

Effect of Photothermal Therapy with Indocyanine Green in Multispecies Biofilm

Myunghwan 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 is to investigate the antibacterial effects of indocyanine green (ICG) and near-infrared diode lasers on multispecies biofilms.

Multispecies biofilms of *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei* and *Candida albicans* were treated with different irradiation time using photosensitizer ICG and 808 nm near-infrared diode laser. Colony forming unit (CFU) was measured, and qualitative evaluation of biofilm was performed with confocal laser scanning microscopy (CLSM). Temperature measurement was conducted to evaluate photothermal effect.

In the groups using ICG and diode laser, reduction in CFU was statistically significant, but the difference in antibacterial effect on *L. casei* and *C. albicans* with irradiation time was not significant, and similar results were confirmed with CLSM. Groups with ICG and diode laser showed higher temperature elevation than groups without ICG, and results of measured temperature were similar to the range of hyperthermia.

In conclusion, ICG and near-infrared diode laser showed antibacterial effects on multispecies biofilms, but studies on protocol are necessary for clinical application.

Key words : Photodynamic therapy, Photothermal therapy, Indocyanine green, Near-infrared diode laser, Multispecies biofilm, Early childhood caries

I. 서 론

광역동 치료(Photodynamic therapy, PDT)는 특정한 빛에 의해 활성화된 광감각제에서 발생하는 자유 라디칼이나 활성 산소(Reactive oxygen species, ROS)가 세포 내의 단백질이나 DNA의 과사를 통해 세포 사멸 효과를 나타내며[1], 광감각제와 광원이 적용된 부위에만 선택적으로 항균 작용을 나타낸다는 점과 반복적인 사용에도 내성이 발생하지 않는 장점을 가진다[2]. Erythrosine, toluidine blue O (TBO), methylene blue (MB), eosin, rose ben-

gal 등 PDT를 위한 여러 광감각제가 있으나, 최근 indocyanine green (ICG)이 새로운 광감각제로 제시되었다[3]. 600 - 900 nm 범위의 파장을 가지는 빛을 흡수하며, 혈액에 용해되었을 때 대략 800 nm의 파장에서 가장 높은 흡수율을 보인다[4]. ICG는 유일하게 미국 Food and Drug Administration (FDA) 승인을 받은 근적외선 염료(Near-infrared dye)로, 안과 영역의 조영술이나 심박출량 측정을 위한 혈관 조영제, 간기능 검사 등에 사용되는 재료이나 적절한 광원과 함께 사용하면 세포 독성을 나타낸다[5]. 광원이 조사된 ICG는 형광 방출, 활성 산소의 발생, 열 변환의 3가지

Corresponding author : Howon Park

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

Tel: +82-33-640-2464 / Fax: +82-33-640-3113 / E-mail: pedo@gwnu.ac.kr

Received September 15, 2020 / Revised November 16, 2020 / November 4, Accepted 2020

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

반응 경로를 보이며, 이 중 약 85%의 흡수된 빛 에너지가 열로 전환된다. ICG의 광반응에서 발생하는 열에 의한 효과는 일반적인 PDT의 기전과 다르므로 광열 치료(Photothermal therapy, PTT)로 분류된다[5].

ICG의 치과 영역에서의 사용은 치주 질환, 치아 우식에 대한 효과가 연구되고 있다[6,7]. 그 중 치아 우식은 다원성 질병으로 여러 원인 요소가 존재하고, 우식원성 미생물이 큰 비중을 차지하며 *Streptococcus mutans*와 *Lactobacillus* 종이 우식의 발생과 진행에 각각 주요한 역할을 한다[8,9]. 또한 최근 *Candida albicans*와 DMF score 사이의 높은 관련성이 보고되어 치아 우식의 원인 세균일 가능성이 제시되었으며[10], 특히 유아기 우식증(Early childhood caries, ECC)을 가진 소아의 치태나 상아질에서 높은 *C. albicans*의 비율이 관찰되어 ECC와의 높은 연관성을 갖는 것으로 알려져 있다[11].

Fekrazed 등[12]은 ICG와 810 nm 근적외선 diode 레이저를 이용하였을 때 *S. mutans*에 대한 유의한 살균 효과를 가지며 이는 MB를 이용한 PDT보다 효과적이라고 보고하였다. 또한 Ahrari 등[13]은 부유상태의 *Lactobacillus* 종에 적용하여 세균 수의 유의한 감소를 보고하였으며, Azizi 등[14]은 *C. albicans*에 대한 항균 효과를 MB를 이용한 PDT, chlorhexidine, nystatin 등과 함께 비교하였고 ICG와 808 nm diode 레이저의 PDT와 nystatin의 사용이 다른 처리보다 유의하게 우수한 항균 효과를 나타냄을 보고했다.

앞선 연구에서 여러 세균에 대한 ICG와 근적외선 레이저의 효과는 보고되었으나 이는 대부분 부유 상태(planktonic)의 세균이나 바이오필름(biofilm) 상태의 단일 균주에 대한 효과만 평가하였다. 실제 임상에서의 우식원성 세균은 다중으로 이루어진 바이오필름 상태로 존재하며 단일 균주에 보이는 효과와 다를 수 있으나, 그에 대한 연구는 보고된 바 없다.

