

# Antibacterial Effect on *Enterococcus Faecalis* and Physical Properties of Chitosan Added Calcium Hydroxide Canal Filling Material

Sol Song<sup>1</sup>, Yu-Jin Kim<sup>2,3</sup>, Jung-Hwan Lee<sup>2,3,4,5</sup>, Joonhaeng Lee<sup>1</sup>, Jisun Shin<sup>1</sup>, Jongbin Kim<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatric Dentistry, <sup>2</sup>Department of Biomaterials Science, College of Dentistry, Dankook University

<sup>3</sup>Department of Nanobiomedical Science & BK21 PLUS NBM Global Research Center for Regenerative Medicine, Dankook University

<sup>4</sup>Institute of Tissue Regeneration Engineering (ITREN), Dankook University

<sup>5</sup>UCL Eastman-Korea Dental Medicine Innovation Centre, Dankook University

## Abstract

The aim of this study was to evaluate the antibacterial effect on *Enterococcus Faecalis* and physical properties of chitosan added calcium hydroxide canal filling material.

Low, medium, high molecular weights of chitosan powder were mixed with calcium hydroxide canal filling material. Also, for each molecular weight group, 1.0, 2.0, 5.0 wt% of chitosan powder were added. An overnight culture of *E. faecalis* was adjusted to  $1 \times 10^6$  CFU/ml. For test of antibacterial effect, three different molecular weights of 2.0 wt% chitosan and three different concentrations of high molecular weight chitosan were mixed with calcium hydroxide canal filling material. The absorbance of plates was analyzed using spectrophotometer at 570 nm with a reference wavelength of 600 nm. Physical properties such as flow, film thickness and radiopacity were examined according to ISO 6876 : 2012.

All molecular weight type of chitosan containing material showed inhibitory effect against *E. faecalis* growth compared to non-chitosan added calcium hydroxide canal filling material group ( $p < 0.05$ ). High molecular weight chitosan containing material showed the most antibacterial effect. Also, the antibacterial effect decreased as the incorporated amount of chitosan decreased ( $p < 0.05$ ). Every molecular weight group of material containing chitosan had a tendency for reduced flow and radiopacity, increased film thickness according to amount of chitosan. Low molecular weight of 1.0 wt% chitosan addition did not show any significant difference of physical properties compared to conventional calcium hydroxide canal filling material.

In conclusion, for reinforcement of antibacterial effect against *E. faecalis* and for favorable physical properties, 2.0 wt% of chitosan adding is recommended. Considering its antibacterial effect of chitosan, further studies are required for clinical application of chitosan in endodontics and pediatric dentistry.

**Key words :** Antibacterial effect, Calcium hydroxide, Chitosan, Flow, Film thickness, Radiopacity

## I. 서 론

치수 과사 및 비가역적 치수염 상태의 유치의 경우 치수절제

술을 시행하여 계승 영구치의 손상 및 조기 치아 상실을 방지하여야 한다[1]. 치수절제술의 목표는 감염된 근관 내 미생물의 제거 및 차후 발생 가능한 재감염 방지이며[2], 치수절제술의 성공

Corresponding author : Jongbin Kim

Department of Pediatric Dentistry, College of Dentistry, Dankook University, 119 Dandae-ro, Dongnam-gu, Cheonan, 31116, Republic of Korea

Tel: +82-41-550-0223 / Fax: +82-41-550-0118 / E-mail: jbkim0222@dankook.ac.kr

Received December 27, 2020 / Revised January 20, 2021 / Accepted January 20, 2021

은 근관 내 감염원의 제거와 직접적 연관이 있다[1,3]. 근관 내 감염 미생물의 제거는 충분한 기구 조작을 통한 기계적 과사조직 제거, 항균 물질을 이용한 근관 내 세척 및 항균성 근관 충전재의 사용을 통해 이루어진다[4]. 하지만 유치 근관의 해부학적 특징 및 정확한 근관장 측정을 위한 양질의 방사선 사진 채득의 어려움 등의 이유로, 감염된 실활 유치 또는 과사 치수 상태의 유치 치수절제술 시 항균성 근관 충전재의 사용은 중요하다[5].

유치의 근관 충전재로 수산화칼슘과 요오드포름 및 실리콘 오일을 혼합한 시린지 형태의 Vitapex<sup>®</sup>(Neo Dental Chemical Products Co., Ltd., Japan)가 널리 사용되고 있다. Vitapex<sup>®</sup>는 방사선 불투과성이며, 약제의 적용이 용이하고, 흡수성이 있어 유치의 치수 치료에 적합하다[6]. 또한 구성 성분인 수산화칼슘은 우수한 항균 능력이 있으며[7], 요오드포름은 살균 작용이 있어 Vitapex<sup>®</sup>는 항균성 근관 충전재이기도 하다[8,9].

최근 천연 항균성 물질의 개발 및 적용에 대한 관심이 증가하면서, 키토산의 치과 분야에서의 연구가 진행되고 있으며, 생체 재료로 폭넓게 응용되고 있다[10]. 키토산(2-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-glucan)은 갑각류 등의 자연 다당류에서 채취한 키틴(chitin)을 탈아세틸화(deacetylation)하여 얻어진다[11]. 여러 연구를 통해 키토산이 생체 적합성과 생 분해성이 있으며[10,12], 특히 그람 양성, 음성균 및 진균을 포함한 폭넓은 항균성이 있음이 밝혀

졌다[13,14].

*Enterococcus Faecalis*는 그람 양성 세균으로, 근관 내 biofilm을 형성하며, 근관 치료에 저항성이 있어 실패한 근관 치료 시 발견되는 대표적인 세균이다[15]. *E. faecalis*는 도말층과 잔사에 서도 생존할 수 있으며, 특히 유치의 통증 병력, 치근단 방사선 투과성과 유의한 연관이 있다고 밝혀졌다[15,16].

키토산의 항균성을 이용하여 근관 내 약제 및 실러와의 적용에 대한 관심이 높아지고 있지만[12,15], 요오드포름 함유 수산화칼슘 근관 충전재의 적용에 대한 연구는 아직까지 부족한 실정이다.

이 연구는 키토산 첨가 수산화칼슘 근관 충전재의 *E. faecalis*에 대한 항균 효과 및 물리적 성질을 평가하고, 근관 치료 영역에서 키토산의 적용 가능성을 고찰해 보고자 하였다.

