

# The Safety of Low Concentration Hypochlorous Acid as an Oral Gargle Solution and Its Anti-Microbial Effects

Beom Joon Kim, Young Hyo Kim and Tae Young Jang

Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Inha University College of Medicine, Incheon, Korea

구강 세척액으로서의 저농도 차아염소산의 안전성 및 구강내 세균에 대한 항균효과

김범준 · 김영효 · 장태영

인하대학교 의학전문대학원 이비인후-두경부외과학교실

Received March 15, 2011

Revised May 19, 2011

Accepted May 19, 2011

Address for correspondence

Tae Young Jang, MD, PhD  
Department of Otorhinolaryngology-  
Head and Neck Surgery,  
Inha University College of Medicine,  
7-206 Sinheung-dong 3-ga, Jung-gu,  
Incheon 400-711, Korea  
Tel +82-32-890-3471  
Fax +82-32-890-3580  
E-mail jangty@inha.ac.kr

**Background and Objectives** The authors aimed to evaluate the safety of low concentration hypochlorous acid as an oral gargle solution. To do this, we carried out *in vitro* and *in vivo* experiments and evaluated its efficacy by compared with normal saline and chlorhexidine gargle using throat culture before and after gargling.

**Materials and Method** The authors treated oral mucosal epithelial cell with 3.5 ppm hypochlorous acid and evaluated cytotoxicity. For evaluation of morphological change, oral mucosa specimens were obtained during surgery before 30 minutes and 2 hours after treatment with hypochlorous acid. The specimens were evaluated with light microscopy. For evaluation of efficacy, we performed oral gargle with normal saline, chlorhexidine and hypochlorous acid in 10 healthy volunteers. The throat cultures were performed before and after each gargling. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus oryzae* were evaluated semi-quantitatively (Grade 0 to 4).

**Results** There was no cellular toxicity in MTT assay and the morphological changes were not observed. Both chlorhexidine and hypochlorous acid showed significant decrease of microbes (chlorhexidine:  $p=0.036$ , hypochlorous acid:  $p=0.031$ ). There was no significant differences between them ( $p=0.217$ ).

**Conclusion** Low concentration hypochlorous acid is safe for the oral mucosal epithelium and has antimicrobial efficacy similar to that of chlorhexidine.

Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2011;54:403-7

**Key Words** Hypochlorous acid · Anti-infective agents · Mouth mucosa.

## 서 론

급성여포성편도염(acute follicular tonsillitis, AFT)을 포함한 각종 구인두감염은 다양한 구강내 세균 감염에 의해 발병하게 된다. 일차적으로 경구 혹은 비경구적 항생제 및 비스테로이드성 항염증약물(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) 등의 내과적 치료를 시행하게 되며, 이외에도 편도와(tonsillar crypts)의 세척 효과를 통한 증상 경감을 위해 구강세척(oral gargle)을 시행하게 된다.

차아염소산(hypochlorous acid, HOCl)은 체내에서 활성화된 호중구 내에서 골수세포형과산화효소(myeloperoxidase, MPO)에 의해 생성되며, 각종 세균에 대해 항균효과를 가진다.<sup>1)</sup> Gould 등<sup>2)</sup>의 연구에 따르면, 차아염소산은 *in vitro* 실험에서 100  $\mu$ M 이상의 농도에서는 세포독성을 가지나, 그 이하의 농도에서는 유의한 세포독성을 가지지 않는다. 또한 Kim, Yu 등<sup>3,4)</sup>의 연구자들도 비강상피세포(nasal epithelial cell)에 저농도의 차아염소산 처리 후 2시간 이후까지도 유의한 독성을 보이지 않는다고 보고하였다. 이러한 차아염소산을

비강세척에 이용하여 항균효과, 항진균효과 및 항바이러스효과를 얻었다고 하는 연구 결과들이 있으나,<sup>3,4)</sup> 아직까지 구강내 상피세포에 대한 차아염소산의 세포독성에 대한 연구 및 구강내 감염에 대한 차아염소산의 치료효과에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 구강상피세포에 대한 차아염소산 처리 후 세포독성을 *in vitro* 실험 및 현미경적 관찰을 통하여 평가하고, 정상 자원자에서 생리식염수, 클로르헥시딘액, 차아염소산 등 다양한 구강 세척액을 이용한 구강세척 전후 항균효과를 세균배양 결과를 비교함으로써 평가하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 저농도의 차아염소산(HOCl) 용액 제조

