 필수적이나 기계적, 화학적 세척은 오히려 재료의 물성을 변질시킬 수 있다 (Nikawa 등, 1997). 의치장착 이환율이 높은 노인들의 경우 신체적 면역력과 동기적 구강위생능력이 상대적으로 저하되어있고 특히 거동이 제한된 환자의 경우 적절한 의치관리능력을 기대하기 더욱 힘들며 국소적, 전신적 항균제 등의 치료는 전신적 질환을 가진 의치장착자의 경우 약물의 중복 및 과다복용, 내성 그리고 치료비 증가 등의 문제점을 가진다. 그 동안 nystatin이나 miconazole 등의 항진균제나 triclosan 등의 항생제를 조직조절재에 투여하는 노력들이 있었으나 투여약제의 조기방출 등의 한시성과 화학 항생제에 대한 세균의 내성증가와 같은 문제점들이 지적되어 왔고 (Douglas와 Walker, 1973; Pesci-Bardon 등, 2004) 따라서 내재적 항균성과 생체안정성을 가진 조직조절재의 개발필요성이 대두되었으나 아직까지 만족할 만한 성과는 미흡하다.

은 (Ag)은 휘발 또는 분해가 일어나지 않는 안정성을 가진 항균물질로 인체에 대한 친화성과 효과적인 항균성을 가진 무기 물질이라는 전통적 경험을 바탕으로 생활 용기에 사용되어 왔다. 은 나노입자 (silver nanoparticles; Ag⁰)는 용액 상태에서 존재하는 은 이온 (Ag⁺)의 응용확대를 위해 나노기술을 적용하여 금속입자상태로 정제한 물질로 귀금속인 은 (Ag)의 초미량 가공화로 인한 비용 절감 및 상용화가 가능하며 은 금속, 은 분말에 비해 극대화된 활동 표면적 그리고 지속적인 Ag⁺용출 등의 장점들이 있으며 (Sondi와 Sondi, 2004; 김지연 등, 2005) 특히 치과용 고분자재료인 폴리머의 acrylates는 Ag⁰와 같은 금속나노입자와의 화학적 결합에 적절한 매개체로 보고되고 있다 (Singh과 Khanna, 2007). Ag 또는 Ag⁺의 항균기전으로 미생물에 존재하는 아미노기, 티올기, 이미다졸기 그리고 카르복실레이트기 등은 비공유전자를 가진 원자단으로서 이들의 작용기는 Ag

또는 Ag⁺과 결합하여 미생물의 호흡 및 전자전달과정을 방해하여 균을 효과적으로 사멸한다고 설명되고 있다 (Russell과 Hugo, 1994; Samuel과 Guggenbichler, 2004).

Ag는 생체불활성 원소이나 특정농도에서 인간조직에 독성을 가진 것으로 보고되며 중등도의 용해성을 가지는 Ag⁰는 Ag⁺방출이 가능하기 때문에 나노입자자체와 용출된 Ag⁺이 모두 세포 독성 반응을 유발시킬 수 있다 (Ivask 등, 2010). 그 독성 기전들 중 하나로 세포 내 미토콘드리아와의 직접적 반응이 언급되는데 (Braydich-Stolle 등, 2005) 미토콘드리아 세포막 단백질은 대개 아미노산을 포함하는 sulfur 성분을 가지며 Ag는 이것과 직접 반응하여 활성산소 (reactive oxygen species)생성을 증가시켜 세포를 사멸시킨다 (Kim 등, 2012). 따라서 Ag⁰이 포함된 조직조절재의 장기간 사용 시 지속적 용출되는 미량의 Ag⁺에 의한 은피증 (argyria)이나 정상균주 위해작용(Petering, 1976; Rungby 등, 1987; Ramage 등, 2001)등의 부작용도 고려될 수 있다. 특히 손상되거나 염증성 구강조직면과 직접 접촉하여 사용되는 조절재의 특성상 항균효과와 동시에 개발재료의 세포친화성이 요구되며 그동안 은 제올라이트 (silver zeolith)와 같은 물질을 조직조절재와 결합시키는 여러 연구가 있었으나 (Mastuura 등, 1997; Nikawa 등, 1997; Abe 등, 2004) Ag⁰을 적용한 조직조절재의 항균특성 및 세포독성도 평가에 대한 연구는 아직 보고된 바 없다.