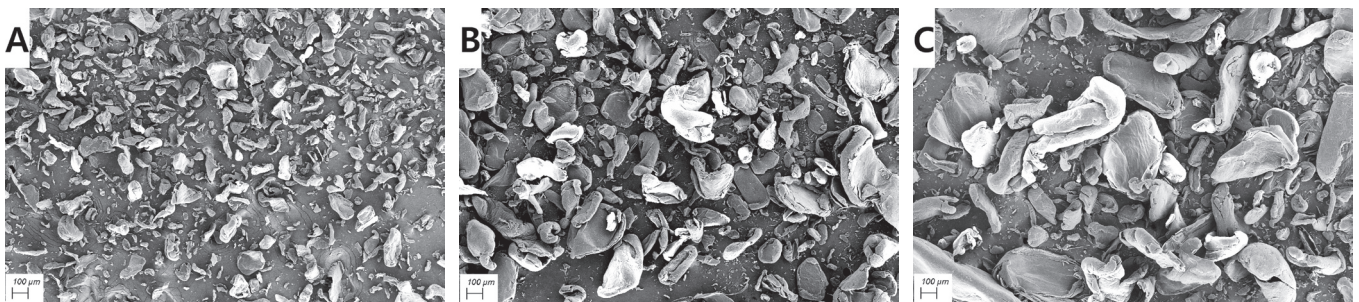
## II. 연구재료 및 방법

### 1. 연구재료

이 연구에서는 고, 중, 저분자량의 3가지 다른 분자량과 서로 다른 농도를 Vitapex<sup>®</sup>와 혼합하여 9개의 실험군을 설정하였다 (Table 1, Fig. 1). 키토산을 첨가하지 않은 Vitapex<sup>®</sup>를 대조군으로

**Table 1.** Materials used in present study

Materials	Composition, details	Manufacturer
Chitosan, Low Molecular Weight	50 - 190 kDa 75 - 85% Deacetylated	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Chitosan, Medium Molecular Weight	190 - 310 kDa 75 - 85% Deacetylated	
Chitosan, High Molecular Weight	310 - 375 kDa > 75% Deacetylated	
Vitapex <sup>®</sup>	Calcium Hydroxide 30.3% Iodoform 40.4% Silicone Oil 22.4% Others 6.9%	Neo Dental, Tokyo, Japan



**Fig. 1.** Scanning electron microscope image of chitosan particles. (A) low molecular weight, (B) medium molecular weight, (C) high molecular weight.

설정하였다(Table 2). 항균 효과 실험 미생물은 *E. faecalis*(ATCC 19433)이며, 배지는 Brain Heart Infusion broth(BHI, Difco, BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA)를 사용하였다.

## 2. 연구방법

### 1) 항균성 평가

#### (1) 세균 배양

*E. faecalis*를 성장이 완전한 현탁액이 얻어질 때 까지 제조사의 지시에 따라 호기성 조건 하 37°C, 24시간 동안 배양기(JSGT-100T, JSR, Gongju, Korea)에서 배양하였다. 배양 미생물은 최종 밀도인  $1 \times 10^6$  CFU/mL이 되도록 broth에 희석하였다.

#### (2) 시료 준비

키토산 분자량 별 항균성 차이를 평가하기 위해, 2.0 wt%의 고, 중, 저분자량 키토산 분말을 총 무게 0.38 g이 되도록 Vitapex®와 혼합하였다. 또한, 첨가 농도 별 항균성 차이를 평가하기 위해 고분자량 키토산 분말 1.0, 2.0, 5.0 wt%를 Vitapex®와 혼합하여 총 무게 0.38 g이 되도록 하였다.

#### (3) 항균성 평가

총량 0.38 g으로 계량되어 있는 대조군과 실험군 시료 50 mL tube에, 배양한 각 5 mL의 세균 용액을 넣고 밀봉한 후, 220 rpm, 37°C 조건 하 shaking incubator(Hanbaek Scientific Co., Bucheon, Korea)에 1시간 배양하였다. 이후, 500 µL의 PrestoBlue™ Cell Viability Reagent(Molecular probes, Eugene, OR, USA)를 각 tube에 첨가 후 2시간 동안 220 rpm, 37°C 조건 하에서 shaking incubator 배양하였다. 배양 후 상기 액체 100 µL

를 채취하여 96 well plate에 옮긴 후, 다기능 측정 마이크로 플레이트 리더(SpectraMax M2, Molecular Devices, CA, USA)를 사용하여 570 및 600 nm에서 흡광도를 판독하여 세균 활성을 계수하였다. 이 때, 기준 흡광도는 600 nm에서 분석한 흡광도로 하여, 항균 정도의 차이는 OD<sub>570</sub>에서 OD<sub>600</sub>을 뺀 것으로 나타났다. 각 군당 3개의 시료로 분석은 독립적으로 6회 시행되었고, 평균과 표준편차를 기록하였다.

#### 2) 물리적 성질

대조군 및 실험군의 유동성(flow), 피막도(film thickness), 방사선 불투과성(radiopacity)은 국제 표준 규격인 ISO 6876 : 2012(Dentistry - Root Canal Sealing Materials)에 제시된 시험 방법에 따라 평가하였다[17]. 모든 측정은  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $50 \pm 5\%$  상대습도 조건에서 시행하였다.

#### (1) 유동성

혼합한 시료 0.05 mL를 40.0 × 40.0 mm, 두께 5.0 mm, 무게 20.0 g의 유리판에 놓고, 3분이 경과한 시점에서 동일한 규격의 다른 유리판을 중앙에 올려놓은 다음 100 g의 추를 포함하여 유리판에 총 120 g의 힘을 가하였다. 혼합 10분 후 유리판에 가한 힘을 제거하고 digital caliper(Mitutoyo, Mitutoyo Corp., Kawasaki, Japan)로 시료의 최대 직경과 최소 직경을 측정하여 평균값을 측정한다. 동일한 방법으로 각 군에서 10번 측정하여 평균값과 표준편차를 구하였다(Fig. 2).

