

Er:YAG 레이저 조사가 *Streptococcus mutans*의 증식억제에 미치는 효과

송광철 · 이창섭 · 이상호 · 이난영

조선대학교 치과대학 소아치과학교실

국문초록

Er:YAG 레이저의 구강내 산 생성 세균인 *S. mutans*에 대한 살균효과를 평가하기 위하여 *S. mutans* KCTC 3065가 포함된 세균배양액에 650 μ m 직경의 조사 beam을 갖는 Er:YAG 레이저를 비접촉식 방법으로, 조사세기(50mJ, 100mJ, 150mJ)와 pulse repetition rate(5Hz, 10Hz, 20Hz), 그리고 조사시간(1초, 3초, 5초)을 달리하여 조사하고 이때의 세균 배양액의 온도변화, 세균 균락수, 산 생성능, 불용성 세포외다당류의 양을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

10 μ l 세균 배양액에서는 레이저를 조사한 군이 레이저를 조사하지 않은 대조군에 비해 전반적으로 세균의 균락수가 감소되었으며 조사세기와 pulse repetition rate가 클수록, 그리고 조사시간이 길어질수록 세균 균락수가 비례하여 감소하는 경향을 보였다. 그러나 100 μ l 세균 배양액에서는 레이저를 조사하지 않은 대조군에 비해 세균 균락수의 변화가 적었다.

10 μ l 세균 배양액에서는 레이저 조사에 의해 *S. mutans*의 산 생성능이 일정시간 동안 억제되었으나 100 μ l 세균 배양액에서는 레이저를 조사하지 않은 대조군에 비해 산 생성능의 변화가 관찰되지 않았다. 10 μ l 세균 배양액에서는 레이저 조사에 의해 *S. mutans*의 불용성 세포외다당류의 합성이 부분적으로 감소되었으나 100 μ l 세균 배양액에서는 변화가 관찰되지 않았다.

이와 같은 사실에 근거해 볼 때 레이저는 *S. mutans*에 대한 증식억제효과를 가지고 있으며 그 기전은 초음파 등에 의한 기계적 작용이 아닌 열작용에 의한 것임을 추정해 볼 수 있다.

주요어 : Er:YAG 레이저, *Streptococcus mutans*

I. 서 론

치아우식증은 만성적인 침습성 질환으로 탈회라는 과정을 통하여 치질이 서서히 파괴되는 질환이다. 이와 같은 탈회과정은 구강내 상주하는 세균의 대사산물인 산을 통하여 유발되는데, 구강내 산을 발생시키는 세균으로는 *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sorbinus*, *Lactobacillus casei*, 그리고 *Actinomyces viscosus* 등이 알려져 있다.

따라서 치아우식증을 예방하는 방법으로 치질을 탈회시키는 직접적인 원인인 병원체 요인을 차단하는 측면에서, 구강내 세균의 집락인 치태(dental plaque) 제거하는 것이 가장 효과적인 방법으로 알려져 있으며¹⁾ 최근에는 치태의 생성을 억제하거나 분해하여 우식증을 예방하고자 하는 시도가 이루어지고 있다²⁻⁵⁾.

그의 치아우식증을 예방하는 방법으로 불소제재 사용, 치면 열구전색, 우식억제제 사용 등 현재까지 여러 가지 방법들이 소개되어 왔는데^{3,6,7)}, 그 중에서도 불소제재는 가장 오래전부터 사용되어 온 효과적인 방법이긴 하나 제재 자체의 불안전성, 광량

섭취시 반상치, 골 형성장애 및 골다공증 유발 등 몇가지 문제점을 가지고 있다⁸⁾.

근래에는 레이저를 조사하여 치면의 물리화학적 특성을 변형 시킴으로써 치아우식증을 예방하는 방법이 소개되었다. 1965년 Stern과 Sognnaes⁹⁾가 루비 레이저를 이용한 치아 법랑질의 내산성 증가를 보고한 이래 Lobene 등¹⁰⁾은 이산화탄소 레이저를, Goodman과 Kaufman¹¹⁾은 아르곤 레이저를, 그리고 Yamamoto와 Sato¹²⁾는 Nd:YAG 레이저를 이용하여 내산성의 증가를 보고한 바 있다. 또한 Tagomori와 Morioka¹³⁾, 국내에서 이와 이¹⁴⁾, 손과 이¹⁵⁾가 레이저를 사용해 치면에서의 불소의 침투를 증가시키고자 하는 시도가 있었다.

또한 레이저를 직접 세균에 조사하여 치아우식증을 예방하려는 시도도 이루어지고 있는데, Hooks 등¹⁶⁾은 CO₂ 레이저의 살균효과에 대해 보고한 바 있다. Stabholz 등¹⁷⁾은 엑시머 레이저를 조사하여 *S. mutans*의 생존율을 감소시켰다고 하였으며 이를 이용하여 근관내 살균이 가능하다고 하여 레이저의 근관치료 분야에서의 사용 가능성에 대해 보고하였다. Burns 등¹⁸⁾은 He-Ne 레이저의 구강내 산생성 세균에 대한 항균작용에 대해

보고한 바 있으며 Schulze 등¹⁹⁾은 Nd:YAG 레이저로 구강내 세균인 *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia Coli*를 살균하였다고 보고하였다. Wilson²⁰⁾은 He-Ne 레이저나 GaAs 레이저 등의 저출력 레이저도 역시 *Streptococcus sanguis*, *Fusobacterium nucleatum* 등의 세균에 살균효과가 있다고 하였으나 Burn 등²¹⁾은 He-Ne 레이저나 GaAs 등의 저출력 레이저는 *S. mutans*, *S. sobrinus*, *Lactobacillus casei* 등의 구강내 산 생성 세균에게는 효과가 없다고 하여 상반된 보고를 하였다.

