

구강에서 채취한 혐기성 세균에 대한 서양산 고추냉이(Horseradish, *Armoracia rusticana*) 뿌리 추출물의 항균효과

장용걸 · 박호원 · 신일식* · 이주현 · 서현우

강릉원주대학교 치과대학 소아치과학교실 및 구강과학연구소, *해양생명공학부 식품미생물학교실

국문초록

서양산 고추냉이(Horseradish, *Armoracia rusticana*)의 주성분인 allylisothiocyanate(AIT)는 각종 세균에 대한 살균 효과로 주목받고 있다. 이전 연구들을 통해 구강내 다양한 세균 및 진균류에 대한 항균성이 입증되었으나 근단내 병소를 유발하는 혐기성 세균에 대한 연구는 미진한 실정이다.

본 연구에서는 사람의 근단 병소에서 직접 분리한 *E. faecalis*와 *F. nucleatum*에 대한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 항균활성을 표준균주와 비교해보고 이를 대표적인 항균제인 클로르헥시딘과 비교하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 서양산 고추냉이 뿌리 추출물은 *E. faecalis* 임상 분리균주에 대하여 표준균주와 같거나 약간 높은 농도에서 항균효과를 나타냈고, 625.0~1,250.0 µg/ml의 농도에서 클로르헥시딘(7.8~15.6 µg/ml)과 대등한 항균효과를 가지는 것으로 나타났다.
2. 서양산 고추냉이 뿌리 추출물은 *F. nucleatum* 임상 분리균주에 대하여 표준균주와 같거나 약간 높은 농도에서 항균효과를 나타냈고, 78.1~312.5 µg/ml의 농도에서 클로르헥시딘(7.8~15.6 µg/ml)과 대등한 항균효과를 가지는 것으로 나타났다.

이번 연구로 표준균주 뿐만 아니라 구강에서 직접 분리한 혐기성 세균에 대한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 항균성을 확인할 수 있었고, 추후 근관 세척제나 소독제로 서양산 고추냉이 뿌리 추출물을 이용할 수 있는 가능성을 보여주었다.

주요어: 서양산 고추냉이 뿌리 추출물, Allylisothiocyanate(AIT), 혐기성 세균, 분리, 클로르헥시딘, 항균효과

I. 서 론

치수 및 치근단 질환의 주원인으로 알려진 세균과 그 부산물은 근관내벽에 세균막 형태로 부착하여 병소를 유발한다^{1,2}. 대표적으로 *Fusobacterium nucleatum*(이하 *F. nucleatum*), *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* 등이 괴사된 근관내의 혼합 감염 및 치근주위 병소와 관련되어 있다고 알려져 있다³⁻⁵. 이러한 절대 혐기성 간균뿐만 아니라 통성 혐기성 구균인 *Enterococcus faecalis*(이하 *E. faecalis*)는 주로 변연 치주염과 근관주위 농과 관련되어 기회감염의 형태로 나타나고^{3,4,7}, 치료에 더 큰 저항성을 가지고 있어 근관치료의 실패를 야기한다고 보고되고 있다⁶.

감염된 근관계로부터 위와 같은 세균을 제거하기 위해 다양한 기구조작법이 사용되고 있으나 근관계의 복잡한 해부학적 형태로 인해 기구의 접근이 불가능한 면이 많아 기구조작 단독으로는 세균을 완전히 제거하기가 어렵다⁸⁻¹⁰. 이 문제를 해결하기 위해서는 근관 세척이 필요하며, 이러한 목적으로 다양한 근관용 항균제제가 개발되었다¹¹. 현재 상용되고 있는 근관세척제로는 차아염소산나트륨(Sodium hypochlorite, NaOCl), 클로르헥시딘(Chlorhexidine digluconate, CHX), 요오드요오드화칼륨(Iodine potassium iodide, IKI), 그리고 수산화칼슘(Calcium hydroxide, Ca(OH)₂) 등이 있다.

NaOCl은 0.5~5.25% 까지 다양한 농도로 사용되며, Sen 등¹²은 감염된 dentin block을 이용한 연구에서 0.25% NaOCl을 15분간 처리했을 때 *E. faecalis*가 완전히 제거되었

교신저자 : 박 호 원

강원도 강릉시 강릉대학로 120 / 강릉원주대학교 치과대학 소아치과학교실 및 구강과학연구소 / 033-640-3158 / pedo@kangnung.ac.kr

원고접수일: 2009년 12월 21일 / 원고최종수정일: 2010년 03월 02일 / 원고채택일: 2010년 03월 11일

* 본 연구는 강릉원주대학교 2009년도 기성회계 학술연구조성비 지원으로 이루어졌음.

다고 보고하였다. 그리고 Bystrom과 Sundqvist¹³⁾는 상아질이나 도말층을 최소로 제거하면서 상아세관, 측방근관 등 도달하기 어려운 부위를 세정하기 위해 NaOCl과 탈석회화 제제의 병용을 추천하기도 하였다. 그러나 NaOCl은 낮은 농도(0.5~1%)로 사용하면 주로 괴사된 조직만을 용해하지만 고농도로 사용하면 치근단 조직에 손상을 주고 괴사된 조직뿐만 아니라 생활 조직까지 용해하는 단점이 있다^{8,14)}.

클로르헥시딘은 그람 양성, 그람 음성균에 효과적인 넓은 항균 범위를 가지는 항균제이다. 클로르헥시딘과 수산화칼슘을 혼합하여 사용하면 절대 혐기성 세균에 강력한 항균효과를 나타내고, 상아질의 수산화인회석이 클로르헥시딘과 결합하여 치료가 끝난 뒤에도 오래 항균효과를 지속시킨다는 보고가 있다^{15,16)}. 또한 2%의 클로르헥시딘은 *E. faecalis*를 제거하는데 NaOCl 보다 더 효과가 있다는 것이 증명되었으며, 비교적 무독성이고 조직을 용해하지 않는다는 점에서 NaOCl과 차이를 보인다¹⁷⁾. 그러나 Estrela 등¹⁸⁾은 *E. faecalis*에 대한 NaOCl과 클로르헥시딘의 효과를 알아보려고 전통적인 배양법과 PCR 기술을 이용한 항균활성 평가를 실시한 결과 두 제제 모두 *E. faecalis*를 효과적으로 제거하지 못한다고 보고하였으며, *E. faecalis* 세균막 모델을 이용한 Estrela 등¹⁹⁾의 연구에서도 비슷한 결과가 나타났다.

그 밖에 IKI는 클로르헥시딘과 병용시 *E. faecalis*를 효과적으로 제거 할 수 있으나 환자에게 알리지 반응을 일으킬 가능성이 있고²⁰⁾, 주로 혼합제제로 사용되는 수산화칼슘의 경우 항균 효과는 매우 뛰어나지만 단독으로 사용하거나 단기간 적용시에는 효과가 없다는 한계가 있다²¹⁾.

