

접착성 성분을 첨가한 실험용 불소바니쉬의 항균 지속성

신성진¹, 손주리², 오승한^{1,3}, 배지명^{1,3,*}

¹원광대학교 치과대학 치과생체재료학교실

²원광보건대학교 치위생과

³원광대학교 생체재료·매식연구소

Antibacterial sustainability of experimental fluoride varnish added with adhesive components

Seong-Jin Shin¹, Ju-Lee Sor², Seunghan Oh^{1,3}, Ji-Myung Bae^{1,3,}*

¹Department of Dental Biomaterials, College of Dentistry, Wonkwang University, Iksan-si, Republic of Korea

²Department of Dental Hygiene, Wonkwang Health Science University, Iksan-si, Republic of Korea

³Institute of Biomaterial-Implant, Wonkwang University, Iksan-si, Republic of Korea

The purpose of this study was to evaluate the sustainability of antibacterial effect against *Streptococcus mutans* of experimental fluoride varnish mixed with 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) and/or glutaraldehyde. Experimental fluoride varnish (EX1) was fabricated. To make fluoride varnish with adhesive materials, EX1 was mixed with 5 wt% of glutaraldehyde (EX2), 35 wt% of HEMA (EX3) or both 5 wt% of glutaraldehyde and 35 wt% of HEMA (EX4). 5 µL of each experimental group was applied to 6 mm diameter polyethylene terephthalate film discs. Discs were stored in distilled water in a shaking incubator at 37°C for 1 hour, 3 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, 5 days and 10 days. The antibacterial activities against *S. mutans* were evaluated by agar diffusion test with the discs at each time. The antibacterial activities were sustained up to 10 days in all groups. The antibacterial activities of EX3 and EX4 were significantly higher than other groups from 8 hours to 10 days and there were no significant differences from EX2 at 10 days. HEMA with and without glutaraldehyde can be applied to fluoride varnish to increase the sustainability of antibacterial activities.

Key words : Fluoride varnish, Sustainability of antibacterial activity, 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), Glutaraldehyde

Seong-jin Shin (ORCID : 0000-0002-4140-5157)

Son ju lee (ORCID : 0000-0003-4611-8891)

Seunghan Oh (ORCID : 0000-0002-7250-721X)

Correspondence: Ji-Myung Bae (ORCID: 0000-0002-8607-8604)

460 Iksan-daero, Iksan-si, Jeonbuk 54538, Republic of Korea

Affiliation: Department of Dental Biomaterials and Institute of Biomaterials · Implant, College of Dentistry, Wonkwang University, Iksan-si, Republic of Korea

Tel: +82-63-850-6859, Fax: +82-63-850-6859

E-mail: baejimy@wku.ac.kr

Received: Sep. 25, 2020; Revised: Nov. 10, 2020; Accepted: Dec. 16, 2020

서론

치아우식은 세계적으로 가장 흔한 만성질환의 하나로 구강 통증과 치아 상실의 주된 원인이다(1). 치면세균막 내에 있는 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) 등의 균은 탄수화물을 대사시켜 산을 생성하여 pH를 낮추고, 치아의 표면 법랑질의 탈회를 일으켜 치아우식증이 진행된다(2).

불소는 치아우식 예방에 효과적인 물질로 알려져 있다(3). 불소를 이용하는 방법은 저농도의 불소 이온을 음료를 통해 복용시키는 불소이온복용법과 고농도의 불소화합물을 치아 표면에 직접 바르는 국소도포법으로 나뉜다(4). 치과진료실에서 실시되는 불소 국소도포방법으로는 산성불화인산염 (Acidulated phosphate fluoride, APF) 겔을 이용한 방법, 2% 불화나트륨을 이용한 이온도입법 등이 있으며(5), 최근 불소바니쉬가 널리 사용되고 있다(6).

불소바니쉬는 치아에 부착성이 높은 천연 레진에 불소를 결합하여 치아에 장기적으로 불소를 방출하는 물질이다(7). 시술 방법이 간편하고 겔에 비해 도포량이 적다는 장점이 있다(8). 불소바니쉬의 주된 치아우식 예방 기전은 치아와 치태 표면에서 재광화를 촉진하고 탈회를 방지하는 것이지만(9), 또한 *S. mutans* 성장을 억제해 산 생성을 억제하는 역할도 한다(10).