#### (2) 피막도

피막도를 평가하기 위하여 먼저 15.0 × 15.0 mm, 두께 5.0 mm의 유리판 2개를 합체한 두께를 마이크로미터기(Mitutoyo, Mitutoyo Corp., Kawasaki, Japan)로 측정하였다. 혼합한 시료

**Table 2.** Experimental groups

Group	Material	Added Molecular Weight of Chitosan	Added Chitosan Concentration (wt%)	
Control	Vitapex®			
I		High Molecular Weight	I-1	1.0
			I-2	2.0
			I-3	5.0
II	Chitosan Added Calcium Hydroxide Canal Filling Material	Medium Molecular Weight	II-1	1.0
			II-2	2.0
			II-3	5.0
III		Low Molecular Weight	III-1	1.0
			III-2	2.0
			III-3	5.0

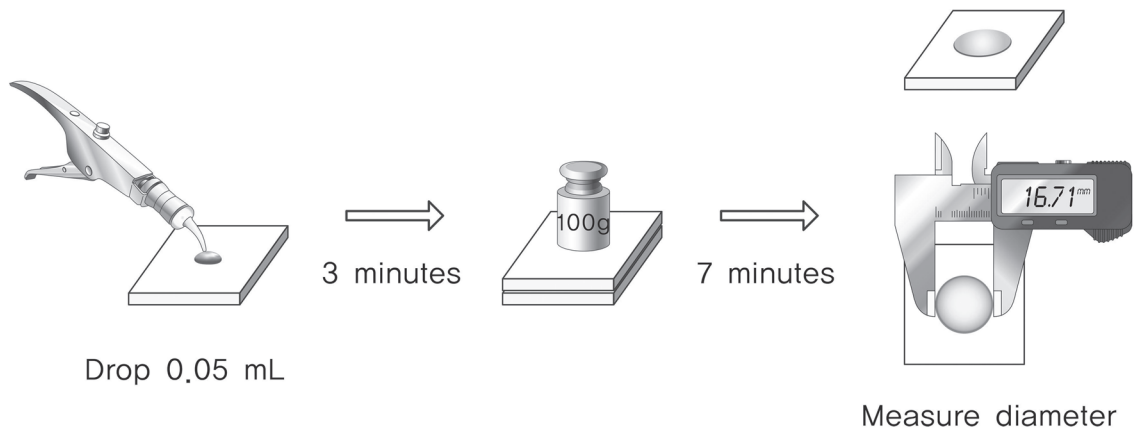


Fig. 2. Schematic figure of flow test.

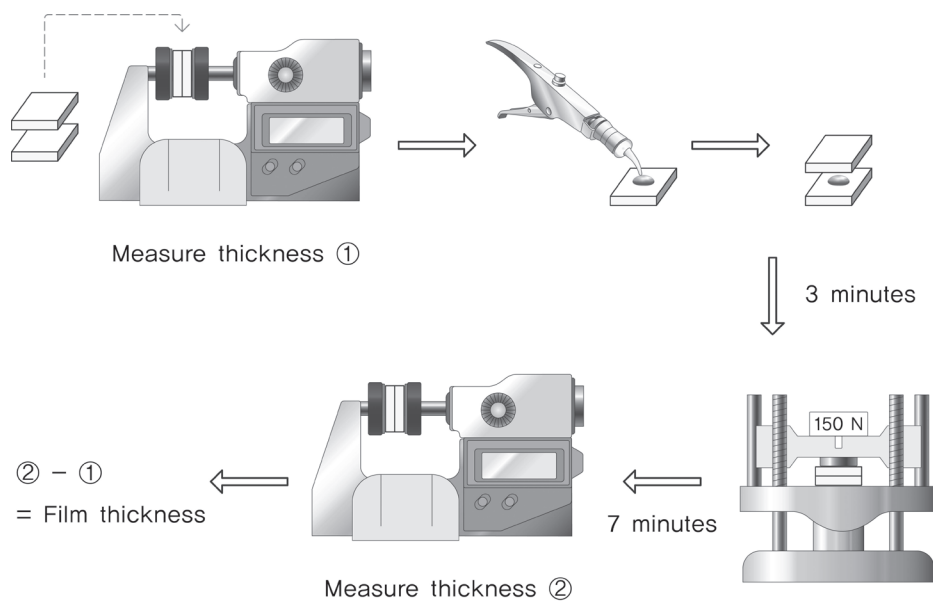


Fig. 3. Schematic figure of film thickness test.

0.01 mL를 유리판의 중앙에 놓고, 두 번째 유리판을 시료의 중앙에 놓은 다음 혼합 후 3분이 경과한 시점에서 150 N의 하중을 유리판에 수직으로 가하였다. 이때 시료가 유리판 사이 면적을 완전히 채우도록 하였으며, 혼합 후 10분이 경과한 시점에서 2개의 유리판과 시료의 두께를 마이크로미터기로 측정하였다. 피막도는 시료가 유리판 사이에 있을 때와 없을 때의 두께 차이로 계산하였고, 시료 당 10회 시험을 실시하여 평균값과 표준편차를 구했다(Fig. 3).

### (3) 방사선 불투과성

내경 10.0mm, 두께 1.0 mm의 원판형 주형을 준비하여 방사선 불투과성 평가에 사용하였다. 시료를 넣은 주형은 디지털

x-ray 센서(Kodak Insight, Rochester, NY, USA)에 1 mm 단위로 1 - 9 mm 눈금이 매겨진 알루미늄 스텝 웨지(step wedge)와 함께 배치하였다. 70 kV, 7 mA, 0.3초 노출시간 및 300 mm 초점 센서 거리에서 작동하는 Kodak-2200 x-ray 기계(Kodak Insight, Rochester, NY, USA)가 방사선 사진 촬영에 사용되었다(Fig. 4). 채득된 디지털 x선 이미지는 회색 단계 분석 프로그램(ImageJ version 1.53a, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)으로 분석하여, 시료의 광학 밀도와 서로 다른 두께의 알루미늄 스텝 웨지의 방사선 불투과성을 비교하였다. 시료 당 10회의 시험을 실시하였고, 시료의 광학 밀도의 알루미늄 두께 상용치(AI mm)로의 환산은 Húngaro Duarte 등[18]의 계산식을 이용하였다.

