

시판 중인 구강청결티슈의 세포 독성 관찰

정임희 · 박지현 · 이민경 · 황영선[†]

을지대학교 보건과학대학 치위생학과

The Cytotoxic Effect of Oral Wet Wipes on Gingival Cells

Im-hee Jung, Ji Hyeon Park, Min Kyeng Lee, and Young Sun Hwang[†]

Department of Dental Hygiene, College of Health Science, Eulji University, Seongnam 13135, Korea

Wet wipes are being increasingly used because of their convenience. Particularly, oral wet wipes are useful for regular cleaning of a baby's mouth after birth. Therefore, the consumption of oral wet wipes has increased over the past few years and a variety of products are commercially available. However, product information on safety is not sufficiently provided and still raises doubts regarding adverse effects. To confirm the safety of wet wipes as an oral hygiene item and provide information for their use, we investigated the cytotoxicity of oral wet wipes and verified the underlying mechanism. The anti-bacterial effect of oral wet wipes was analyzed using the disk diffusion method. The cytotoxic effects of oral wet wipes were observed based on morphological changes using microscopy and determined using a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay in gingival epithelial cells and gingival fibroblasts. Evaluation of apoptosis by oral wet wipes was explored using propidium iodide flow cytometric analysis and a terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick-end labeling (TUNEL) assay. Apoptosis-related molecules were also analyzed using western blotting. Five types of oral wet wipes were tested, and two products from Fisher-Price and Dr. Kennedy revealed strong cytotoxic effects on gingiva epithelial cells and gingiva fibroblasts, although they also showed intense anti-bacterial effects on oral bacteria. Cell cycle arrest in the G2/M phase and apoptosis were observed based on treatment of extracts from Fisher-Price and Dr. KENNEDY. Relatively high TUNEL levels, reduction of proliferating cell nuclear antigen and cyclin-dependent kinase 4 expression, and fragmentation of poly (ADP-ribose) polymerase were also elucidated. These results suggest that commercial oral wet wipes could exert cytotoxic influences on oral tissue, although there are anti-bacterial effects, and careful attention is required, especially for infants and toddlers.

Key Words: Apoptosis, Cell cycle, Cell survival, Gingiva, Oral wet wipes

서론

생후 2주부터 6개월까지는 영아의 치아가 맹출되지 않고 맹출할 위치의 뼈와 잇몸의 모양이 형성되는 시기이다. 보통 치아는 맹출 시기에 치근이 형성되기 시작해 맹출 1~2년 후 치근이 완성되며, 보통 만 3세 정도면 20개의 유치를 갖게 된다¹⁾. 유중절치(앞니)는 6~10개월, 상악 유측절치는 8~13개월, 하악 유측절치는 10~16개월, 유견치(송곳니)는 16~23개월, 제1유구치(어금니)는 13~19개월 정도에

맹출된다¹⁾. 따라서 이 시기의 유치 맹출 및 발육과 성장은 영구치 건강에도 영향이 클 뿐 아니라 성격 형성 등 평생 건강을 좌우하는 주요 요인이 되므로, 부모를 통한 세심한 영유아 치아 건강 관리가 필요한 시기이다. 경제적 수준 및 예방의료에 대한 인식 향상은 자녀의 구강건강 관리에 대한 관심 증가로 연결되고 있고, 의료 접근성도 높아졌을 뿐만 아니라 다양한 구강 보조용품들도 출시되고 있어 자가 구강건강 관리가 지속 가능해지고 있다^{2,3)}.

*Streptococcus salivarius*와 같은 구강 미생물은 생후 24

Received: December 14, 2017, Revised: February 26, 2018, Accepted: March 5, 2018

ISSN 2233-7679 (Online)

[†]Correspondence to: Young Sun Hwang

Department of Dental Hygiene, College of Health Science, Eulji University, 553 Sanseong-daero, Sujeong-gu, Seongnam 13135, Korea
Tel: +82-31-740-7493, Fax: +82-31-740-7352, E-mail: kiteys@eulji.ac.kr, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7012-3434>

Copyright © 2018 by Journal of Dental Hygiene Science

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

시간 정도에도 관찰되기 시작하며 생후 1년 정도에는 특정 *Actinomyces*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Neisseria*, *Nocardia*, *Staphylococcus*, *Veillonella*가 출현하고 치아 맹출 후에는 *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus mitior*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Bacteroides* 및 나선균이 출현하는 것으로 알려져 있다⁴⁾. 특히 우식 개시에 매우 중요한 역할을 하고 있는 *S. mutans*는 치아 맹출 전에도 구강 안에서 집락 형성이 가능한 것으로 보고되고 있는데, 부모를 통한 수직적 획득 외에도 수평적 획득에 의한 유아 우식 이환에 따른 것으로 보고 있다⁵⁾. *S. mutans*의 조 기감염은 향후 유치열기 우식 발생과 높은 연관성을 보인다⁶⁾. 유아기 우식증은 0세부터 3세의 영유아 시기에 가장 빈발하는 구강 질환으로 우유병을 수시로 사용하거나 물고 잠들 때 주로 상악 전치에 발생하는데, 진행 속도가 매우 빠르다.