천연물은 수천 년 동안 민간요법에 사용되어 왔고, 최근 건강에 대한 관심이 높아지면서 천연 항균성 물질의 개발에 대한 관심이 증가하고 있다^{22,23)}. 그 중 서양산 고추냉이(Horseradish, *Armoracia rusticana*)는 향신료로서의 역할뿐만 아니라 항균 효과로도 주목받고 있으며, 주성분인 allylisothiocyanate(AIT)는 각종 세균과 곰팡이 등에 살균효과를 가진다고 보고되고 있고, 최근에는 *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sorbinus*, *Lactobacillus casei*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Aggregatibacter actinomycetem-comitans* 그리고 *Candida albicans* 등 다양한 구강내 미생물에 대한 항균활성이 보고되고 있다²⁵⁻²⁸⁾.

이 등²⁹⁾은 감염된 근관에서 흔히 분리되는 절대 혐기성 표준균주에 대한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 항균활성을 증명한 바 있다. 그러나 임상 분리균주에 대한 AIT의 항균효과에 관해서는 아직까지 연구가 없는 실정이다.

본 연구는 사람의 감염된 치근관 내에서 직접 분리한 혐기성 세균과 이에 대응하는 표준균주에 대한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 항균효과를 비교해보고, 이를 대표적인 구강용 항균제인 클로르헥시딘과 비교하여 서양산 고추냉이 뿌리 추출물을 이용한 근관용 세척제 개발에 기초자료를 마련하기 위해 시행하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

1.1 시료

서양 와사비 분말(Biscoats Co., Ltd., Seoul, Korea)을 증류수와 혼합한 후 증류하여 추출한 정유를 서양산 고추냉이 뿌리 추출물 시료로 사용하였고, AIT 농도측정을 위해 AIT 표준용액(Fluka Co., Haan, Germany)과 헥산(Hexane, Showa Co., Tokyo, Japan)을 사용하였다. 항균효과의 비교를 위해 1,000 µg/ml 클로르헥시딘 용액(Hexamidine, Bukwang Co., Ltd., Ansan, Korea)을 사용하였다.

1.2 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 AIT 함량 분석

추출액의 AIT 농도를 측정하기 위해 추출물 2 ml를 헥산 2 ml와 혼합한 후, 60℃ 항온 수조(RW-3025G shaking water bath, Jeio Tech Co., Ltd., Kimpo, Korea)에서 1시간 동안 가열하고 이를 다시 실온으로 냉각하였다. 헥산층 1 µl를 이용하여 FID(Flame Ionization Detector)가 부착된 가스 크로마토그래피(HP 6890 series, Hewlett Packard Development Co., Palo Alto, California, USA)로 AIT의 농도를 측정하였고, column은 HP-Innowax capillary column(30 mm × 0.32 mm, 0.5 µm film thickness, Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, California, USA)을 사용하였다. Injection port와 FID의 온도는 각각 250℃, 260℃로 유지하였으며, carrier gas는 질소를 사용하였다.

AIT 표준용액의 농도별 가스 크로마토그래피 결과를 수식화하여 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 AIT 함량을 측정하였으며, 그 결과 추출물은 약 560,000±1,208.3 µg/ml의 AIT를 함유하고 있었다(Fig. 1). 본 실험에서는 이 추출물에 각각의 세균 배양배지를 가하여 double dilution법으로 희석하여 사용하였다.

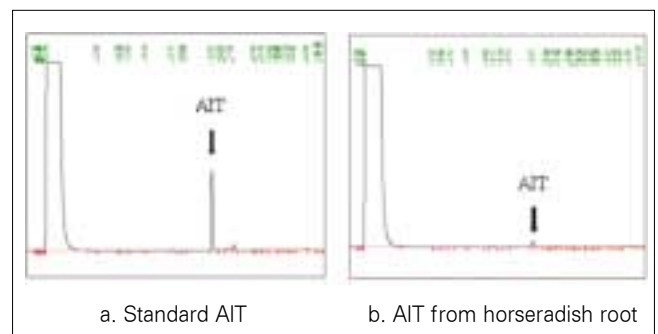


Fig. 1. Gas Chromatogram of standard AIT and AIT extracted from Horseradish(*Armoracia rusticana*) root.

1.3 사용균주 및 배지

1.3.1 임상 분리균주의 획득 및 동정

a. 임상 분리균주 채취

강릉대학교 치과병원 소아치과에 내원한 환자들 중 전신적으로 건강이 양호한 자로서 전신질환, 약물 알러지, 특이체질 및 최근 3개월 이내에 항생제 및 기타 약물을 복용한 사실이 없는 소아를 대상으로 세균을 채취 하였다. 세균은 만성 또는 급성의 치근단 염증이 있는 유치 또는 영구치의 근관내 또는 개방되지 않은 농양에서 채취 하였으며, 이전에 근관치료를 받지 않은 치아를 대상으로 하였다. 해당 치아에 리버덤을 장착하고 3% 과산화수소로 클램프, 리버 쉬트, 치관부 등 치아 주변을 소독하였다. 2.5% sodium hypochlorite로 재차 소독한 후 5% sodium thiosulfate로 불활성화하였다. 멸균 소독한 bur로 분무 없이 치수강을 개방하고 file을 이용하거나 근관이 넓은 경우 멸균된 paper point를 근단부에 1분간 유지한 후 빼내어 근관내 세균을 채취하였고, 개방되지 않은 농양에서 세균을 채취한 경우 5% iodine tincture로 주변부 구강점막을 소독하고, 18G needle로 흡인하였다. 채취한 세균은 Reinforced Clostridial Medium(RCM, Oxoid, Ogdensburg, New York, USA) 0.5 ml가 담긴 에펜도르프 튜브에 옮긴 후 즉시 혐기성 상자(AnaeroPack Rectangular Jar™, Mitsubishi gas chemical Co., Tokyo, Japan)에 넣고 밀봉하여 실험실로 운반하여 다음의 실험에 사용하였다.

환자로부터의 균 채취에 관하여 연구자가 소속된 의료기관의 임상실험연구윤리위원회로부터 사전 승인(2009-4-1)을 받았으며, 보호자에게 균 채취의 목적, 방법 및 안전성에 관하여 자세히 설명한 후 동의서를 받은 경우에 한하여 균 채취를 실시하였다.

b. 세균 배양 및 분리균주의 획득

채취한 세균이 담긴 에펜도르프 튜브를 바로 Anaerobic chamber(Bactron, Sheldon Manufacturing, Cornelius, Oregon, USA)로 운반하였다. 수 회 vortexing 한 후, 한 백금이 취해 RCM agar 평판배지에 도말하여 37℃ 혐기성 조건(H₂ 5%, CO₂ 5%, N₂ 90%)하에서 48시간 동안 배양하였다. 이 때 성장한 세균군락 중에서 형태, 색깔 및 모양이 다른 군락 상이한 군락을 선별하여 한 백금이 취한 후 RCM agar 평판배지에 다시 도말하고 48시간 동안 배양하였다. 이 과정을 총 3회 반복하고 순수 분리된 세균군락을 한 백금이 취하여 RCM agar 평판배지에 도말하여 세균동정에 사용하였다. 동일한 세균을 다시 한 백금이 취하여 RCM agar 사면배지에 접종하고 48시간 동안 혐기성 상자에서 배양한 후 동정 결과가 나올 때까지 4.0℃ 냉장보관 하였다.