이번 연구의 목적은 ICG와 근적외선 diode 레이저가 ECC와 관련된 *S. mutans*, *Lactobacillus* 종, *C. albicans*를 포함하는 다중 우식원성 바이오필름에 미치는 효과를 실험실 조건에서 양적(quantitative), 정성적(qualitative)으로 평가하고, 온도 변화를 평가하여 PTT의 효과를 알아보는 것이다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 세균 배양

S. mutans ATCC 25175, *L. casei* ATCC 334, *C. albicans* KCTC 7270 표준 균주를 Brain Heart Infusion (BHI; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) broth에 5% CO₂, 37°C 조건에

서 18시간 각각 배양하였다. 각 세균 배양액의 혼탁도는 분광 광도계(Smart Plus 2700; Young-woo Inst., Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였다. *S. mutans*와 *L. casei*는 접종을 위해 BHI broth를 이용하여 1 × 10⁹ colony-forming unit (CFU)/mL로, *C. albicans*는 2 × 10⁹ CFU/mL로 희석하였다.

2. 바이오필름 형성

다중 우식원성 바이오필름 형성을 위해 원형의 hydroxyapatite (HA) disk (BioSurface Technologies Corporation, Bozeman, MT, USA, diameter 1.27 cm)를 광원의 크기에 맞는 6.0 mm × 1.0 mm 직사각형 형태로 잘라서 사용하였다. HA 시편의 옆면과 뒷면은 Silicone (Examixfine injection type, GC Corporation, Tokyo, Japan)이 적용되었다(Fig. 1). 준비된 HA 시편은 ethylene oxide gas를 이용하여 소독되었으며 24-well plate에서 1% sucrose를 포함하는 BHI broth 960 μL와 *S. mutans*와 *L. casei*의 희석액 각각 20 μL, *C. albicans*의 희석액 1000 μL를 접종하였다. 각 세균의 최종 접종 농도는 *S. mutans*와 *L. casei*가 1 × 10⁷, *C. albicans*가 1 × 10⁹ CFU/mL였으며 이 농도는 최종적인 세균 수 측정에서 유사한 집락 수를 갖도록 pilot study를 통하여 설정되었다.

3. 광감각제와 광원

ICG (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 분말을 멸균 증류수 (Sterile distilled water)에 용해시켜 2 mg/mL의 농도로 실험 직전에 제작하여 암실에 보관하였다. 광원은 근적외선 diode 레이저(808MD-300-1245, Laserland, Besram Technology Incorporation, Hengelo, Netherlands)를 1 cm 거리에서 광조사 하였으며 출력(808 nm, 300 mW)은 광도계(DigiRate LM-100; Monitex, New Taipei City, Taiwan)를 이용하여 확인하였다.

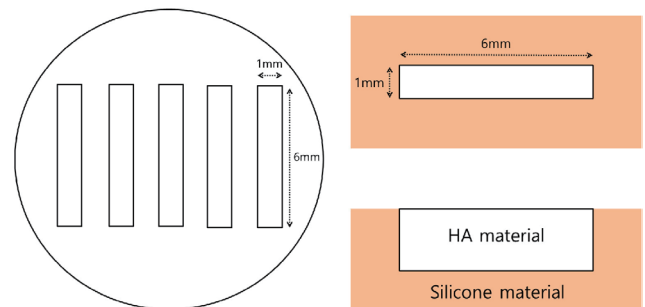


Fig. 1. Preparation of hydroxyapatite material specimen.

Table 1. Experimental groups

Group	Treatment	Irradiation Time (sec)
I	Control, ICG (-), Radiation (-)	-
II	ICG only	-
III	Radiation only (808 nm diode laser)	10
IV		30
V		60
VI	ICG (+), Radiation (+)	10
VII		30
VIII		60

n = 3, replicated twice, ICG : Indocyanine green

4. 바이오필름 처치

모든 well에서 배지를 제거 후, 멸균증류수에 희석시킨 2 mg/mL의 ICG 용액 20 μ L를 바이오필름이 형성된 시편에 적용하여 5분 간 암실에서 보관하였다. 광원 조사는 각각 10초, 30초, 60초 시행되었으며 실험군은 Table 1과 같이 설정하였다.

5. Colony-forming unit 측정

인산완충생리식염수(phosphate-buffered saline, PBS)를 이용하여 세척되었고 각 시편을 초음파 처리(VC 100; Sonics & Materials Inc., Danbury, CT, USA)하여 세균을 탈락시켰다. 이후 PBS로 희석하여 혈액 한천 배지(Blood agar plate)에 50 μ L씩 도말하여 5% CO₂, 37°C 조건에서 72시간 배양하였고, 배양된 각 세균의 수는 맨눈으로 측정하였으며 3가지 균의 서로 다른 형태를 통하여 구분하였다. 측정된 각 세균의 수는 Log CFU 값으로 변환하여 사용되었다.

6. 공초점 레이저 주사 현미경 관찰

광감각제 및 광원 처리 후 다중 우식원성 바이오필름의 정성적(qualitative) 평가를 위해 공초점 레이저 주사 현미경(Confocal laser scanning microscopy, CLSM) 관찰을 사용하였다. 각 실험 방법에 따라 처리된 시편은 세척 후 200 μ L의 LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit Solution (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA)를 이용하여 제조사의 지시에 따라 상온의 암실에서 15분 간 염색되었다. LEICA TCS SP8 (Leica Microsystem, Wetzlar, Germany)을 이용하여 10배 배율로 바이오필름을 관찰하였다.

7. 바이오필름 표면 온도 측정

ICG와 근적외선 diode 레이저에 의한 온도 변화를 평가하기 위해 광조사를 시행하는 III - VIII군에 대해 1채널 열전대 온도계(thermocouple thermometer; Testo 295, Testo, Lenzkirch, Germany)와 열전대(K type thermocouple; 2ABAc, 2.0 mm diameter/1.0 m length, Thermocoax, France)를 이용하여 바이오필름 표면 온도를 측정하였다. 바이오필름을 형성하여 배지를 제거한 후 37°C 배양기에 보관하여 동일한 초기 온도로 설정하였으며, 3회 측정하여 평균값을 통해 결과를 비교하였다.