본 연구에서는 천연항균물질인 Ag을 나노금속입자형태로 가공 및 정제하여 조직조절재에 여러 농도로 첨가한 후 의치구내염 주 원인균인 칸디다 균 (Candida albicans), 병원성 호흡기감염 유발균인 포도상구균 (Staphylococcus aureus) 그리고 구강 외 균주인 대장균 (Escherichia coli)에 대한 항균특성을 평가하고 Ag⁰ 첨가에 따른 조절재의 구강치은세포와의 친화성을 측정함으로써 새로운 항균성 조직조절재 개발가능성과 임상적용을 타진하는데 있다.

재료 및 방법

1) 실험재료 및 시편제작

(1) 은 나노 용액 정제

1.0 노르말 농도의 질산은 (AgNO₃) (Kojima Chemicals Co., Japan) 수용액 500 mL와 안정제인 PVP (PolyN-vinyl-2-pyrrolidone, Sigma-Aldrich Co., Missouri, USA)를 5.0%의 농도로 isopropyl 알코올에 녹

인 500 mL 용액 두 가지를 서서히 혼합한 후 1 시간 동안 아르곤 (Ar) 가스로 혼합용액 내 산소 (O₂)를 제거하였다. 다음 단계로 20 KGy의 ⁶⁰Co 감마선으로 혼합 용액을 조사하여 조직조절재에 첨가될 은 나노용액 (약 10⁵ mg/L)을 정제하였다 (이 등, 2007). TEM (transmission electron microscopy) 분석결과 평균 50 - 100 nm입자 크기를 가지는 Ag⁰을 확인하였다 (Figure 1).

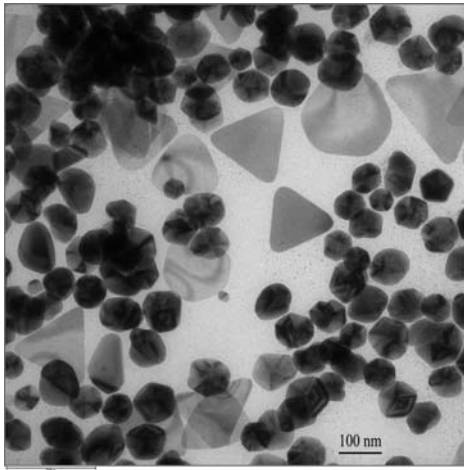


Figure 1. TEM views of the prepared silver nanoparticles used in this study. The average of particle size is distributed from 50 (hexagonal) to 100 (triangular) nm.

(2) 은 나노-조직조절재(Ag⁰TC) 시편제작

실험시편용 조직조절재로 Coe-soft (GC cooperation, Tokyo, Japan)을 선택하였고 먼저 조절재 모노머에 Ag⁰ sol (은 나노 용액)을 각각 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 부피비 (vol/vol %)로 각각 혼합한 다음, 조절재 분말을 제조사 권고의 혼수비 (wt/wt %)로 30초간 혼합하였다. 균일한 시편제작을 위해 혼합된 조직조절재를 지름 20 mm, 높이 2.0 mm 디스크형태 음형을 가진 금속 몰드 내에 주입한 후 몰드 양면을 일정한 압력하에서 두 장의 유리판으로 고정한 후 경화 시까지 30 분간 항온조에 보관하였으며 Ag⁰가 투여되지 않은 시편을 대조군 (0 %)으로 설정하였다 (n = 12).

2) 항균 및 세포독성실험

(1) 실험균주 및 항균실험

항균성 검사를 위한 세 가지 표준균주들로서 *S. aureus* (Staphylococcus aureus, ATCC:6538), *C. albicans* (Candida albicans, ATCC:66027) 그리고 *E. coli* (Escherichia coli, ATCC: 10449)등을 선택하였고 초기

투여 생균수 측정을 위하여 균 혼탁액 (microbial suspensions)을 분광기 (Milton Roy spectronic 20D⁺ spectrophotometer, Ivyland, USA)에서 600 nm 파장 및 흡광도 (O.D.; optical density) 1.0으로 조정하였다. 균 배양액을 완충용액 (phosphate buffer solution)으로 10⁻⁴ 배로 단계 희석 (serial dilution)하고 평판 계수법 (spread method)을 시행하여 37°C, 24 시간 배양 후 초기 투여 생균 수 (2 x 10⁷ CFU/mL)를 측정하였다 (CFU: colony forming unit). 시편들을 초음파 세척기 (Branson 2200, Danbury, USA)에 무균 증류수를 이용하여 1 시간동안 처리한 다음 항균실험 직전 EO (ethylene oxide) gas 소독을 24 시간 시행하였다. 멸균된 시편 (Ag⁰ 투여 농도 당 12개)들을 12 well dish (Costa, Corning, New York, USA)에 넣고 시편위에 희석된 각 균주 180 μL 씩 접종 후 습윤 상태 하에서 37°C 조건으로 24, 72 시간 배양한 후 혼탁액 100 μL을 채집하여 균 증감 양상을 도말평판법 (streaking agar plate)으로 확인하였다.