이와 같은 레이저의 세균에 대한 살균 혹은 항균 작용은 광열 작용, 광화학작용, 광기계작용 등 여러 가지 기전으로 추정하고 있지만 레이저의 종류 또는 세균에 종류에 따른 효과는 다양하게 보고되고 있다. 그러나 레이저의 파장과 세균의 세포의 화학적 조성사이의 상호작용이 살균효과를 좌우하는 중요한 요인으로 추정되고 있다.

치아우식증의 치료는 연화된 우식 상아질의 제거가 우선적으로 시행되어야 하는데, 이 과정에서 감염된 우식치질을 충분히 제거하지 않으면 세균에 의해 재 감염되어 이차적인 우식을 유발하는 계기를 제공하게 된다. 현재까지 치질의 제거에 가장 효과적이라고 알려진 Er:YAG 레이저의 구강내 산생성 세균에 대한 살균효과에 관한 연구가 미진한 편이다. Er:YAG 레이저에 의한 치질제거시 감염된 상아질에 존재하는 세균을 억제할 수 있다면 이차 치아우식증의 예방에 효과가 있다고 사료되며 치질 삭제에 가장 효과적인 Er:YAG 레이저를 직접 치태에 조사하여 세균의 증식 억제효과를 발휘할 경우 치아삭제 뿐만 아니라 치아우식증 예방분야에도 활용될 가능성이 크다고 하겠다.

따라서 본 연구는 Er:YAG 레이저의 구강내 산생성 세균인 *S. mutans*에 대한 증식억제효과를 평가하는데 그 목적이 있다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 레이저

파장 2940nm, 최대출력 15W, pulse repetition rate의 범주가 2-50Hz인 Er:YAG 레이저(Fidels Plus®, Model 21-1AF, Fotona, Slovenia)를 사용하였다(Fig. 1). 이때 사용한 handpiece는 비접촉 조사방식의 RO2 model (Fotona, Slovenia)을 사용하였으며 초점거리는 7mm로 조정하였다. 레이저의 광 전달계는 articulated arm 형태였다.

2) 세 균

한국 생명공학연구소 유전자원센터 유전자은행 (Korean Collection for Type cultures, Daejeon, Korea)에서 분양받은 *Streptococcus mutans* KCTC 3065을 사용하였다.



Fig. 1. Er:YAG laser(Fidels Plus®, Model 21-1AF, Fotona, Slovenia) used in this study.

2. 실험방법

1) 세균배양 및 배지준비

각각의 세균은 Brain heart infusion (BHI) broth 또는 BHI agar plate에서 37°C 탄산가스 배양기에서 배양하여 사용하였으며, 산 생성능 변화 및 세포외다당류 합성능 실험을 위해서는 BHI broth에 5% Yeast extract와 10% 자당이 함유된 배지(BHI-YS)에서 배양하였다.

2) 레이저 조사에 따른 세균 배양액의 온도변화 측정

2.94μm 파장의 pulsed Er:YAG 레이저로 조사조건을 다음과 같이 달리하여 각각 조사하였다. 레이저 조사는 비접촉식 방법으로 조사하였으며 조사 beam의 직경은 650μm였다. 조사세기는 pulse당 50mJ, 100mJ, 150mJ로 조사하였으며 이때 pulse repetition rate는 5Hz, 10Hz, 20Hz의 세 종류를 사용했다. 또한 조사시간은 각각 1초, 3초, 5초로 하였으며 세균 배양용액의 부피는 10μl와 100μl로 하여 조사하였다.

이때 세균배양액의 온도변화를 95°C까지(정확도: 0.5°C ± 0.5%) 측정할 수 있으며 needle type probe가 부착된 디지털 온도계(Model # 310, Corning Inc., U.S.A.)를 사용하여 0.1°C 단위로 측정하였다.

3) Er:YAG 레이저 조사의 *S. mutans* KCTC 3065에 대한 생존을 평가

레이저 조사에 따른 *S. mutans* KCTC 3065의 살균효과를 알아보기 위하여 실험 2)에서 기술한 3가지 조사조건의 각 조합별로 각각 12회씩 레이저를 조사하였다.

레이저를 조사한 후 각각의 세포배양액을 6,000배 희석하여

bacitracin이 함유된 BHI agar plate에 도말하여 37℃ 탄산가스 배양기에서 48시간 배양하였다. 배양후 agar plate에 자라난 균락의 수를 측정하였으며 레이저를 조사하지 않은 대조군의 균락 수를 100CFU로 조정하여 상대적인 균락 수를 비교하였다.

4) Er:YAG 레이저 조사가 *S. mutans* KCTC 3065의 산 생성능에 미치는 영향에 관한 평가

Er:YAG 레이저의 조사가 *S. mutans* KCTC 3065의 산 생성능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 레이저를 조사하지 않은 경우를 대조군으로 하고, 조사조건을 100mJ, 10Hz, 3sec로 하여 레이저를 조사한 경우를 실험군으로 분류하였다. 배양 용액의 부피는 10μl와 100μl 2가지를 사용하였으며 pH는 7.0으로 조절하였다.

상기의 조건으로 Er:YAG 레이저를 조사한 후 이들을 BHI broth에 5% Yeast extract와 10% 자당이 함유된 배지에서 24시간 동안 배양하면서 세균 배양액의 수소이온농도지수를 pH electrode(Model 91-5/06, Orion Research Inc., U.S.A.)와 pH meter(Model 920, Orion Research Inc., U.S.A.)를 이용하여 3시간, 6시간, 12시간, 그리고 24시간 후의 산 생성 정도를 측정하였다.

5) Er:YAG 레이저 조사가 *S. mutans* KCTC 3065의 불용성 세포외다당류 합성에 미치는 영향 평가

Er:YAG 레이저의 조사에너지, pulse repetition rate, 그리고 조사시간이 *S. mutans* KCTC 3065의 불용성 세포외다당류 합성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 레이저를 조사하지 않은 군을 대조군으로 하고, 조사조건을 상기의 2)항과 같이 하여 레이저를 조사한 경우를 실험군으로 하여 불용성 세포외다당류인 글루칸의 양을 측정하였다. 배양 용액의 부피는 10μl와 100μl의 2가지를 사용하였다.