유아기 구강위생은 대부분 젖은 형질이나 거즈를 이용해 보호자가 손가락으로 아이의 치아 및 잇몸을 닦아 주는 형태이다. 치아 및 잇몸을 닦아 줌으로써 수유나 이유식 후 구강 내에 잔존하는 음식물을 제거할 수 있을 뿐만 아니라 잇몸을 마사지하는 효과도 기대할 수 있다. 최근에는 유아를 위한 일회용 구강청결티슈가 시판되고 있는데 휴대가 용이하고 간편하게 구강위생 관리를 할 수 있기 때문에 수요가 늘고 있다⁷⁾. 시판되고 있는 구강청결티슈는 정제수를 기본으로 하고 있으며 자일리톨, 프로폴리스, 감초추출물 등 다양한 기능성 성분이 함유된 제품도 시판되고 있다. 치약을 잘 뱉지 못하는 영유아와 자가 구강관리가 어려운 노인 및 장애인들이 주요 대상이었지만 일반인을 대상으로 하는 제품도 있다. 국내외의 영유아 산업 증대와 함께 영유아 구강위생에 대한 인식 및 관심이 증가함에 따라 영유아용 구강청결 보조용품의 출시가 확대되고 있지만, 구강청결티슈에 대한 소비자들의 인체 안전성에 관한 정보가 매우 취약하므로 구강세포가 매우 예민한 영유아를 대상으로 하는 제품의 경우 개별 안정성 연구 및 이에 대한 정보 제공이 반드시 필요하다.

본 연구에서는 구매도가 높은 시판 구강청결티슈 5종을 대상으로 구강위생용품으로서의 안전성을 확인하고 이에 대한 정보를 제공하고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 구강청결티슈 성분 추출

마이비(Mybee; Avent Korea, Seoul, Korea), 닥터케네디(Dr. KENNEDY; Kennedy & Kennedy, Seoul, Korea), 궁중비책(Goongbe; Zero to Seven, Seoul, Korea), 아이수

(I-Soo; Wooil C&Tech, Pyeongtaek, Korea), 피셔프라이스(Fisher-Price; C&Tech, Hwaseong, Korea)에서 판매하는 일회용 구강청결티슈를 각각 20 ml 구강세포 배양액에 담가 24시간 동안 교반을 유지하며 티슈 성분을 추출하였다. 추출 성분용액은 5,000 rpm에서 10분 동안 원심분리한 후 상층액을 원액 시료로 사용하였고, 대조군으로는 구강청결티슈에 사용된 분량의 순면부직포를 멸균하여 동일 조건에서 성분을 추출해 실험에 사용하였다. 구강미생물에 대한 실험에는 구강청결티슈 성분을 구강미생물 배양액으로 동일 과정에 따라 추출해 적용하였다.

2. 구강세포주 및 구강미생물 배양

구강상피세포와 구강섬유세포를 fetal bovine serum이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium/F-12 phenol red-free medium (3:1) 배지로 37°C, CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 추출된 구강청결티슈 성분은 동일 배양액으로 희석하여 세포에 적용하였다. *S. mutans*와 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*는 한국생명공학연구원 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures)에서 분양받았으며, brain-heart infusion (BHI) 배지(Becton, Dickinson and Company, Baltimore, MD, USA)로 35°C 인큐베이터에서 교반 배양하였다. 배양된 미생물은 3,000 rpm으로 원심분리하여 phosphate-buffered saline (PBS)로 세척하였고 이를 다시 PBS에 풀어 650 nm 파장에서 흡광도를 측정(DU 800 spectrophotometer; Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA)하여 colony-forming unit (CFU)/ml를 결정하였다.

3. 연구방법

1) 구강세포주 현미경 관찰

60 mm petri dish에서 배양된 구강세포를 구강청결티슈 성분이 포함된 세포배양액으로 교체해 배양한 후 세포모양 변화를 위상차현미경(CKX41-A32PHP; Olympus, Tokyo, Japan)을 통해 확인하였다.

2) 구강세포 독성 분석

96-well에서 배양된 구강세포(구강상피세포: 1×10^4 cells/well, 구강섬유세포: 3×10^3 cells/well)를 구강청결티슈 성분이 포함된 배양액으로 교체하여 24시간 배양하였다. 배양액을 제거한 후 5 mg/ml 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 용액을 넣고 37°C에서 4시간 배양하였다. 상등액을 제거한 후 200 μ l dimethyl sulfoxide를 넣어 formazan을 용해하고, microplate reader

기(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 구강미생물 독성 분석

미생물 농도는 650 nm에서 광학밀도(optical density) 값이 0.4가 되게 한 후 BHI 평판배지에 시험관을 도말하였다. 멸균한 원형 Whatman 종이 디스크(지름 8 mm)를 배치하고 추출한 구강청결티슈 성분을 각각 5 µl씩 디스크에 점적한 후 35°C 인큐베이터에서 배양하였다. 24시간 배양 후 미생물 증식 억제 작용이 나타난 원형 디스크 주위의 clear zone을 측정하였다.

4) Fluorescence-activated cell sorting (FACS) 분석

100 mm 배양판에서 배양된 구강상피세포(4×10^5 cells/well)를 구강청결티슈 성분이 포함된 배양액으로 교체하여 24시간 배양하였다. Trypsin을 이용해 세포를 수확한 후 PBS로 세척하고 70% ethanol로 고정하였다. 0.25 mg/ml RNase-A와 50 µg/ml propidium iodide를 넣어 반응한 후 FACSria™III (BD, Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하여 세포주기(cell cycle)를 분석하였다. 결과 분석에는 WinMDI 3.0 소프트웨어(BD)를 이용하였다.

5) TUNEL 반응

구강청결티슈 성분에 의한 세포사멸(apoptosis)은 terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick-end labeling (TUNEL)이 적용된 *In Situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche, Minneapolis, MN, USA)을 이용하였고 제조회사가 제공하는 실험방법에 따라 진행하였다. Chamber slide에서 배양된 구강상피세포는 구강청결티슈 성분이 포함된 배양액으로 교체하여 16시간 배양하였다. PBS 세척 후 4% paraformaldehyde로 고정하고 Triton-X100으로 반응하였다. PBS 세척 후 TUNEL 반응 용액을 넣어 빛을 차단하고 37°C에서 1시간 배양하였다. PBS 세척 후 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)로 염색 후 마운트(VECTASHIELD antifade mounting medium with DAPI; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)하였고 형광현미경(EVOS FL monochrome microscope; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 세포반응을 관찰하였다.