치아 표면과 레진의 접착을 도와주는 성분으로 유기인산 에스테르, 4-META (4-methacryloxyethyl trimellitate anhydrate), NPG-GMA (N-phenyl glycine), isocyanate, HEMA, glutaraldehyde 등이 사용된다(11, 12). 이 중 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA)는 상아질에 대한 친화성과

침투성을 가지고 있어 상아질 접착제의 결합강도를 증가시키는 효과를 가진다(13). Glutaraldehyde는 레진 접착시스템에서 콜라겐 섬유 네트워크를 안정시키는 역할뿐 아니라 소독제와 지각과민처리제의 역할을 한다(14). HEMA와 glutaraldehyde는 주로 상아질 접착제, 상아세관을 폐쇄하는 지각과민처리제, 항균제로 응용이 되었다(15, 16) 하지만 HEMA와 glutaraldehyde와 같은 접착성 성분을 불소바니쉬에 첨가하여 지속적인 불소 방출로 인한 항균 효과의 지속성을 평가한 논문은 없었다.

본 연구의 목적은 HEMA와 glutaraldehyde 같은 치아와의 접착성 성분을 실험용 불소바니쉬에 첨가하였을 때 시간에 따라 *S. mutans*에 대한 항균의 지속성이 증가되는지를 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 불소바니쉬 제작

실험용 불소바니쉬(EX1)는 45 wt% 로진(KR-610, Arakawa, Osaka, Japan)과 5 wt% NaF (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 50 wt% Ethanol (absolute, Merck, German)에 혼합하였다. 교반기(RCH-3, Tokyo Rikakikai Co., Ltd, Tokyo, Japan)위에서 90°C 물중탕을 하여, overhead stirrer (RW20DZM.n, IKA Korea, Ltd., Seoul, Korea)를 사용해 240 rpm으로 30분간 혼합하여 제작하였다(17).

Table 1. Classification of experimental groups in the study

CODE	Experimental group
EX1	Experimental fluoride varnish
EX2	Experimental fluoride varnish + 5 wt% glutaraldehyde
EX3	Experimental fluoride varnish + 35 wt% HEMA
EX4	Experimental fluoride varnish + 5 wt% glutaraldehyde + 35 wt% HEMA
VV	V-varnish (Vericom, Chuncheon, Korea) 5% NaF, tricalcium phosphate, rosin, xylitol

2. 불소바니쉬와 접착성 성분의 혼합

실험용 불소바니쉬(EX1)에 접착성 성분을 혼합하여, 5 wt% glutaraldehyde(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 첨가군(EX2), 35 wt% HEMA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 첨가군(EX3), 35 wt% HEMA와 5% glutaraldehyde를 혼합한 군(EX4)를 제작하였다(Table 1). 접착성 성분은 EX1과 같은 방법으로 혼합하였다. 시중에 시판되는 불소바니쉬와 비교하기 위해서 V-Varnish (Vericom, Chuncheon, Korea; VV)를 사용하였다.

3. 항균의 지속성 시험

S. mutans (ATCC 25175)를 3.7% BHI broth에 접종하여 24시간 동안 37°C 배양기(JSGT-100T, JSR, Cheongwon, Korea)에서 1차 배양했다. 1차 배양한 균액을 3.7% BHI broth에 접종하여 6시간 2차 배양하였다. *S. mutans*를 1×10^5 CFU/mL로 희석하여 한천배지에 접종하였다.

직경 6 mm polyethylene terephthalate (PET) film disc에 불소바니쉬를 각각 5 μ L 도포하고 건조하였다. 증류수에 불소바니쉬를 도포한 디스크를 담고, 37°C 진탕배양기(JSSI-100C, JSR, Cheongwon, Korea) 1시간, 3시간, 8시간,

12시간, 24시간, 5일, 10일 동안 120 rpm으로 진탕하여 보관하였다. 보관 후 물질이 도포된 면이 한천에 닿도록 균이 접종된 한천배지 위에 위치시켰다. 이후 24시간 동안 37°C로 배양하여 디스크 주변에 형성된 *S. mutans* 억제대(inhibition zone)의 직경을 직각 방향으로 각각 측정하여 평균을 구하여 항균의 지속성을 평가하였다(18).