각각의 조건에서 Er:YAG 레이저를 조사한 후 이들을 600μl의 BHI broth에 5% Yeast extract와 10% 자당이 함유된 배지에서 24시간 배양한 다음 불용성 세포외다당류를 정량하였다. 이를 위해 우선 세균배양액을 5,000×g에서 15분간 원심분리하여 세균 pellet을 얻고, 이를 1ml의 1 PBS로 세척한 다음 이를 다시 위와 같은 조건에서 원심분리하여 상청액은 버리

고, 세균 pellet만을 얻는다. 이러한 세척 과정을 1회 반복한 다음 0.4ml의 0.5N NaOH를 넣고 실온에서 90분간 방치한 다음 5,000×g에서 15분간 원심분리하여 상청액 0.2ml를 새로운 eppendorf tube로 옮기고, 여기에 0.1ml의 1N HCl를 넣어 상청액을 중화시킨다. 여기에 0.9ml의 메탄올을 넣고 5,000×g에서 10분간 원심분리하여 상청액은 버리고, pellet를 0.4ml의 Sulfuric acid/Water(5:1)에 녹인다. 이중에서 0.1ml을 0.1ml의 0.5% phenol과 즉시 섞은 다음 0.5ml의 고농도 황산을 넣고 즉시 교반한 다음 실온에서 20분간 반응시키고, 495nm 파장에서 흡광도 (A₄₉₅)를 측정하였다.

III. 실험 성적

1. Er:YAG 레이저 조사에 의한 세균 배양액의 온도상승

100μl 세균배양액의 온도상승은 50mJ, 5Hz, 1sec 조사에서 2.0℃ 상승하였으며 최대 에너지인 150mJ, 20Hz, 5sec에서 6.8℃ 상승하였다. 또한 10μl 세균배양액의 온도상승은 50mJ, 5Hz, 1sec 조사에서 6.2℃ 상승하였으며 최대에너지인 150mJ, 20Hz, 5sec에서 45.3℃ 상승하였다.

전반적으로 조사에너지, pulse repetition rate, 그리고 조사시간이 커질수록 이에 비례하여 온도가 상승하였다(Table 1).

2. Er:YAG 레이저 조사에 의한 *S. mutans* KCTC 3065의 생존율 평가

10μl의 세균 배양액에서는 레이저를 조사하지 않은 상태의 세균 균락수를 100CFU로 하여 상대적으로 평가하였는데, 레이저의 조사세기가 커질수록, 조사시간이 길어질수록 세균 균락수가 감소되었다. 그러나 pulse repetition rate에 따른 변화는 50mJ 조사군을 제외한 100mJ과 150mJ에서는 큰 차이가 없었다(Fig. 2-4).

100μl의 세균 배양액에서는 레이저를 조사하지 않은 경우 보다 세균 균락수가 증가하는 경향을 보였으며 특히 조사세기에 관계없이 10Hz 이상에서 5초간 조사한 경우는 유의할 만한 증가를 보였다(Fig. 5-7).

Table 1. Mean temperature(°C) rise of BHI broth during Er:YAG laser irradiation

		50mJ			100mJ			150mJ		
		1sec	3sec	5sec	1sec	3sec	5sec	1sec	3sec	5sec
10μl	5Hz	6.2±2.4	13.2±3.2	25.7±2.5	8.1±0.7	16.8±1.5	27.3±2.4	12.7±3.0	20.3±2.8	34.3±3.0
	10Hz	8.7±2.2	15.2±1.9	29.1±2.5	11.1±1.8	19.5±1.8	32.5±1.9	15.3±2.0	26.9±2.3	38.5±2.5
	20Hz	11.9±1.9	20.3±1.2	33.3±3.2	14.7±2.2	33.1±1.7	39.3±1.9	18.2±2.3	40.7±3.0	45.3±2.7
100μl	5Hz	2.0±0.2	2.2±0.3	2.5±0.2	2.8±0.3	3.1±0.3	3.4±0.3	3.5±0.4	3.7±0.4	3.9±0.4
	10Hz	4.0±0.5	4.1±0.6	4.2±0.5	4.5±0.4	4.4±0.5	4.8±0.6	4.5±0.5	4.8±0.7	5.0±0.7
	20Hz	4.5±0.4	4.3±0.6	4.9±0.4	4.8±0.3	5.0±0.6	5.3±0.7	5.2±0.5	5.7±0.8	6.8±0.8

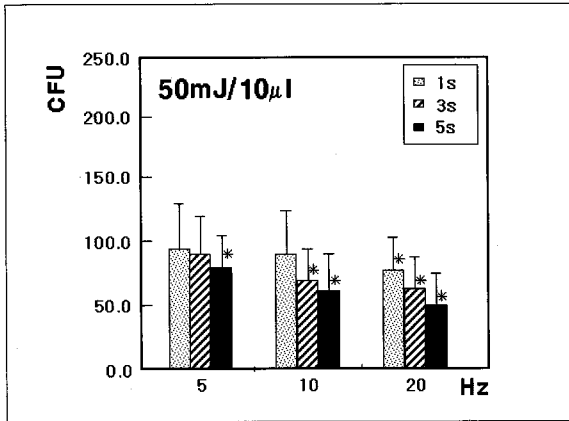


Fig. 2. Bacteriocidal effects of the Er:YAG laser for exposure time, pulse repetition rate and irradiation energy(50mJ) in 10µl BHI broth. Asterisk(*) means the significant (P<0.05) difference from the control group(100.0 CFU).