저농도의 차아염소산 용액은 이전의 연구들을 참조하여 제조하였으며,<sup>3)</sup> salicid 기기(Dolki, Ltd., Seoul, Korea) 및 315 mg의 NaCl가 들어 있는 salicid packet을 사용하였다. Salicid 기기 내에 salicid packet 1개를 넣고 pH 7.0의 증류수 35 mL를 넣은 후 작동시키는 것으로서, 제조 직후 약 3.5 ppm의 농도를 가지는 차아염소산 용액을 제조할 수 있었다. 용액의 오스몰 농도(osmolality)는 약 3.54 Osm/L이었다.

### 세포 배양(Cell culture) 및 세포 독성 평가(Cytotoxicity assay)

YD-10B 세포주(oral tongue, squamous cell carcinoma,  $1 \times 10^5$  cells/culture)를 배양하여 실험에 사용하였으며, 세포 배양법은 이전 연구들의 방법을 참조하였다.<sup>3)</sup> 세포 독성 평가는 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) assay를 이용하였다. 96-well plate 각각의 well 내에 100  $\mu$ L 배양액 속에  $9.6 \times 10^3$  cells의 밀도가 되도록 세포를 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 24시간 동안 두었다. 3.5 ppm의 차아염소산 용액 2  $\mu$ L를 각각의 well에 넣고 24시간 동안 다시 배양하였다. 차아염소산을 포함한 배양액을 30분과 2시간 이후 각각 제거하고 이후 10  $\mu$ L의 MTT 용액을 각각의 well에 넣고 37°C에서 4시간 동안 두었다. 그 후 배양액을 제거하고 각각의 well에 200  $\mu$ L의 dimethyl sulfoxide를 첨가하여 세포용해(cell lysis)를 유도하였다. 흡광도(OD) 측정을 위해 ELISA plate reader를 사용하였고 test wavelength는 570 nm, reference wavelength는 630 nm로 설정하였다.

### 형태학적 변화 관찰

차아염소산 노출 후 구강내 상피세포의 형태학적 변화를

살펴보기 위하여, 구강내 감염 등의 증거가 전혀 없이 구개수 인두피판술(uvulopalatal flap)을 시행받은 환자를 대상으로 구강내 조직을 채취하였다. 수술 시작 전, 전신마취를 위한 기도삽관이 이루어지고 흡인을 방지하기 위해 기도삽관튜브의 ballooning이 충분히 이루어져 있는 상태에서, 수술을 위해 제거되어야 할 부위에 표시를 하고 표시선 안쪽의 구강점막 조직을 일부 절제하였다. 이후 구강 견인기로 입을 벌린 상태에서 5분간 차아염소산으로 구강 세척을 시행하였다. 차아염소산 용액을 모두 흡입하여 제거한 후, 수술 진행 도중 30분 이후와 2시간 이후에 표시선 안쪽에서 각각 조직을 다시 일부 절제하였다. 조직은 10% formalin을 이용하여 고정하였으며 이후 paraffin에 담근 후 슬라이드를 제작하여 hematoxylin-eosin 염색을 시행하여 광학현미경으로 관찰하였다. 환자는 연구의 필요성 및 진행 과정에 대해 충분한 설명을 듣고 자의로 동의하였으며, 본 연구는 인하대학교 임상시험윤리위원회(Institutional Review Board)의 승인을 받은 후 진행되었다.

### 구강내 정상 세균총에 대한 항균효과(Anti-microbial effect)

10명의 무증상 건강 자원자를 대상으로, 동량의 1) 생리식염수, 2) 글루콘산클로르헥시딘 가글액(Hexamedin<sup>®</sup>, Bukwang Pharm., Seoul, Korea) 그리고 3) 차아염소산 용액을 이용하여 구강 세척을 시행하기 전과 구강세척 시행 10분 후 각각 면봉 도말법을 이용하여 세균 배양을 시행하였다. 각각의 용액은 같은 양을 사용하였으며 구강 세척 후 다음 용액을 이용하여 세척하기까지 적어도 1주일 이상의 휴지기를 두어 이전 세척 용액에 의한 효과가 완전히 배제될 수 있도록 하였다. 멸균된 면봉을 이용하여 양측 편도 주위의 전구개궁 부위에서 도말한 이후 곧바로 면봉을 배지에 접촉하여 진단 검사의학과로 의뢰하였으며, 대상균은 *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus oryzae* 등 7종류의 세균을 분석하였다. 배지에서 자라는 세균의 밀도에 따라 Grade 0(no growth), Grade 1(few), Grade 2(a few), Grade 3(some), Grade 4(many) 등으로 분류하였다.