8. 통계 분석

통계 분석을 위해 SPSS version 22 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)가 사용되었다. 각 처리 방법에 따른 항균 효과를 비교하기 위해, 측정된 CFU 값을 Kruskal-Wallis test로 통계적 유의성을 분석하였고, Bonferroni test 사후 분석을 이용하였다.

III. 연구 성적

1. Colony-forming unit 측정

다중 우식원성 바이오필름에 포함된 각 세균의 CFU 결과를 Table 2 - 5에 정리하였다. ICG와 diode 레이저를 적용한 VI - VIII군에서 세 균 모두 CFU 값이 감소하는 양상을 보였다($p < 0.05$). Table 6에서 대조군에 대한 VI, VII, VIII군의 Log CFU 결과를 비율로 나타내었으며 조사 시간이 길어짐에 따라 더 많은 세균 감소 비율을 보였고, 가장 높은 세균 감소는 *S. mutans*에서 관찰되었다. *S. mutans*의 경우 각각 10초와 30초를 적용한 VI, VII군과 60초를 적용한 VIII군 간 CFU 값의 유의한 차이를 보였으나, *L. casei*와 *C. albicans*는 광조사 시간을 달리한 VI - VIII군 간 통계적 유의성은 관찰되지 않았다(Fig. 2-4).

2. 공초점 레이저 주사 현미경 관찰

CLSM 관찰에서 초록색 형광은 살아있는 세균, 붉은색 형광은 죽은 세균을 나타낸다[15]. ICG와 diode 레이저를 여러 조건으로 처리한 I - VIII군의 항균 효과를 시각적으로 관찰할 수 있다(Fig. 5). CLSM으로 촬영한 바이오필름의 살아있는 세포와 죽어있는 세포의 colocalization 분석을 Pearson's correlation analysis를 시행하여 pixel distribution diagram인 산점도(scatter plot)로 그래프화 하였다(Fig. 6)[16]. Log CFU 분석에서 유의한 차이를 보이

Table 2. Multispecies bacterial counts

Group	Bacterial Count (Mean ± standard deviation, Log CFU/mL)		
	<i>S. mutans</i>	<i>L. casei</i>	<i>C. albicans</i>
I (control)	6.80 ± 0.08	6.40 ± 0.17	5.49 ± 0.11
II (ICG only)	6.76 ± 0.10	6.22 ± 0.10	5.45 ± 0.12
III (ICG -, L 10s)	6.73 ± 0.04	6.30 ± 0.05	5.43 ± 0.05
IV (ICG -, L 30s)	6.73 ± 0.20	6.38 ± 0.16	5.50 ± 0.13
V (ICG -, L 60s)	6.72 ± 0.15	6.31 ± 0.06	5.49 ± 0.17
VI (ICG +, L 10s)	6.45 ± 0.15*	5.72 ± 0.17*	5.11 ± 0.16*
VII (ICG +, L 30s)	6.32 ± 0.16*	5.67 ± 0.31*	4.85 ± 0.25*
VIII (ICG +, L 60s)	5.70 ± 0.15**	5.58 ± 0.37*	4.84 ± 0.17*

ICG : Indocyanine green, L : Light irradiation

* : statistically significant different with other groups, ** : statistically significant different with Group VI, VII

ρ : Kruskal-Wallis test & Bonferroni's post-hoc test

Table 3. Multiple comparisons of *Streptococcus mutans* bacterial counts

Group	I (control)	II (ICG only)	III (ICG-, L 10s)	IV (ICG-, L 30s)	V (ICG-, L 60s)	VI (ICG+, L 10s)	VII (ICG+, L 30s)	VIII (ICG+, L 60s)
I (control)								
II (ICG only)	1.000							
III (ICG-, L 10s)	1.000	1.000						
IV (ICG-, L 30s)	1.000	1.000	1.000					
V (ICG-, L 60s)	1.000	1.000	1.000	1.000				
VI (ICG+, L 10s)	0.030	0.012	0.029	0.036	0.038			
VII (ICG+, L 30s)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000		
VIII (ICG+, L 60s)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	

ρ values from Kruskal-Wallis test & Bonferroni's post-hoc test

ICG : Indocyanine green, L : Light irradiation

Table 4. Multiple comparisons of *Lactobacillus casei* bacterial counts

Group	I (control)	II (ICG only)	III (ICG-, L 10s)	IV (ICG-, L 30s)	V (ICG-, L 60s)	VI (ICG+, L 10s)	VII (ICG+, L 30s)	VIII (ICG+, L 60s)
I (control)								
II (ICG only)	1.000							
III (ICG-, L 10s)	1.000	1.000						
IV (ICG-, L 30s)	1.000	1.000	1.000					
V (ICG-, L 60s)	1.000	1.000	1.000	1.000				
VI (ICG+, L 10s)	0.000	0.003	0.000	0.000	0.038			
VII (ICG+, L 30s)	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	1.000		
VIII (ICG+, L 60s)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	

ρ values from Kruskal-Wallis test & Bonferroni's post-hoc test

ICG : Indocyanine green, L : Light irradiation

Table 5. Multiple comparisons of *Candida albicans* bacterial counts

Group	I (control)	II (ICG only)	III (ICG-, L 10s)	IV (ICG-, L 30s)	V (ICG-, L 60s)	VI (ICG+, L 10s)	VII (ICG+, L 30s)	VIII (ICG+, L 60s)
I (control)								
II (ICG only)	1.000							
III (ICG-, L 10s)	1.000	1.000						
IV (ICG-, L 30s)	1.000	1.000	1.000					
V (ICG-, L 60s)	1.000	1.000	1.000	1.000				
VI (ICG+, L 10s)	0.004	0.017	0.031	0.003	0.005			
VII (ICG+, L 30s)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.156		
VIII (ICG+, L 60s)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.117	1.000	

p values from Kruskal-Wallis test & Bonferroni's post-hoc test
ICG : Indocyanine green, L : Light irradiation