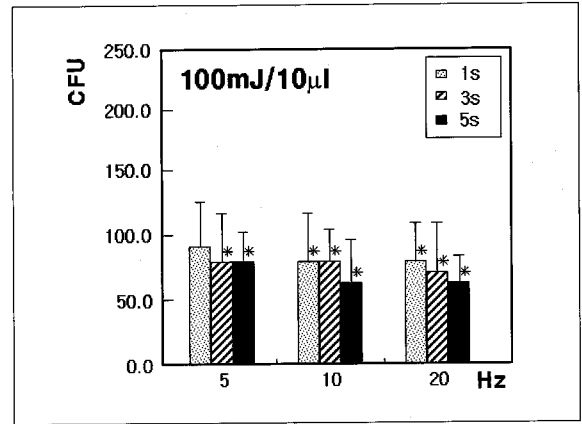


Fig. 3. Bacteriocidal effects of the Er:YAG laser for exposure time, pulse repetition rate and irradiation energy (100mJ) in 10µl BHI broth. Asterisk(*) means the significant (P<0.05) difference from the control group (100.0 CFU).

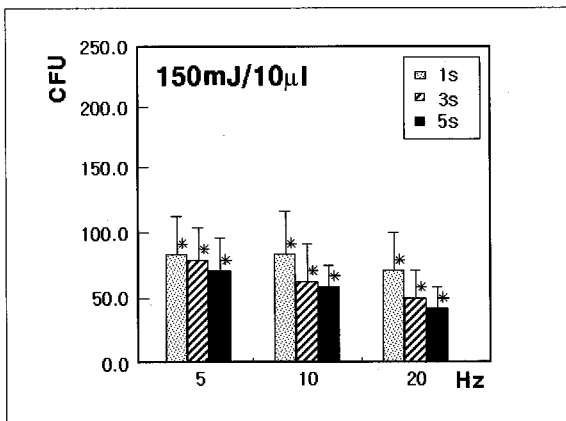


Fig. 4. Bacteriocidal effects of the Er:YAG laser for exposure time, pulse repetition rate and irradiation energy (150mJ) in 10µl BHI broth. Asterisk(*) means the significant (P<0.05) difference from the control group (100.0 CFU).

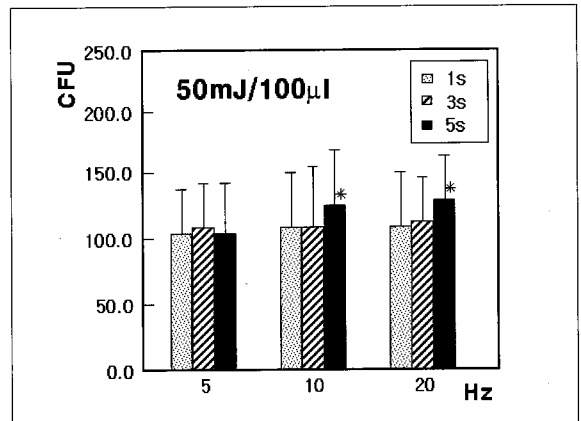


Fig. 5. Bacteriocidal effects of the Er:YAG laser for exposure time, pulse repetition rate and irradiation energy (50mJ) in 100µl BHI broth. Asterisk(*) means the significant (P<0.05) difference from the control group (100.0 CFU).

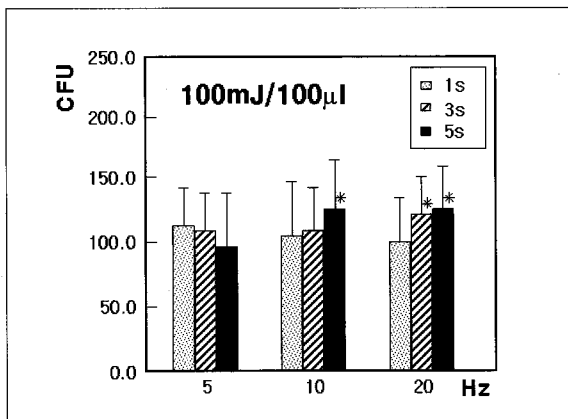


Fig. 6. Bacteriocidal effects of the Er:YAG laser for exposure time, pulse repetition rate and irradiation energy (100mJ) in 100µl BHI broth. Asterisk(*) means the significant (P<0.05) difference from the control group (100.0 CFU).

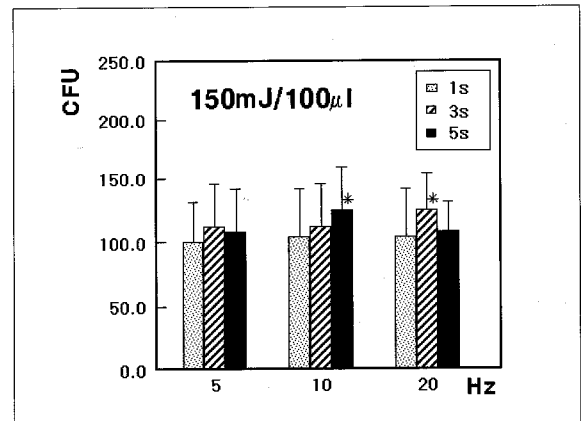


Fig. 7. Bacteriocidal effects of the Er:YAG laser for exposure time, pulse repetition rate and irradiation energy (150mJ) in 100µl BHI broth. Asterisk(*) means the significant (P<0.05) difference from the control group (100.0 CFU).

3. Er:YAG 레이저조사가 *S. mutans* KCTC 3065의 산 생성능에 미치는 영향

10 μ l의 세균 배양액의 경우 레이저를 조사하지 않은 대조군에 비해 10mJ, 10Hz, 3sec로 레이저를 조사한 실험군이 3시간, 6시간, 12시간에서 pH가 통계학적으로 유의하게 ($P < 0.05$) 높게 관찰되었다(Fig. 8). 그러나 24시간 경과 후 대조군의 pH는 4.2, 실험군의 pH는 4.3으로 양 군간의 차이가 없었다.

100 μ l의 세균 배양액의 경우 시간 경과에 따른 대조군과 실험군 사이에 pH는 유의한 차가 없었다.