c. 균주의 동정

RCM agar 평판배지에 도말한 단일 세균을 37℃ 혐기성 조건 하에서 48시간 동안 배양한 후, 세균의 동정을 위해 마크로

Table 1. List of microbes isolated from oral cavity

| Subject | Clinical remarks | Species | Origin |
|---------|--------------------------------|---------------------------------|--------|
| 1 | Chronic pulpitis | <i>Streptococcus suis</i> | ED |
| | | Isolation was failed | |
| 2 | Periodontal lesions | <i>Streptococcus anginosus</i> | A |
| | | <i>Streptococcus anginosus</i> | |
| | | <i>Streptococcus salivarius</i> | |
| 3 | Periodontal lesions | <i>Lactobacillus casei</i> | PD |
| | | <i>Lactobacillus casei</i> | |
| 4 | Apical and periodontal lesions | <i>Enterobacter sp.</i> | A |
| | | <i>Enterococcus faecalis</i> | |
| 5 | Acute pulpitis | <i>Fusobacterium nucleatum</i> | ED |
| | | <i>Collinsella aerofaciens</i> | |
| 6 | Acute pulpitis | <i>Fusobacterium nucleatum</i> | ED |
| | | Isolation was failed | |
| | | Isolation was failed | |

ED, Endodontal; A, Abscess; PD, Periodontal

젠사(Macrogen Co., Ltd., Seoul, Korea)에 의뢰하였다. 세균의 동정은 16s rRNA 염기서열 분석으로 이루어졌다. PCR 반응은 PTC-225 Peltier Thermal Cycler(MJ Research, Inc., Waltham, Massachusetts, USA)를 사용하였고, 염기서열 분석은 ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems, Inc., Foster City, California, USA)를 이용하여 진행하였다. 6명의 환자로부터 총 14종류의 상이한 세균군락에 대한 평판배지를 얻었으며, 이 중 분석결과가 나오지 않은 3개를 제외하고 나머지 11개의 배지에 대한 결과를 얻었다(Table 1). 이 가운데 감염된 치근관에 특징적으로 분포하는 세균인 *E. faecalis* 1종과 *F. nucleatum* 2종이 동정되어 이를 실험에 사용하였다.

1.3.2 표준균주 및 사용배지

본 연구에서 임상 분리균주와의 항균효과 비교를 위해 사용된 표준균주는 *E. faecalis* KCTC 5289와 *F. nucleatum* KCTC 5103이며, 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC, Daejeon, Korea)로부터 분양받아 사용하였다. *E. faecalis* 임상 분리균주와 표준균주는 배양배지로 Brain Heart Infusion broth(BHI, Difco, BD Diagnostic Systems, Loveton circle, Sparks, Maryland, USA)와 Brain Heart Infusion agar(BHI agar, Difco, BD Diagnostic Systems, Loveton circle, Sparks, Maryland, USA)를 사용하였고, *F. nucleatum*은 배양배지로 Reinforced Clostridial Medium(RCM, Oxoid, Ogdensburg, New York, USA)과 Reinforced Clostridial Medium agar(RCM agar, Oxoid, Ogdensburg, New York, USA)를 사용하였다. *E. faecalis*의 경우 37℃ 혐기성 조건 하에서 24시간 동안, *F. nucleatum*의 경우 같은 조건에서 48시간 동안 전배양하여 실험에 사용하였다.

2. 연구방법

2.1 항균활성 측정 실험

2.1.1 서양산 고추냉이 뿌리 추출물 사용균

서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 항균활성은 disk paper method를 이용하여 측정하였다. 각 균주를 전배양하여 640 nm(V530 UV/VIS spectrophotometer, Jasco, Tokyo, Japan) 파장에 대한 흡광도(A640)가 0.7-0.8이 되도록 일정하게 현탁하여 균주수를 1.0×10^8 CFU/ml로 맞추었다. 이후 현탁액에 각 배지를 가하여 2.0×10^5 CFU/ml로 희석한 것을 균 접종액으로 사용하였다. 접종액 100 μ l를 각 평판배지에 분주하고 멸균된 spreader를 사용하여 균일하게 도말하였다. 멸균된 직경 10 mm filter paper disk(Whatman No.2)를 각 균주가 도말된 배지에 밀착시키고 서양산 고추냉이 뿌리 추출물 30 μ l를 흡수시켜 혐기성 상자에 넣은 후, 37 $^{\circ}$ C에서 각각 24시간, 48시간 동안 배양하였다. 이 때 서양산 고추냉이 뿌리 추출물 농도는 예비실험 결과와 박 등²⁸⁾의 이전 연구 설계를 참고로 각각 80,000 μ g/ml, 20,000 μ g/ml 농도로 설정하였다. 배양 후 disk 주변에 형성된 투명환(clear zone)의 유무로 항균효과 여부를 확인하였다.

2.1.2 클로르헥시딘 사용균

서양산 고추냉이 뿌리 추출물 사용균과 동일한 방법으로 각 균주에 대한 클로르헥시딘의 항균활성을 확인하였다.

2.2 최소억제농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC) 측정

2.2.1 서양산 고추냉이 뿌리 추출물 사용균

Microtube를 이용하여 서양산 고추냉이 뿌리 추출물 원액을 BHI 배지로 단계 희석하여 *E. faecalis* 실험용으로 준비하였고, 같은 방법으로 RCM 배지로 단계 희석한 것을 *F. nucleatum* 실험용으로 준비하였다. 멸균된 96-well flat-bottom microplate(Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Germany)의 첫 well은 blank(BHI 또는 RCM 배지만 200 μ l)로 설정하고, 두 번째 well은 negative control(BHI 또는 RCM 배지 100 μ l와 접종액 100 μ l)로 설정하였다. 나머지 well은 순차적으로 희석한 추출물을 각 농도별로 100 μ l씩 넣고 접종액을 100 μ l씩 넣어 최종 생균수가 1.0×10^5 CFU/ml가 되도록 하였고, 희석액의 최종 농도는 처음 농도의 1/2이 되도록 혼합하였다. 각각의 96-well plate를 parafilm으로 밀봉한 후 혐기성 상자에 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 각각 24시간, 48시간 동안 배양하였다. 배양 후, 각 균주의 증식 유무를 micro plate reader(OD: 660 nm, EL800, Bio-Tek Instrument Inc., Winooski, Vermont, USA)로 측정하였다.

2.2.2 클로르헥시딘 사용균

서양산 고추냉이 뿌리 추출물 사용균과 동일한 방법으로 각

균주에 대한 클로르헥시딘의 최소억제농도를 측정하였다. 클로르헥시딘은 BHI 배지로 단계 희석하여 *E. faecalis* 실험용으로, RCM 배지로 단계 희석하여 *F. nucleatum* 실험용으로 사용하였다.

