

Streptococcus Mutans Biofilm Inhibition Effect of Indocyanine Green and Near Infrared Diode Laser

Yeowon Kim¹, Howon Park¹, Juhyun Lee¹, Hyunwoo Seo¹, Siyoung Lee²

¹Department of Pediatric Dentistry, Oral Science Research Center, College of Dentistry, Gangneung-Wonju National University

²Department of Microbiology and Immunology, College of Dentistry, Gangneung-Wonju National University

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the effect of Indocyanine Green (ICG) and near-infrared (NIR) diode laser on *Streptococcus mutans* biofilms depending on ICG concentrations.

S. mutans biofilms were formed on a Hydroxyapatite disk, and 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg/mL ICG solutions dissolved in sterile distilled water and a NIR diode laser having a power of 300 mW and a wavelength of 808 nm were applied to the biofilms. The temperature changes of the biofilm surface according to the concentrations of the ICG solution were measured using a 1-channel thermocouple thermometer.

Compared to the control group, in the groups with only the 3.0, 4.0, 5.0 mg/mL ICG solution application, and in the groups with the 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg/mL ICG solution application and light irradiation, a statistically significant decrease in the bacterial counts were observed.

The temperature increase according to the concentration of the ICG solutions was 9.53°C, 10.43°C, 11.40°C, 12.10°C, 12.67°C, and 13.63°C in ICG solutions of 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, and 5.0 mg/mL respectively.

This study presents the potential for clinical application of ICG and NIR diode lasers as a new method for preventing dental caries.

Key words : Indocyanine Green, Near Infrared Diode laser, *Streptococcus mutans*, Biofilm, Photodynamic therapy, Photothermal therapy

I. 서 론

치아 우식증은 전 세계적으로 가장 흔한 만성 및 전염성 질환이며, 조사에 따르면 10세 미만 한국 아동의 치아 우식증은 최근 9년간 꾸준히 증가하는 추세이다[1,2]. 치아 우식증의 주요 원인 중 하나는 세균 및 타액에 기원을 둔 중합체 기질에 묻혀 있는 미생물 군락(Microbial community)인 치태이다[3].

*Mutans streptococci*는 치태의 형성에 중요한 역할을 하며, 그 중 *Streptococcus mutans*는 접착, 산생성, 산내성의 특성을 가짐으로써 치태의 환경을 변화시켜 치아 우식증의 진행에 기여하게 된다[4].

치아 우식증의 조절을 위한 기존의 방법들은 치태의 기계적 제거 및 항균제 또는 항생제의 사용을 포함한다. 그러나 이 방법들은 구강 점막의 기계적 손상, 정상 세균총 붕괴, 치아 및 수복물 착

Corresponding author : Hyunwoo Seo

Department of Pediatric Dentistry, College of Dentistry, Gangneung-Wonju National University, 7 Jukheon-gil, Gangneung, 25457, Korea

Tel: +82-33-640-2758 / Fax: +82-33-640-3113 / E-mail: hwseo@gwnu.ac.kr

Received July 7, 2020 / Revised July 29, 2020 / Accepted July 28, 2020

※The authors declare that there is no conflict of interest.

색 등의 한계점을 가진다[5]. 광역동 치료(Photodynamic therapy, PDT)는 광감각제의 광매개 활성화에 의해 생성되는 세포 독성 반응성 산소종(Cytotoxic reactive oxygen species), 주로 일중항 산소(Singlet oxygen)의 생성을 야기하는 산소 의존적 광화학 반응으로, 치아 우식의 위험도가 높고 협조도가 불량한 환자에게 PDT는 치아 우식증 예방을 위한 새로운 접근 방법이 될 수 있다[5,6].

임상 및 연구에서 사용되는 광감각제로는 Erythrosine, Toluidine blue O, Methylene blue, Eosin, Rose Bengal, Malachite green, Porphyrin 등이 있으며, 최근에는 Indocyanine Green(ICG)이 PDT를 위한 새로운 광감각제로 소개되었다[7]. ICG는 750 - 900 nm 영역의 근적외선(Near Infrared, NIR)을 흡수하며, 미국 식품의약국(Food and Drug Administration, FDA)에 의해 임상 용도로 승인된 유일한 NIR 염료이다. ICG는 빛의 흡수 이후에 형광 방출, 반응성 산소종 생성, 열 발생의 효과를 나타낼 수 있는데, 열 발생 효과로 인해 ICG에 의해 매개되는 광반응은 광열 치료(Photothermal therapy, PTT)로 정의되기도 한다[8]. PTT는 빛을 조사해 열을 발생시킴으로써 국소적인 가열을 통해 세포를 선택적으로 사멸시키는 치료법을 뜻한다[9].