6) Western blotting

1% NP-40, 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 10 mM NaCl, protease inhibitor cocktail (Roche

Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)이 함유된 세포 분해용액으로 추출된 단백질 50 µg을 10% SDS-PAGE에서 전기영동 하였다. Nitrocellulose membrane으로 분리된 단백질을 전기영동한 후 5% 탈지유로 blocking하였다. Nitrocellulose membrane에 1,000배 희석한 1차 항체를 넣고 4°C에서 24시간 반응하였다. PBS/Tween-20 용액으로 membrane을 3회 세척한 후 3,000배 희석된 horseradish peroxidase가 부착된 2차 항체를 넣어 상온에서 2시간 반응하였다. 1차 항체에 대한 단백질 발현은 Enhanced Chemiluminescence Detection kit (ECL; Amersham Life Science, Parsippany, NJ, USA)를 이용한 Kodak x-ray 필름으로 확인하였다. Gel Doc XR⁺ imaging system (Bio-Rad)을 이용하여 단백질 발현을 비교 분석하였다.

7) 통계처리

자료 분석은 InStat™ statistical software Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA, USA)를 이용하여 one-way ANOVA로 분석하였고 p값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 것으로 해석하였다.

결 과

1. 구강미생물 및 구강세포 생육에 대한 구강청결티슈 성분 효과

Disc diffusion 분석법을 이용하여 구강청결티슈 성분이 구강미생물 생육에 미치는 영향을 관찰하였다. BHI 평판배지에 *S. mutans* 혹은 *A. actinomycetemcomitans*를 도말하고 구강청결티슈 성분을 점적한 디스크를 배치하여 생육을 관찰하였다. 24시간 후 대조군과 비교했을 때 궁중비책, 마이비, 아이수 제품 성분에 의한 구강미생물 생육억제 작용

Table 1. The Antibacterial Effect of Commercial Oral Wet Wipes against Oral Bacteria

Compound	Size of clear zone (disk margin, mm)	
	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
Control	0	0
Goongbe	3.5±0.01*	3.2±0.02*
Fisher-Price	15.2±0.6**	14.1±0.7**
Mybee	2.9±0.22*	2.65±0.21*
I-Soo	2.5±0.05*	1.91±0.03*
Dr. KENNEDY	16.1±0.9**	17.8±0.4**

Values are presented as mean±standard deviation. *p<0.05, **p<0.01.

은 제한적으로 관찰된 반면 피서프라이스와 닥터케네디 제품 성분은 높은 구강미생물 생육억제 작용을 나타내었다 (Table 1). 이런 결과는 구강세포에서도 관찰되었는데 궁중

비책, 마이비, 아이수 제품 성분이 함유된 배지로 배양된 구강상피세포와 구강섬유세포는 세포 모양 변화와 세포독성이 현저히 관찰되지 않았지만 피서프라이스와 닥터케네디