2.3 최소살균농도(Minimum Bactericidal Concentration, MBC) 측정

2.3.1 서양산 고추냉이 뿌리 추출물 사용균

MBC의 측정은 Bamba 등³⁰⁾의 방법을 사용하였다. MIC 측정 후 균주의 증식이 관찰되지 않은 배양액을 한 백금이 취하여 평판배지에 도말 한 후, 혐기성 상자에 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 각각 24시간, 48시간 동안 배양한 후 증식유무를 확인하였다.

2.3.2 클로르헥시딘 사용균

서양산 고추냉이 뿌리 추출물 사용균과 동일한 방법으로 각 균주에 대한 클로르헥시딘의 최소살균농도를 측정하였다.

모든 실험 과정은 Anaerobic chamber 내에서 실시하였고 배양의 효과를 증대시키기 위해 혐기성 상자에서 배양하였다. 이는 Anaerobic chamber와 혐기성 상자에서의 세균배양 실험 결과 후자의 환경에서 혐기성 세균성장이 더 잘 이루어진다는 이전 연구를 근거로 하였다⁵²⁾. 모든 임상 분리균주 및 표준균주에 대하여 동일한 과정을 3회 반복하여 평균과 표준편차를 구하였다.

III. 연구 결과

1. 항균 활성 측정 결과

실험에 사용된 모든 임상 분리균주 및 표준균주의 평판배지에서 paper disk 주위로 투명환이 형성되었으며, 이 결과로 서양산 고추냉이 뿌리 추출물과 클로르헥시딘은 표준균주는 물론 구강내에서 분리된 *E. faecalis*와 *F. nucleatum* 임상균주에 대하여 항균활성이 있음을 확인하였다(Fig. 2, 3).

2. 최소억제농도(MIC)

*E. faecalis*와 *F. nucleatum* 임상 분리균주 및 표준균주에 대한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물과 클로르헥시딘의 평균 MIC 및 표준편차는 Table 2와 같다.

3. 최소살균농도(MBC)

각 균주에 대한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물과 클로르헥시딘의 MBC를 측정한 결과는 Table 3과 같다.



Fig. 2. Antimicrobial activity against isolated *E. faecalis*.



Fig. 3. Antimicrobial activity against isolated *F. nucleatum*.

Table 2. MIC values for horseradish root extracts and chlorhexidine against *E. faecalis* and *F. nucleatum*

| Strains | MIC(Mean ± Standard deviation) | |
|-------------------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| | Horseradish Root Extracts (µg/ml) | Chlorhexidine (µg/ml) |
| <i>E. faecalis</i> KCTC 5289 | 1,041.7 ± 294.6 | 10.4 ± 3.7 |
| <i>E. faecalis</i> 1 | 1,250.0 ± 0 | 15.6 ± 0 |
| <i>F. nucleatum</i> KCTC 5103 | 130.2 ± 36.8 | 7.8 ± 0 |
| <i>F. nucleatum</i> 1 | 260.4 ± 73.7 | 10.4 ± 3.7 |
| <i>F. nucleatum</i> 2 | 312.5 ± 0 | 10.4 ± 3.7 |

Table 3. MBC values for horseradish root extracts and chlorhexidine against *E. faecalis* and *F. nucleatum*

| Strains | MBC(Mean ± Standard deviation) | |
|-------------------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| | Horseradish Root Extracts (µg/ml) | Chlorhexidine (µg/ml) |
| <i>E. faecalis</i> KCTC 5289 | 6,666.7 ± 2,357.0 | 83.3 ± 29.5 |
| <i>E. faecalis</i> 1 | 8,333.3 ± 2,357.0 | 104.2 ± 29.5 |
| <i>F. nucleatum</i> KCTC 5103 | 625.0 ± 0 | 52.1 ± 14.4 |
| <i>F. nucleatum</i> 1 | 1,041.7 ± 294.6 | 83.3 ± 29.5 |
| <i>F. nucleatum</i> 2 | 1,250.0 ± 0 | 62.5 ± 0 |

Ⅳ. 총괄 및 고찰

AIT는 십자화과에 속하는 모든 식물에 존재하는 천연 화합물로, 액체와 증기 형태 모두 강력한 항균활성을 가진다고 알려져 있다^{31,32}. AIT는 고추냉이에서 추출된 정유 중 약 80%를 차지하고, 식물체 내에서 포도당 및 황산수소나트륨과 결합된 sinigrin이라는 안정된 화합물 상태로 저장되어 있는데, 세포가 외부의 물리적인 힘에 의해 파괴되면 myrosinase라는 효소의 작용으로 AIT와 glucose 그리고 KHSO₄가 생성된다^{33,34}. AIT는 단백질의 이황화 결합에서 산화된 glutathione을 잘라내고³⁵, 인슐린, bovine serum albumin, ovalbumin 그리고 lysozyme 같은 단백질을 공격하여 lysine과 arginine 잔기에 thioure-

alike 유도체를 형성하는 등 단백질 구조를 변화시킨다고 알려져 있다^{35,36}. 그리고 Kojima와 Ogawa³⁷는 AIT를 비롯한 다양한 isothiocyanate가 효모의 산소섭취를 방해하여 세균의 대사 기능에 영향을 미치는데, 그 중 AIT가 가장 큰 역할을 한다고 보고하였다.

대표적인 구강용 항균제인 클로르헥시딘은 근관세척용액이나 근관내 소독을 목적으로도 광범위하게 사용되고 있다. 그러나 클로르헥시딘은 치아나 수복물에 변색을 일으키며, 미각이상 및 작열감 등을 유발 할 수 있다⁴³. 또한 합성물의 가장 큰 단점인 세포독성을 간과 할 수 없는데, Tatnall 등⁵⁷은 고농도의 클로르헥시딘이 사람의 섬유모세포에 독성을 나타낸다고 하였고, Agarwal 등⁵⁸은 말초혈액 내 호중구의 세포막을 빠르게 파괴한

다고 보고한 바 있으며, Krautheim 등⁵⁹⁾은 클로르헥시딘에 의한 알려지성 피부염을 보고한 바 있다. 이러한 이유로 천연물질에서 항균제를 개발하려는 움직임이 계속되고 있고, 본 실험을 통해 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 구강내 혐기성 임상 분리균에 대한 항균력을 확인하여 근관내 세척제로의 가능성을 발견하였다는데 의의가 있다. 근관 세척제로서의 또 하나의 장점은 휘발성인데, 실험을 통해 확인한 AIT의 휘발성은 복잡한 근관내에서 일반 세척제로는 제거하기 힘든 부위에 존재하는 세균에 항균효과를 미칠 수 있는 가능성을 제시한다.