4. 통계처리

통계 분석은 SPSS 프로그램(IBM SPSS Statistics version 24; IBM Corp., Armonk, NY, USA)를 이용하였다. 접착 성분이 들어간 실험용 불소바니쉬의 항균 능력을 비교하기 위해 One-way ANOVA를 시행하였고, 사후분석으로 Duncan's test를 시행하였다($\alpha = 0.05$).

결 과

모든 불소바니쉬 군은 10일까지 항균 능력을 보였다. 또한 증류수에서의 보관 기간이 길어질수록 항균 능력은 감소하였다(Table 2, Figure 1). EX 3군과 EX 4군은 8시간에서 10일까지 항균력이 다른 군보다 유의성 있게 높았으나

Table 2. Antibacterial effect of experimental fluoride varnish mixed with HEMA and/or glutaraldehyde at each time after cycling in distilled water

	0 h	1 h	3 h	8 h	12 h	24 h	5 d	10 d
EX1	20.80 ^{aA} (1.82)	18.77 ^{bAB} (2.42)	17.02 ^{aB} (0.23)	14.31 ^{bC} (1.74)	12.70 ^{bC} (2.08)	13.29 ^{bC} (2.08)	11.94 ^{cCD} (1.66)	9.84 ^{bD} (1.13)
EX2	22.18 ^{aA} (10.76)	22.18 ^{aA} (2.35)	17.83 ^{aAB} (3.37)	16.16 ^{bABC} (1.09)	13.38 ^{bBC} (0.54)	11.50 ^{bC} (0.82)	11.06 ^{cC} (1.24)	10.46 ^{abC} (0.78)
EX3	24.95 ^{aA} (2.27)	18.37 ^{bBC} (0.51)	18.74 ^{aB} (1.02)	18.69 ^{aB} (1.68)	17.37 ^{aBC} (1.05)	16.47 ^{aC} (1.28)	13.73 ^{abD} (1.89)	11.89 ^{aD} (1.21)
EX4	23.88 ^{aA} (1.88)	19.24 ^{bB} (0.69)	18.89 ^{aB} (1.06)	19.10 ^{aB} (1.85)	18.65 ^{aB} (0.88)	17.30 ^{aB} (1.81)	14.60 ^{aC} (0.87)	11.94 ^{aD} (1.39)
VV	20.27 ^{aA} (1.77)	14.43 ^{cBC} (2.53)	16.16 ^{aBC} (1.51)	13.80 ^{bCD} (2.41)	12.95 ^{bCD} (1.41)	15.58 ^{bBC} (0.16)	13.60 ^{abCD} (0.92)	11.94 ^{aD} (0.87)

Different lowercase letters are significantly different among materials within each period time (column) and different uppercase letters are significantly different among period within materials (row) by one-way analysis of variance and Duncan's test at $\alpha = 0.05$.