4. Er:YAG 레이저 조사가 *S. mutans* KCTC 3065의 불용성 세포외다당류 합성에 미치는 영향

10 μ l의 세균 배양액의 경우 레이저를 조사하지 않은 대조군

의 경우 24시간 경과 후 1마리 당 500.0 μ g/600 μ l의 불용성 세포외다당류를 생성하였으며 50mJ의 조사세기로 레이저를 조사한 경우는 450-550 μ l 불용성 세포외다당류를 생성하였으나 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 차이를 보이지는 않았다(Fig. 10). 그러나 100mJ과 150mJ의 세기로 조사한 군은 20Hz의 pulse repetition rate에서 3초 이상 조사하였을 때 불용성 세포외다당류의 생성이 유의하게 감소되었다(Fig. 11, 12).

100 μ l의 세균 배양액의 경우 레이저를 조사하지 않은 대조군의 경우 24시간 경과 후 1마리 당 500.0 μ g/600 μ l의 불용성 세포외다당류를 생성하였으며 50mJ과 100mJ의 세기로 레이저를 조사한 군은 대조군에 비해 유의할 만한 불용성 세포외다당류의 증감이 관찰되지 않았다(Fig. 13, 14). 그러나 150mJ의 세기로 조사한 경우 20Hz, 3초와 20Hz, 5초로 조사한 군에서 불용성 세포외다당류의 유의할만한 증가가 관찰되었다(Fig. 15).

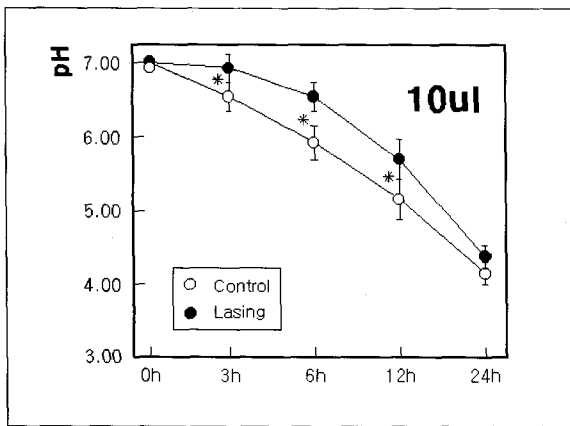


Fig. 8. pH changes in 10 μ l BHI-YS broth after laser irradiation. Asterisk(*) means the significant ($P < 0.05$) difference between the control and the experimental group.

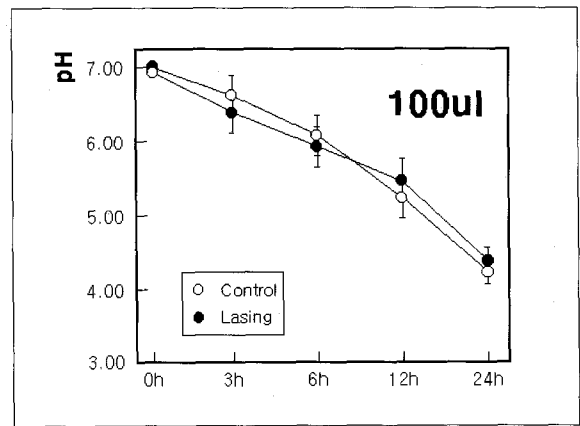


Fig. 9. pH changes in 100 μ l BHI-YS broth after laser irradiation.

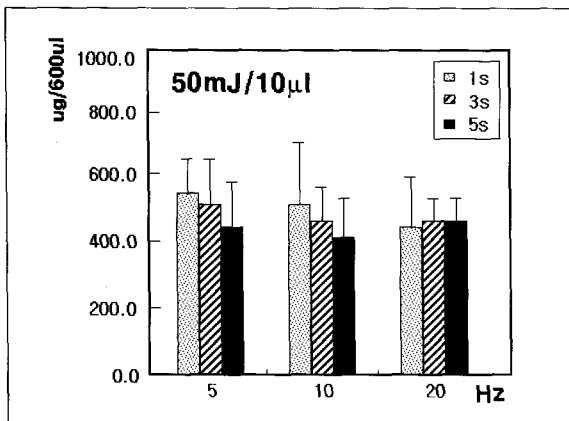


Fig. 10. Comparison of extracellular polysaccharide production as function of exposure time, pulse repetition rate in 10 μ l BHI-YS broth by irradiation energy of 50mJ.

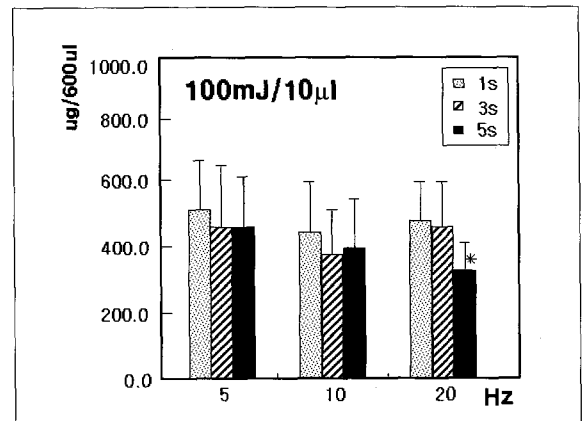


Fig. 11. Comparison of extracellular polysaccharide production as function of exposure time, pulse repetition rate in 10 μ l BHI-YS broth by irradiation energy of 100mJ. Asterisk(*) means the significant ($P < 0.05$) difference from non-lasing group.

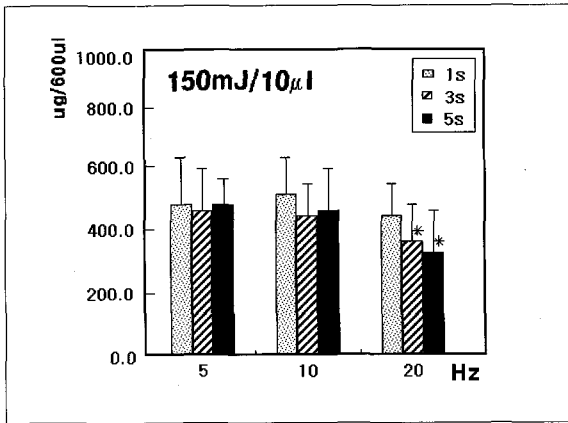


Fig. 12. Comparison of extracellular polysaccharide production as function of exposure time, pulse repetition rate in 10% BHI-YS broth by irradiation energy of 150mJ. Asterisk(*) means the significant (P<0.05) difference from non-lasing group.