본 연구에 사용된 정유형태의 서양산 고추냉이 뿌리 추출물은 각 균주에 맞는 배지로 희석하여 사용하였다. 정유의 경우 물에 쉽게 녹지 못하므로 에탄올과 혼합하면 균일하게 희석되어 희석시 발생하는 농도 오차를 줄일 수 있으나, 에탄올 자체의 항균작용으로 인한 상승효과가 생길 가능성이 있기 때문에 순수한 고추냉이 뿌리 추출물의 항균활성 평가를 위해 배지로 희석하였다^{27,28)}. 추출물의 희석시 microtube를 사용하여 잉여 공간으로 휘발할 수 있는 AIT 증기의 양을 최소화 하였고, 정유를 배지에 넣고 충분히 vortexing 하여 알갱이가 잘 분산되어 섞이도록 하였다^{27,28)}.

최소억제농도 측정을 위한 96-well plate의 설계시 같은 plate 안에 동종의 표준균주와 분리균주를 함께 분주하여 항균제의 효과를 직접 비교 할 수 있도록 하였고, 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 경우 AIT의 휘발성이 인접 well에 영향을 줄 수 있기 때문에 가능한 멀리 떨어진 위치에 배치하였다. 그리고 편성 혐기성 세균인 *E. faecalis*와 절대 혐기성 세균인 *F. nucleatum*의 배양시간이 서로 다르기 때문에 한 종류의 96-well plate 내에 하나의 균종만 접종하였다.

본 연구에 사용된 *E. faecalis* 임상 분리균주는 소아의 유구치 협착 치은의 개방되지 않은 농양에서 채취하였다. *E. faecalis*는 치료된 근관병소가 재발한 경우에 흔히 분리되고, 감염된 근관의 52.94%에서 발견되는 주요 균종으로 알려져 있다^{38,39)}. 이 균은 영양소가 부족한 환경에서도 살아남을 수 있는 능력이 탁월하고 다른 균과 최소로 공생하므로 생존력이 우수하다⁴⁰⁾. 또한 수산화칼슘 등의 항균제에 내성이 있는 것으로 밝혀져 있다⁴¹⁾. 본 연구에 사용된 *F. nucleatum* 한 종은 외상으로 합입된 후 치료되지 않은 유증절치 치근단에서 분리되었고, 나머지 한 종은 치수노출을 동반한 치관과절로 부분 치수절단술을 시행한 영구 중절치의 치근단 병소에서 분리하였다. 감염된 근관내에서 발견되는 모든 혐기성 세균에 대한 평가가 이루어지지 않았으나 대표적인 통성 혐기성 구균인 *E. faecalis*와 노출되지 않은 근단에서 주로 관찰되는 절대 혐기성 간균인 *F. nucleatum*에 대한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 항균활성을, 표준균주는 물론 임상 분리균주에서도 확인 할 수 있었다는데 이번 연구의 의의가 있다^{39,42)}.

구강내에서 채취한 두 종류의 혐기성 세균에 대한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물과 클로르헥시딘의 항균활성 유무를 알아보기 위해 disk paper method를 사용하였는데, 모두 disk 주위로 투명환을 형성함으로써 두 임상 분리균에 대해 항균활성이

있음을 확인하였다. 그러나 이전 연구들^{25,27-29)}에서와 같이 그 모양과 퍼짐 양상은 항균제에 따라 다르게 나타났다. 클로르헥시딘을 사용한 균은 paper disk 주변으로 명확한 경계의 투명환을 형성한 반면 서양산 고추냉이 뿌리 추출물을 사용한 균의 경우 불분명한 경계를 나타내었다. 유 등²⁵⁾과 김 등²⁷⁾은 서양산 고추냉이 뿌리 추출물 중 AIT 성분의 휘발성으로 인하여 투명환의 경계가 불분명해지고 직접 시료가 닿지 않은 부위의 colony까지 영향을 미친다고 하였다.

서양산 고추냉이 뿌리 추출물 희석액을 이용한 측정 결과, 환자의 구강내에서 직접 채취한 *E. faecalis* 임상 분리균주와 표준균주의 MIC는 각각 1,250.0 µg/ml와 1,041.7 µg/ml로 나타났고, MBC의 경우 임상 분리균주는 8,333.3 µg/ml, 표준균주는 6,666.7 µg/ml였다. 실험시마다 약간의 차이는 있었지만 대부분 MIC의 2~4배 농도에서 MBC 값을 기록하였다. *F. nucleatum*의 경우 2종의 임상 분리균주에 대한 MIC는 각각 260.4 µg/ml, 312.5 µg/ml를, 표준균주는 그보다 낮은 130.2 µg/ml를 나타냈고, MBC의 경우에도 분리균주는 각각 1,041.7 µg/ml, 1,250.0 µg/ml를, 표준균주는 625.0 µg/ml로 한 단계 낮은 값을 나타냈다. 전반적으로 *F. nucleatum*이 *E. faecalis*에 비해 서양산 고추냉이 뿌리 추출물에 더 민감하게 반응하였는데 이것은 그람 양성균보다 그람 음성균에 대한 AIT의 항균활성이 더 강하였다고 보고한 안 등²²⁾과 Shin 과 Lee²⁴⁾의 이전 연구결과와 일치한다. 박 등²⁸⁾은 서양산 고추냉이 천연물과 합성 AIT를 이용한 항균활성 연구에서 *E. faecalis* 표준균주에 대한 MIC는 각각 937.6 µg/ml, 2,000 µg/ml로, MBC는 각각 3,500 µg/ml, 6,000 µg/ml로 보고하여 본 연구와 비슷한 결과를 보여 주었다. 그러나 *F. nucleatum*의 경우 본 연구에서 측정된 MIC, MBC 값은 이 등²⁹⁾의 이전 연구 결과보다 다소 높게 측정되었다. 절대 혐기성 세균의 경우 산소에 상당히 민감하기 때문에 실험 중 산소노출을 최소화하려는 노력이 필요하다. 이 등²⁹⁾의 연구 설계 중 한계점으로 지적된 완전한 혐기성 작업조건을 만들어 주기 위해 모든 실험과정을 Anaerobic chamber 안에서 진행하였고, 이것이 본 연구에서 *F. nucleatum*에 대한 MIC, MBC 값이 이전 연구에 비해 다소 높게 나온 원인 중 하나로 생각해 볼 수 있다.

김 등²⁷⁾은 치태에서 분리한 *S. mutans*에 대한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 항균활성 연구에서 표준균주의 경우 MIC는 2,500 µg/ml, 임상 분리균주는 830~2,500 µg/ml 범위이고, MBC는 각각 6,670 µg/ml, 4,170~8,330 µg/ml 범위로 서양산 고추냉이 뿌리 추출물이 *S. mutans* 임상 분리균주에 대하여 표준균주와 같거나 약간 낮은 농도에서 항균효과를 나타낸다고 하였다. 그러나 본 연구에서는 *E. faecalis*, *F. nucleatum* 모두 서양산 고추냉이 뿌리 추출물에 대하여 임상 분리균주가 표준균주에 비해 더 큰 MIC, MBC 값을 기록하였다. 노 등⁵⁴⁾은 녹차 추출물을 이용한 항균활성 연구에서 분리된 균주가 표준균주에 비해 더 내성이 강하다고 하였고, 이는 표준균주에 비해 야생균주가 외부환경에 대응하는 능력이 우수하기 때문이라고 하였다. 김 등⁵⁶⁾도 *Enterobacter cloacae*의 증균

속 저항성에 관한 연구에서 분리균주가 표준균주보다 증균속에 대해 저항성이 크다고 하였고, 이는 환경내의 미생물이 환경에 대한 적응성이 높으며 유전적으로 이러한 성질을 획득하였을 가능성이 높다고 하여 본 연구의 결과를 지지한다.