ICG와 NIR 다이오드 레이저에 의한 광반응이 *S. mutans*의 생존에 미치는 영향을 평가하는 연구가 이루어지고 있지만, *S. mutans* 세균막(biofilm)에 대한 영향을 평가한 연구는 거의 없다[1]. 세균막은 다중 매트릭스 구조를 이루어 항균제의 침투를 막으므로, 부유 상태의 미생물 보다 세균막 상태의 세균을 억제하는 것이 훨씬 어렵다. 따라서 치아 우식증 예방을 위한 항균 효과를 평가하기 위해서는 실험에서 세균막에 대한 효과를 평가하는 것이 필요하다.

따라서 이번 연구의 목적은 실험실 환경에서 NIR 다이오드 레이저의 조사를 통한 ICG의 광반응이 *S. mutans* 세균막에 미치는 효과를 정량적, 정성적으로 평가하고, 이 광반응으로부터 발생하는 온도 상승을 관찰하여 치아 우식증 예방을 위한 임상적 사용의 가능성을 알아보는 것이다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 세균 배양

S. mutans ATCC25175 균주를 5% CO₂, 37°C의 조건에서 18시간 동안 Brain heart infusion broth(BHI, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)에서 배양하였다. 세균혼탁용액의 혼탁도를 분광 광도계(Smart Plus 2700; Young-woo inst., Seoul, Korea)로 측정하여 총 세균 수를 산정한 후, BHI broth를 이용하여 10⁷ Colony Forming Unit/mL(CFU/mL)로 희석하였다.

2. 세균막(Biofilm) 형성

Hydroxyapatite(HA) disk(직경 1.27 cm, Biosurface Technologies Corporation, Bozeman, MT)의 한 면에서 가로 8.0 mm, 세로 2.0 mm 크기의 면적을 남기고 모두 검정색 Nail varnish를 바른 후, 반대쪽 면과 옆면에는 실리콘 재료(Examixfine injection type; GC Corporation, Tokyo, Japan)를 도포하였다. EO gas로 멸균한 HA disk를 12-well cell culture plate에 넣고, BHI broth 1980 µL와 10⁷ CFU/mL의 *S. mutans* 배양액 20 µL를 접종하여 5% CO₂, 37°C의 조건에서 24시간 동안 *S. mutans* 세균막을 형성시켰다.

3. 광감각제와 광원

ICG(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 분말을 멸균 증류수(Sterile distilled water)에 용해시켜 각각 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg/mL의 농도로 제조하였다. 용액의 안정성을 고려하여 제조는 실험 직전에 이루어졌으며, 암실에 보관하면서 실험에 사용하였다.

광원으로는 가로 6.0 mm, 세로 1.0 mm 크기의 직사각형 모양으로 조사되며 810 nm의 파장과 300 mW 출력을 가지는 다이오드 레이저(808MD-300-1245, Laserland, Besram Technology Incorporation, Hengelo, Netherlands)를 사용하였고, Radiometer(DigiRate LM-100; Monitex, New Taipei city, Taiwan)를 이용하여 출력을 확인하였다.

4. 세균막의 처치

S. mutans 세균막이 형성된 HA disk가 들어있는 각 well에서 배양액을 제거하고 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg/mL 농도의 ICG 용액 10 µL를 Biofilm 위에 도포한 후 5분간 암실에 보관하였다. 그 다음 30초 간 광조사를 시행하였다. 농도에 따른 효과를 비교하기 위하여 다음과 같이 균을 분류하였다(Table 1).

5. Colony Forming Unit(CFU) 측정

각 조건에 따른 처리 후, 각 well을 10초간 두 번 초음파 처리(VC 100; Sonics & Materials Inc., Danbury, CT, USA)하여 세균 부유액으로 만들었다. 각 well 당 두 개의 Blood agar plate(Hanil-KOMED, Seongnam, Gyeonggi-do, Korea)를 이용하여 각각 50 µL의 배양액을 도말한 후에 5% CO₂, 37°C의 조건에서 72시간 동안 배양하였다. CFU를 측정하여 로그값을 구한 후, 각 조건에 따른 항균 효과를 비교하였다.

Table 1. Experimental Groups

Group	Treatment	ICG Concentration (mg/mL)	
I	Control, No ICG, No NIR Diode laser		
II	NIR Diode laser only		
III	ICG only	III-1	0.5
		III-2	1.0
		III-3	2.0
		III-4	3.0
		III-5	4.0
		III-6	5.0
IV	ICG and NIR Diode laser	IV-1	0.5
		IV-2	1.0
		IV-3	2.0
		IV-4	3.0
		IV-5	4.0
		IV-6	5.0

6. 세균막 표면의 온도 변화

대조군 및 II군과 IV군의 시편들이 *S. mutans* 세균막 표면의 온도 측정을 위해서 사용되었다. 각 조건에 따른 처리 후, 광조사 전에 시편 표면에 1채널 열전대 온도계(Testo 925, Testo, Lenzkirch, Germany)에 연결된 Thermocouple(Serie/Batch 5971, Thermocoax, Suresnes, France)을 위치시키고 광조사에 따른 온도 변화를 측정하였다.