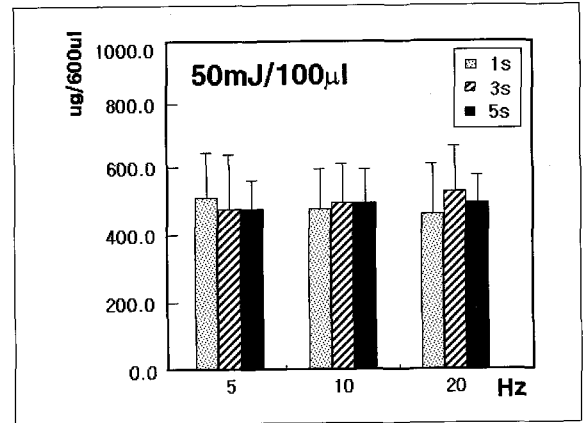


Fig. 13. Comparison of extracellular polysaccharide production as function of exposure time, pulse repetition rate in 10% BHI-YS broth by irradiation energy of 50mJ.

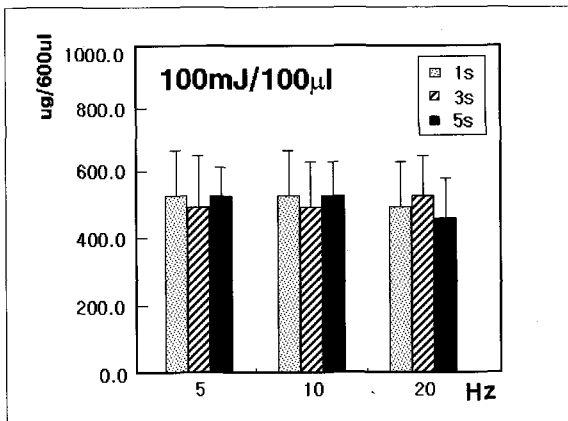


Fig. 14. Comparison of extracellular polysaccharide production as function of exposure time, pulse repetition rate in 100% BHI-YS broth by irradiation energy of 100mJ.

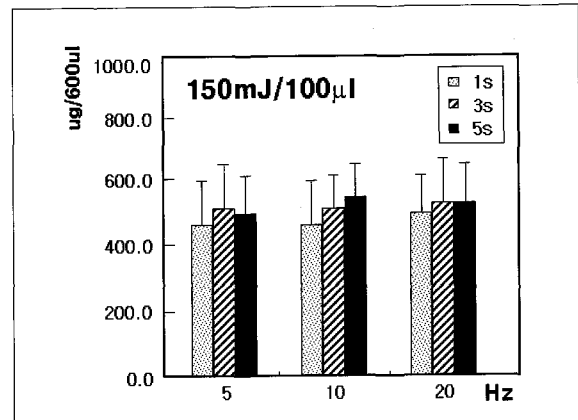


Fig. 15. Comparison of extracellular polysaccharide production as function of exposure time, pulse repetition rate in 10% BHI-YS broth by irradiation energy of 150mJ.

IV. 총괄 및 고찰

레이저의 특성을 좌우하는 가장 중요한 요소는 파장인데, 세균에 대한 작용 역시 레이저 파장의 세균에 대한 흡수율이라 할 수 있다. 이외에도 세균에 영향을 줄 수 있는 레이저의 조사조건으로 출력 혹은 조사에너지, pulse repetition rate, 조사시간, 조사광의 직경 등을 들 수 있으며 생물학적 요인으로는 세균의 색, 열전도율, 수분의 함량, 유기물의 함량, 그리고 세균집락의 밀도 등을 들 수 있다.¹⁹⁾

레이저의 세균에 대한 조사 효과에 대해 여러 연구, 보고가 있었는데 대부분이 Nd:YAG, Er:YAG, CO₂, 아르곤 레이저 등 고출력 레이저를 대상으로 하였으며²²⁻²⁵⁾ 일부 연구에서는 He-Ne, Diode 레이저 등의 저출력 레이저의 조사 효과에 대해 보고하고 있다.²⁶⁻²⁸⁾

레이저를 구강내 세균에 조사하는 목적은 *S. mutans*, *S.*

sobrinus, *Lactobacillus casei*, 그리고 *A. viscosus* 등 산 생성 세균을 억제하여 치아우식증을 예방하거나 감염된 우식치질을 제거시 주변치질을 살균하여 이차우식의 방지^{17, 20, 28, 29)}, *Actinobacillus actinomycetem comiyans*, 그리고 *Porphyromonas gingivalis*, *S. sanguis* 등 치주낭 등에 분포되어 있으며 치주질환을 유발하는 세균의 증식을 억제^{20, 22)}, 그리고 근관 내부 살균^{17, 23-25, 31)}, 기구 등의 소독¹⁶⁾ 등 크게 몇 가지로 분류할 수 있으나 그 중에서도 근관내 세균의 살균목적에 대한 연구가 많이 이루어지고 있으며 실제 임상적으로 상당한 효용성이 있는 것으로 평가되고 있다.

고출력 레이저의 조사시 세균의 생존이나 대사작용의 변화를 초래하는 광학적 요인으로 광열작용, 광기계작용, 광화학작용 등을 들 수 있다. 그러나 반도체 레이저, He-Ne 레이저 등 저출력 레이저의 경우 광화학적 작용에 의해 세균의 생존에 영향을 미친다고 보고되고 있다^{20, 28)}. 이중 광기계적 작용은 주로 초

음파발생에 의한 세균 세포막 혹은 세포성분의 파괴를 초래하며 광화학작용은 빛을 흡수하는 조직성분에 흡수된 후 조직내 산소에 작용하여 자유기(free radical)를 형성하고 이 자유기가 세균 대사의 방해와 세포막 지방질의 과산화를 초래하므로써 살균효과를 나타내게 된다^{20,32,33}.