항균효과는 단위 당 균락 균 수 (CFU)로 평가하고 통상적인 기준에 따라 (Bruns 등, 1985; Gristina 등, 1989) 99.9% 균 감소율을 실험시편의 최소세균사멸농도 (MBC; minimum bactericidal concentration)로 결정하였고 3번의 독립된 연속실험을 시행한 후 그 평균값과 표준편차를 구하였다.

3) 세포독성실험 (MTT)

(1) 세포배양

Ag⁰TC 시편들에 대한 세포독성실험을 위해 사람의 치은 섬유아세포인 human gingival fibroblast (HGF, ATCC 2014, USA)를 선택하였다. 세포의 일차배양은 37°C, 5.0% CO₂ incubator에서 24시간 시행되었고 적정 실험 세포농도의 결정은 실험세포 수 측정 후 96 well plate (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA)에 세포 농도별로 각각 분주한 후 ELISA reader (ELISA processor II, Behring, Germany)로 570 nm 파장 하에 측정된 흡광도 0.6 ~ 0.7의 값으로 시행하였다 (4 x 10⁴ cell/mL).

(2) 세포독성실험 (MTT)

세포독성실험은 미토콘드리아의 탈수소효소작용을 보는 MTT (tetrazolium-based 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5 diphenyltetrazolium bromide) (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) 시험법을 다음과 같이 시행하였다.

배양 섬유아세포를 hemocytometer (Superior Marien

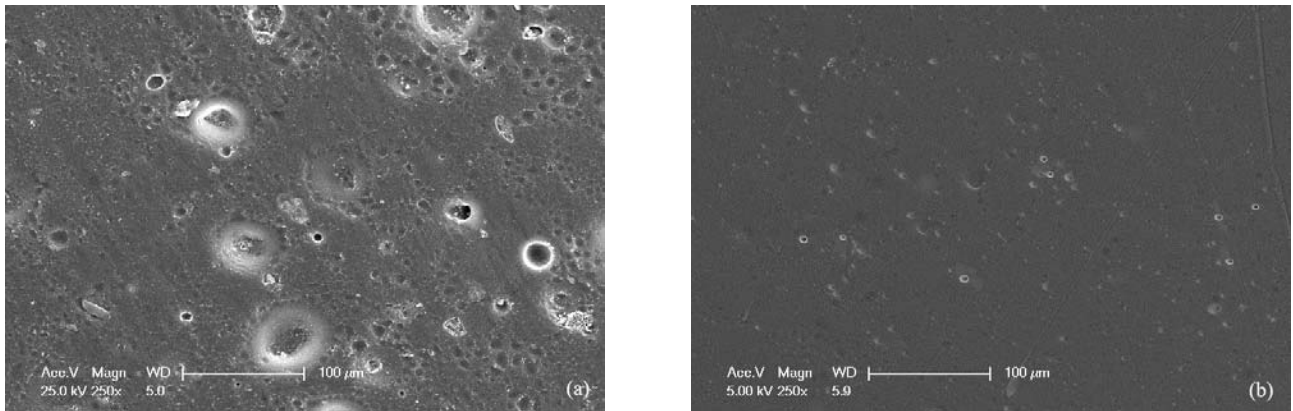


Figure 3. SEM image of 2.0 % Ag⁰TC composite(a), though a few large porosities are detected, overall surface texture is similar with control(b)(x 250).

Feld, Germany)를 이용하여 96 well plates에 well 당 4 x 10⁴ cells/mL의 농도로 180 μ L씩 분주하고 이를 5.0% CO₂, 95% air, 37 °C로 24 시간 배양하였다. 항균실험용 시편과 같이 동일하게 제작된 각 농도별 (0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 %) Ag⁰TC 시편들을 10 mL의 세포배양액에 넣고 shaker로 흔들면서 24 시간 동안 유출시켜 MTT시험에 사용할 시편 용출액 (extracts)으로 사용하였다. 각각의 용출액들을 plate well에 20 μ L씩 첨가한 후 2, 8, 24, 72 시간 동안 5.0 % CO₂, 95% air, 37°C로 배양하였고 phosphate buffered saline에 희석한 10 % MTT를 각 plate well에 100 μ L씩 넣고 4 시간동안 배양하였다. MTT 용액을 흡입하여 제거하고 DMSO (dimethyl sulfoxide, Amresco, St. Louis, Missouri, USA) 100 μ L를 넣은 뒤 formazan이 용해되도록 30분간 배양하였다. ELISA reader를 사용하여 wave length 570 nm에서 흡광도를 측정하였고 세포독성도 (cytotoxicity)를 세포 생존율 (Cv: Cell viability)로 평가하기 위해 다음의 식을 사용하였으며 Table 1에 따라 세포독성정도를 평가하였다(ISO, 1992).