### 통계분석(Statistical analysis)

통계분석을 위하여 SPSS 12.0(Statistical Package for the Social Sciences, Version 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 프로그램을 사용하였으며, 통계기법으로 Student's t-test 및 Fisher's exact test를 사용하였다. 모든 결과는(평균±표준편

차)와 같이 표기하였으며  $p$ -value 0.05 미만을 통계적 유의성의 기준으로 삼았다.

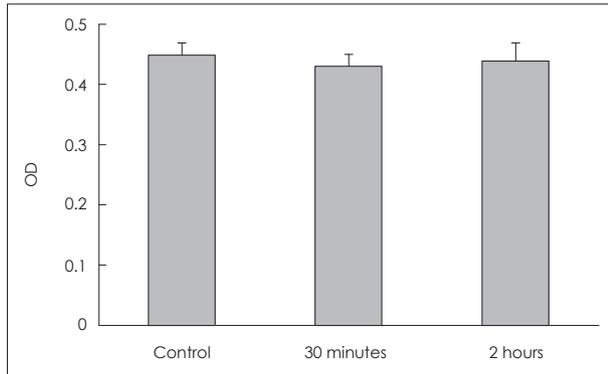
## 결 과

### 차아염소산 처리 후 세포독성 및 형태학적 변화

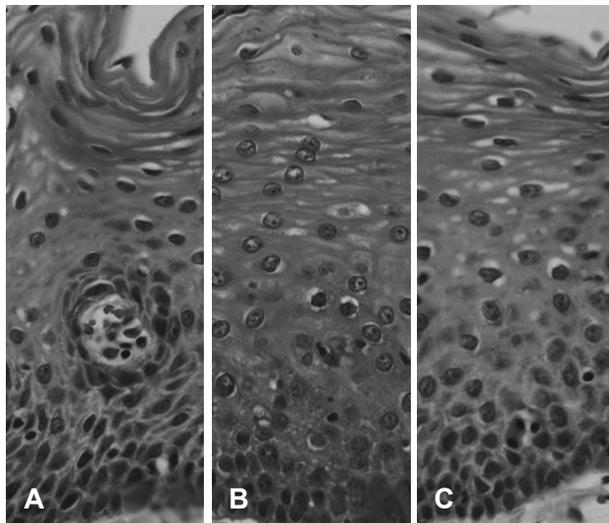
세포독성시험(cytotoxicity assay) 결과, 차아염소산 처리 후 2시간 이후까지도 유의한 세포수의 감소를 보이지 않았다(Fig. 1). 또한 광학현미경으로 수술 중 차아염소산 처리 전과 30분 후, 2시간 후 각각 얻은 구강내 상피세포를 관찰하였을 때, 2시간 후까지도 형태학적인 변화의 증거 없이 상피세포층이 잘 유지되고 있는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