Table 6. Colony-forming unit count percentage of control group (%)

Group	Percentage of Bacterial Count (%)		
	<i>S. mutans</i>	<i>L. casei</i>	<i>C. albicans</i>
I (control)	100.00	100.00	100.00
VI (ICG +, L 10s)	6.95	20.92	43.23
VII (ICG +, L 30s)	34.45	21.17	25.48
VIII (ICG +, L 60s)	8.35	19.05	23.26

ICG : Indocyanine green, L : Light irradiation

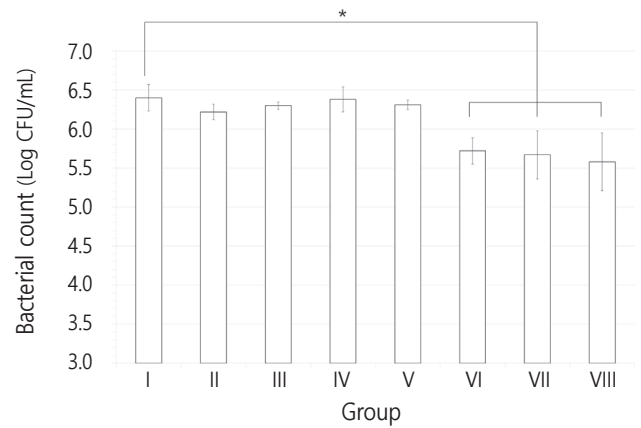


Fig. 3. Mean and standard deviation of *Lactobacillus casei* bacterial count.

* : $p < 0.05$

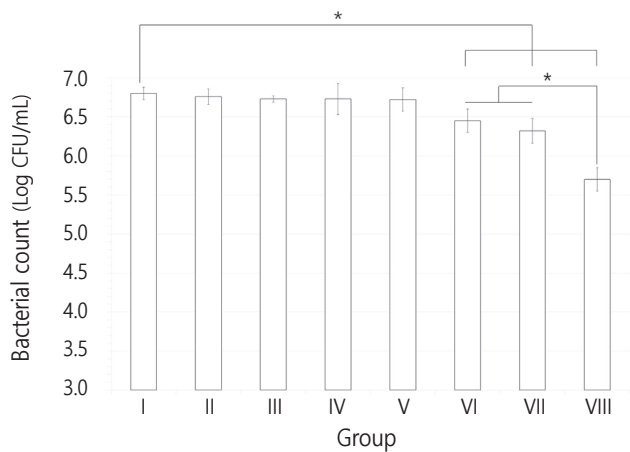


Fig. 2. Mean and standard deviation of *Streptococcus mutans* bacterial count.

* : $p < 0.05$

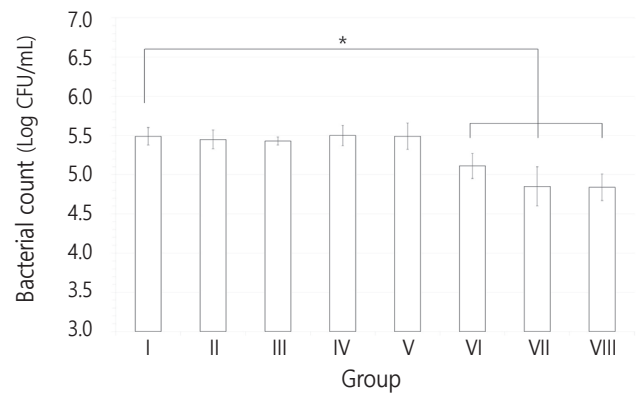


Fig. 4. Mean and standard deviation of *Candida albicans* bacterial count.

* : $p < 0.05$

Fig. 5. Confocal laser scanning microscopy images of Live/Dead cells in in-vitro cariogenic multispecies biofilm. (A) Group I (control), (B) Group II (ICG only), (C) Group III (ICG-, L 10s), (D) Group IV (ICG-, L 30s), (E) Group V (ICG-, L 60s), (F) Group VI (ICG+, L 10s), (G) Group VII (ICG+, L 30s), (H) Group VIII (ICG+, L 60s).