$$C_v (\text{세포 생존율}) = \frac{\text{Sample optical density}}{\text{Control optical density}} \times 100\%$$

Table 1. Grades of cytotoxicity corresponding to cell proliferation percentage

Cell proliferation	Cytotoxicity grade
Less than 25%	Highly cytotoxic
25 - 50 %	Moderate cytotoxic
More than 50%	Not cytotoxic

4) Scanning electron microscope (SEM)/energy dispersion X-ray (EDAX) 분석

주사전자현미경 (Philips XL30S FEG, Phillips, Eindhoven, Netherlands)분석으로 Ag⁰TC 실험시편과 대조 군간의 표면 상태 및 기공도 변화를 관찰하였고 시편내의 실제적인 Ag⁰ 존재를 확인하기 위해 시편의 gold sputtering 후 EDX (Saphire detector with LEAP+Crystals, EDAX Inc., New Jersey, USA)분석을 시행하였다.

Table 2. Antimicrobial effect of Ag⁰TC specimens against three tested strains. Results are presented as CFU count with standard deviation

Strains (Initial CFU: 2×10 ⁷ /mL)	h	Colony count (CFU)				
		0 (control)	0.1 %	0.5 %	1.0 %	2.0 %
<i>C. albicans</i>	24	3×10 ⁸ (10 ⁷)	7×10 ⁶ (10 ⁴)	8×10²(10²)		
	72	2×10 ⁸ (10 ⁸)	2×10 ⁶ (10 ⁶)	ND		
<i>S. aureus</i>	24	5×10 ⁸ (10 ⁸)	7×10 ⁵ (10 ⁵)	2×10²(86)		
	72	8×10 ⁸ (10 ⁸)	3×10 ⁵ (10 ⁴)	ND	ND	ND
<i>E. coli</i>	24	2×10 ⁸ (10 ⁷)	5×10 ⁴ (10 ⁴)	40(95)		
	72	3×10 ⁸ (10 ⁸)	2×10 ⁵ (10 ⁵)	ND		

Bold letter means 99.9% reduction of CFU.
ND; non-detectable.

5) 통계

Ag⁰TC와 대조군과의 항균효과 및 세포독성도를 평가 및 분석하기 위해 일원 ANOVA로 통계처리하고 각 투여 농도 및 적용 시간에 따른 유의성 차이를 검정하기 위해 Duncan test를 수행하였으며 모든 통계는 99.9%의 유의 수준으로 검정되었다 (p = 0.01).

결 과

1) Ag⁰TC의 항균 효과

Ag⁰TC의 *C. albicans*, *S. aureus* 그리고 *E. coli* 실험 균주들에 대한 24시간 배양과 72시간 연장 배양 후 항균 효과는 0.5, 1.0, 2.0% Ag⁰ 투여 농도에서 세 균주들에 대한 세균사멸효과가 나타났으며 최소세균사멸농도는 24 시간 배양 시 0.5% 투여군으로 관찰되었다 (Table 1). 초기 투여균주 수 (2.0 × 10⁷ CFU) 고려 시 Ag⁰TC가 첨가 되지 않은 대조군은 모든 실험균주에 대하여 세균증식이 발생되었고 0.1% Ag⁰ 투여군에서 대조군에 대한 유의차있는 세균증식억제효과가 나타났으나 (p < 0.01) 사멸농도에는 미치지 못하였으며 배양시간 연장에 따른 항균효과의 통계적 유의차는 나타나지 않았다 (p > 0.01) (Table 1).

2) Ag⁰TC의 세포독성

대조군 (0 % Ag⁰)을 기준으로 각 Ag⁰ 투여농도와 배양 시간에 따른 생존 HGF 세포의 백분율 (Cv)을 산정한 결과, 0.1% Ag⁰ 투여군은 모든 배양기간에서 대조군과 유의차가 없었고 (p > 0.01) 0.5% Ag⁰ 투여군은 24, 72 시

간 배양 시, 1.0%와 2.0% Ag⁰ 투여 군들의 경우 8, 24, 72 배양시간에서 세포생존율이 대조군과 비교하여 유의 성 있게 감소하였다 (p < 0.01)(Figure 2).