### 차아염소산 처리 후 구강내 정상 세균총의 항균효과

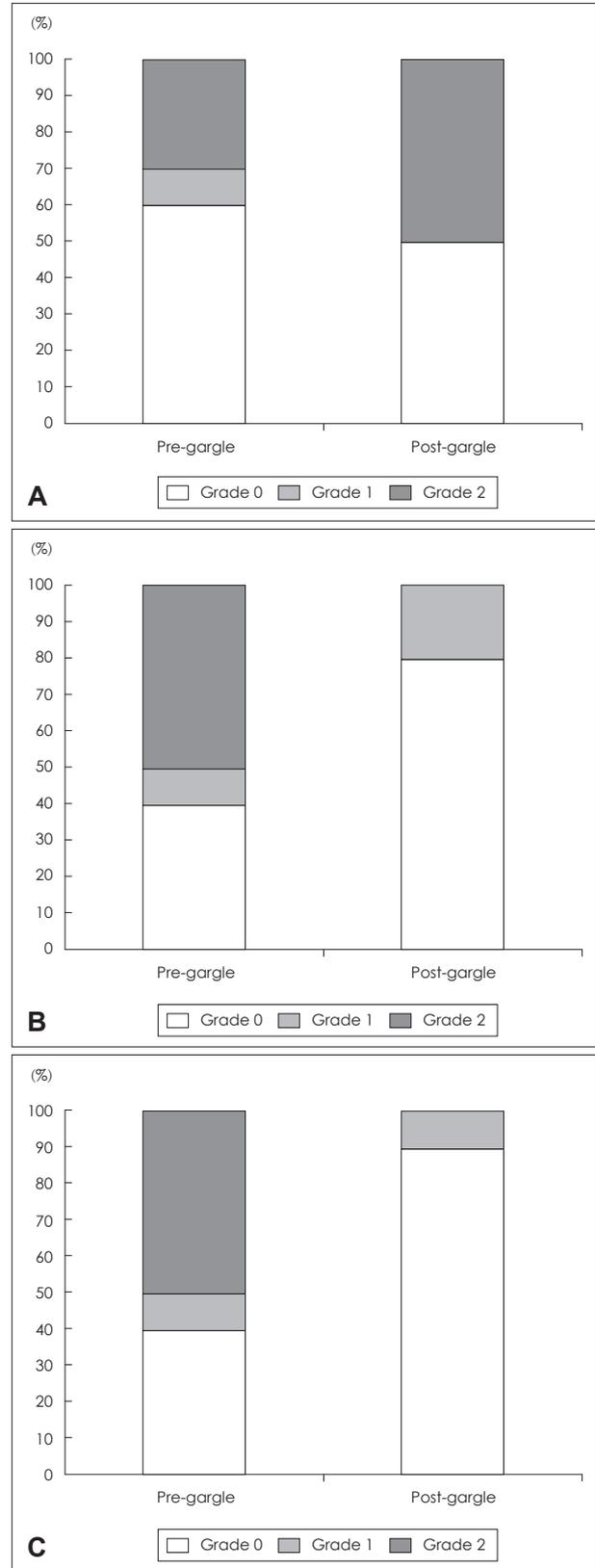
생리식염수 구강세척 전후 구강내 세균총의 수는 유의한 감



**Fig. 1.** Measurement of Optical Density (OD) by 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay before, 30 minutes after, and 2 hours after low concentration hypochlorous acid treatment to oral tongue squamous cell carcinoma cell line. Error bar represents standard deviation.  $p > 0.05$ , Student's t-test.



**Fig. 2.** Evaluation of morphological change to human oral mucosal epithelium (A) before, (B) 30 minutes after, and (C) 2 hours after treatment with hypochlorous acid ( $\times 400$ , H&E stain).



**Fig. 3.** Result of throat culture after (A) normal saline gargle, (B) chlorhexidine gargle and (C) hypochlorous acid gargle. Grade 0: no growth, Grade 1: few growth, Grade 2: a few growth, Fisher's exact test.

소를 보이지 않았으나( $p=0.574$ )(Fig. 3A), 클로르헥시딘 가글액 및 차아염소산 구강세척 후에는 세척 전에 비해 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다(클로르헥시딘:  $p=0.036$ , 차아염소산:  $p=0.031$ )(Fig. 3B and C). 클로르헥시딘 가글액 후 2명과 차아염소산 구강세척 후 1명에서 각각 Grade 1의  $\beta$ -hemolytic streptococci가 검출되었으며 통계적으로 의미 있는 차이는 없었다(Fisher's exact test,  $p=0.217$ ).

## 고 찰

차아염소산은 강한 항균효과를 가지고 있어 이전부터 세제 및 표백제 등으로 사용되어 왔다.<sup>5,6)</sup> 차아염소산은 골수세포형과산화효소에 의해 생성되어 독성 및 산화작용을 하게 되며 항균작용을 하게 된다.<sup>1,7,8)</sup> 본 연구에서 세포독성 평가 및 광학현미경을 통한 형태학적 평가를 통하여 이전에 밝혀진 비강점막세포에 대한 안전성뿐 아니라 처음으로 구강상피세포에 대하여도 안전성을 확보할 수 있음을 *in vitro* 및 *in vivo* 연구를 통하여 확인할 수 있었다. 구강점막은 중층각화상피(stratified squamous epithelium)로 이루어져 있고 두꺼운 각화층에 의해 보호받고 있으므로 비강점막세포에 비해 보다 세포독성 등에 강할 것으로 예상되며, 따라서 구강 세척액의 독성에도 보다 안전성이 높을 것으로 생각된다. 추후 전자현미경 연구 등을 추가함으로써 이러한 안전성에 대한 평가를 좀 더 확실히 할 수 있을 것으로 기대된다.