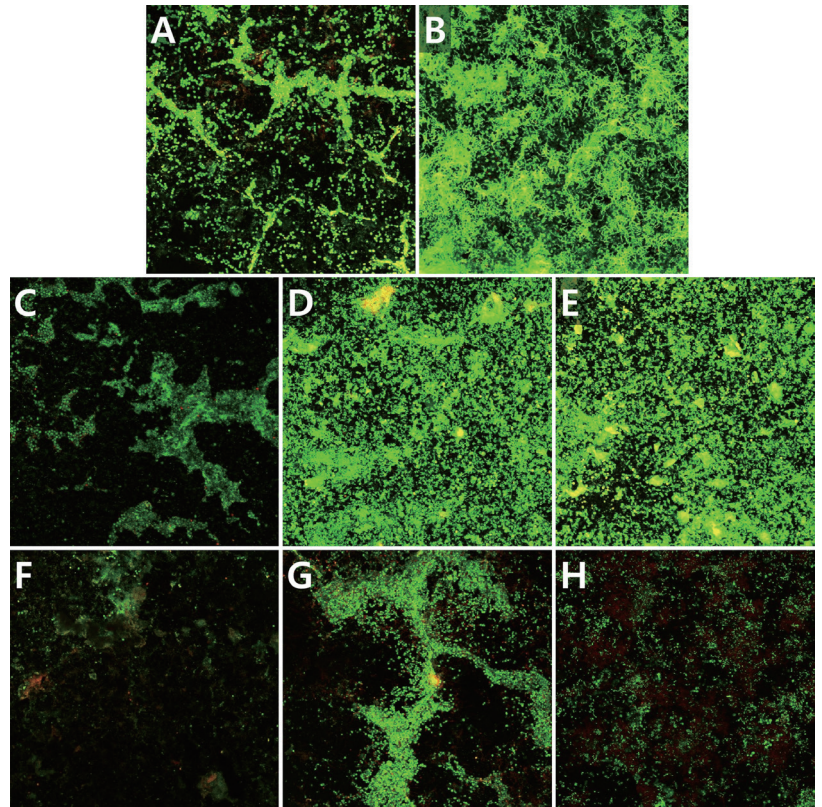
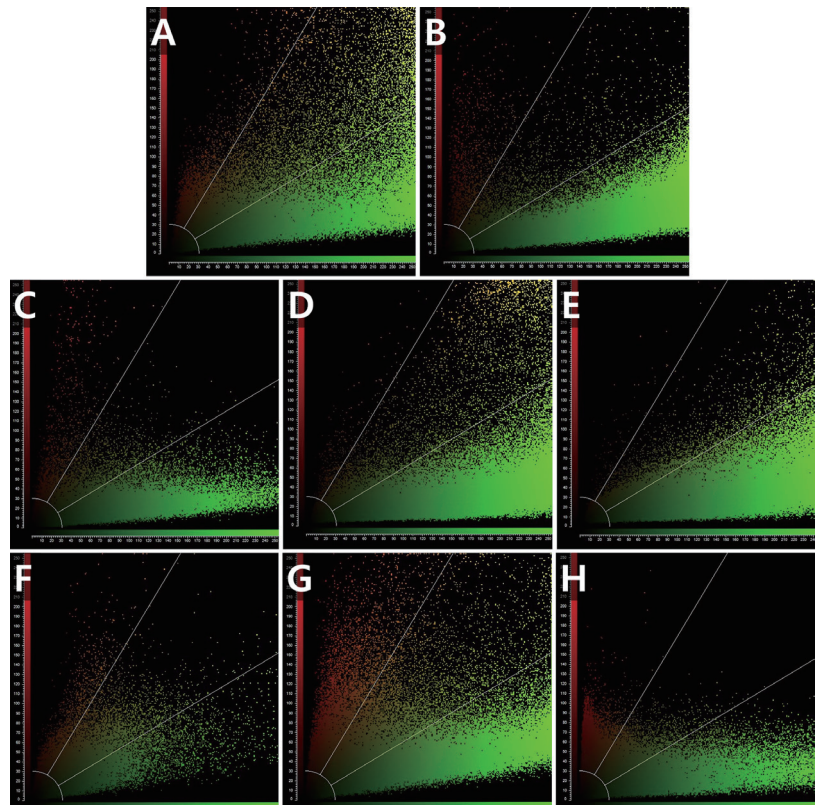


Fig. 6. Scatter plots of Live/Dead cells analysis. (A) Group I (control), (B) Group II (ICG only), (C) Group III (ICG-, L 10s), (D) Group IV (ICG-, L 30s), (E) Group V (ICG-, L 60s), (F) Group VI (ICG+, L 10s), (G) Group VII (ICG+, L 30s), (H) Group VIII (ICG+, L 60s).



지 않았던 I - V군은 유사하게 대부분 초록색 형광을 띄며, 살아있는 세포로 주로 구성되어 있다. 반면 ICG와 근적외선 diode 레이저를 사용한 VI - VIII군은 붉은색 형광의 죽은 세균의 비율이 늘어난 것을 확인할 수 있고, VI군보다도 VII, VIII군에서 더 높은 붉은색 형광의 비율이 관찰된다.

3. 바이오필름 표면 온도 측정

ICG와 근적외선 diode 레이저 조사 조건에 따른 바이오필름의 표면 온도를 측정하였다. 모든 시편들의 초기 온도는 동일하게 설정되었고 31.2°C로 측정되었다. 광조사를 시행한 III - VIII군에 대해 각각 표면 온도 및 온도 변화량을 Table 7에 정리하였고 그래프화 하였다(Fig. 7). ICG 없이 광조사한 III - V군보다 ICG와 함께 광조사를 시행한 VI - VIII군은 모두 상대적으로 온도가 높았으며, 평균 약 5.77°C 높은 온도 상승을 보였다. ICG 없이 60초 광조사한 V군보다도 ICG와 함께 10초 광조사한 VI군의 온도가 더 높았고, 가장 높은 온도 변화는 VIII군에서 13.8°C 상승하여 45°C로 측정되었다.