세포독성평가(Table 1)(ISO, 1992)에서 대조군, 0.1% 그리고 0.5% Ag⁰ 투여군들의 경우 모든 배양기간에서 세포독성이 관찰되지 않았고 1.0 % 투여군의 경우 2, 8 시간 배양 시의 세포독성은 나타나지 않았으나 24, 72 시간 배양에서 세포생존율은 각각 30%와 31%로서 중등도의 세포독성을 보였다. 2.0% 투여군의 경우 2 시간 배양 시 64%의 생존율로 세포독성이 나타나지 않았으나 8 시간 배양 시 39 %의 세포생존율로 중등도의 독성을, 24, 72 시간 배양 시 각각 18%와 15%의 생존율을 기록하여 고도의 세포독성도를 표출하였다 (Figure 2).

3) SEM/EDX 분석 결과

표면 양상을 전자현미경 (x 250)으로 관찰한 결과 2.0% Ag⁰TC 시편에서 대조군과 비교 시 확장된 기공이 다소 관찰되었으나 그 외 특이한 표면 결함 등의 소견은 나타나지 않았고 (Figure 3) EDX 스펙트럼 상에서 시편 내의 Ag⁰의 존재를 약 3 keV 지점의 특징적인 Ag peak 로 확인하였다(Figure 4).

고 찰

PMMA (polymethylmethacrylate), PEMA (polyethyl-methacrylate) 폴리머의 acrylate는 Ag⁰과 같은 금속나노 입자의 화학적 결합에 안정제 (stabilizer)로 적용되어 왔 고 비록 폴리머와의 화학결합으로 인한 Ag⁺의 활동은 억제

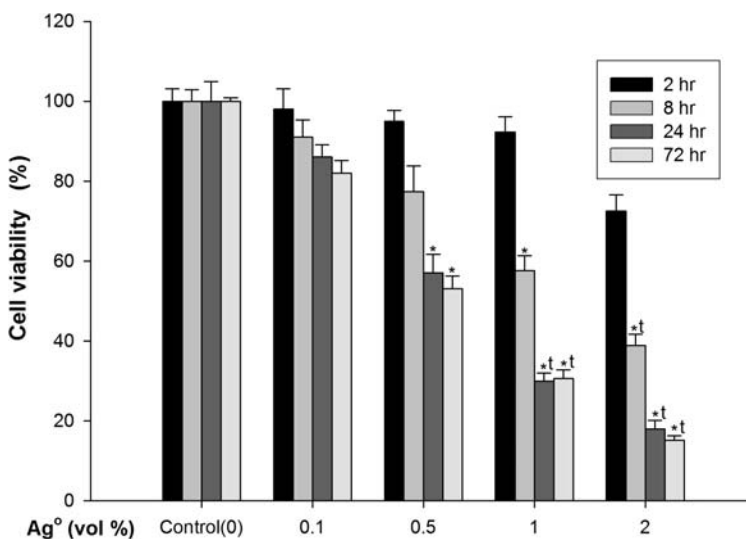


Figure 2. Cell viabilities(%) for tissue conditioners with varying concentration In the range of 0 - 2.0 % of Ag⁰ at 2-72 incubating hours. *means statistically different group from control and t means cytotoxic(< 50 % Cv) against HGF.

되나 시간 경과에 따라 폴리머는 Ag^+ 의 Ag^0 로의 전환을 유도하여 금속나노입자의 폴리머에 침착 시 금속이온의 집괴화 (agglomeration)나 침전을 조절시켜 고른 분포를 가능하게 하며 (Singh과 Khanna, 2007) 본 실험의 EDX분석에서 시편 폴리머내 안정적인 합체를 확인하였다(Figure 4). 은을 silver powder (은 분말) 또는 silver oxide 등의 형태로 의료용 catheter와 같은 폴리머에 첨가 시 Samuel과 Guggenbichler (2004)는 나노입자에 비해 큰 입자크기 ($1-4 \mu m$)를 가진 silver powder의 경우 작용면적크기의 제한성, silver oxide의 경우 용해성으로 인한 수 시간 정도의 짧은 효능지속기간 등의 미흡한 항균효능을 언급하였다. Ag 을 silver zeolite (magnesium-aluminum silicate)의 형태로 조직조절재에 투여하는 연구들도 보고되었는데 Mastuura 등, 1997; Nikawa 등, 1997; Abe 등, 2004) zeolite의 경우 고농도의 Ag^+ 을 방출하지만 8일 미만의 한정된 작용기간의 문제점도 보고되었다 (Samuel과 Guggenbichler; 2004).