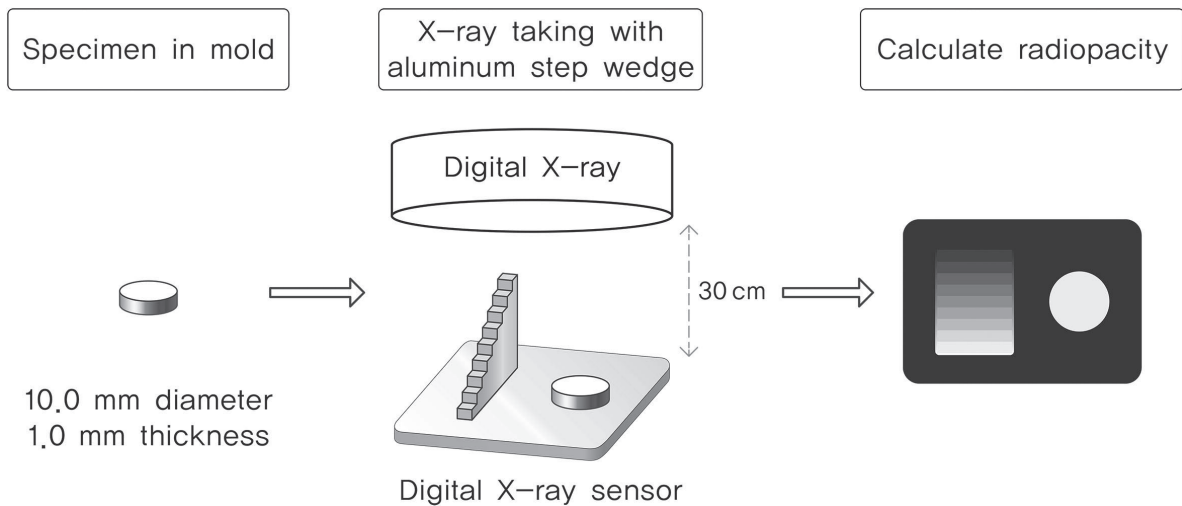


Fig. 4. Schematic figure of radiopacity test.

### 3. 통계 분석

통계 분석은 SPSS 21.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 Kruskal-Wallis test로 변수간 상호 관계를 확인하였으며, Bonferroni's method에 의해 보정된 유의수준을 이용하여 사후 검정으로 Mann-Whitney test를 시행하였다.

## Ⅲ. 연구 성적

### 1. 항균성 평가

같은 농도의 다른 분자량의 키토산을 첨가한 경우, 키토산을 첨가한 모든 실험군에서 대조군에 비해 낮은 흡광도를 보였다(Fig. 5). 2.0 wt%의 고분자량 키토산 함유 Vitapex®군에서 가장 낮은 흡광도를 보였고, 중분자량과 저분자량 키토산 함유 Vitapex®군 간의 유의한 차이가 관찰되지 않았다( $p > 0.05$ ).

같은 분자량의 다른 농도의 키토산을 첨가한 경우, 키토산을 첨가한 모든 실험군에서 대조군에 비해 낮은 흡광도를 보였다(Fig. 6). 고분자량 키토산 첨가 농도가 높을수록 흡광도의 유의한 감소를 보였다( $p < 0.05$ ).

### 2. 물리적 성질

#### 1) 유동성

서로 다른 분자량 및 농도의 키토산 첨가에 따른 유동성 비교 결과, 1.0 wt% 저분자량 키토산 함유 Vitapex®군을 제외한 나머지 8개 실험군에서 대조군과 유의한 차이를 보였다(Fig. 7). 고분

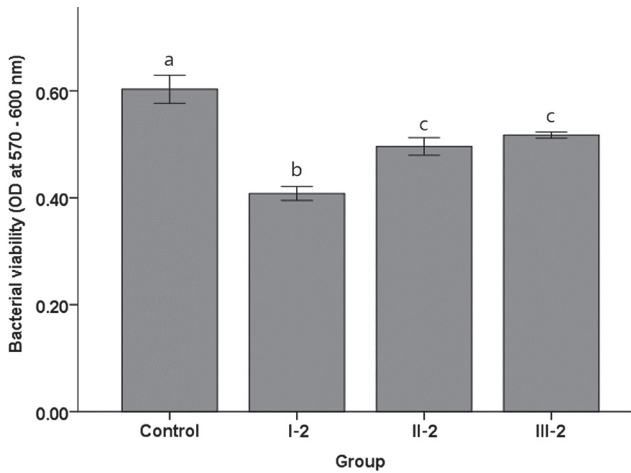
자량 키토산 첨가 군의 경우, 2.0 wt%와 5.0 wt% 첨가 군에서 유의한 차이를 보이지 않았다( $p > 0.05$ ). 중분자량 키토산 첨가 군의 경우, 1.0 wt%와 5.0 wt% 첨가 군에서 유의한 차이를 보였다( $p < 0.05$ ). 저분자량 키토산 첨가 군의 경우, 첨가 농도가 증가할수록 감소된 유동성을 보였다( $p < 0.05$ ).

#### 2) 피막도

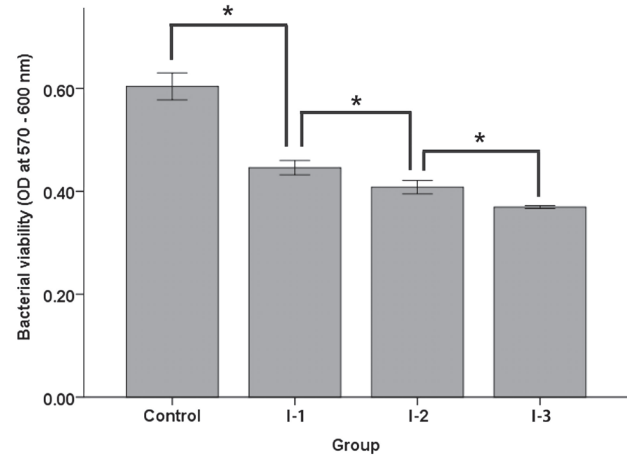
서로 다른 분자량 및 농도의 키토산 첨가에 따른 피막도 비교 결과, 1.0 wt% 저분자량 키토산 함유 Vitapex®군을 제외한 나머지 8개 실험군에서 대조군과 유의한 차이를 보였다(Fig. 8). 1.0 wt% 저분자량 키토산 함유 Vitapex®군을 제외한 나머지 8개 실험군에서 대조군과 유의한 차이를 보였다( $p = 0.00$ ). 고분자량 키토산 첨가 군의 경우, 1.0 wt%와 5.0 wt% 첨가 군에서 유의한 차이를 보였다( $p = 0.00$ ). 중분자량 키토산 첨가 군의 경우, 1.0 wt%와 2.0 wt% 첨가 군 간 피막도의 유의한 차이는 없었으나 5.0 wt% 첨가 군에서 피막도가 증가하였고, 저분자량 키토산 첨가 군의 경우, 첨가 농도가 증가할수록 피막도의 증가를 보였다( $p < 0.05$ ).