본 연구 결과와 김 등²⁷⁾의 연구 결과를 볼 때, 서양산 고추냉이 뿌리 추출물은 클로르헥시딘에 비해 다소 높은 농도에서 구강내 세균에 대해 항균효과를 나타낸다고 볼 수 있다. Shin과 Lee²⁴⁾도 식품 부패균에 대한 연구에서 *S. aureus*와 *E. coli*에 대해 약 12,000 µg/ml의 높은 MIC 값을 보고한 바 있다. 안 등²²⁾은 AIT 단독 사용시와 유기산인 초산(acetic acid)과 혼합하여 사용했을 때의 MIC 농도를 조사한 결과, 초산 혼합 사용시 상승작용으로 인해 AIT의 MIC 농도를 1/20까지 줄일 수 있다고 보고하여 유기산 혼합사용에 따른 MIC 농도 감소의 가능성을 제시한 바 있다. 향후 서양산 고추냉이 뿌리 추출물과 다른 유기산 및 타 항균제와의 혼합 사용시 항균활성, 상승작용 및 농도 감소의 가능성에 대하여 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

전통적으로 균주의 동정시 고체 혹은 액체 배지에 세균을 배양하고 성장 형태나 색깔 등으로 구별하는 방법이 사용되어 왔으나 이러한 방법은 많은 노력과 비용이 필요하고 시간소모가 많다는 단점이 있다⁴⁷⁾. 그람염색, colony 형태, 성장 필수요소, 효소 및 대사 활성 등의 표현형적 특성을 이용한 생화학 kit가 개발되어 전통적인 방법을 보완하고 있다. 그러나 이 방법은 결과가 안정적이지 않으며, 표현형적 특성은 외부의 스트레스나 세균의 진화에 의해 변화할 가능성이 있다⁴⁸⁾. 또한 구강내 절대 혐기성 세균의 경우 같은 속의 다른 균일지라도 표현형이 유사하여 생화학적 방법으로는 동정이 불가능한 경우가 많고 동정 가능한 균에 대한 데이터베이스가 한정 되어 있다는 한계가 있다^{47,49,50)}. 이러한 단점을 보완하고자 현재는 분자학적 방법의 일종인 중합효소 연쇄 반응법(polymerase chain reaction, PCR)이 널리 쓰이고 있다. 이 방법은 여러 가지 세균 감염증의 진단을 신속히 그리고 정확히 할 수 있고, 매우 민감하거나 배양되지 않는 균, 또는 성장시키기 어려운 균주에 대해서도 분석이 가능하다는 장점이 있다⁴⁷⁾. Gomes 등⁵¹⁾은 전통적 방법과 PCR을 이용한 근관내 절대 혐기성 세균의 동정을 실시하여 각각 13%와 50%의 동정률을 보였고, 특정 세균의 경우 1%와 38%로 큰 차이를 보여 PCR의 우수성을 입증한 바 있다. 그러나 PCR은 매우 예민한 검사법이어서 극소량의 유전자가 오염되어도 결과에 오류가 생긴다는 단점이 있다^{5,47)}. 이번 실험에서도 총 14개의 샘플 중 3개가 실험과정 중 오염되었거나 두 개 이상의 균이 섞여 있어 분석결과가 나오지 않았다. 하나의 샘플은 분주 과정 중에 오염된 것으로 보이고, 나머지 두 개의 샘플은 3회의 반복된 분리 동정으로도 단일 세균으로 완전히 분리되지 못한 것으로 판단된다. 이를 개선하기 위해서는 균의 채취, 이송, 분주 그리고 배양과정 중에 오염이 되지 않도록 좀 더 세심한 주의가 필요할 것이다.

이번 연구는 다음과 같은 한계점과 보완점들을 가지고 있다. 첫째, 연구에 사용된 균의 종류가 적다. 본 실험에 사용된 균은

치근단 병변을 가진 환자의 근관내 또는 개방되지 않은 농양에서 채취한 것으로 모두 6명의 환자에서 채취한 균을 대상으로 실험하였다. 이는 아이들의 구강건강에 대한 부모들의 관심이 높아지면서 감염된 근관을 가진 환자를 발견하기가 어려웠고, 몇 명은 균 채취 도중 행동조절이 되지 않아 분리 도중에 중단하였으며, 균 채취 대상자 부모 중 일부는 자녀의 구강에서 균을 채취하는 것에 대해 거부감을 나타내어 사전 동의를 얻는데 실패하였기 때문이다. 그리고 인간 숙주 내에서 세균들이 성장하는데 사용하는 특수 성장요소들에 대해 알려진 것이 없으므로 사람에서 채취한 균을 인공배지에서 배양하였을 때 필수 영양분이나 성장요소 부족으로 배양에 실패했을 가능성이 있다⁴⁴⁾. 또한 배양배지 자체가 일부 종들에게는 독성을 나타내거나 성장을 억제시키기도 하며⁴⁵⁾, 샘플 내의 다른 세균들이 연구대상 종을 억제시키는 물질들을 생산하기도 한다⁴⁶⁾. 결과적으로 이번 연구에서는 통성 혐기성 균주인 *E. faecalis*와 절대 혐기성 균주인 *F. nucleatum*만이 분리되어 실험에 사용하였으나, 앞으로 이 세균들 이외에도 *Prevotella* 종, *Porphyromonas* 종 및 *Peptostreptococcus* 종 등 다양한 절대 혐기성 세균들도 분리 동정하여, 이들 균주에 대한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 항균활성을 평가해야 할 것이다.

둘째, 이번 연구는 in vitro에서 진행된 실험으로, 서양산 고추냉이 뿌리 추출물을 이용한 근관 세척제의 개발을 위해서는 추후 in vivo에서의 항균효과에 대해서도 연구되어야 할 것이다. 실험실 조건들은 in vivo 상황을 완전하게 재현할 수 없으므로⁵³⁾, 서양산 고추냉이 뿌리 추출물을 근관 세척제로 사용하기 위해서는 실제 치근관내 적용시 추출물의 침투도, 항균성 및 AIT 자체의 휘발성이 미치는 영향에 대한 현미경학적 연구 등이 필요할 것으로 사료된다.