일반적인 조직조절재는 표면의 흡수성, 포함 성분인 plasticizer와 solvent 등의 요소들로 인한 잠재적 항균성과 동시에 세포독성을 가지는 것으로 보고되며 (Dahl 등, 2006; Ozdemir 등, 2009) 구강조직과의 일정기간 긴밀한 접촉 환경을 고려할 때 항균성 치과생체재료는 효과적인 세균사멸능력과 동시에 구강조직에 대한 친화성이 확보되어야 하므로 Ag^0 를 투여한 조직조절재의 항균 효과 및 세포독성학적 분석에 물성과 더불어 우선적 고려가 필요하다 (Dahl 등, 2006).

조직조절재의 구강내 적용시점부터 표면거침성과 기공은 세균균락형성의 표적이 되며 일단 유해균이 표면에 부착되면서 여러 단계의 과정을 거쳐 세균막 (biofilm)을 형성한다. 특히 세균막하부의 세균균락은 식균작용과 항생치료의 난이성이 존재하므로 염증상태인 구강점막의 경우 조절재 적용 초기부터 유해세균의 균락형성을 예방할 수 있어야 한다. Gruber 등 (1966)은 zinc undecylenate를 투여한 칸디다균 증식억제 실험에서 효과적이며 독성이 없는 항진균제를 재료에 첨가시킬 것을 제안하였고 이 후 nystatin, amphotericin B, chlorhexidine 등의 약제투여에 의한 항균효과가 보고되기도 하였다 (Olsen, 1975). 그러나 약제와 조직조절재간의 화학적 상호작용에 의한 효과 감소 (Thomas와 Nutt, 1978), 내성 및 약제성분의 조기방출 (Douglas와 Walker, 1973; Pesci-Bardon 등 2004) 등의 단점들이 보고되었고 또한 약제입자가 타액에 용해되고 남은 조절재 표면 공간이 세균의 새로운 배지역할을 할 수 있으며 세균영양소가 풍부한 실제 구강 내 환경을 고려할 때 그 효능이 의문시될 수 있다. 본 실험에 사용된

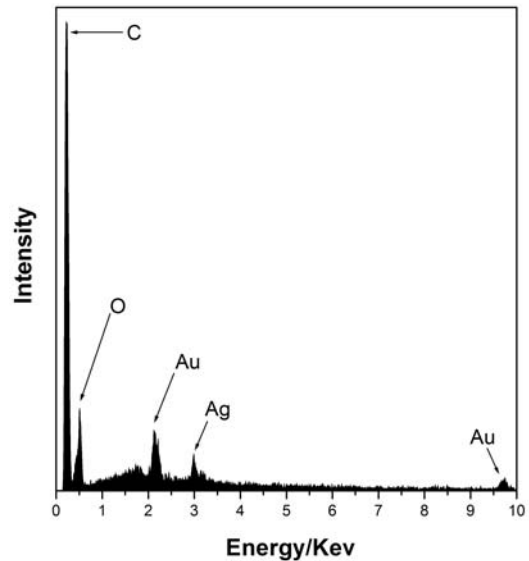


Figure 4. EDX analysis identified silver in surface of Ag^0 TC. The sample was gold sputtered under high vacuum before the analysis.

Coe-soft에는 첨가항균성분으로 zinc undecylenate가 포함되어 있어서 대조군 자체의 항균성과 함께 실험시편에 투여된 Ag 와의 상승효과가 기대되었으나 원재료자체인 coe soft (대조군)의 경우 세 가지 균주들에 대한 어떠한 세균 수 감소효과는 관찰되지 않았다. 실험방법의 상이성이 존재하지만 Oikta 등 (1992)과 Chang과 Lee (1985)의 연구들에서도 zinc undecylenate의 항균기능에 대한 의문을 제기한 바 있고 따라서 본 실험의 세균 사멸능력은 0.5% 이상 투여된 Ag^0 의 효과로 판단된다. 구강조직과의 직접 접촉과 더불어 타액 흐름이 다소 제한된 조직조절재의 적용환경을 재현하기 위하여 항균실험에서는 $180 \mu L$ 의 미량의 세균혼탁액을 시편 위에 직접 접종하였고 시편 표면의 Ag^0 와 직접 접촉 또는 유리된 Ag^+ 이 멸균작용을 초래한 것으로 평가된다. 은이 결합된 폴리머 (Ag -polymer)의 항균기전에 대한 명확한 규명은 아직 없으나 폴리머 내의 은의 촉매작용 (catalytic action)에 의해 발생된 활성산소 (active oxygen)가 세균의 구조 손상을 초래하거나 (Yoshida 등, 1999) 또는 폴리머 내에 고정된 살균물질이 세균과 직접 접촉하여 세균막을 파괴한다는 기전 등이 언급되고 있다 (Imazato 등, 2003).