#### 3) 방사선 불투과성

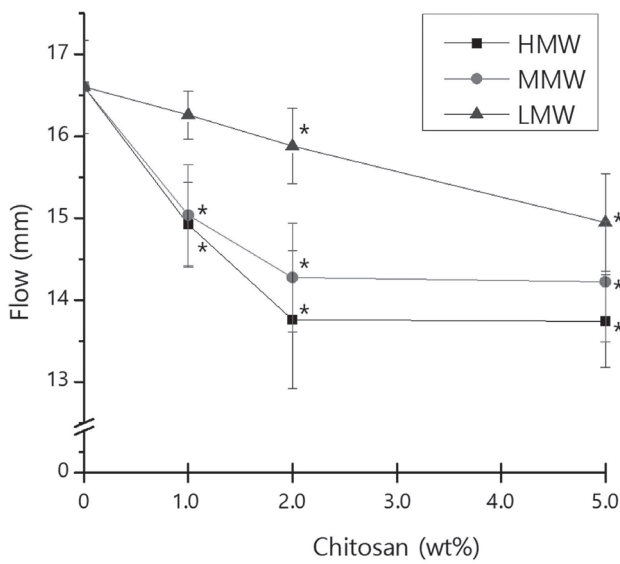
서로 다른 분자량 및 농도의 키토산 첨가에 따른 방사선 불투과성 비교 결과, 모든 실험군에서 같은 분자량 함유 시 첨가 키토산 양이 많아질수록, 감소된 방사선 불투과성을 보였다(Fig. 9). 대조군과 실험군, 알루미늄 스텝 웨지의 방사선 불투과성을 비교할 수 있는 방사선 이미지는 Fig. 10과 같다. 1.0 wt% 저분자량 키토산 함유 Vitapex®군을 제외한 나머지 8개 실험군에서 대조군과 유의한 차이를 보였다( $p = 0.00$ ).



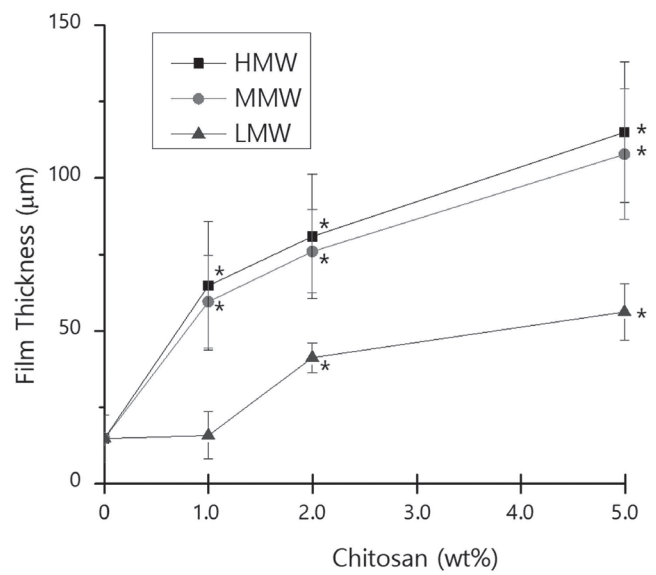
**Fig. 5.** Bacterial viability of different molecular weight of chitosan powder added calcium hydroxide canal filling material. Same letters in the columns indicate non significantly different by the Mann-Whitney test.



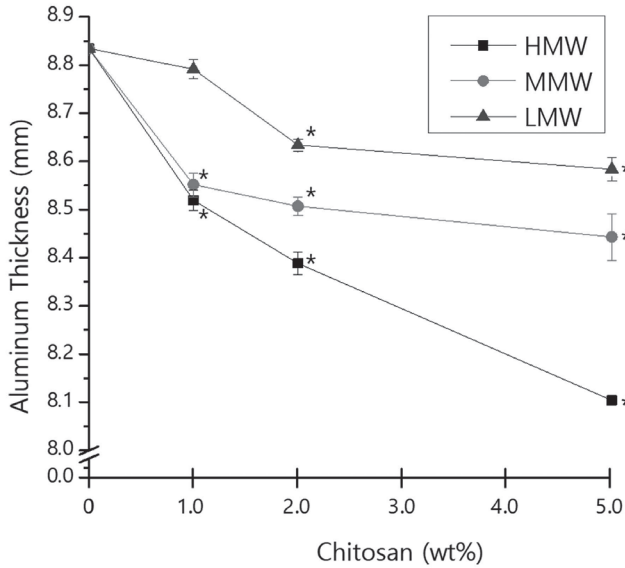
**Fig. 6.** Bacterial viability of different concentration of chitosan powder added calcium hydroxide canal filling material.  $p$  value from Mann-Whitney test ( $p < 0.05$ )



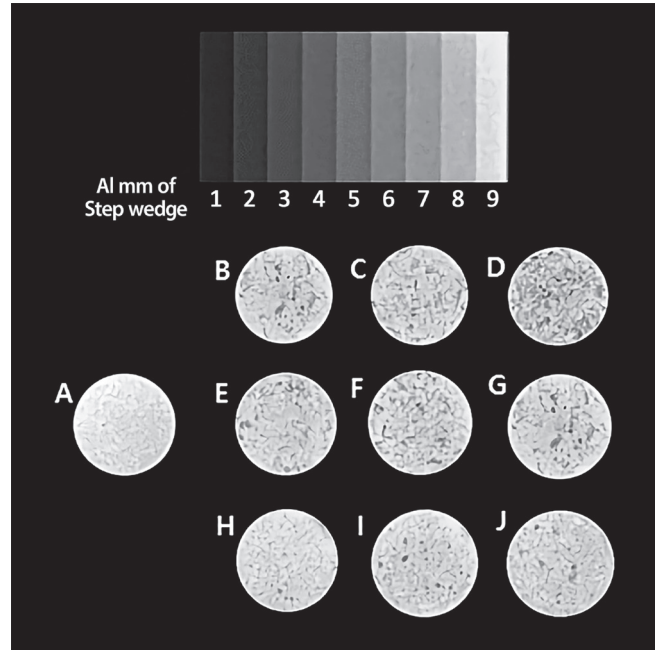
**Fig. 7.** Flow of control, experimental groups.  $p$  value from Mann-Whitney test, asterisk letter describing significant difference with control group. HMW = high molecular weight, MMW = medium molecular weight, LMW = low molecular weight



**Fig. 8.** Film thickness of control, experimental groups.  $p$  value from Mann-Whitney test, asterisk letter describing significant difference with control group. HMW = high molecular weight, MMW = medium molecular weight, LMW = low molecular weight



**Fig. 9.** Radiopacity of control, experimental groups.  $p$  value from Mann-Whitney test, asterisk letter describing significant difference with control group. HMW = high molecular weight, MMW = medium molecular weight, LMW = low molecular weight



**Fig. 10.** Radiographic image of the radiopacities of control, experimental groups and their equivalence to those of the aluminum step wedge. (A) Control Group, (B) Group I-1, (C) Group I-2, (D) Group I-3, (E) Group II-1, (F) Group II-2, (G) Group II-3, (H) Group III-1, (I) Group III-2, (J) Group III-3.