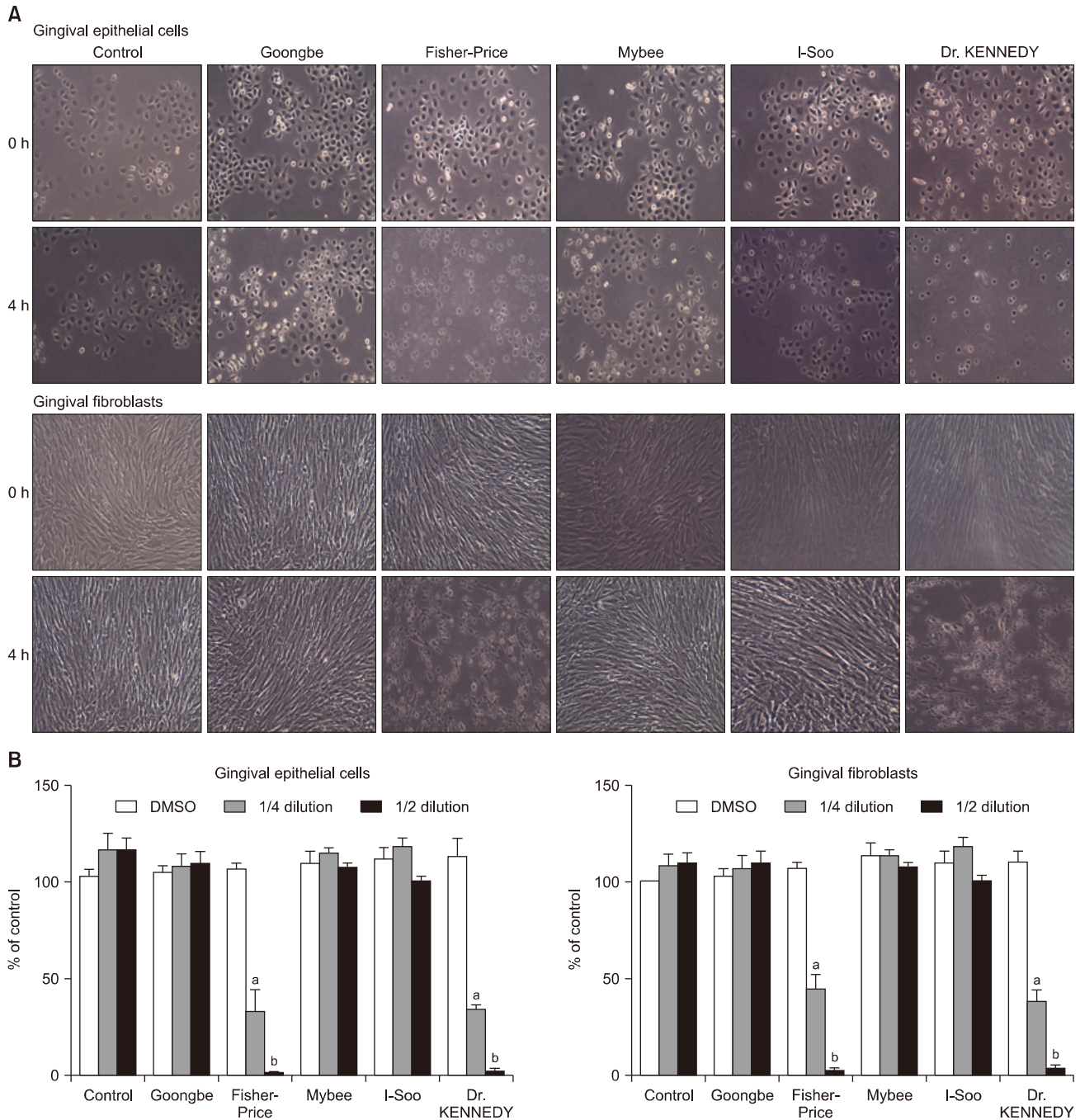


Fig. 1. Effect of oral wet wipes on morphology and cytotoxicity of oral cells. (A) The solution from oral wet wipes were treated in oral gingival epithelial cells and oral gingival fibroblasts for 4 hours. The oral wet wipes from Goongbe, Fisher-Price, Mybee, I-Soo, and Dr. KENNEDY were tested. Pictures were taken using a phase-contrast microscope at 200× magnifications. (B) The solution from oral wet wipes (1/2 or 1/4 dilution) were treated in oral cells for 24 hours and cytotoxicity were observed using 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. DMSO: dimethyl sulfoxide. ^ap < 0.01, ^bp < 0.001 vs. DMSO-treated media.

제품 성분이 함유된 배지로 배양된 구강상피는 위축된 세포 모양이 관찰되었고 구강점유세포는 짧아진 방추형을 나타내었다(Fig. 1A). 피셔프라이스와 닥터케네디 제품 성분은 구강세포에 대한 강한 독성을 나타내었다(Fig. 1B).

2. 구강청결티슈 성분에 의한 세포 독성 분석

구강청결티슈 성분에 의한 구강세포 독성의 원인을 분석하고자 구강청결티슈 성분으로 배양된 구강상피세포를 유

세포분석기를 이용하여 세포주기를 관찰하였다(Fig. 2A). 대조군과 비교하여 피셔프라이스와 닥터케네디 제품 성분은 G2/M phase에서 세포주기 진행을 현저히 억제하였고 세포자멸 또한 증가시켰다. 궁중비책, 마이비, 아이수 제품 성분에 의한 G2/M phase 세포주기 진행 억제 및 세포자멸을 나타낸 세포 수는 대조군과 비교하여 제한적이었다. 세포자멸에서 나타나는 DNA 절편의 3'-OH 말단을 TUNEL 방식으로 표식함으로써 구강청결티슈 성분에 의한 구강세포자