7. 공초점 레이저 주사 현미경 (Confocal laser scanning microscopy, CLSM) 관찰

생존력의 시각화를 위해 모든 *S. mutans* 세균막 표본을 공초점 레이저 현미경으로 평가하였다. 모든 시편을 1000 µL PBS로 2회 세척하고, SYTO-9(녹색, 생존 세포) 및 프로피디움 요오드화물(적색, 사멸 세포)을 함유하는 200 µL의 LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit 용액(Molecular Probes, Inc., Eugene, USA)을 적용하여 제조업체의 지시에 따라 암실에서 15분 동안 실온에서 염색하였다. 염색 후에 세균막을 200 µL의 Double distilled water(DDW)로 부드럽게 헹구었다. 그 다음 HA disk를 슬라이드 글라스로 옮기고, 공초점 현미경(LEICA TCS SP8, Leica Microsystem, Wetzlar, Germany)을 통해 10배 배율로 검사하였다.

8. 통계 분석

SPSS 버전 22.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여 Log₁₀ CFU/mL 값에 대한 통계 분석을 시행하였다. Bonferroni test 사후 분석 방법을 적용하였다.

III. 연구 성적

1. Colony Forming Unit(CFU) 측정과 공초점 레이저 주사 현미경(CSLM) 관찰

대조군과 비교했을 때, NIR 다이오드 레이저의 조사만 시행한 II군 및 0.5, 1.0, 2.0 mg/mL ICG 용액을 도포한 III-1, 2, 3군과 0.5 mg/mL ICG 용액의 도포와 NIR 다이오드 레이저의 조사를 함께 시행한 IV-1군은 모두 세균 수가 감소하는 양상을 보이지 않았다. 그러나 3.0, 4.0, 5.0 mg/mL ICG 용액의 도포를 시행한 III-4, 5, 6군과 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg/mL ICG 용액의 도포와 NIR 다이오드 레이저의 조사를 함께 시행한 IV-2, 3, 4, 5, 6은 대조군과 비교할 때 세균 수가 감소하는 양상을 보였다(Table. 2, Fig. 1). 이러한 경향이 CLSM 사진에도 나타났다(Fig. 2).

Table 2. *Streptococcus mutans* bacterial counts and *p* value from Bonferroni's post-hoc test

Group (n = 6)	Bacterial count (Mean ± Standard deviation)		
	Log (CFU/mL)	<i>p</i> value	
I (0 N-)	7.97 ± 0.36		
II (0 N+)	7.66 ± 0.77	1.000	
III	III-1 (0.5 N-)	7.18 ± 0.82	1.000
	III-2 (1.0 N-)	7.21 ± 0.90	1.000
	III-3 (2.0 N-)	6.88 ± 0.25	0.135
	III-4 (3.0 N-)	6.70 ± 0.51*	0.023
	III-5 (4.0 N-)	6.62 ± 0.55*	0.010
	III-6 (5.0 N-)	6.41 ± 0.78*	0.001
IV	IV-1 (0.5 N+)	7.32 ± 0.73	1.000
	IV-2 (1.0 N+)	6.63 ± 0.03*	0.011
	IV-3 (2.0 N+)	6.52 ± 0.12*	0.003
	IV-4 (3.0 N+)	6.43 ± 0.39*	0.001
	IV-5 (4.0 N+)	5.97 ± 0.61*	0.000
	IV-6 (5.0 N+)	5.44 ± 0.24*	0.000

Bonferroni's post-hoc test (* : *p* < 0.05)
N- = No NIR Diode laser; N+ = NIR Diode laser