Table 7. Evaluation of biofilm surface temperature

Group	Temperature (°C)	Δ T (°C)
III (ICG -, L 10s)	35.3	4.1
IV (ICG -, L 30s)	36.5	5.3
V (ICG -, L 60s)	39.7	8.5
VI (ICG +, L 10s)	40.3	9.1
VII (ICG +, L 30s)	43.5	12.3
VIII (ICG +, L 60s)	45.0	13.8

Initial Temperature : 31.2°C
ICG : Indocyanine green, L : Light irradiation

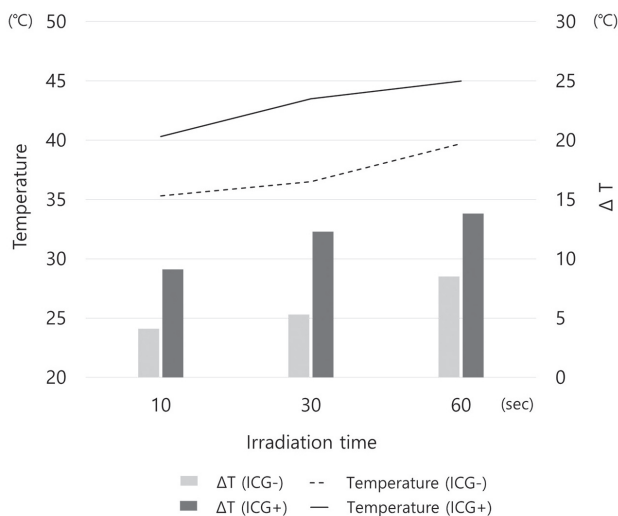


Fig. 7. Evaluation of biofilm surface temperature.

IV. 총괄 및 고찰

PDT를 적용할 때 광원은 광감각제를 활성화시킬 수 있는 파장 영역이어야 한다. 여러 조합의 광원과 광감각제가 연구되고 있으나 대부분 가시광선 영역의 광원이 사용되고 있다[17]. 이번 연구에서 사용된 근적외선 영역의 808 nm 파장을 갖는 diode 레이저는 높은 투과율을 가지며, ICG와 함께 이용되어 항균 목적으로 적용될 경우 깊은 부위의 치아 조직이나 상아세관까지 효과를 낼 수 있다는 장점을 갖는다[18].

이 연구의 결과에서 ICG와 함께 광원을 10초, 30초, 60초를 각각 적용한 모든 군에서 세균 수의 감소를 보였다($p < 0.05$). 그 중 *S. mutans*에 대해서는 10초, 30초와 60초 간에도 통계적으로 유의한 차이가 나타났으며, *L. casei*와 *C. albicans*는 조사 시간에 따른 유의성은 나타나지 않았으나 CFU값은 감소하는 경향성을 보였다.

그러나 가장 항균 효과가 높았던 VIII군에서의 CFU 값의 감소량은 *S. mutans*, *L. casei*, *C. albicans* 각각 약 1.10, 0.82, 0.65 Log CFU/mL로 이는 *S. mutans*, *Lactobacillus*종, *C. albicans*의 부유 상태의 단일 균주에 대해 각각 1.39, 1.10, 1.20 Log CFU/mL의 감소를 보고하였던 이전의 연구들보다 낮은 수치였다[12-14]. 앞선 연구들은 9 J 또는 10 J의 에너지를 사용했고, 이번 연구의 VIII군에서는 더 높은 에너지량인 18 J을 사용하였지만 절대적인 세균 감소 수는 더 적었다.

이에 대해 첫째, 이전의 연구들은 부유 상태의 세균에 대해 진행된 연구인 반면 이번 연구에서는 인공 바이오필름을 형성하여 실험을 진행하였다. 바이오필름 상태의 세균은 구조적으로 미생물들에 의해 생성된 glycoprotein과 polysaccharide의 matrix에 의해 캡슐화(encapsulated)되어있는 상태로 존재하며[19], 부유 상태의 세균에 비해 성장 속도, 활성화 정도, 유전자 발현 등 여러 가지 면에서 다르다고 알려져 있다[20,21]. 이런 바이오필름 상태의 세균은 부유 상태의 세균보다 항균 물질이나 숙주의 면역체계에 대한 저항성이 높고, 이는 PDT의 효과에도 낮은 감수성을 갖는다[22]. 둘째, 단일 세균으로 존재할 때 보다 다중 세균으로 이루어진 바이오필름의 경우 단일 세균의 바이오필름에 비해 두꺼운 두께와 구조의 복잡성 및 세균 간의 상호작용 때문에 항균 작용을 나타내는 치료에 저항성이 높다[23]. Teixeira 등 [24]은 TBO와 적색 LED를 이용한 PDT가 다중 세균의 바이오필름에 대해, 단일 세균의 바이오필름에 적용되었을 때 보다 낮은 항균 효과를 보고했고, Müller 등[25]의 연구에서 *S. mutans*, *C. albicans*를 포함하는 6종류의 세균으로 이루어진 다중 세균 바이오필름에 대해 단일 세균의 바이오필름에는 유의한 효과를 보였던 조건의 MB와 soft laser를 이용한 PDT가 세균 수의 감소에

있어서 유의한 효과를 나타내지 못했으며, 이 연구들은 이번 연구의 결과와 유사했다.

또한 *L. casei*와 *C. albicans*에 대해 조사 시간에 따라 유의한 차이가 발생하지 않은 결과에 대해서, 이전 Pereira 등[26]은 다중 세균 바이오필름에 대한 PDT 후 주사전자현미경(scanning electron microscopy)을 이용하여 분석한 결과 PDT의 세포 사멸 효과가 바이오필름의 표면에서 주로 일어난다고 하였고, O'Neill 등[27]은 CLSM을 이용한 연구에서 유사한 결과를 확인하였다. 이번 연구에서도 다중 세균의 바이오필름의 두께로 인해 광감각제인 ICG 희석액의 충분한 침투가 이루어지지 않아 광조사 시간이 증가했음에도 불구하고 유의한 효과 차이가 나타나지 않은 것으로 추측된다. 반면 이번 연구에서 *S. mutans*는 10초, 30초 광조사한 군에 비해 60초 광조사한 군에서 더 많은 세균 수의 감소를 보였다($p < 0.05$). Soria-Lozano 등[28]은 여러 종류의 세균에 대해 여러 광감각제를 이용한 PDT의 효과를 조사한 결과, 광감각제의 종류에 따라 각 세균에 대한 PDT의 효능이 상이하다고 하였고, 이번 연구의 결과를 토대로 ICG와 근적외선 diode 레이저가 *S. mutans*에 대한 효능이 *L. casei*와 *C. albicans*에 비해 상대적으로 높다고 추측할 수 있으나 이것을 명확히 하기 위해서는 추가적인 연구가 필요하다.