#### IV. 총괄 및 고찰

이 연구는 수산화칼슘 근관 충전재에 다양한 분자량과 농도의 키토산을 첨가하여 *E. faecalis*에 대한 항균성 및 물리적 성질을 평가하여 그 임상적 적용에 대한 가능성을 알아보고자 하였다.

*E. faecalis*는 영양분 공급 없이 상아질 세관 내에 최소 10일 이상 생존할 수 있다[19]. 특히 양성자 펌프 기전 및 높은 pH에서 생존할 수 있어 수산화칼슘 제재에 저항성이 있다[20]. Rôças 등[21]은 한국 환자들 대상으로 한 연구에서 치근단 병소와 연관된 근관 충전된 영구치의 64%에서 *E. faecalis*가 발견된다고 보고하였다. 또한, *E. faecalis* 단일종이 치료하지 않은 유치의 근관 내 세균총과 실패한 치수절제술의 근관 내 세균총 간 유의한 차이를 보이는 세균이다[22].

Vitapex®의 *E. faecalis*에 대한 항균 효과에 관한 연구는 실험 방법에 따라 상반된 연구 결과를 보인다. 한천 배지 확장 시험 (agar diffusion test)에서는 항균 효과를 거의 보이지 않거나 미미한 항균 효과를 보인다고 보고되었지만[2-4], 직접 접촉 시험 (direct contact test)시에는 항균 효과를 보였다[3,15]. 항균 효과

의 유무와는 별도로, Vitapex®는 86 - 100%의 우수한 임상적 성공률을 보이며 사용의 용이성 덕분에 유치의 치수절제술 및 미성숙 영구치의 치근단 형성술에 사용되고 있다[23].

키토산은 천연 다당류로, 항균성, 항진균성, 생분해성 및 생체 적합성을 포함한 다양한 특성을 가지고 있어 조직 공학, 제약, 식품 과학 및 농업 등 다양한 과학 및 산업 분야에서 활용으로 주목을 받고 있다[24]. 치과에서는 근관 치료, 수복 치료, 치주, 보철, 임플란트, 구강외과 및 우식 예방 등에 다양한 적용이 보고되었다[25]. 키토산은 *E. faecalis*에 대한 항균성이 있고[26], *E. faecalis*를 제거하기 위해 비교적 긴 접촉 시간이 필요하기 때문에 근관 치료 약제와 실리의 적용에 유용할 수 있다[12,27].

키토산의 항균 효과는 분자량, 농도 뿐 아니라 탈아세틸화 (deacetylation) 정도, chitin의 출처 등에 의해 결정된다[14]. 키토산의 항균성 기전은 크게 4가지로 나눌 수 있다. 첫 번째로, 양전하를 띤 키토산 분자는 음전하의 세균 표면에 부착하여 세균 막과 상호 작용하여 세포 투과성을 변화시킨다. 두 번째로, 확산된 가수 분해 산물과 미생물 DNA의 상호 작용으로 mRNA 및 단백질 합성을 억제 유도를 한다. 세 번째로, 키토산은 영양소와 필

수 금속의 킬레이트화를 통해 미생물 성장을 억제한다. 마지막으로, 세포 표면에 부착한 키토산은 고분자막을 형성하여 세균의 세포 내 영양소의 출입 방지 및 호기성 세균의 성장을 억제하는 산소 장벽 역할로 작용하게 된다[14,28].

동일 농도의 다른 분자량의 키토산 첨가에 의한 항균 효과를 평가한 이 연구의 결과는 Chen 등[29]과 Kim과 Shin[30]의 연구 결과와 부합한다. 이와 같은 연구 결과는 고분자량 키토산은 세균의 세포막을 통과하지 못해 세포 표면에 적체되어 세균 세포막으로의 영양 이동을 차단하여 세포 용해를 유발하며, 고분자량 키토산에서 해리된 키토산 분자는 세포막과 상호 작용하여 세포 투과성을 변화시키기 때문으로 생각할 수 있다[28].

또한, 동일 분자량 키토산을 혼합 농도의 증가에 따라 항균 효과가 증가한 이 연구의 결과는 Wang 등[10], Kim과 Shin[30], Liu 등[31]의 연구와 결과를 같이한다. Liu 등[31]은 키토산의 항균성 기전은 세균을 응집시켜 죽이는 것으로 설명하였다. 낮은 농도에서는 키토산이 배양 배지에 있는 세균을 충분히 응집시킬 수 없으며, 이에 따라 세포의 재생산을 통해 세균의 증식이 이루어진다고 하였다. 하지만, 이 결과와 상반되는 결과 및 농도에 따라 키토산의 항균성 기전이 다름을 보고한 연구도 있었는데[32], 낮은 농도에서 키토산은 음전하를 띤 세포 표면에 결합하여 세포막을 교란시키고 세포 내 성분의 누출을 유도하여 세포를 사멸시키는 반면 더 높은 농도에서는, 양전하를 띤 키토산이 세포 내 성분의 누출을 방지하며, 세균 세포들은 서로를 밀어내고 응집을 방지한다고 하였다.