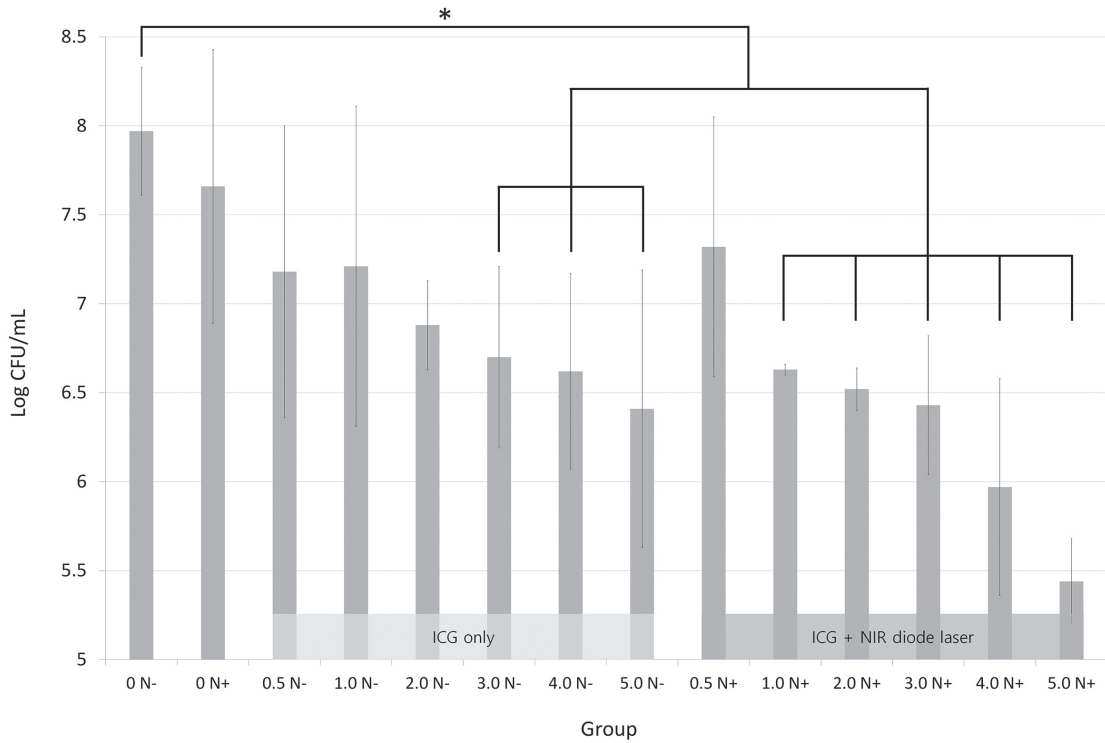


Fig. 1. Mean and standard deviation of *Streptococcus mutans* bacterial count. Bonferroni's post-hoc test (* : $p < 0.05$)