마찬가지로, CLSM 관찰에서도 ICG와 근적외선 diode 레이저를 함께 적용한 VI - VIII군에서 사멸된 세포를 나타내는 붉은색 형광의 눈에 띄는 증가가 관찰되었지만 살아있는 세균인 초록색 형광의 비율도 높은 것을 산점도 그래프를 통해 확인할 수 있고 (Fig. 6), 이는 이번 연구의 조건에서는 항균 효과가 다소 부족한 것으로 판단할 수 있다.

실제 구강 내에서의 다중 우식원성 세균으로 이루어진 바이오필름은 실험실 조건과는 상이하며, 이는 PDT를 적용할 때 적절한 사용 조건을 설정하는데 어려움을 준다[29]. 이 연구의 결과를 토대로, 더 많은 광원 에너지량이나 더 높은 광감각제의 농도, 적용 시간 등에 관한 실험실 및 생체내 연구가 필요하며, 이번 연구에서 사용된 조건에서 세균 수의 감소를 보였으나 American society of Microbiology에서 제시하는 항균력을 나타내는 수치인 3 Log CFU/mL에는 미치지 못하므로[30], 충분한 항균 효과를 낼 수 있는 적정 조건을 찾는 것이 실제 임상적인 사용을 위해 필수적이다.

열 치료(hyperthermia)는 이전부터 의과 영역에서 이용되어 왔으며, 종양 세포가 정상 세포보다 온도 상승에 민감하므로 암 치료에 좋은 효과를 갖는다[31]. 열 치료의 온도 범위는 약 40 - 43°C 사이이며 42°C는 암세포의 사멸에 충분하지만 정상 세포에는 유해한 작용이 없다고 알려져 있는데, 이는 정상 세포와 다른 암세포의 pH와 낮은 산소 수준, 단백질 변성 등에 의한 차이

로 인해 나타난다[32]. 또한 대부분의 정상 조직은 44°C 이하에서 30분보다 짧게 적용되는 열 치료에서 손상이 발생하지 않는다고 보고된다[5]. 이번 연구에서 근적외선 diode 레이저의 광조사, ICG를 포함하지 않은 III - V군보다 ICG를 포함한 VI - VIII군에서 세균 수가 더 많이 감소하였고, 상대적으로 더 높은 열 발생량을 보였으며, 각각 40.3, 43.5, 45°C까지 상승하는 것을 확인할 수 있었다. 이번 연구에서 사용된 조건에서 측정된 온도가 열 치료의 범위와 유사하며, 이를 통해 ICG와 근적외선 diode 레이저가 PTT의 효과가 있다고 판단할 수 있다.

V. 결 론

ECC와 연관된 *S. mutans*, *L. casei*, *C. albicans*를 포함하는 다중 우식원성 바이오필름에 대한 ICG와 근적외선 diode 레이저의 효과를 평가하였고, 3가지 군 모두에서 항균 효과를 보였다. 이를 통해 실제 임상에서 다중 세균으로 이루어진 바이오필름에도 우식 예방을 위한 보조 수단으로 사용될 수 있는 가능성을 제시한다.

Authors' Information

Myunghwan Kim <https://orcid.org/0000-0002-6157-8645>

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

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

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

Siyoung Lee <https://orcid.org/0000-0001-8826-1413>

References

1. Rkein AM, Ozog DM : Photodynamic therapy. *Dermatol Clin*, 32:415-425, 2014.
2. Konopka K, Goslingski T : Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res*, 86:694-707, 2007.
3. Srikanth K, Reddy C, Naveen A *et al.* : Effect of a single session of antimicrobial photodynamic therapy using indocyanine green in the treatment of chronic periodontitis: a randomized controlled pilot trial. *Quintessence Int*, 46:391-400, 2015.
4. Porta S, Salwitsch P, Korstako W, *et al.* : Detection and evaluation of persisting stress-induced hormonal disturbances by a post stress provocation test in humans. *Life Sci*, 53:1583-1589, 1993.
5. Giraudeau C, Mordon S, Frochot C, *et al.* : Indocyanine