본 연구에서는 레이저의 살균작용의 여부와 그 기전을 규명하고자 하였으며 이를 위해 2가지 량의 세균 배양액을 사용하였다. 10 μ 배양액의 경우 레이저를 조사할 경우 조사세기나 조사시간이 길어질 경우 세균 배양액이 완전히 증발되었으며 최저 6.2 $^{\circ}$ C에서 최고 47.3 $^{\circ}$ C 온도 상승이 초래되었다. 이는 온도상승에 의해 배양액이 증발되면서 기화작용에 의해 열을 빼앗기므로써 온도계의 sensor에는 큰 영향을 끼치지 못한 것으로 사료되나 실제 증발후의 고형의 배양물의 온도는 이보다 훨씬 상승되었을 것으로 사료된다. 따라서 10 μ 세균 배양액에서는 광열작용에 의한 세균 증식억제효과 여부를 평가하고자 하였다.

100 μ 의 세균 배양액의 경우 레이저를 조사할 경우 2.0 $^{\circ}$ C-6.8 $^{\circ}$ C의 온도 상승을 보이므로써 온도상승에 의한 살균효과를 기대하기 어렵다. 그러나 만일 이 경우에도 살균효과가 있었다면 이는 레이저의 광열작용이 아닌 광기계작용이나 광화학작용에 의한 것이라고 추정해 볼 수 있다. 그러나 *S. mutans*는 빛 감응 물질을 가지고 있지 않다고 알려져 있기 때문에³⁹ 낮은 온도에서 세균의 증식억제가 있을 경우 광기계적 작용, 즉 초음파 발생에 의한 살균효과를 가지고 있음을 추정해 볼 수 있다.

그러나 100 μ 의 배양액의 경우 레이저를 조사할 경우 대조군에 비해 세균 수의 변화가 없거나 오히려 증가하는 현상이 관찰되었다. 2-6 $^{\circ}$ C의 온도 상승이 세균의 증식을 유도한다고 생각되어 진다(Fig. 5-7).

세균의 산 생성능을 평가하기 위해 24시간 동안 세균 배양액의 pH를 측정할 결과 시간이 경과되면서 pH가 감소되어 24시간 후에는 레이저의 조사여부 및 세균배양액의 양에 관계없이 4.2-4.5까지 떨어지는 결과를 보여주고 있다(Fig. 8, 9). 10 μ 세균 배양액의 경우 3시간, 6시간, 12시간에는 레이저를 조사한 실험군이 조사하지 않은 대조군에 비해 더 높은 pH를 보이므로써(P<0.05) 산 생성 능력이 일정시간 저하되어 있음을 보여주고 있으나 24시간 후에는 대조군과 차이를 보이지 않으므로써 12시간 이후에 산 생성 능력이 점차 회복됨을 알 수 있었다. 그러나 100 μ 세균 배양액의 경우 대조군과 실험군간의 시간 경과에 따른 pH의 차이가 없었는데, 이는 2-6 $^{\circ}$ C사이의 온도 상승은 *S. mutans*의 산 생성능에 아무런 변화도 초래하지 못한다는 사실을 알 수 있었다(Fig. 9).

이와 같은 연구결과에 비추어 볼 때 레이저를 조사할 경우 일정하고 이상의 온도상승이 초래되면 *S. mutans*의 산 생성능력이 저하되며 또한 일정시간이 경과된 후에는 점차적으로 산 생성 능력이 회복된다는 사실을 알 수 있었다.

*S. mutans*의 virulency를 좌우하는 또 다른 요소가 치면에 대한 부착능인데 이와 같은 부착능은 글루칸 같은 불용성 세포 외다당류의 합성을 통해 이루어진다. 따라서 본 연구에서는 레

이저 조사에 의한 불용성 세포외다당류 생성에 대한 대사능력 변화여부를 관찰하므로써 치아우식증을 유발하는 virulency에 대한 변화가 있는지를 평가하고자 하였다.

10 μ 세균배양액의 경우 40 $^{\circ}$ C 전후까지 온도상승이 유발된 100mJ, 20Hz, 5초군과 150mJ, 20Hz, 3초군과 150mJ, 20Hz, 5초군에서 불용성 세포외다당류 생성이 300-400 μ g/600 μ 로 레이저를 조사하지 않은 대조군에 비해 100-200 μ g/600 μ 감소되었다(Fig. 10-12). 100 μ 세균배양액의 경우 대조군과 실험군간의 불용성 세포외다당류 생성의 차이가 없었다(Fig. 13, 14, 15). 이와 같은 결과로 볼 때 레이저 조사에 의한 *S. mutans*의 불용성 세포외다당류 생성능에 대한 영향은 산 생성능에 미치는 영향에 비해 상대적으로 둔감한 것으로 나타났다.

이와 같이 열에 의해 세균대사의 작용을 억제하는 기전에 대해서 Mehl 등²⁰은 레이저 열에 의해 세균 세포질 수분의 증발과 이로 인한 세포벽의 물리화학적 붕괴에 의한다고 하였으며 이를 생화학적 면에서 보면 당의 일종인 glucose를 글루코겐으로 분해하는 과정에 필요한 글루코겐 분해효소 군, 그 중에서도 특히 phosphogluco-mutase, kinase, 그리고 phosphatase에 치명적인 손상을 가하므로써 당의 이동과 대사에 장애를 초래하며 이와 같은 현상에 의해 세포가 파괴된다고 하였다.