근관 충전재는 근관의 다양한 형상을 따라 흘러 들어 미세한 부위를 채울 수 있도록 적절한 유동성을 가져야 한다[7]. 유동성이 너무 낮으면 미세한 부분까지의 충전이 어려우며, 유동성이 너무 높으면 조작성이 저하되며 근침공을 넘어 과잉 충전될 가능성이 있으므로 적절한 유동성을 가져야 한다. 또한, 치근침 또는 치근단의 미세한 부위까지 충전을 위해 피막도는 작을수록 임상 적용에 유리하다. ISO 6876 : 2012에서 근관 충전용 실러는 50  $\mu\text{m}$  이하의 피막도를 가져야 한다고 규정하고 있는데[17], 이 규정에 부합하는 균은 대조군과 저분자량 1.0, 2.0 wt% 키토산을 첨가한 실험군이다. 근관 충전재는 주변 해부학적 구조와 재료의 명확한 구분을 통해 근관 치료 후 밀폐성 확인이 용이할 수 있도록 적절한 방사선 불투과성이 요구된다. 1 mm 두께의 치과용 재료는 알루미늄 3 mm 두께 이상의 방사선 불투과성을 가져야 한다고 ISO 6876 : 2012 규격에서 규정하고 있다[17]. 대조군의 방사선 불투과성 결과는 Segato 등[33]의 결과와 부합하며, 모든 실험군과 대조군에서 ISO 기준에 부합하였다.

모든 요구 사항을 충족하는 근관 충전재는 유치 및 영구치의 근관 치료 후 치료 결과에 대한 좋은 예후를 기대할 수 있다. 이

연구에서는 키토산 첨가에 따라 물리적 성질과 항균성은 상반된 결과가 도출된다. 키토산 첨가에 따라 *E. faecalis*에 대한 증가된 항균성이 보이거나 기존 Vitapex<sup>®</sup>와 비교하여 저하된 물리적 성질을 보인다.

연구 결과를 종합하였을 때, Vitapex<sup>®</sup>에 첨가하여 항균성의 강화와 적절한 물성을 얻기 위해선, 2.0 wt%의 키토산 분말의 첨가가 적절할 것으로 결론 낼 수 있었다. 하지만, 항균성이 높은 물질은 동시에 높은 세포 독성을 보이는 경향이 있다. 이에, 실제 임상에서 키토산을 수산화칼슘 근관 충전재에 적용하기 위해서는 항균성뿐 아니라 세포 독성에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료되었다. 키토산은 *E. faecalis* 뿐만 아니라 다른 세균 및 진균에 광범위한 항균성이 있다는 점을 고려할 때, 근관 세척제, 근관 충전제 및 실러에 대한 연구로 확장하는 것 또한 의미 있는 연구가 될 것으로 생각되었다.

## V. 결 론

이 연구는 수산화칼슘 근관 충전재(Vitapex<sup>®</sup>)에 키토산을 첨가하여 *E. faecalis*에 항균 효과 및 물리적 성질을 평가하였으며, 다음과 같은 결론을 얻었다.

Vitapex<sup>®</sup>에 키토산을 첨가함으로써 *E. faecalis*에 대한 항균성이 증가하였다. 고분자량 키토산 첨가 시 가장 높은 항균성을 보였으며, 첨가 농도가 높을수록 높은 항균성을 보였다. 이에 반하여, 첨가하는 키토산 분자량이 클수록, 농도가 높을수록 키토산을 첨가하지 않은 대조군에 비해 유동성, 피막도, 방사선 불투과성 등 물리적 성질이 저하되었다. 1.0 wt% 저분자량 키토산의 첨가는 대조군과 물리적 성질에서 유의한 차이를 보이지 않았다.

수산화칼슘 근관 충전재(Vitapex<sup>®</sup>)의 키토산 첨가는 *E. faecalis*에 대한 항균성 강화에 효과적이다. Vitapex<sup>®</sup>의 항균성 강화와 적절한 물리적 성질을 얻기 위해 2.0 wt% 키토산의 첨가가 적절하다. 키토산의 항균성을 고려할 때 키토산의 근관 치료 및 소아 치과 분야에서의 적용을 위한 추가적인 연구가 필요할 것이다.