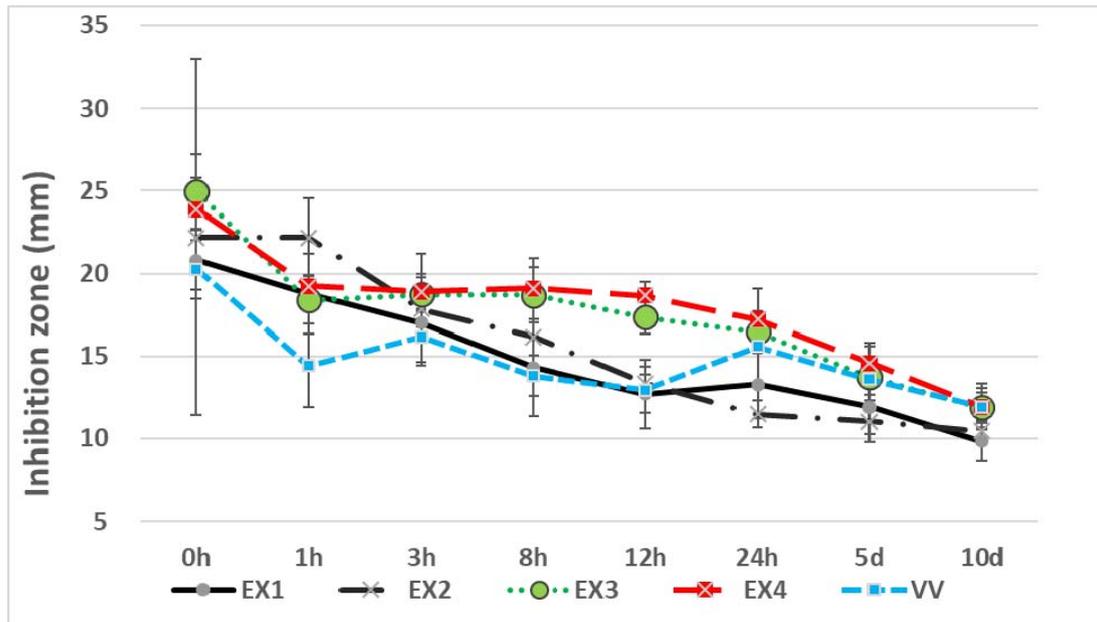


Figure 1. Sustainability of the antibacterial activities of experimental fluoride varnishes mixed with HEMA and/or glutaraldehyde.

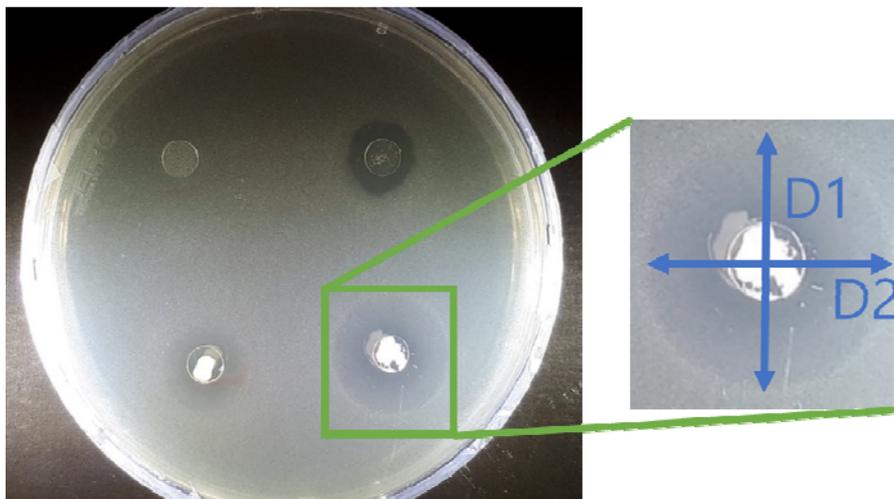


Figure 2. Inhibition zone of agar diffusion test. The inhibition zone is average of D1 and D2.

($P < 0.05$). 5일에서는 VV군과의 유의차가 없었고($P > 0.05$), 10일에서는 VV군과 EX2군과의 유의차가 없었다($P > 0.05$).

고 찰

본 실험에서는 접착성 물질인 HEMA와 glutaraldehyde를

실험용 불소바니쉬에 혼합하였을 때 시간에 따른 항균의 지속성이 증가되는지 한천배지시험으로 평가하였다. 그 결과 HEMA와 glutaraldehyde와 혼합된 불소바니쉬가 10일까지 더 높은 항균 능력을 보였으며 특히 초기 8시간, 12시간, 24시간에서 HEMA를 포함한 EX3군과 EX4군이 유의성 있게 높은 항균력을 보였다.