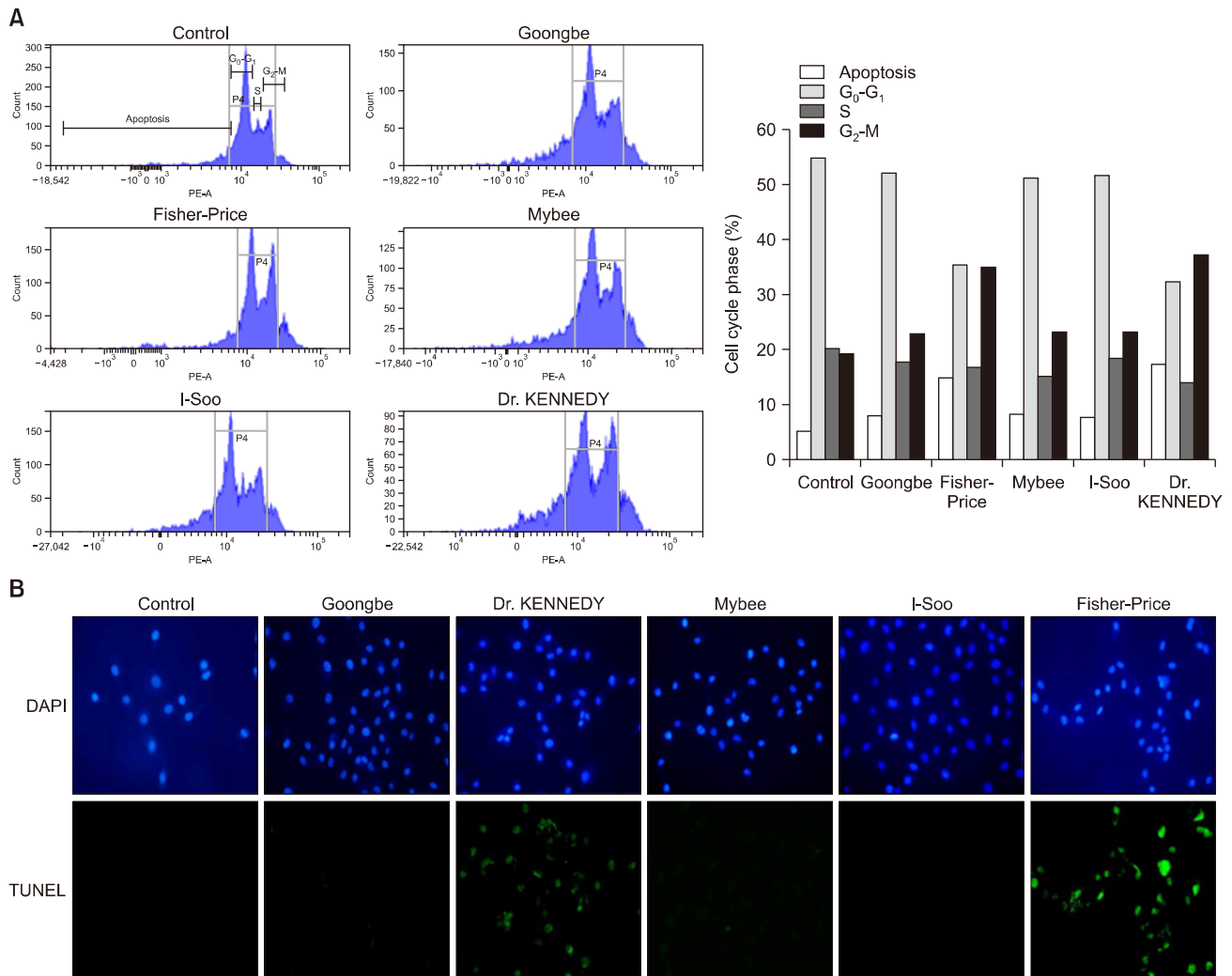


Fig. 2. Effect of oral wet wipes on oral cell growth. (A) After gingival epithelial cells were cultured for 24 hours in the presence of oral wet wipes solution (1/4 dilution), the cells were fixed with ethanol and the nuclei were stained with propidium iodide. The cell cycle distribution was analyzed via flow cytometry. Cell cycle phase (%) was shown in graph. (B) Twenty-four hours cultured cells in oral wet wipes solution (1/4 dilution) were performed a terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick-end labeling (TUNEL) assay using an *In Situ* Cell Death Detection Kit (Roche) and then stained with a 1 μ g/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) solution (blue) for 10 minutes. Intensely stained TUNEL positive cells (green) were visualized under a fluorescence microscope ($\times 200$ original magnification). (C) Total lysates of oral wet wipes solution-treated cells were examined in western blotting assay as described in the Materials and Methods section. The expression of apoptosis-related proteins was observed using specific antibodies. β -Actin was tested as loading control. The proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) protein level normalized to β -actin were showed in graph. PARP: poly (ADP-ribose) polymerase. ^ap < 0.05, ^bp < 0.01.

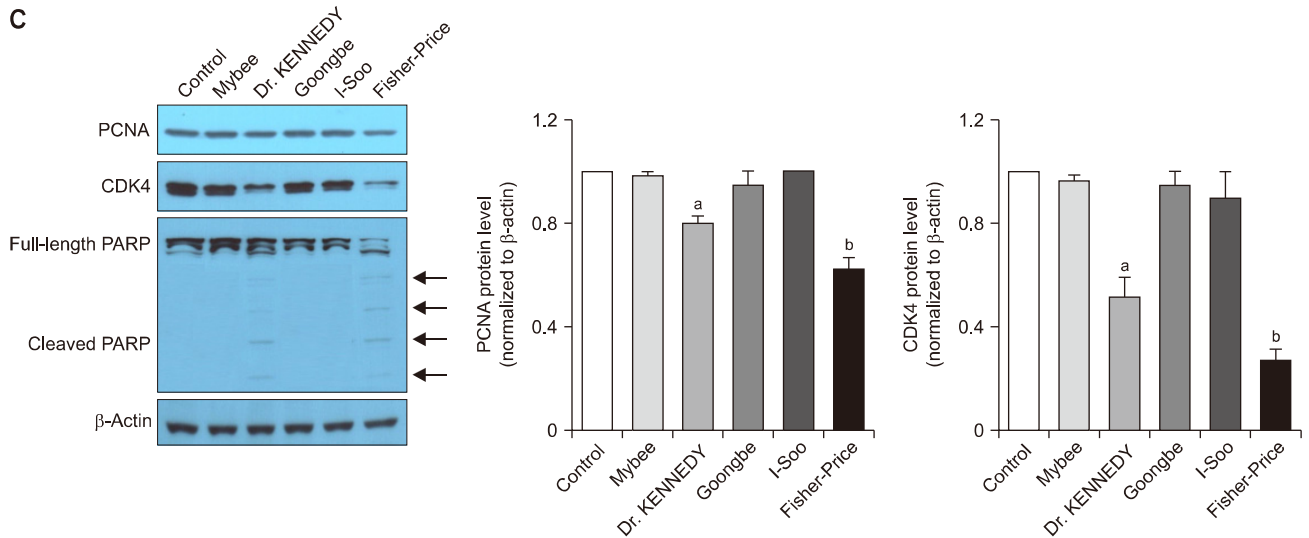


Fig. 2. Continued.

멸을 형광현미경으로 관찰하였다(Fig. 2B). 세포주기 분석 결과와 같이 궁중비책, 마이비, 아이수 제품 성분에 의한 세포자멸은 매우 제한적이었지만 피셔프라이스와 닥터케네디 제품 성분에 의한 강한 세포자멸 유도가 확인되었다. 세포자멸을 나타내는 TUNEL 형광은 DAPI로 염색된 핵에서 일치되게 검출되었다. 또한 세포자멸에서 관찰되는 proliferating cell nuclear antigen (PCNA)과 cyclin-dependent kinase 4 (CDK4)의 발현 감소 및 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 단백질의 분절이 피셔프라이스와 닥터케네디 제품 성분에 의해 유도되었다(Fig. 2C).