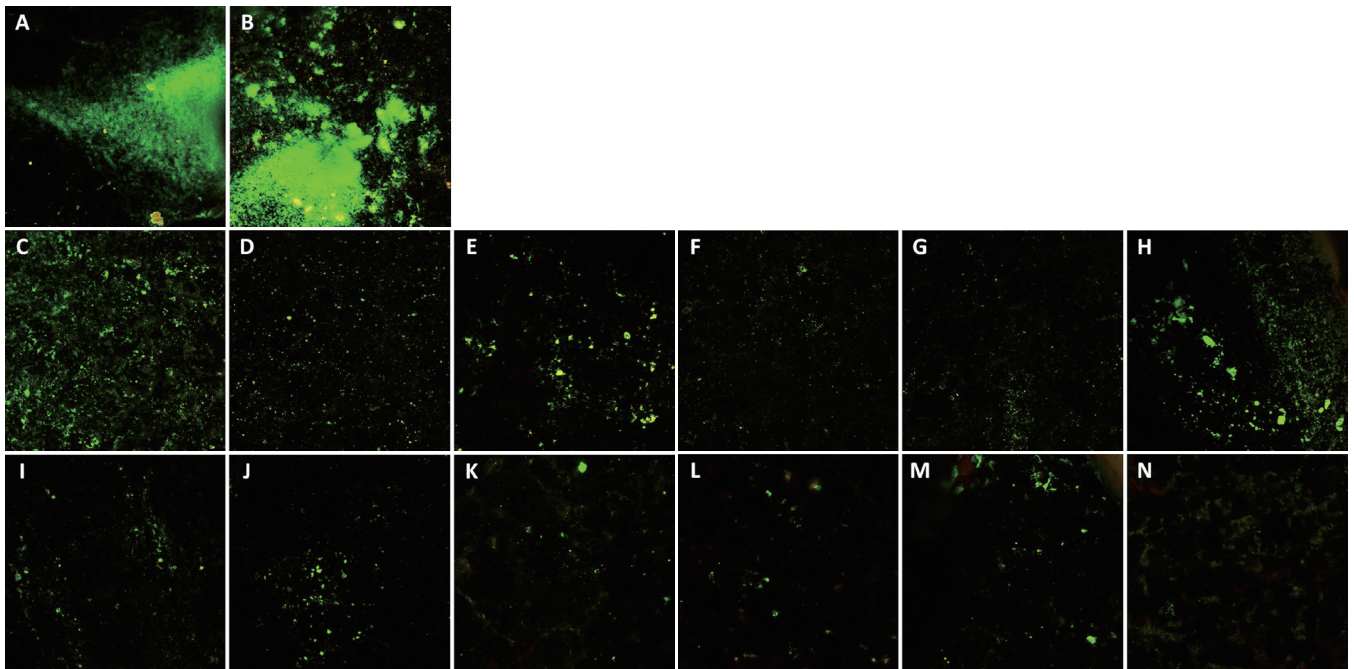


Fig. 2. Confocal laser scanning microscopy images. (A) Group I (0 N-), (B) Group II(0 N+), (C) Group III-1(0.5 N-), (D) Group III-2(1.0 N-), (E) Group III-3(2.0 N-), (F) Group III-4(3.0 N-), (G) Group III-5(4.0 N-), (H) Group III-6(5.0 N-), (I) Group IV-1(0.5 N+), (J) Group IV-2(1.0 N+), (K) Group IV-3(2.0 N+), (L) Group IV-4(3.0 N+), (M) Group IV-5(4.0 N+), (N) Group IV-6(5.0 N+).

Table 3. Surface temperature change of Biofilms

Group	Temperature (°C)	Δ T (°C)
I (0 N-)	21.07	
II (0 N+)	29.47	8.40
IV-1 (0.5 N+)	30.60	9.53
IV-2 (1.0 N+)	31.50	10.43
IV-3 (2.0 N+)	32.47	11.40
IV-4 (3.0 N+)	33.17	12.10
IV-5 (4.0 N+)	33.73	12.67
IV-6 (5.0 N+)	34.70	13.63

N- = No NIR Diode laser; N+ = NIR Diode laser

2. 세균막 표면의 온도 측정

정확성을 위해 모든 온도 측정은 3번씩 시행되었다. 대조군의 세균막 표면 온도는 21.07°C 이었다. 30초의 NIR 다이오드 레이저의 조사만 시행한 II군에서는 8.40°C의 온도 상승이 관찰되었다. 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg/mL 농도의 ICG 도포 후 NIR 다이오드 레이저의 조사를 함께 시행한 IV군에서는 각각 9.53°C, 10.43°C, 11.40°C, 12.10°C, 12.67°C, 13.63°C의 온도 상승이 관찰되었다(Table. 3).

IV. 총괄 및 고찰

ICG는 간에서 대사되고 50 - 80 mg/kg의 반수 치사량(Lethal dose 50%)을 가지며 장점막에 흡수되지 않기 때문에 저독성으로 분류된다[8]. 이러한 높은 안전성 때문에 ICG는 안혈관 조영술 및 간 기능 검사 등의 의료 영역에 널리 사용되고 있다[8]. ICG에 의해 매개되는 광반응은 산소 없이도 발생할 수 있는데, 이러한 특성 때문에 치과 영역에서는 주로 혐기성 세균에 의해 발생하는 치주 질환 또는 근관 내 감염의 조절을 위한 새로운 치료 방법으로 소개되었다[10,11]. 그러나 항균 효과를 위한 최적 조건에 대한 연구는 부족하며, 각 연구들마다 사용된 ICG의 농도는 일관성이 없다. 이전 연구들을 살펴보면, 사용된 ICG의 농도는 부유 상태의 세균에서 1.9 - 1000 μL/mL, 세균막 상태의 세균에서 5 mg/mL까지로 다양하였다[1,11,12]. 이번 연구에서는 세균막에서 항균제의 감수성이 낮은 것을 고려하여 비교적 높은 농도의 ICG용액을 사용하여 *S. mutans* 세균막에 대한 효과를 평가하였다.

810 nm NIR 다이오드 레이저는 치과에서 흔히 치주 치료, 임플란트 주위염, 근관 내 감염의 조절, 치아 미백 등에 사용되며,

조직의 국소적인 온도 상승을 통해 항균 효과를 나타내는 특징을 가진다[13]. Giraudeau 등[8]은 ICG에 5 - 10 W/cm²의 출력을 가진 광원을 초 또는 분의 노출시간으로 적용하면 광독성이 나타날 수 있다고 하였다. 이번 연구에서는 NIR 다이오드 레이저와 ICG로 인한 온도 상승이 주변 조직과 치질에 미치는 손상을 최소화할 수 있도록 5 W/cm²의 비교적 낮은 출력을 가지는 NIR 다이오드 레이저를 광원으로 사용하였다.