본 실험에서 독성평가는 시편에서 유리된 Ag^+ 추출액으로 MTT assay를 이용하여 HGF의 생존율을 평가하는 간접방식이었으며 세포를 시편 표면 위에 적용하는 직접 방식에 비하여 항상성과 반복가능성의 장점을 가진다 (Bouillaguet 등, 2002). MTT assay는 치과생체재료의 독성평가에 간편하면서 신속하고 재현 가능한 이점으로 널리 사용되며 실험재료가 세포를 괴사시키지는 않지만 대

사작용이나 기능에 영향을 주는 것 까지 파악할 수 있다는 것이 다른 세포독성실험보다 장점이라고 할 수 있다 (Ciapetti 등, 1993).

본 연구의 실험재료인 Coe-soft는 분말과 액의 혼합에 의한 gel형태의 조직조절재로 주요 구성성분은 polyethyl methacrylate (PEMA)분말과 dibutylphthalate (49.7%), benzyl salicylate (35.1%), 그리고 ethyl alcohol (15.2%) 이 혼합된 모노머로 이루어져 있다. MTT assay 결과에서 세포생존율은 Ag⁰ 투여 농도와 배양시간에 따라 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었으며 Ag⁰이 투여되지 않은 대조군의 성적을 고려할 때 모노머성분인 plasticizer와 solvent에 의한 세포 독성유발요인은 배제되었다. 이는 중합 후 시편을 증류수에 계류시킨 요소와 더불어 조절재에 대한 저작압력이 plasticizer와 solvent의 용출을 가속시켜 재료의 탄성과 체적변형을 점진적으로 초래하는 실제임상 환경과 다른 본 실험상의 정적인 실험조건과의 차이에서 기인한 것으로 판단되며 상대적으로 Ag⁰ 함유 시편자체의 독성평가가 가능하였다. 그러나 본 실험의 경우 배양 72 시간까지의 초기독성평가였으며 Ag⁰이 포함된 조직조절재를 주기적 교체 없이 구강 내에 장기간 사용 할 경우 지속적 용출되는 미량의 Ag⁺에 의한 은피증 (argyria)이나 정상균주 위해작용 (Petering, 1976; Rungby 등, 1987; Ramage 등, 2001)등의 부작용에 대한 고려도 필요하다. Kim 등(2012)은 Ag⁰의 생의학적응에 있어 Ag⁰의 입자 크기(10 - 100 nm)에 따른 세포독성도 변화연구에서 세포 생존율이 투여 나노입자의 크기와 반비례하였음을 보고하였다. 따라서 본 실험에서 정제된 Ag⁰의 평균 입자크기 (50 - 100 nm)를 감안할 때 보다 향상된 세포친화성을 위한 연구는 계속 필요하다.

본 실험에서 0.5% Ag⁰TC는 양호한 구강생체 친화성과 우수한 항균성을 가진 새로운 조직조절재로서의 개발 가능성을 생체 외 실험으로 부분적으로 확인하였으나 보다 명확한 임상적응을 위한 생체 실험, 개조시편의 물성 및 색조변화 등에 대한 계속적 연구가 요구된다.

결론

본 연구에서는 은 나노 (Ag⁰)가 투여된 (0 - 2.0%)의 치 조직조절재 (Coe-soft)에 *S. aureus*, *C. albicans* 그리고 *E. coli* 등 세 가지 표준균주에 대한 항균특성과 치은 섬유아세포에 대한 세포독성도를 MTT assay로 각각 평가하고 아래와 같은 결론을 도출하였다.