고 찰

통계청과 현대경제연구원의 분석에 따르면 출산율 저하에 따라 2012년 48.5만 명이었던 출생아 수가 2015년 43.3만 명으로 영유아 인구는 감소 추세이지만⁸⁾, 국내 유아용품 시장 규모는 2012년 1.69조 원에서 2015년 2.37조 원으로 성장세를 보이고 있다⁹⁾. 1자녀 가구가 늘어나면서 양육의 질에 관심을 갖는 부모가 늘어난 탓도 있지만 유아동용품 기업들의 프리미엄 마케팅 전략도 육아지출비용 증가를 초래한 것으로 분석되고 있다. 2015년 기준 우리나라 출산율은 경제협력개발기구(OECD) 국가 중 최하위를 유지함에도 불구하고, 유아동용품 기업들이 ‘안심하고 먹고 사용할 수 있다’는 광고 문구를 앞세워 고가의 프리미엄 제품을 출시하고 있고, 유아동용품의 가격이 비쌀수록 아이에게 유용할 것이라는 기대심리 때문에 유아동 산업시장 규모는 성장세를 유지하고 있다⁹⁾.

이와 상응하게 물티슈 시장 규모도 2016년 약 3,900억 원 규모로 매년 약 8.5%씩 성장세를 보이고 있고, 안전관리 강화를 위해 2015년 7월부터 공산품에서 화장품 영역으로 변경 관리되고 있다. 국내에서 시판 중인 물티슈는 인체 청결용과 구강 청결용으로 분류되고 있다⁷⁾. 인체 청결용의 경우 화장품 안전기준 적용을 받아 제조단계부터 사용 원료 기준 제시 및 품질검사가 시행되고 있고 부작용 보고도 의무화되어 있다. 하지만 구강청결용 물티슈는 의약품으로 지정되어 있어 시판 전에 안전성 심사는 거치고 있지만, 미국이나 유럽 등의 경우 화장품 혹은 공산품으로 분류하고 있어 벤조산나트륨과 같은 물티슈 보존제의 함량 기준에 대한 논란들이 이어지고 있다¹⁰⁾. 특히나 영유아에게 적용될 수 있는 구강청결용 물티슈는 입안의 건강과 위생을 위해 사용하는 제품으로 빨거나 먹을 수 있으므로 제품 성분 제한 및 함량 한도에 대한 엄격한 기준 마련이 더욱 시급하다. 최근에는 아기 구강청결티슈에서 방부제 및 안정화제가 검출되어 문제가 되었는데 검출된 벤조산은 비타민 C와 반응해 발암물질을 형성할 수 있고¹¹⁾, 안정화제 EDTA 2나트륨은 여러 부작용을 보일 수 있다¹²⁾. 지속적인 노출 시 남아의 경우 정자 감소증, 여아의 경우 유방암 발생의 부작용이 제시되고 있다¹³⁾. 의약품 외용제들의 허용 범위는 내용제의 40배 이상으로 외용제 기준치는 초과하지 않았지만 내용제 기준치로는 초과된 함량이었다. 이에 2016년 식품의약품안전처는 구강용품에 사용되는 보존제의 종류 및 사용 범위를 의약품에 사용하는 허용 기준으로 조정하였다¹⁴⁾. 하지만 아이는 자발적 빨기가 어렵기 때문에 유아 대상 구강제품을 외용제 기준으로 적용하기에는 매우 부적절하다.

유치열기의 치아 우식증은 맹출 직후 나타나는 형성부전성 우식증, 생후 2년 이내에 수유와 연관된 상악유전치부 우식증, 유구치 맹출 후의 열구 우식증, 유치열 완성 후의 유구치 인접면 우식증 등이 있다¹⁵⁾. 영유아기에 우유병이나 간식을 수시로 접하거나 물고 잠들 때 발생하는 상악 전치의 우식 발생 및 진행속도는 매우 빠르다. 따라서 영유아의 이와 잇몸 위생을 위한 간편성과 편리성 때문에 구강청결티슈의 사용이 증가하고는 있지만 시판 회사에서 소비자에게 제공하는 정보는 매우 부족하고 성분에 대한 안전기준치조차 적절하게 제시되지 못하고 있어 영유아 구강위생 관리에 허점이 드러난 상황이다. 이와 함께 자가 구강관리가 어려운 노약자 및 장애인뿐만 아니라 일반인도 제품 대상이 되므로 인체 안전성에 관한 적절한 조사 및 정보제공이 필요하다. 이에 본 연구에서는 시판되고 있는 다양한 구강청결티슈 중 구매도가 높은 제품 5종에 대해 구강위생용품으로서의 안전성을 확인하였다.

연구결과, 5종의 구강청결티슈 중 구강미생물 *S. mutans* 및 *A. actinomycetemcomitans*에 대한 항균작용이 높았던 피셔프라이스와 닥터케네디 제품 성분은 구강상피세포와 구강섬유세포에 대해 강한 세포 모양 변화 및 세포 독성을 나타내었다. 궁중비책, 마이비, 아이수 제품 성분은 그 효과들이 제한적이었다. 피셔프라이스와 닥터케네디 제품의 성분이 항균활성이 있다고는 하지만 구강세포에 대한 강한 세포독성은 영유아나 노약자에게 자주 사용될 경우 세포 손상이 우려될 수 있다. 피셔프라이스와 닥터케네디 제품 성분에 의한 구강세포 독성은 G2/M phase에서 세포주기 진행 억제와 더불어 세포자멸 유도로 분석되었다. 세포자멸에서 관찰되는 PCNA 및 CDK4 단백질의 발현 감소와 함께 PARP 단백질 분절이 확인되었을 뿐 아니라 강한 염색체 분절이 관찰되었다^{16,17)}. 세포자멸은 세포 내에서 자살신호 전달 기작이 활성화되면서 세포 스스로가 죽어가는 과정으로 세포괴사(necrosis)와 달리 면역반응을 거의 유도하지 않지만 세포자멸 후의 잔재들은 macrophage 등의 면역세포에 의해 제거된다¹⁸⁾. 모든 세포는 세포자멸 기작을 가지고 있으므로 과도한 내·외부의 여러 스트레스 요인에 의해 세포자멸을 유도하는 단백질들이 활성화되면 DNA 분절뿐만 아니라 단백질들의 분절들이 발생된다. 세포주기는 하나의 세포가 두 개의 세포로 분열하여 증식하는 과정으로 간기(interphase)와 mitosis (M phase)로 구성되어 있으며, 간기는 DNA가 복제되는 S phase와 휴지기인 G₁과 G₂ phase로 구성된다¹⁹⁾. 새로운 세포가 본래의 세포 염색체 수와 형태를 갖도록 DNA를 복제하는 과정에 문제가 발생하거나 상동염색체 분리 과정에 이상이 발생되면 비정상적인 세포가 만들