ICG와 NIR다이오드 레이저에 의한 항균 효과의 기전에 대해서는 아직 논쟁이 진행 중이다. Reindl 등[14]은 측정된 삼중항 형성의 양자 수율(Quantum yields of triplet formation)이 효율적인 반응성 산소종, 특히 일중항 산소를 생성하기에 충분히 높다고 제안함으로써 ICG와 NIR 다이오드 레이저에 의한 광반응이 PDT일 수 있음을 뒷받침하였다. 또한 ICG에 저전력 밀도를 가진 광원을 적용하면 PDT를 통한 광독성이 나타나고, 이때는 열전도를 통한 충분한 냉각으로 인해 세포나 조직에서 온도 증가가 거의 감지되지 않는다고 하는 주장도 있다[8]. 그러나 Engle 등[15]은 일중항 산소의 직접적인 검출에 대한 증거는 없다고 주장하였으며, 다른 연구에서는 100 mW와 300 mW의 810 nm NIR 다이오드 레이저를 ICG에 적용했을 때 최대 80°C까지의 온도 상승을 보고하였다[16].

이번 연구에서 NIR 다이오드 레이저 조사만을 시행한 II군과 5 mg/mL ICG 용액에 광조사를 함께 시행한 IV-6군의 세균막 표면 온도 상승을 비교했을 때, 그 온도 차이는 5.23°C 이었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 ICG와 NIR 다이오드 레이저에 의한 발열 효과는 ICG의 광반응에 의한 열 발생과 NIR 다이오드 레이저에 의한 가열 작용이 함께 작용하여 나타나는 것으로 보인다. 그러나 이러한 결과를 통해 ICG와 NIR 다이오드 레이저에 의한 항균 효과의 기전이 반응성 산소종 생성에 기초한 광화학적 효과를 이용하는 PDT인지, 여기된 일중항 상태와 레이저로부터 발생하는 열을 이용한 PTT인지를 구분하는 것은 어렵다. 따라서 ICG와 NIR 다이오드 레이저를 이용한 광반응의 용어 정의는 신중해야 한다.

Fatma 등[1]은 ICG 용액 만을 도포한 경우에도 세균 수가 감소하지만, NIR 다이오드 레이저를 함께 조사했을 때는 더 큰 세균 수의 감소가 관찰된다고 보고하였다[1]. 이번 연구에서는 3.0, 4.0, 5.0 mg/mL의 ICG 용액 만을 도포한 III-4, 5, 6군에서 세균 수가 감소하는 양상이 관찰되었다. 이는 *S. mutans* 세균막이 고농도의 ICG 용액 자체에 영향을 받았거나, 시편을 암실에 보관하며 빛에 대한 노출을 최소화했지만 불가피 하게 일어난 빛의 노출에 의한 ICG의 광반응에 의한 것으로 사료되었다.

또한 이번 연구에서 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg/mL의 ICG와 NIR 다이오드 레이저를 함께 적용한 IV-2, 3, 4, 5, 6군에서 농도가 증

가할수록 CFU 값이 감소하는 경향이 보였고, 3.0, 4.0, 5.0 mg/mL ICG 용액 만을 도포한 Ⅲ-4, 5, 6군과 3.0, 4.0, 5.0 mg/mL의 ICG 용액의 도포와 NIR 다이오드 레이저 조사를 함께한 IV-4, 5, 6군을 비교했을 때는 IV-4, 5, 6군에서 좀 더 큰 세균 수의 감소가 관찰되었다. 그러나 통계 처리 결과에서는 이러한 CFU 값의 감소들이 군 간의 차이를 나타내지는 못하였다.

이에 대한 원인으로 두 가지 가설을 생각해볼 수 있다. 첫째는 높은 농도의 ICG 용액으로 인한 자체의 차폐 효과(Self-shielding) 때문에 NIR 다이오드 레이저의 투과가 어려워 충분한 항균 효과를 얻지 못했을 수 있다는 것이다[12]. 둘째는 ICG 수용액은 농도가 높을수록 안정성이 더 높아지는데, 이로 인해 ICG의 분해가 불리해져 ICG에 의한 광독성이 효율적으로 나타나지 못할 수 있다는 것이다[17]. 그럼에도 불구하고 5.0 mg/mL의 ICG와 NIR 다이오드 레이저를 함께 사용한 IV-6군에서 대조군에 비해 가장 큰 세균 수의 감소가 나타난 점을 미루어 볼 때, ICG와 NIR 다이오드 레이저를 함께 사용하면 항균 효과의 상승이 있을 수 있다고 추측할 수 있다.