클로르헥시딘 구강세척은 집중치료실 치료를 받고 있는 구강위생이 불량한 환자들에서 병원내 감염(nosocomial infection)을 감소시키는 효과가 있는 것으로 알려져 있다.<sup>9)</sup> 클로르헥시딘 및 benzydamine 용액은 또한 구강세척액으로써 사용하였을 때 두경부암 환자에서의 방사선 조사후 점막염(irradiation mucositis)을 감소시키며, 항암치료 이후 유발된 구인두 점막염에도 효과가 있는 것으로 알려졌다.<sup>10,11)</sup> 또한 급성 구인두염증에도 구강세척액이 효과가 있다는 연구 결과도 있으며,<sup>12)</sup> 따라서 구강 세척액은 보다 다양한 임상적 기능을 가지고 있다. 본 연구 결과 정상 자원자의 구강내 세균총에 대해 차아염소산 구강세척액은 클로르헥시딘과 동등한 수준의 항균효과를 가지는 것을 알 수 있었다. 따라서 구강내 감염증에 대해서 효과적인 구강 세척액으로서의 기능을 할 수 있을 것으로 기대된다. *In vitro* 실험에서 항균효과 및 항바이러스 효과를 평가한 연구는 있었으나,<sup>3,4)</sup> 실제 인체내 *in vivo* 연구에서 이러한 항균효과를 실제로 평가한 것은 본 연구가 첫 번째 연구이다.

본 연구에서는 항균효과를 평가하기 위해 인후배양(throat culture) 방법을 사용하였다. 인후배양법은 전통적으로 급성

편도염의 원인균을 규명하고 확진할 수 있는 검사법으로서 A군 연쇄상구균에 대하여 90~97%의 민감도 및 90% 이상의 특이도를 가지는 것으로 알려져 있다.<sup>13)</sup> 그러나 본 연구에서는 건강자원자를 참여시켰기 때문에 구강 세척 전에도 인후배양 결과 양성률이 다소 낮았다. 또한 구강내 혼재하는 수십 종류의 세균 중 7가지 대표적인 균주만 선정하여 결과를 분석하였기 때문에, 실제로 연구에 포함되지 않은 균주 중 다른 세균이 검출되었을 수 있다는 가능성을 배제할 수 없다. 그러나 연구대상에 포함된 균주들은 구인두 감염을 주로 일으키는 주된 원인균이므로 본 연구 결과에 의미가 있다고 할 수 있으며, 추후 급성 여포성 편도염 환자 등을 대상으로 추가적인 연구를 수행할 때 편도 삼출물 등에 대하여 인후배양 검사를 진행한다면 보다 높은 양성률 및 보다 의미 있는 결과를 기대할 수 있을 것이다.

본 연구는 동일한 10명의 피험자에서 각각의 용액에 대해 번갈아 구강 세척을 시행하고 전후 인후배양을 시행하여 결과를 비교 분석하였기 때문에 피험자간 변이(inter-individual variation) 등의 혼란변수를 배제할 수 있으므로 통계적 가치가 매우 높다고 할 수 있다. 다만 10명이라는 적은 피험자 수가 본 연구의 약점이다. 그러나 연구 진행시 아직 세포독성 및 인체 안전성에 대한 검증이 완전히 이루어지지 않은 상태에서 대규모의 피험 인원을 포함하여 연구를 진행하는 것은 비윤리적이라고 저자들은 판단하였기 때문에, 대조군과의 통계적 유의성을 규명할 수 있는 최소한의 참여 인원만을 선정하였다. 본 연구를 통하여 구강 세척액으로서의 저농도 차아염소산의 안전성을 입증하였으므로, 추후 클로르헥시딘과 차아염소산 구강세척액의 항균효과가 의미 있는 차이가 있는지 밝히기 위하여 보다 많은 수의 자원자를 모집하는 것이 필요하다고 생각된다.