본 실험의 결과로 볼 때 glutaraldehyde보다는 HEMA가

항균의 지속성에 더 큰 영향을 미치는 것으로 보인다. HEMA 자체의 항균 능력이 있어(19), 레진 기질과 결합해서 장기적으로 항균 능력을 보이는 것으로 생각된다. Glutaraldehyde 또한 항균 능력이 있지만(20), 레진 기질과 결합할 수 없어 단기간 내에 용매로 용출된 것으로 보인다. 실험에 사용된 불소바니쉬(EX1)는 레진 베이스, 용매로 사용된 에탄올, NaF로 구성되어 있다. HEMA와 glutaraldehyde가 혼합되어 있을 때, glutaraldehyde는 치아의 유기성분의 아미노기와 결합하고, HEMA의 한쪽 그룹은 글루타르알데하이드와 다른 한쪽의 이중결합은 레진 성분과 결합한다(11, 21). Munksgaard와 Asmussen의 연구에 따르면 HEMA와 glutaraldehyde를 혼합해 dentin과의 결합강도를 보았을 때, 적절한 HEMA의 농도는 35%, glutaraldehyde는 3% 이상이라고 하였다(12). 또한 35 wt% HEMA와 5 wt% glutaraldehyde를 포함하는 Gluma desensitizer (Heraeus Kulzer, Germany) 제품이 오랫동안 지각과민치치제로서 임상에 쓰이고 있다(22). 따라서 본 실험에서는 35 wt%의 HEMA와 5 wt%의 glutaraldehyde로 농도를 결정하였다.

실제 시판되는 제품과의 비교를 위해 VV군을 사용하였다. EX3, EX4군은 VV군과 비교하여 1 h, 8 h, 12 h, 24 h 등 초기 항균력이 더 높았다. 불소바니쉬에 들어있는 로진은 치아표면에 접착성을 부여하고, 불소와 같은 유효물질을 서서히 방출하는 역할을 해주는 물질로서 로진의 종류와 용매와의 비율에 따라 불소방출량 등 불소바니쉬의 성질이 달라진다(23). 그러므로 항균의 지속성 역시 불소바니쉬에 함유된 로진의 종류에 따라 달라질 것이라 생각된다.

HEMA나 glutaraldehyde는 세포독성을 가지는 것으로 알려져 있다(24, 25). Sengun 등의 결과에 따르면 35 wt% HEMA와 5 wt% glutaraldehyde를 포함하는 Gluma desensitizer에서 Human gingival fibroblast에 대한 독성을 관찰할 수 있었다(26). 본 실험에서는 HEMA와 glutaraldehyde를 불소바니쉬에 혼합하여 희석했기 때문에 직접적인 적용보다는 독성이 낮을 것으로 생각되나 보다 정확한 평가가 필요하다.

본 실험에 사용한 불소바니쉬(EX1)는 우치 표면에서 30일 동안 0.03 ppm 이상의 유효 불소 농도를 방출한다는 특징이 있다(23). Son 등의 연구에 따르면 NaF가 들어있지 않은 로진제제 바니쉬 자체로도 항균 능력을 보였지만, NaF를

첨가했을 때 억제대가 증가하는 것을 보여 더 큰 항균 능력을 보였다(27). 본 실험에서 사용된 불소바니쉬는 PET film에 도포하여 한천배지시험을 한 결과 10일 동안 항균력이 지속되었지만 20일, 30일에는 항균력을 보이지 않았다(18).

본 실험에서는 이전의 실험 결과를 토대로 실험용 불소바니쉬의 항균의 지속성을 간단하게 평가하기 위해 PET film disc를 사용하였다(18). 불소바니쉬가 적용되는 실제 치아와는 차이가 있어 이와 유사한 실험을 위해서는 hydroxyapatite, 우치나 사람의 법랑질 시편에 불소바니쉬를 도포하여 항균의 지속성 시험을 평가할 필요가 있다. 추후 불소바니쉬에 대한 HEMA와 glutaraldehyde의 혼합이 불소바니쉬의 불소유리능력에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 평가도 필요하다. 또한 HEMA나 glutaraldehyde의 혼합이 불소바니쉬의 물리·기계적 성질에 어떠한 영향을 주는지 평가도 필요하다.