또한 ICG와 NIR 다이오드 레이저의 광반응을 통한 항균 효과에서 발생하는 열에 의한 주변 조직과 치질의 손상을 고려해야 한다는 우려가 있다. 42.5°C 이상의 치수 온도는 치수 조직의 비가역적인 손상을 유발한다[18,19]. Kreisler 등[20]에 따르면 잔존 상아질 두께가 3.0 mm 일 때, 809 nm의 GaAlAs 레이저를 0.5 - 2.5 W의 출력으로 10 - 120초 간 조사했을 때 치수의 온도 증가는 0 - 3.5°C 이었다. 이번 연구에서는 5.0 mg/mL ICG 용액에 810 nm의 NIR 다이오드 레이저를 300 mW의 출력으로 30초 간 조사하였을 때, 최대 13.63°C의 온도 상승이 관찰되었다. 사용된 레이저 조사량이 치수에 해로운 영향을 미칠 가능성이 낮다는 것을 짐작할 수 있지만, 그럼에도 불구하고 한 곳으로의 집중적인 조사는 치질의 온도를 상승시킬 수 있는 가능성이 있으므로 실제 사용 시에는 레이저를 움직이면서 반복적으로 조사하는 형태가 안정성 면에서 더 바람직할 수 있다.

이번 연구는 치아 우식증 예방을 위한 관점에서 ICG와 NIR 다이오드 레이저가 *S. mutans* 세균막의 억제에 미치는 영향을 CFU count를 통해 정량적으로, CLSM을 통해 정성적으로 평가했다는 점과, ICG와 NIR 다이오드 레이저에 의한 열 발생을 측정하여 발열이 항균 효과에 미치는 영향을 평가한 것에 의의가 있다.

그러나 이 연구는 실험실 조건에서 형성된 *S. mutans* 세균막에 대한 항균작용을 평가했다는 점에서 한계를 가진다. 구강 내에서 치아 우식증을 유발하는 세균들은 미생물 군락을 이루며, 세포 외 기질의 발달과 유전자 발현의 변형 등으로 실험실에서 배양한 세균막과는 다른 특성을 가진다. 이로 인해 ICG와 NIR

다이오드 레이저에 의한 항균 효과에 더 큰 저항성을 가질 수 있다.

따라서 임상 조건에서 ICG와 NIR 다이오드 레이저의 효과를 평가하기 위한 추가적인 연구가 필요하며, 추가적으로 이러한 광반응에 의한 항균 효과의 기전을 명확하게 밝히는 것이 효과적인 미생물 제거를 위해 필요할 수 있다. 또한 ICG와 NIR 다이오드 레이저를 이용한 광반응을 임상적으로 사용하기 위해서는 ICG의 농도 및 적용 시간과 NIR 다이오드 레이저의 출력, 조사 시간 및 조사 거리 등을 포함하는 정확한 프로토콜을 구성하기 위한 추가적 연구가 필요하다.

V. 결 론

ICG만을 *S. mutans* 세균막에 적용하면 ICG 용액의 농도가 3.0 mg/mL 이상일 때 유의한 세균 수의 감소가 관찰되었으며, ICG와 NIR 다이오드 레이저를 함께 *S. mutans* 세균막에 적용하면 ICG 용액의 농도가 1.0 mg/mL 이상일 때 유의한 세균 수의 감소가 관찰되고, 최대 13.63°C의 온도 상승을 보였다. 즉, ICG 용액의 농도가 3.0 mg/mL이면 그 자체로도 *S. mutans* 세균막을 억제할 수는 있으나, NIR 다이오드 레이저를 함께 사용하면 주변 조직 손상의 우려 없이 더 효율적인 항균 작용을 나타낼 수 있다.

따라서 이번 연구는 새로운 치아 우식증 예방법으로써 ICG와 NIR 다이오드 레이저의 임상 적용 가능성을 제시한다.

Authors' Information

Yeowon Kim <http://orcid.org/0000-0002-4306-4296>

Howon Park <http://orcid.org/0000-0001-5741-9804>

Juhyun Lee <http://orcid.org/0000-0002-7586-9478>

Hyunwoo Seo <http://orcid.org/0000-0001-6894-0099>

Siyong Lee <http://orcid.org/0000-0001-8826-1413>

References

1. Fatma Aytac Bal, Ismail Ozkocak, Merve Agaccioglu, *et al.* : Effects of photodynamic therapy with indocyanine green on *Streptococcus mutans* biofilm. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 26:229-234, 2019.
2. Lee KY : Dental disease changes by age in the last 9 years: 2010 to 2018. *Health Policy Institute*, 13:1-7, 2020.
3. Robert J Berkowitz : *Mutans Streptococci*: Acquisition and Transmission. *Pediatr Dent*, 28:106-109, 2006.