셋째, 이번 연구에서는 구강내에서 임상 분리한 혐기성 세균에 대한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 항균성을 알아보기 위해 사용되는 근관 세척제 중 대표적인 구강내 항균제인 클로르헥시딘과 항균활성을 비교하였다. 그러나 근관용 세척제로의 가능성을 알아보기 위해서는 세균에 대한 항균력 뿐만 아니라 세포 독성, 조직 용해 능력에 대한 평가와 함께 NaOCl이나 수산화칼슘과 같은 다른 약제와의 비교 실험도 필요할 것이다.

넷째, 이번 연구에서는 알코올 자체의 항균성을 배제하기 위해 추출물 정유를 각각의 세균에 맞는 배지에 넣고 와류혼합하여 유상액 형태로 만들어 사용하였는데 이러한 방법으로는 정유가 완전히 섞이지 않을 가능성이 있다. 추후 배지로만 희석한 경우와 소량의 알코올로 1차 희석한 후 배지로 2차 희석하여 알코올 함량을 최소한으로 낮춘 상태에서의 항균활성에 관한 연구가 이루어져야 할 것이다.

V. 결 론

본 연구에서는 서양산 고추냉이 뿌리 추출물을 이용하여 사람의 구강내에서 직접 분리한 혐기성 세균에 대한 항균효과를 알아보고, 표준균주에 대한 항균효과와의 차이를 평가하였으

며, 이를 대표적인 구강용 항균제인 클로르헥시딘과 비교하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 서양산 고추냉이 뿌리 추출물은 *E. faecalis* 임상 분리균주에 대하여 표준균주와 같거나 약간 높은 농도에서 항균 효과를 나타냈다.
2. 서양산 고추냉이 뿌리 추출물은 *E. faecalis*에 대하여 625.0~1,250.0 µg/ml의 농도에서 클로르헥시딘 (7.8~15.6 µg/ml)과 대등한 항균효과를 가지는 것으로 나타났다.
3. 서양산 고추냉이 뿌리 추출물은 *F. nucleatum* 임상 분리균주에 대하여 표준균주와 같거나 약간 높은 농도에서 항균효과를 나타냈다.
4. 서양산 고추냉이 뿌리 추출물은 *F. nucleatum*에 대하여 78.1~312.5 µg/ml의 농도에서 클로르헥시딘(7.8~15.6 µg/ml)과 대등한 항균효과를 가지는 것으로 나타났다.

이번 연구로 표준균주 뿐만 아니라 구강에서 직접 분리한 혐기성 세균에 대한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 항균성을 확인할 수 있었고, 추후 근관 세척제나 소독제로 서양산 고추냉이 뿌리 추출물을 이용할 수 있는 가능성을 보여주었다.

참고문헌

1. Sundqvist G : Ecology of the root canal flora. J Endod, 8:427-430, 1992.
2. Nair PN, Sjögren U, Krey G, et al. : Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, a symptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. J Endod, 16:580-588, 1990.
3. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Souto R, et al. : *Actinomyces species, streptococci, and Enterococcus faecalis* in primary root canal infections. J Endod, 28:168-172, 2002.
4. Gomes BP, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, et al. : Microbiological examination of infected dental root canals. Oral microbial Immunol. 19:71-76, 2004.
5. Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, et al. : *Porphyromonas gingivalis, Porphyromonas endodontalis, Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. Oral Microbiol Immunol, 20:211-215, 2005.
6. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U : Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Endod, 85:86-93, 1998.
7. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR : Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular disease. J Endod, 30:315-320, 2004.
8. Ercan E, Ozekinci T, Atakul F, Gül K : Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal : in vivo study. J Endod, 30:84-87, 2004.
9. Peters OA, Laib A, Gohring TN, Barbakow F : Changes in root canal geometry after preparation assessed by high resolution computed tomography. J Endod, 27:1-6, 2001.
10. Byström A, Sundqvist G : Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. Scand J Dent Res, 89:321-328, 1981.
11. Goldman LB, Goldman M, Kronman JH, Lin PS : The efficacy of several irrigating solutions for endodontics: a scanning electron microscopic study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 52:197-204, 1981.
12. Sen BH, Safavi KE, Spångberg LS : Antifungal effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine in root canals. J Endodon, 25:235-238, 1999.
13. Bystrom A, Sundqvist G : The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. Int Endod J, 18:35-40, 1985.
14. Zehnder M, Kosicki D, Luder H, et al. : Tissue-dissolving capacity and antibacterial effect of buffered and unbuffered hypochlorite solutions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 94:756-762, 2002.
15. Podbielski A, Spahr A, Haller B : Additive antimicrobial activity of calcium hydroxide and chlorhexidine on common endodontic bacterial pathogens. J Endod, 29:340-345, 2003.
16. Sirén EK, Haapasalo MP, Waltimo TM, Ørstavik D : In vitro antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine or iodine potassium iodide on *Enterococcus faecalis*. Eur J Oral Sci, 112:326-331, 2004.
17. Stephan C, Kenneth M : Pathways of the pulp ninth edition. 신홍인터내셔널, 서울, 258, 2007.
18. Estrela C, Silva JA, de Alencar AH, et al. : Efficacy of sodium hypochlorite and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* - a systematic review. J Appl Oral Sci, 16:364-368, 2008.
19. Estrela C, Estrela CRA, Decurcio DA, et al. : Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in