접착성 성분인 HEMA와 glutaraldehyde를 혼합한 실험용 불소바니쉬는 접착성 성분을 첨가하지 않은 불소바니쉬에 비해 10일까지 *S. mutans*에 대한 항균력을 더 강하게 보인다. Glutaraldehyde를 포함 또는 포함하지 않은 HEMA는 특히 초기단계인 8시간, 12시간, 24시간 이후의 항균력이 다른 군보다 높게 지속되었다. 그러므로 Glutaraldehyde와 HEMA 혹은 HEMA를 불소바니쉬에 혼합하면 불소바니쉬보다 더 지속적인 항균력으로 인해 임상적으로 치아우식의 예방에 더욱 효과적일 것으로 사료된다.

사 사

이 성과는 2018년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2018R1A2B6002088).

참고문헌

1. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. Lancet. 2007;369(9555):51-9.
2. Featherstone J. Dental caries: a dynamic disease

- process. *Aust Dent J.* 2008;53(3):286-91.
3. Cury JA, De Oliveira BH, Dos Santos APP, Tenuta LMA. Are fluoride releasing dental materials clinically effective on caries control? *Dent Mater.* 2016;32(3):323-33.
 4. American Dental Association Council on Scientific Affairs. Professionally applied topical fluoride. *J Am Dent Assoc.* 2006;137(8):1151-9.
 5. Seppä L, Leppänen T, Hausen H. Fluoride Varnish versus Acidulated Phosphate Fluoride Gel: A 3-Year Clinical Trial. *Caries Res.* 1995;29(5):327-30.
 6. Weintraub JA, Ramos-Gomez F, Jue B, Shain S, Hoover CI, Featherstone JDB, et al. Fluoride Varnish Efficacy in Preventing Early Childhood Caries. *J Dent Res.* 2006;85(2):172-6.
 7. Petersson L, Twetman S, Dahlgren H, Norlund A, Holm A, Nordenram G, et al. Professional fluoride varnish treatment for caries control: a systematic review of clinical trials. *Acta Odontol Scand.* 2004;62(3):170-6.
 8. Beltrán-Aguilar ED, Goldstein JW, Lockwood SA. Fluoride Varnishes. *J Am Dent Assoc.* 2000;131(5):589-96.
 9. Kim HN, Kim JB, Jeong SH. Remineralization effects when using different methods to apply fluoride varnish in vitro. *J Dent Sci.* 2018;13(4):360-6.
 10. Wassel MO, Khattab MA. Antibacterial activity against *Streptococcus mutans* and inhibition of bacterial induced enamel demineralization of propolis, miswak, and chitosan nanoparticles based dental varnishes. *J Adv Res.* 2017;8(4):387-92.
 11. 한국치과재료학교수협의회. *치과재료학*. 8판. 서울: 군자출판사; 2020. 247-249 p.
 12. Munksgaard EC, Asmussen E. Bond Strength Between Dentin and Restorative Resins Mediated by Mixtures of HEMA and Glutaraldehyde. *J Dent Res.* 1984;63(8):1087-9.
 13. Van Meerbeek B, Vanherle G, Lambrechts P, Braem M. Dentin- and enamel-bonding agents. *Curr Opin Dent.* 1992;2:117-27.
 14. Ergücü Z, Hiller KA, Schmalz G. Influence of dentin on the effectiveness of antibacterial agents. *J Endod.* 2005;31(2):124-9.
 15. André CB, Gomes BPFA, Duque TM, Rosalen PL, Chan DCN, Ambrosano GMB, et al. Antimicrobial activity, effects on *Streptococcus mutans* biofilm and interfacial bonding of adhesive systems with and without antibacterial agent. *Int J Adhes Adhes.* 2017;72:123-9.
 16. Ishihata H, Kanehira M, Finger WJ, Shimauchi H, Komatsu M. Effects of applying glutaraldehyde-containing desensitizer formulations on reducing dentin permeability. *J Dent Sci.* 2012;7(2):105-10.
 17. 손주리, 김아진, 오승환, 배지명. 실험용 항균성 불소바니쉬의 최소억제농도와 최소살균농도. *대한치과재료학회지.* 2018;45(2):139-46.
 18. 손주리, 배지명. 항균물질과 혼합한 실험용 불소바니쉬의 *Streptococcus mutans*에 대한 항균의 지속성. *대한치과재료학회지.* 2020;47(2):63-70.
 19. Grande R, Pacella S, Di Giulio M, Rapino M, Di Valerio V, Cellini L, et al. NF-κB mediated down-regulation of collagen synthesis upon HEMA (2-hydroxyethyl methacrylate) treatment of primary human gingival fibroblast/*Streptococcus mutans* co-cultured cells. *Clin Oral Investig.* 2015;19(4):841-9.
 20. Shen C, Javid NS, Colaizzi FA. The effect of glutaraldehyde base disinfectants on denture base resins. *J Prosthet Dent.* 1989;61(5):583-9.
 21. Lee J, Sabatini C. Glutaraldehyde collagen cross-linking stabilizes resin-dentin interfaces and reduces bond degradation. *Eur J Oral Sci.* 2017;125(1):63-71.
 22. Munksgaard EC, Irie M, Asmussen E. Dentin-Polymer Bond Promoted by Gluma and Various Resins. *J Dent Res.* 1985;64(12):1409-11.
 23. 신경수, 김아진, 오승환, 배지명. 불소 지속방출 및 생체 적합성을 가진 불소 바니쉬의 개발. *대한치과재료학회지.* 2017;44(1):21-31.
 24. Pagano S, Lombardo G, Balloni S, Bodo M, Cianetti