또한 추후 연구를 통하여 클로르헥시딘 용액과 동등한 정도 혹은 그보다 우수한 수준의 항균효과를 입증할 수 있다면, 클로르헥시딘과 같이 집중치료실 환자의 구강위생 향상을 통한 병원내 감염의 예방, 급성 인두염증의 치료 등 저농도 차아염소산의 임상적 적응증을 보다 확대시킬 수 있을 것으로 기대된다. 또한 salicyd 기기 구입시 반영구적으로 사용이 가능하므로, 장기적으로 구강 세척을 시행하여야 하는 환자군에서는 의료비 절감의 효과 또한 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

## Acknowledgments

This study was supported by Inha University Research grants.

## REFERENCES

- 1) Albrich JM, McCarthy CA, Hurst JK. Biological reactivity of hypochlorous acid: implications for microbicidal mechanisms of leukocyte myeloperoxidase. Proc Natl Acad Sci U S A 1981;78(1):210-4.

- 2) Gould NS, Gauthier S, Kariya CT, Min E, Huang J, Brian DJ. Hypertonic saline increases lung epithelial lining fluid glutathione and thiocyanate: two protective CFTR-dependent thiols against oxidative injury. *Respir Res* 2010;11:119.
- 3) Kim HJ, Lee JG, Kang JW, Cho HJ, Kim HS, Byeon HK, et al. Effects of a low concentration hypochlorous Acid nasal irrigation solution on bacteria, fungi, and virus. *Laryngoscope* 2008;118(10):1862-7.
- 4) Yu M, Park H, Kwon H, Jang Y. The effect of a low concentration of hypochlorous acid on rhinovirus infection of nasal epithelial cells. *Am J Rhinol Allergy*. 2010 Dec 17. [Epub ahead of print]
- 5) Bruch MK. Toxicity and safety of topical sodium hypochlorite. *Contrib Nephrol* 2007;154:24-38.
- 6) Landa-Solis C, González-Espinosa D, Guzmán-Soriano B, Snyder M, Reyes-Terán G, Torres K, et al. Microcyn: a novel super-oxidized water with neutral pH and disinfectant activity. *J Hosp Infect* 2005; 61(4):291-9.
- 7) Lapenna D, Cuccurullo F. Hypochlorous acid and its pharmacological antagonism: an update picture. *Gen Pharmacol* 1996;27(7):1145-7.
- 8) Wang L, Bassiri M, Najafi R, Najafi K, Yang J, Khosrovi B, et al. Hypochlorous acid as a potential wound care agent: part I. Stabilized hypochlorous acid: a component of the inorganic armamentarium of innate immunity. *J Burns Wounds* 2007;6:e5.
- 9) Cabov T, Macan D, Husedzinović I, Skrlin-Subić J, Bosnjak D, Sestan-Crnek S, et al. The impact of oral health and 0.2% chlorhexidine oral gel on the prevalence of nosocomial infections in surgical intensive-care patients: a randomized placebo-controlled study. *Wien Klin Wochenschr* 2010;122(13-14):397-404.
- 10) Kin-Fong Cheng K, Ka Tsui Yuen J. A pilot study of chlorhexidine and benzydamine oral rinses for the prevention and treatment of irradiation mucositis in patients with head and neck cancer. *Cancer Nurs* 2006;29(5):423-30.
- 11) Cheng KK. Children's acceptance and tolerance of chlorhexidine and benzydamine oral rinses in the treatment of chemotherapy-induced oropharyngeal mucositis. *Eur J Oncol Nurs* 2004;8(4):341-9.
- 12) Passàli D, Volonté M, Passàli GC, Damiani V, Bellussi L; MIS-TRAL Italian Study Group. Efficacy and safety of ketoprofen lysine salt mouthwash versus benzydamine hydrochloride mouthwash in acute pharyngeal inflammation: a randomized, single-blind study. *Clin Ther* 2001;23(9):1508-18.
- 13) Schwartz RH, Wientzen R Jr, Pedreira F, Feroli EJ, Mella GW, Guandolo VL. Penicillin V for group A streptococcal pharyngotonsillitis. A randomized trial of seven vs ten days' therapy. *JAMA* 1981; 246(16):1790-5.