어지므로 이런 세포들은 세포자멸을 거쳐 제거된다. 또한 S와 M phase 사이의 G₁과 G₂ phase에는 cyclin-Cdk (cyclin-dependent kinase) 복합체로 구성된 checkpoint라는 감시시스템이 작동하고 있어, 세포주기 진행에 이상이 감지되면 세포주기를 멈추고 복구 기작(repair system)을 활성화하기도 한다.

구강청결티슈는 부직포에 정제수와 방부제 등이 함유되어 있다. 상품정보에 따르면 항균작용뿐만 아니라 강한 구강세포 독성을 나타낸 피셔프라이스와 닥터케네디 제품에는 키토산(chitosan)이 공통으로 첨가되어 있다. 키토산은 키틴(chitin)을 탈아세틸화해 만든 동물성 식이섬유로 N-acetyl-d-glucosamine이 β-1,4 결합으로 구성되어 있으며, 이에 대한 소화효소가 없어 인체 흡수가 어렵다²⁰⁾. 키토산은 제산작용 및 혈청 콜레스테롤과 중성지방량 감소, 장내 유용세균의 발육을 촉진하는 것으로 알려져 있으며, 대식세포 활성화 등의 면역 조절 활성화도 보고되어 있다^{21,22)}. 또한 수용성의 N-acetyl-d-glucosamine oligomers (chitin oligosaccharide; NACOS)와 D-glucosamine oligomers (chitosan oligosaccharide; COS)의 항염증(anti-inflammatory) 및 항암(anti-cancer) 효과에 대한 연구도 보고된 바 있다²³⁾. 하지만 탈아세틸화 정도와 점도에 따라 다양한 형태의 수용성 혹은 불용성 키토산이 형성되고 그 특성과 기능 또한 다른 것으로 알려져 있다. 2014년 즈음 구강청결티슈에 함유된 파라벤류가 문제가 되면서 무방부제 제품이 출시되었는데, 화학방부제 대신 키토산을 첨가함으로써 치아균과 치주균의 세포막 형성 억제와 구취감소 효과가 있는 것으로 설명하고 있다²⁴⁾. 하지만 화학방부제보다 미생물 생육 억제 활성이 낮고 키토산 분해 활성이 있는 미생물의 생육에 오히려 영양분으로 사용될 수 있으므로 제조나 유통 과정 중에 이로 인한 문제 발생 소지가 남아 있다. 더욱이 키토산이 포함된 시판 구강청결티슈 성분에 의한 강한 구강세포 독성이 본 연구에서 확인된 만큼 직접 접촉이 필수인 구강청결티슈에 대한 키토산 적용 방식의 재고가 필요할 것으로 보인다. 특히 구강 내용물의 자발적 빨기가 어려운 영유아에 대해서는 상대적으로 잔존 키토산이 높을 수 있어 내용에 준하는 기준치 마련이 필요할 것으로 보인다. 또한 키토산은 긍정적인 기능성이 많은 만큼 방부제로서의 활성을 극대화하기 위해 구강세포독성이 낮은 키토산을 선별하여 대체하는 것도 바람직할 것으로 보인다. 2018년 현재 10여종의 구강위생물티슈가 시판되고 있으며, 본 연구에서는 쇼핑몰 상품거래 기준 상위 5종 제품에 대한 안전성을 조사하였다. 상위 5종 제품들은 화학보존제 무첨가 및 무표백 등 구강 제품들의 최근 경향을 모두 반영하고 있고, 나머지 제

품들에 대해서는 상품거래량이 적어 전수조사는 시행하지 않았다. 본 연구 결과는 구강청결티슈에 대한 구강위생용품으로서의 안전성을 확인함으로써 제품사용 시 유의해야 할 정보를 제공하고자 하였다.

요약

구강위생을 위한 간편성과 편리성 때문에 영유아에서 건강취약자 및 일반인에 이르기까지 구강청결티슈 사용이 증가되고 있다. 또한 기본 성분인 정제수 외에도 구강위생에 도움이 될 목적으로 다양한 기능 성분이 첨가된 구강청결티슈들이 시판되고 있다. 하지만 함유 성분에 대한 제공정보가 부족하고 함유량 기준이 마련되지 못하고 있어 구강 환경이 예민한 영유아 등에게 적용하기 위해서는 이들 제품에 대한 연구자료가 필요할 것으로 보인다. 본 연구에서는 구매도가 높은 시판 구강청결티슈 5종에 대한 구강세포 안전성을 확인함으로써 제품사용 시 유의해야 할 정보를 제공하고자 하였다. 시험 결과 피셔프라이스와 닥터케네디 제품 성분은 구강미생물 *S. mutans* 및 *A. actinomycetemcomitans*에 대한 항균작용을 나타냈지만 구강상피세포 및 구강섬유세포에도 독성을 나타냈다. 항균작용이 제한적인 공중비책, 마이비, 아이수 제품 성분은 구강상피세포 및 구강섬유세포에 대한 독성도 낮았다. 피셔프라이스와 닥터케네디 제품 성분에 의한 구강세포 독성은 G2/M phase에서 세포주기 진행 억제와 세포자멸 유도에 의한 것으로 분석되었다. 따라서 구강 환경이 예민한 영유아 등을 대상으로 한 반복적이고 빈번한 사용은 구강세포 독성의 가능성을 높일 수 있다.