## Authors' Information

Sol Song <https://orcid.org/0000-0001-6978-8324>

Yu-Jin Kim <https://orcid.org/0000-0001-5219-1935>

Jung-Hwan Lee <https://orcid.org/0000-0001-8678-5459>

Joonhaeng Lee <https://orcid.org/0000-0002-3575-5476>

Jisun Shin <https://orcid.org/0000-0003-2147-5163>

Jongbin Kim <https://orcid.org/0000-0001-8744-9553>



## References

1. Cordeiro MM, Rocha MJ : The effects of periradicular inflammation and infection on a primary tooth and permanent successor. *J Clin Pediatr Dent*, 29:193-200, 2005.
2. Reddy S, Ramakrishna Y : Evaluation of antimicrobial efficacy of various root canal filling materials used in primary teeth: a microbiological study. *J Clin Pediatr Dent*, 31:193-198, 2007.
3. Amorim Lde F, Toledo OA, Estrela C, *et al.* : Antimicrobial analysis of different root canal filling pastes used in pediatric dentistry by two experimental methods. *Braz Dent J*, 17:317-322, 2006.
4. Tchaou WS, Turng BF, Minah GE, Coll JA : In vitro inhibition of bacteria from root canals of primary teeth by various dental materials. *Pediatr Dent*, 17:351-355, 1995.
5. Harini Priya M, Bhat SS, Sundeeep Hegde K : Comparative evaluation of bactericidal potential of four root canal filling materials against microflora of infected non-vital primary teeth. *J Clin Pediatr Dent*, 35:23-29, 2010.
6. Nurko C, Garcia-Godoy F : Evaluation of a calcium hydroxide/iodoform paste (Vitapex) in root canal therapy for primary teeth. *J Clin Pediatr Dent*, 23:289-294, 1999.
7. Desai S, Chandler N : Calcium hydroxide-based root canal sealers: a review. *J Endod*, 35:475-480, 2009.
8. Thomas AM, Chandra S, Chandra S, Pandey RK : Elimination of infection in pulpectomized deciduous teeth: a short-term study using iodoform paste. *J Endod*, 20:233-235, 1994.
9. Ding SJ, Kao CT, Huang TH, *et al.* : The physical and cytological properties of white MTA mixed with Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> as an accelerant. *J Endod*, 34:748-751, 2008.
10. Wang N, Ji Y, Wang S, *et al.* : Antibacterial effect of chitosan and its derivative on *Enterococcus faecalis* associated with endodontic infection. *Exp Ther Med*, 19:3805-3813, 2020.
11. Uragami T, Yamamoto S, Miyata T : Dehydration from alcohols by polyion complex cross-linked chitosan composite membranes during evaporation. *Biomacromolecules*, 4: 137-144, 2003.
12. Supotngarmkul A, Panichuttra A, Matangkasombut O, *et al.* : Antibacterial property of chitosan against *E. faecalis* standard strain and clinical isolates. *Dent Mater J*, 39:456-463, 2020.
13. No HK, Park NY, Lee SH, Meyers SP : Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int J Food Microbiol*, 74:65-72, 2002.
14. Goy RC, Britto DD, Assis OB : A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros*, 19:241-247, 2009.
15. Estrela C, Estrela CR, Silva JA, *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.
16. Cogulu D, Uzel A, Oncag O, Eronat C : PCR-based identification of selected pathogens associated with endodontic infections in deciduous and permanent teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 106:443-449, 2008.
17. International Organization for Standardization : ISO 6876:2012 Dentistry - Root canal sealing materials. Available from URL: <https://www.iso.org/standard/45117.html> (Accessed on July 21, 2020).
18. Húngaro Duarte MA, de Oliveira El Kadre GD, de Moraes IG, *et al.* : Radiopacity of portland cement associated with different radiopacifying agents. *J Endod*, 35:737-740, 2009.
19. Siqueira JF Jr : Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J*, 34:1-10, 2001.
20. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D : Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J*, 35:221-228, 2002.
21. Rôças IN, Jung IY, Lee CY, Siqueira JF Jr : Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in a South Korean population. *J Endod*, 30: 504-508, 2004.
22. Punathil S, Bhat SS, Bhat SV, Hegde SK : Microbiological analysis of root canal flora of failed pulpectomy in primary teeth. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 3:241-246, 2014.
23. Mortazavi M, Mesbahi M : Comparison of zinc oxide and eugenol, and Vitapex for root canal treatment of necrotic primary teeth. *Int J Paediatr Dent*, 14:417-424, 2004.
24. Li Q, Dunn ET, Grandmason EW, Goosen MFA : In Applications and properties of chitosan. *J Bioact Compat Polym*, 7: 370-397, 1992.
25. Kmiec M, Pighinelli L, Reis V, *et al.* : Chitosan-properties and applications in dentistry. *J Adv Tissue Eng Regen Med*, 2:35-41, 2017.
26. Shenoi PR, Morey ES, Wanmali SS, *et al.* : In vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of chitosan and other endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis*. *Gen Dent*, 64:60-63, 2016.
27. Shrestha A, Shi Z, Neoh KG, Kishen A : Nanoparticulates for antibiofilm treatment and effect of aging on its antibacte-

- rial activity. *J Endod*, 36:1030-1035, 2010.
28. Hosseinejad M, Jafari SM : Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. *Int J Biol Macromol*, 85:467-475, 2016.
  29. Chen YM, Chung YC, Li SY, *et al.* : Antibacterial properties of chitosan in waterborne pathogen. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 37:1379-1390, 2002.
  30. Kim JS, Shin DH : Inhibitory effect on Streptococcus mutants and mechanical properties of the chitosan containing composite resin. *Restor Dent Endod*, 38:36-42, 2013.
  31. Liu N, Chen XG, Yu LJ, *et al.* : Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of Escherichia coli. *J Carbohydr Polym*, 64:60-65, 2006.
  32. Lim SH, Hudson SM : Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group. *Carbohydr Res*, 339:313-319, 2004.
  33. Segato RA, Pucinelli CM, Silva LA, *et al.* : Physicochemical Properties of Root Canal Filling Materials for Primary Teeth. *Braz Dent J*, 27:196-201, 2016.

국문초록

## 키토산 첨가 수산화칼슘 근관 충전재의 *Enterococcus Faecalis*에 대한 항균 효과 및 물리적 성질

송슬<sup>1</sup> · 김유진<sup>2,3</sup> · 이정환<sup>2,3,4,5</sup> · 이준행<sup>1</sup> · 신지선<sup>1</sup> · 김종빈<sup>1</sup>

단국대학교 치과대학<sup>1</sup> 소아치과학교실, <sup>2</sup> 생체재료학교실

<sup>3</sup> 단국대학교 나노바이오효학과 BK21 plus 재생의학 글로벌리서치센터

<sup>4</sup> 단국대학교 조직재생공학연구소

<sup>5</sup> 단국대학교 UCL 이스트만-코리아 덴탈메디슨 혁신센터

이 연구의 목적은 키토산 첨가 수산화칼슘 근관 충전재의 *Enterococcus Faecalis*에 대한 항균 효과 및 물리적 성질을 알아보는 것이다. 저, 중, 고분자량의 키토산 분말을 수산화칼슘 근관 충전재와 혼합하였고, 각 분자량 별로 키토산 분말을 1.0, 2.0, 5.0 wt%로 첨가하였다. *E. faecalis*를 배양하여  $1 \times 10^6$  CFU/ml로 조정하였다. 항균 효과 실험을 위해 2.0 wt% 키토산의 3가지 다른 분자량, 3가지 다른 농도의 고분자량 키토산을 수산화칼슘 근관 충전재와 혼합하였다. 기준 파장 600 nm인 570 nm에서 분광광도계를 이용하여 상층액의 흡광도를 측정하였다. 유동성, 피막도 및 방사선 불투과성은 ISO 6876 : 2012에 의거하여 측정하였다.

키토산을 포함하는 모든 분자량 유형의 실험군은 키토산을 첨가하지 않은 대조군에 비해 *E. faecalis* 성장 억제 효과를 보였다. 고분자량 키토산 첨가 군에서 가장 좋은 항균 효과를 보였다( $p < 0.05$ ). 또한 키토산 첨가량이 감소할수록 항균 효과도 감소하였다( $p < 0.05$ ). 키토산을 함유하는 수산화칼슘 근관 충전재의 모든 분자량 군은 키토산 함량의 증가 따라 유동성 및 방사선 불투과성이 감소하고 피막도가 증가하는 경향을 보였다. 1.0 wt% 저분자량 키토산의 첨가는 기존 수산화칼슘 근관 충전재와 비교하여 물성에 큰 차이를 보이지 않았다.

연구 결과를 종합하였을 때, 수산화칼슘 근관 충전재에 첨가하여 항균성 강화와 적절한 물성을 얻기 위해선 2.0 wt%의 키토산 분말의 첨가가 적절하다. 키토산의 항균 효과를 고려할 때, 키토산의 근관 치료 및 소아치과 분야에서의 적용을 위한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료되었다.