4. Jeffrey A Banas : Virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Front Biosci*, 9:1267-1277, 2004.
5. Rajesh S, Koshi E, Philip K, Mohan A : Antimicrobial photodynamic therapy: An overview. *J Indian Soc Periodontol*, 15:323-327, 2011.
6. Hakimiha N, Khoei F, Bahador A, Fekrazad R : The susceptibility of *Streptococcus mutans* to antibacterial photodynamic therapy: a comparison of two different photosensitizers and light sources. *J Appl Oral Sci*, 22:80-84, 2014.
7. Raut CP, Sethi KS, Warang A, et al. : Indocyanine green-mediated photothermal therapy in treatment of chronic periodontitis: A clinico-microbiological study. *J Indian Soc Periodontol*, 22:221-227, 2018.
8. Giraudeau C, Moussaron A, Frochot C, et al. : Indocyanine Green: Photosensitizer or Chromophore? Still a Debate. *Curr Med Chem*, 21:1871-1897, 2014.
9. Kim BG, Yeo DG, Na HB : Research trends in photothermal therapy using gold nanoparticles. *Appl Chem Eng*, 28:383-396, 2017.
10. Nagahara A, Mitani A, Noguchi T, et al. : Antimicrobial photodynamic therapy using a diode laser with a potential new photosensitizer, indocyanine green-loaded nanospheres, may be effective for the clearance of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodont Res*, 48:591-599, 2013.
11. Pourhajibagher M, Chiniforush N, Bahador A, et al. : Sub-lethal doses of photodynamic therapy affect bio-film formation ability and metabolic activity of *Enterococcus faecalis*. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 15:159-166, 2016.
12. Henderson BW, Dougherty TJ : How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol*, 55:145-157, 1992.
13. Pirnat S : Versatility of an 810 nm diode laser in dentistry: An overview. *J Laser Health Acad*, 2007:1-9, 2007.
14. Reindl S, Penzkofer A, Baumler W, et al. : Quantum yield of triplet formation for indocyanine green. *J Photochem Photobiol*, 105:65-68, 1997.
15. Engel E, Schraml R, Vasold R, et al. : Light-induced decomposition of indocyanine green. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49:1777-1783, 2008.
16. Meister J, Hopp M, Frentzen M, et al. : Indocyanine green (ICG) as a new adjuvant for the antimicrobial photo-dynamic therapy (aPDT) in dentistry. *Lasers Dent*, 8929:1-10, 2014.
17. Saxena V, Sadoqi M, Shao J : Degradation kinetics of indocyanine green in aqueous solution. *J Pharm Sci*, 92: 2090-2097, 2003.
18. Zach L, Cohen G : Pulp reponse to externally applied heat. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 19:515-530, 1965.
19. Pohto M, Scheinin A : Microscopic observations on living dental pulp. *Acta Odontol Scand*, 16:303-327, 1958.
20. Kreisler M, Al-Haj H, d'Hoedt B : Intrapulpal temperature changes during root surface irradiation with an 809-nm GaAlAs laser. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 93:730-735, 2002.

국문초록

Indocyanine Green과 근적외선 다이오드 레이저의 *Streptococcus mutans* 세균막에 대한 억제 효과

김여원¹ · 박호원¹ · 이주현¹ · 서현우¹ · 이시영²

¹강릉원주대학교 치과대학 소아·청소년치과학교실 및 구강과학연구소

²강릉원주대학교 치과대학 미생물학 및 면역학교실

이 연구의 목적은 Indocyanine Green(ICG)과 근적외선(Near Infrared, NIR) 다이오드 레이저가 *Streptococcus mutans* 세균막에 미치는 효과를 ICG 용액의 농도에 따라 평가하는 것이었다.

Hydroxyapatite disk에 *S. mutans* 세균막을 형성하여 멸균 증류수에 용해시킨 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg/mL의 ICG 용액과 300 mW의 출력, 808 nm의 파장을 가지는 NIR 다이오드 레이저를 적용하였다. 모든 표본은 공초점 레이저 주사 현미경(Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM)을 이용하여 관찰하였다. 또한 1채널 열전대 온도계와 Thermocouple을 이용하여 광조사 시에 ICG 용액의 농도에 따른 세균막 표면의 온도 변화를 함께 측정하였다.

대조군과 비교 시에 ICG 용액만을 도포한 군에서는 3.0, 4.0, 5.0 mg/mL의 농도에서, 그리고 ICG 용액의 도포와 광조사를 함께 시행한 군에서는 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg/mL의 농도에서 통계적으로 유의한 세균 수의 감소가 관찰되었다. 용액의 농도에 따른 온도 증가는 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg/mL의 ICG 용액에서 각각 9.53°C, 10.43°C, 11.4°C, 12.1°C, 12.67°C, 13.63°C 이었다.

즉, ICG 용액의 농도가 3.0 mg/mL이면 그 자체로도 *S. mutans* 세균막을 억제할 수는 있으나, NIR 다이오드 레이저를 함께 사용하면 주변 조직 손상의 우려 없이 더 효율적인 항균 작용을 나타낼 수 있다. 따라서, 이번 연구는 새로운 치아 우식증 예방법으로 ICG와 NIR 다이오드 레이저의 임상적 적용의 가능성을 제시한다.