감사의 글

이 논문은 2015년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(2015R1D1A1A01056946).

References

1. Kwon JH, Choi BJ, Lee JH, Kim SO, Son HK, Choi HJ: Eruption time and sequence of permanent teeth in students from E-elementary school. J Korean Acad Pediatr Dent 36: 253-261, 2009.
2. Jang KA, Kim DY: The relations between mothers' oral health behavior and children's mean number of decayed or filled primary teeth. J Korean Soc Dent Hyg 10: 215-229, 2010.
3. Jeung MO, Kang PS, Lee KS, Hwang TY: Usage patterns of oral care products of dental patients. Yeungnam Univ J Med 24: 319-329, 2007.
4. Kim HE: Change of paradigms in caries-associated bacteria in the caries process: ecological perspectives. J Dent Hyg Sci 14: 87-93, 2014.
5. Song HJ, Kim JG, Yang YM, Baik BJ, Kim MA, Jeong HK: Distribution and transmission of Streptococcus mutans among children and their mothers. J Korean Acad Pediatr Dent 38: 9-16, 2011. <https://doi.org/10.5933/JKAPD.2011.38.1.009>
6. Lee SW, Song JS, Choi BJ, Choi HJ, Lee JH: Correlation of caries activity between mothers and children with cariogram and evaluation of caries risk factors. J Korean Acad Pediatr Dent 36: 337-347, 2009.
7. Korea Health Industry Development Institute: Consumption pattern analysis of wet tissue in Korea. Retrieved November 3, 2017, from <https://goo.gl/K35fvQ>(2015, November 9).
8. Korean Statistical Information Service: Population projections for Korea (2015~2065). Retrieved November 3, 2017, from http://www.index.go.kr/potal/main/EachDtlPageDetail.do?idx_cd=1010(2016, December 12).
9. Hyundai Securities: Indulgent parents, growth of the kids industry. Retrieved November 3, 2017, from http://hkconsensus.hankyung.com/apps.analysis/analysis.downpdf?report_idx=357888(2015, August 6).
10. National Institute of Environmental Research: Risk assessment for hazardous substances contained in household product. Retrieved November 3, 2017, from <http://library.nier.go.kr/search/DetailView.ax?cid=5591218>(2014).
11. U.S. Food and Drug Administration: Questions and answers on the occurrence of benzene in soft drinks and other beverages. Retrieved November 3, 2017, from <https://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/ChemicalContaminants/ucm055131.htm>(2006, July 12).
12. Dae Myung Chemical: Material safety data sheet. CAS No. 6381-92-6. Retrieved November 3, 2017, from http://www.daemyungchem.co.kr/shop/data/upload/20160307175103_6852.pdf(2009, November 4).
13. Seoul Metropolitan Library: Preventive management of environmental hormone for child. Retrieved November 3, 2017, from <http://lib.seoul.go.kr/search/detail/CATLAZ000000730825>

- ?tr_code=lib(2015).
14. Ministry of Food and Drug Safety: Administrative notice of the revised stipulation; Permission of quasi-drug items. Retrieved November 3, 2017, from [http://www.mfds.go.kr/index.do?mid=675&seq=32006&cmd=v\(2016, June 9\)](http://www.mfds.go.kr/index.do?mid=675&seq=32006&cmd=v(2016, June 9)).
 15. Lim KU, Lee KH, Ra JY, et al.: Comparison of severe early childhood caries prevalence by two diagnostic criteria. *J Korean Acad Pediatr Dent* 35: 677-683, 2008.
 16. Ahmad N, Feyes DK, Agarwa R, Mukhtar H, Nieminen AL: Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 89: 1881-1886, 1997. <https://doi.org/10.1093/jnci/89.24.1881>
 17. Tang Y, Zhao DY, Elliott S, et al.: Epigallocatechin-3 gallate induces growth inhibition and apoptosis in human breast cancer cells through survivin suppression. *Int J Oncol* 31: 705-711, 2007. <https://doi.org/10.3892/ijco.31.4.705>
 18. Chaabane W, User SD, El-Gazzah M, et al.: Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 61: 43-58, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00005-012-0205-y>
 19. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN: The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 36: 131-149, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x>
 20. Kim SK, Jeon YJ: Bioactivities of chitin and chitosan(2)-Antitumor activities by immunological function of chitin, chitosan and their oligosaccharides. *J Chitin Chitosan* 2: 3-14, 1997.
 21. Jeon YJ, Lee EH, Kim SK: Bioactivities of chitin and chitosan(1)-antimicrobial function, hypertension control function and cholesterol control function. *J Chitin Chitosan* 1: 4-13, 1996.
 22. Sugano M, Watanabe S, Kishi A, et al.: Hypocholesterolemic action of chitosans with different viscosity in rats. *Lipids* 23: 187-191, 1988. <https://doi.org/10.1007/BF02535456>
 23. Azuma K, Osaki T, Minami S, Okamoto Y: Anticancer and anti-inflammatory properties of chitin and chitosan oligosaccharides. *J Funct Biomater* 6: 33-49, 2015. <https://doi.org/10.3390/jfb6010033>
 24. Kennedy & Kennedy: Dr. KENNEDY oral health premium mouth wipe. Retrieved November 3, 2017, from http://www.drkennedy.kr/front/php/product.php?product_no=222&main_cate_no=25&display_group=1.