- green: photosensitizer or chromophore? Still a debate. *Curr Med Chem*, 21:1871-1897, 2014.
6. Monzavi A, Bagherpasand O, Chiniforush N, *et al.* : Antimicrobial photodynamic therapy using diode laser activated indocyanine green as an adjunct in the treatment of chronic periodontitis: A randomized clinical trial. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 14:93-97, 2016.
 7. McNally KM, Gillings BR, Dawes JM : Dye-assisted diode laser ablation of carious enamel and dentine. *Aust Dent J*, 44:169-175, 1999.
 8. Hamada S, Slade HD : Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev*, 44:331, 1980.
 9. Byun R, Jacques NA, Hunter N, *et al.* : Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries. *J Clin Microbiol*, 42:3128-3136, 2004.
 10. de Carvalho FG, Spolidorio LC, Spolidorio DMP, *et al.* : Presence of *mutans streptococci* and *Candida* spp. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. *Arch Oral Biol*, 51:1024-1028, 2006.
 11. Thomas A, Jose D, Bajpai G, *et al.* : Association of oral *Candida albicans* with severe early childhood caries-a pilot study. *J Clin Diagn Res*, 10:109-112, 2016.
 12. Fekrazad R, Khoei F, Hakimiha N, Bahador A : Photoelimination of *Streptococcus mutans* with two methods of photodynamic and photothermal therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 10:626-631, 2013.
 13. Ahrari F, Ghazvini K, Emrani N, *et al.* : Antimicrobial photodynamic therapy of *Lactobacillus acidophilus* by indocyanine green and 810-nm diode laser. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 24:145-149, 2018.
 14. Azizi A, Lawaf S, Rahimi A, *et al.* : Effect of photodynamic therapy with two photosensitizers on *Candida albicans*. *J Photochem Photobiol B*, 158:267-273, 2016.
 15. Boulos L, Coallier J, Desjardins R, *et al.* : LIVE/DEAD® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J Microbiol Methods*, 37:77-86, 1999.
 16. Bolte S, Cordelieres FP : A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc*, 224:213-232, 2006.
 17. Gurosoy H, Ozeakir-Tomruk C, TanalpJ, Yilmaz S : Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. *Clin Oral Invest*, 17:1113-1125, 2013.
 18. Pirnat S : Versatility of an 810 nm diode laser in dentistry: an overview. *J Laser Health Acad*, 4:1-9, 2007.
 19. Ten Cate JM, Klis FM, De Groot PWJ, *et al.* : Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. *J Dent Res*, 88:105-115, 2009.
 20. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP : Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284:1318-1322, 1999.
 21. Wilson M : Bacterial biofilms and human disease. *Sci Prog*, 84:235-254, 2001.
 22. Schneider M, Krause F, Braun A, *et al.* : The impact of antimicrobial photodynamic therapy in an artificial biofilm model. *Lasers Med Sci*, 27:615-620, 2012.
 23. De Freitas MTM, Duarte S, Zanin ICJ, *et al.* : Effect of photodynamic antimicrobial chemotherapy on mono- and multi-species cariogenic biofilms: a literature review. *Photomed Laser Surg*, 35:239-245, 2017.
 24. Teixeira AH, Duarte S, Zanin ICJ, *et al.* : Effect of photodynamic antimicrobial chemotherapy on in vitro and in situ biofilms. *Caries Res*, 46:549-554, 2012.
 25. Müller P, Guggenheim B, Schmidlin PR : Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro. *Eur J Oral Sci*, 115:77-80, 2007.
 26. Pereira CA, Junqueira JC, Jorge AOC, *et al.* : Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study. *Lasers Med Sci*, 26:341-348, 2011.
 27. O'Neill JF, Hope CK, Wilson M : Oral bacteria in multispecies biofilms can be killed by red light in the presence of toluidine blue. *Lasers Surg Med*, 31:86-90, 2002.
 28. Soria-Lozano P, Revillo MJ, Rezusta A, *et al.* : In vitro effect photodynamic therapy with different photosensitizers on cariogenic microorganisms. *BMC Microbiol*, 15:187-194, 2015.
 29. Nagata JY, Baesso ML, Hayacibara MF, *et al.* : Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: evaluation of the photosensitizers used and light source properties. *Photodiagn Photodyn Ther*, 9:122-131, 2012.
 30. Cieplik F, Tabenski L, Buchalla W, Maisch T : Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens. *Front Microbiol*, 5, 405, 2014.
 31. Anghileri LJ, Robert J : Hyperthermia in cancer treatment (Vol. 2). *CRC Press*, 1986.
 32. Kuo WS, Chen SJ, Yeh CS, *et al.* : Near-infrared Au nanorods in photodynamic therapy, hyperthermia agents, and near-infrared optical imaging. *Proc. SPIE*, 7910:791009, 2011.

국문초록

Indocyanine Green을 이용한 광열 치료의 다중 우식원성 바이오필름에 대한 효과

김명환¹ · 박호원¹ · 이주현¹ · 서현우¹ · 이시영²

¹강릉원주대학교 치과대학 소아·청소년치과학교실 및 구강과학연구소

²강릉원주대학교 치과대학 미생물학 및 면역학교실

이 연구의 목적은 indocyanine green (ICG)과 근적외선 diode 레이저의 사용이 다중 우식원성 바이오필름에 미치는 항균 효과를 조사하는 것이다.

Streptococcus mutans, *Lactobacillus casei*, *Candida albicans*를 포함하는 다중 바이오필름이 ICG와 808 nm 근적외선 diode 레이저를 사용하여 서로 다른 조사 시간에 따라 처리되었다. Colony-forming unit (CFU)을 측정하였고, 바이오필름의 정성적 평가를 위해 공초점 레이저 주사 현미경(Confocal laser scanning microscopy, CLSM) 관찰을 시행하였다. 또한 광열 치료의 효과를 평가하기 위해 온도 측정이 시행되었다.

ICG와 근적외선 diode 레이저를 사용한 군에서 CFU의 감소량이 통계적으로 유의하였으나, *L. casei*와 *C. albicans*에서는 시간에 따른 항균 효과의 유의한 차이는 관찰되지 않았다. CLSM 관찰에서도 유사한 세균 감소를 확인할 수 있었다. ICG와 근적외선 diode 레이저를 사용한 군은 ICG 없이 광조사를 시행한 군보다 더 높은 온도 상승을 보였으며, 측정된 온도는 열 치료의 온도 범위와 유사하였다.

결론적으로, ICG와 근적외선 diode 레이저는 다중 우식원성 바이오필름에 항균 효과를 보였다. 우식 예방을 위한 보조 수단으로 사용될 가능성을 가지나, 임상적인 적용을 위해서는 적용 프로토콜에 관한 연구가 필요하다.