1. 0.5, 1.0 및 2.0% Ag⁰TC 시편에서 세 균주에 대하여 항균효과가 도출되었고 최소세균사멸농도는 24, 72시간 배양 시 0.5% Ag⁰ 투여군으로 관찰되었다(p<0.01).
2. 세포독성평가에서 대조군(0%), 0.1% 그리고 0.5% Ag⁰TC 시편들의 경우 2, 8, 24, 72 시간 배양기간 동안 세포독성은 나타나지 않았고 1.0% 투여군의 경우 2, 8 시간 배양 시 세포독성은 나타나지 않았으나 24, 72 시간 배양에서 중등도의 세포독성을 보였다. 2.0% Ag⁰TC 시편에서 2 시간 배양 시 세포독성이 관찰되지 않았으나 8 시간 배양 시 중등도의 독성을, 24, 72 시간 배양 시 고도의 세포독성도를 표출하였다.
3. 본 연구를 통하여 0.5% Ag⁰가 첨가된 조직조절재는 우수한 항균성과 세포친화성을 가지는 의치용 생체재료로서의 가능성이 도출되었으나 명확한 임상적 적용을 위하여 물성변화, 색조변색 그리고 생체 실험 등의 추가 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.
- Bouillaguet S, Shaw L, Gonzalez L, Wataha JC, Krejci I (2002). Long-term cytotoxicity of resin-based dental restorative materials. *J Oral Rehabil* 29:7-13.
- Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager J, Hofmann MC(2005). In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germ line stem cells. *Toxicol Sci* 88:412.
- Bruns W, Keppeler H, Bancks R (1985). Suppression of intrinsic resistance to penicillins in *Staphylococcus aureus*, by polidocanol, a dodecyl polyethyleneoxid ether. *Antimicrob Agents Chemother* 27:632-639.
- Chang DS, Lee KW (1985). The inhibiting effect of tissue conditioners combined with antifungal agents on the growth of *Candida albicans*. *J Korean Acad Prosthodont* 23: 268-280.
- Ciapetti G, Cenni E, Pratelli L, Pizzoferrato A. In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. *Biomaterials* 1993;14:359-64.

- Dahl JE, Frangou-Polyzois MJ, Polyzois GL (2006). In vitro biocompatibility of denture relining materials. *Gerodontology* 23:17-22.
- Douglas WH, Walker DM(1973). Nystatin in denture liners—An alternative treatment of denture stomatitis. *Br Dent J* 135: 55-59.
- Gristina AG, Jennings RA, Naylor PT, Myrvik QN, Webb LX (1989). Comparative in vitro antibiotic resistance of surface-colonizing coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 33:813-816.
- Gruber RG, Lucatorto FM, Molnar EJ (1966). Fungus growth on tissue conditioners and soft denture liners. *JADA* 73:641-643.
- Haase A, Manton A, Graf P, Plendl J, Thuenemann AF, Meier W, Taubert A, Luch A(2012). Arch Toxicol A novel type of silver nanoparticles and their advantages in toxicity testing in cell culture systems Mar 29. (Epub ahead of print)
- 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.
- ISO (1992). ISO 10993-1:1992.
- Ivask A, Bondarenko O, Jephina N, Kahru A (2010). Profiling of the reactive oxygen species-related ecotoxicity of CuO, ZnO, TiO₂, silver and fullerene nanoparticles using a set of recombinant luminescent Escherichia coli strains: differentiating the impact of particles and solubilized metals. *Anal Bioanal Chem* 398:701-716.
- Kim TH, Kim M, Park HS, Shin US, Gong MS, Kim HW (2012). Size dependent cellular toxicity of silver nanoparticles. *J Biomed Mater Res A*, 100:1033-1043.
- Lubick N (2008). Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles or both? *Environ Sci Technol* 42:8617.
- Matsuura T, Abe Y, Sato Y, Okamoto K, Ueshige M, Akagawa Y (1997). Prolonged antimicrobial effect of tissue conditioners containing silver-zeolite. *J Dent* 25:373-377.
- Nikawa H, Yamamoto T, Hamada T, Rahardjo MB, Murata H, Nakadona S (1997). Antifungal effect of zeolite-incorporated tissues conditioner against Candida albicans growth and/or acid production. *J oral rehabil* 24:350-357.
- Okita N, Orstavik D, Orstavik J, Ostby K (1991). In vivo and in vitro studies on soft denture materials: microbial adhesion and tests for antibacterial activity. *Dent Mater* 7: 155-160.
- Ozdemir KG, Yilmaz H, Yilmaz S (2009). In Vitro Evaluation of Cytotoxicity of Soft Lining Materials on L929 Cells by MTT Assay. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 90:82-86.
- Olsen I (1975). Denture stomatitis : Effects of chlorhexidine and amphotericin B on the mycotic flora. *Acta Odontol Scand* 33:41-46.
- Petering HG (1976). Pharmacology and toxicology of heavy metals: silver. *Pharmacol Therapeut* 1:127-130.
- Pesci-Bardon C, Fosse T, Serre D, Madinier I (2006). In vitro antiseptic properties of an ammonium compound combined with denture base acrylic resin. *Gerodontology* 23:111-116.
- 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. *Antimicrob Agents Chemother* 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.
- 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. *Mater chem phys* 104:367-372.
- 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 interface sci* 275:177-182.
- Thomas CJ, Nutt GM (1978). The in vitro fungicidal properties of Visco-gel, alone and combined with nystatin and amphotericin B. *J Oral Rehabil* 5:167-172.
- Welker WA (1977). Prosthodontic treatment of abused oral tissue. *J Prosthet Dent* 37:259.