- S, Barbati A, et al. Cytotoxicity of universal dental adhesive systems: Assessment in vitro assays on human gingival fibroblasts. *Toxicol Vitr.* 2019;60 (June):252-60.
25. Sun HW, Feigal RJ, Messer HH. Cytotoxicity of glutaraldehyde and formaldehyde in relation to time of exposure and concentration. *Pediatr Dent.* 12(5): 303-7.
26. Sengun A, Buyukbas S, Hakki SS. Cytotoxic effects of dental desensitizers on human gingival fibroblasts. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater.* 2006; 78B(1):131-7.
27. Son JL, Kim AJ, Oh S, Bae JM. Inhibitory effects on streptococcus mutans of antibacterial agents mixed with experimental fluoride varnish. *Dent Mater J.* 2020; 39(4):690-5.

접착성 성분을 첨가한 실험용 불소바니쉬의 항균 지속성

신성진¹, 손주리², 오승한^{1,3}, 배지명^{1,3,*}

¹원광대학교 치과대학 치과생체재료학교실

²원광보건대학교 치위생과

³원광대학교 생체재료·매식연구소

본 연구는 불소바니쉬에 글루타르알데하이드와 하이드록시에틸 메타크릴산(HEMA)과 같은 접착성 성분을 혼합하였을 때 *Streptococcus mutans*에 대한 항균의 지속성이 증가되는지를 평가하고자 하였다. 실험용 불소바니쉬(EX1)를 제작 후, EX1군에 HEMA를 혼합(EX2), 글루타르알데하이드를 혼합(EX3), HEMA와 글루타르알데하이드를 혼합(EX4)하여 접착성 성분이 들어간 불소바니쉬를 제작하였다. 직경 6 mm polyethylene terephthalate 필름 디스크에 각 실험군을 5 µL씩 적용하였고, 증류수에 넣은 후 37°C 진탕배양기에서 각각 1시간, 3시간, 8시간, 12시간, 1일, 5일, 10일동안 보관하여 불소바니쉬가 용출되도록 하였다. 각 시간 별로 필름 디스크를 꺼내어 *S. mutans*군에 대한 한천배지시험을 실시하여 항균력이 지속되는지 평가하였다. 모든 불소바니쉬는 10일까지 항균 능력을 보였고, EX3군과 EX4군은 8시간에서 10일까지 유의성있게 높은 항균 능력을 보였으며, 10일에서는 EX2군과 유의성 있는 차이가 없었다. Glutaraldehyde와 HEMA 혹은 HEMA 첨가 시 불소바니쉬의 항균의 지속성을 증가시킬 수 있다.

색인 단어 : 불소바니쉬, 항균의 지속성, 하이드록시에틸메타크릴산, 글루타르알데하이드