- infected human root canals. *Int Endod J*, 40:85-93, 2007.
20. Spangberg L, Engström B, Langeland K : Biologic effects of dental materials. 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 36:856-871, 1973.
 21. Sjögren U, Figdor D, Spångberg L, Sundqvist G : The anti- microbial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J*, 24:119-125, 1991.
 22. 안은숙, 김지혜, 신동화 : 휘발성 Allyl Isothiocyanate계 화합물의 항균 활성에 관한 연구. *한국식품학회지*, 31:206-211, 1999.
 23. Koo H, Gomes B, Rosalen P, et al. : In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Archives of Oral Biology*, 45:141-148, 2000.
 24. Shin IS, Lee JM : Study on antimicrobial and antimutagenic activity of horseradish(*Wasabia japonica*) root extracts. *J Korean Fish Soc*, 31:835-841, 1998.
 25. 유난영, 이주현, 서현우, 박호원 : 구강내 미생물에 대한 서양산 고추냉이(*Armoracia rusticana*) 뿌리 추출물의 항균효과. *대한소아치과학회지*, 33:447-456, 2006.
 26. Masuda H, Inoue T, Kobayashi Y : Anticaries effect of Wasabi components. *ACS symposium series*, 859:142-153, 2003.
 27. 김혜경, 박호원, 신일식 등 : 치태에서 분리된 *Streptococcus mutans*에 대한 서양산 고추냉이(*Armoracia rusticana*) 뿌리 추출물의 항균효과. *대한소아치과학회지*, 35:225-234, 2008.
 28. 박광선, 박호원, 신일식 등 : 구강 내 미생물에 대한 서양산 고추냉이(Horseradish, *Armoracia rusticana*) 뿌리 천연추출물과 합성 Allyl isothiocyanate의 항균활성 비교. *대한소아치과학회지*, 36:217-226, 2009.
 29. 이원주, 박호원, 신일식 등 : 치근관 내 편성 혐기성 세균에 대한 서양산 고추냉이 뿌리 추출물의 항균효과. *대한소아치과학회지*, 36:237-244, 2009.
 30. Bamba H, Kondo Y, Wong R, 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.
 31. Pascal J, Peter L : Antimicrobial activity of gaseous allyl isothiocyanate. *J Food Prot*, 60:943-947, 1997.
 32. Shofran B, Purrington S, Breidt F, Fleming H : Antimicrobial properties of sinigrin and its hydrolysis products. *J Food Sci*, 63:621-624, 1998.
 33. Hitomi K : Analysis of volatile components in essential oil of upland wasabi and their inhibitory effects on platelet aggregation. *Biosci Biotech Biochem*, 58:2131-2135, 1994.
 34. Kazuo I : Volatile components of wasabi(*Wasabia Japonica*) and horseradish(*Cochleria aroracia*). *Nippon Shokuhin Kagyo Gakkaishi*, 18:365-370, 1981.
 35. Kawasashi S, Toshiyuki K : Interaction of oxidized glutathione with allyl isothiocyanate. *Phytochemistry*, 24:715-718, 1985.
 36. Kawasashi S, Toshiyuki K : Interaction of proteins with allyl isocyanate. *J Agri Food Chem*, 35:85-88, 1987.
 37. Kojima M, Ogawa K : Studies on the effect of isothiocyanates and their analogues on microorganisms: (I) effects of isothiocyanates on the oxygen uptake of yeasts. *J Ferment Technol*, 49:740-746, 1971.
 38. Peciulienė V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M : Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Journal of Endodontics*, 34:429-434, 2001.
 39. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, et al. : Microorganisms from canals from root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J*, 36:1-11, 2003.
 40. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U : Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 85:86-93, 1998.
 41. Sjögren U, Figdor D, Spångberg L, Sundqvist G : The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Dent J*, 24:119-125, 1991.
 42. Chu FC, Tsang CS, Chow TW, Samaranayake LP : Identification of cultivable microorganisms from primary endodontic infections with exposed and unexposed pulp space. *J Endod*, 31:424-429, 2005.
 43. Schaupp H, Wohnaut H : Disturbances of taste from oral disinfectants. *HNO*, 26:335-341, 1978.
 44. Usman N, Baumgartner JC, Marshall JG : Influence of instrument size on root canal debridement. *J Endod*, 30:110-112, 2004.
 45. Wade W : Unculturable bacteria-the uncharacterized organisms that cause oral infections. *J R Soc Med*, 95:81-83, 2002.
 46. Relman DA, Falkow S : Identification of uncultured microorganisms : expanding the spectrum of charac-

- terized microbial pathogens. Infect Agents Dis, 1:245-253, 1992.
47. Luiz F, Mario J : Detection of *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* in chronic endodontic infection. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 103:285-288, 2007.
 48. Ochman H, Lerat E, Daubin V : Examining bacterial species under the specter of gene transfer and exchange. Proc Natl Acad Sci USA, 102:6595-6599, 2005.
 49. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J : Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. Oral Microbiol Immunol, 11:266-273, 1996.
 50. Robertson K, Drucker D, Blinkhorn A, et al. : A comparison of techniques used to distinguish stains of *Prevotella intermedia* from *Prevotella nigrescens*. Anaerobic, 5:119-122, 1999.
 51. Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, et al. : *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. Oral Microbiol Immunol, 20:211-215, 2005.
 52. Miller PH, Wiggs LS, Miller JM : Evaluation of AnaeroGen system for growth of anaerobic bacteria. J Clin Microbiol, 32:2388-2391, 1995.
 53. Sena N, Gomes B, Vianna M, et al. : In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. Int Endod J, 39:878-885, 2006.
 54. 노현정, 신용서, 이갑상, 신미경 : 쌀밥 부패미생물에 대한 녹차 물추출물의 항균활성. Korean J Food Sci Technol, 28:66-71, 1996.
 55. 김자영, 오서진, 정승일 : 독활(*Aralia continentalis*) 추출물 Continentalic Acid의 항균활성 연구. 한방안이비인후피부과학회지, 19:161-167, 2006.
 56. 김영희, 이상준, 정영기, 정경태 : *Enterobacter cloacae* K41 plasmid의 중금속 저항성. J Life Sci, 15:566-571, 2005.
 57. Tatnall FM, Leigh IM, Gibson JG : Comparative study of antiseptic toxicity on basal keratinocytes, transformed human keratinocytes and fibroblasts. Skin Pharmacology 3:157-163, 1990.
 58. Agarwal S, Piesco NP, Peterson De, et al. : Effects of sanguinarium, chlorhexidine and tetracycline on neutrophil viability and functions in vitro. Journal of Periodontal Research, 32:335-344, 1997.
 59. Krautheim AB, German THM, Bircher AJ : Chlorhexidine anaphylaxis: case report and review of the literature. Contact Dermatitis, 50:113-116, 2004.

Abstract

THE ANTIMICROBIAL EFFECT OF HORSERADISH(*ARMORACIA RUSTICANA*) ROOT EXTRACTS AGAINST ANAEROBES ISOLATED FROM ORAL CAVITY

Yong-Gul Jang, 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 and Technology, Gangneung-Wonju National University*

Objective : The aim of this study was to determine the antimicrobial effect of horseradish root extracts against *Enterococcus faecalis* and *Fusobacterium nucleatum* isolated from oral cavity compared with reference strain, and compared with that of chlorhexidine.

Method : Horseradish root extracts and chlorhexidine were sequentially diluted and tested against anaerobes(*E. faecalis*, *F. nucleatum*) isolated from children's oral cavity. The microbes were anaerobically incubated and the minimum inhibitory concentration(MIC) and minimum bactericidal concentration(MBC) were detected.

Results :

1. Horseradish root extracts showed antimicrobial effect against *E. faecalis* isolated strain at same or slightly higher concentration compared with MIC of reference strain.
2. 625.0~1,250.0 $\mu\text{g/ml}$ horseradish root extracts showed similar antimicrobial effect with chlorhexidine(7.8~15.6 $\mu\text{g/ml}$).
3. Horseradish root extracts showed antimicrobial effect against *F. nucleatum* isolated strain at same or slightly higher concentration compared with MIC of reference strain.
4. 78.1~312.5 $\mu\text{g/ml}$ horseradish root extracts showed similar antimicrobial effect with chlorhexidine(7.8~15.6 $\mu\text{g/ml}$).

Conclusions : The results of this study confirm that horseradish root extracts has antimicrobial effect against anaerobes isolated from oral cavity as well as reference strain. And we found the potential of horseradish root extracts as a canal irrigant or disinfectant.

Key words : Horseradish(*Armoracia rusticana*) root extracts, Allylthiocyanate(AIT), Anaerobes, Isolation, Chlorhexidine, Antibacterial effect