본 연구에서는 *S. mutans*만을 대상으로 하였으나 Rooney 등²⁴은 세균의 외부 환경의 변화에 대한 포자형성 여부와 열에 대한 저항성에 따라 레이저 조사 효과가 다르다고 한 바, 다른 세균에 대해서도 연구가 이루어져야 할 필요가 있다. Zakariassen 등³¹은 세균의 종류에 따라 레이저 조사에 따른 살균 및 회복율이 다르다고 하였으며 이에 영향을 미칠 수 있는 요인으로 레이저 조사세기 및 레이저 빛의 전달각이라 하였다. 이밖에도 레이저의 종류도 세균에 대한 영향이 다를 수 있는데, Shultz 등¹⁸은 Nd:YAG 레이저의 경우 *S. aureus*보다 *Escherichia coli*에게 더 치명적인 손상을 가한다고 하였으며 Martinetto 등³⁴은 아르곤 레이저의 경우 *Escherichia coli*보다 *S. aureus* 더 치명적인 손상을 가한다고 하였다. Moritz 등²³은 실험실외적인 방법으로 근관내에 *Escherichia coli*와 *Enterococcus faecalis* 등의 세균을 대상으로 YAG계 레이저를 조사한 결과 Er:YAG, Nd:YAG, Ho:YAG 순으로 효과가 좋았다고 보고하였다.

본 연구에서는 한 가지 종류의 세균을 대상으로 하였으나 향후 Nd:YAG, CO₂, 아르곤 레이저 등 여러 가지 치과용 레이저에 대한 구강내 산 생성 세균, 즉 *S. sobrinus*, *Lactobacillus casei*, 그리고 *A. viscosus* 등에 대한 조사 효과에 대해서도 연구가 필요하리라 사료된다.

Burns 등¹⁷은 *S. mutans* 나 *S. sobrinus* 세균 배양액에 toluidine blue O라는 광감각제를 첨가하므로써 출력이 낮은 He-Ne 레이저로 세균의 증식을 억제시켰다고 보고하였으며 *S. mutans* 보다는 *S. sobrinus* 가 더 영향이 컸다고 보고하였다. 또한 이들은 저출력 레이저인 GaAs 레이저 역시 aluminium disulphonated phthalocyanine(ADP)이라는 광감각제를

세균 배양액에 첨가하여 조사할 경우 낮은 출력에서도 *S. sobrinus*와 *Lactobacillus casei*의 증식이 억제되었다고 보고하였다²⁰⁾. 이와 같이 저출력 레이저가 세균증식 억제효과가 있다면 고출력 레이저에 비해 상대적으로 구강내 조직의 손상이 적어 더 효과적일 수 있다. 따라서 고출력 레이저 뿐 아니라 저출력 레이저의 흡수율을 증가시키는 광감각제를 사용함으로써 보다 낮은 출력으로 구강내 조직에는 손상을 주지 않고 세균에 집중적으로 손상을 줄 수 있는지에 대한 연구도 필요하리라 생각된다. 또한 세균 배양액의 경우 레이저 조사에 의해 열 상승이 일정 한도에 이르면 기화현상에 의해 열을 빼앗김으로 인해 온도상승이 많이 유발되지 않는다. 이는 구강내의 치태라는 고체상태의 조건과는 상당히 다른데, 세균용액에서는 실제 구강내의 치태를 대상으로 레이저를 조사하였을 때보다는 레이저의 열을 효과적으로 세균에 전달할 수 없어 증식억제 효과는 물론 세균의 대사작용을 억제하는 효과가 감소되었으리라 사료되므로 앞으로의 연구는 구강내의 조건과 더 유사한 상태로 실험실적인 조건을 부여하는 방법론적 개선이 필요하리라 사료된다.

V. 결 론

Er:YAG 레이저의 구강내 산 생성 세균인 *S. mutans*에 대한 살균효과를 평가하기 위하여 *S. mutans* KCTC 3065가 포함된 세균배양액에 650 μ m 직경의 조사 beam을 갖는 Er:YAG 레이저를 비접촉식 방법으로, 조사세기(50mJ, 100mJ, 150mJ)와 pulse repetition rate(5Hz, 10Hz, 20Hz), 그리고 조사시간(1초, 3초, 5초)을 달리하여 조사하고 이때의 세균배양액의 온도변화, 세균 군락수, 산 생성능, 불용성 세포외다당류의 양을 측정된 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 레이저를 조사한 경우 10 μ 세균 배양액의 온도가 조사조건에 따라 6.2-45.3 $^{\circ}$ C 상승하였으며 100 μ 세균 배양액의 온도는 2.0-6.8 $^{\circ}$ C 상승되므로써 10 μ 세균 배양액이 상대적으로 큰 온도상승을 보였다.
2. 10 μ 세균 배양액에서는 레이저를 조사한 군이 레이저를 조사하지 않은 대조군(100.0 CFU)에 비해 전반적으로 세균의 군락수가 감소되었으며 조사세기와 pulse repetition rate가 클수록, 그리고 조사시간이 길어질수록 세균 군락수가 비례하여 감소하는 경향을 보였다(P<0.05). 그러나 100 μ 세균 배양액에서는 레이저를 조사하지 않은 대조군에 비해 세균 군락수의 변화가 적었으며 조사세기와 pulse repetition rate가 클수록, 그리고 조사시간이 길어질수록 세균 군락수가 증가하는 경향이 있었다.
3. 10 μ 세균 배양액에서는 레이저 조사에 의해 *S. mutans*의 산 생성능이 일정시간 동안 억제되었으나 100 μ 세균 배양액에서는 레이저를 조사하지 않은 대조군에 비해 산 생성능의 변화가 관찰되지 않았다.
4. 10 μ 세균 배양액에서는 레이저 조사에 의해 *S. mutans*의 불용성 세포외다당류의 합성이 부분적으로 감소되었으나

100 μ 세균 배양액에서는 변화가 관찰되지 않았다.

이상의 결과를 요약해 보면, 레이저 조사에 의해 온도상승이 상대적으로 큰 10 μ 세균 배양액에서는 *S. mutans*의 집락수와 산 생성능이 감소되고 불용성 세포외다당류의 합성이 부분적으로 억제되나 100 μ 세균 배양액에서는 변화가 관찰되지 않는다는 사실을 알 수 있으며, 이와 같은 사실에 근거해 볼 때 레이저는 *S. mutans*에 대한 증식억제효과를 가지고 있으며 그 기전은 초음파 등에 의한 기계적 작용이 아닌 열작용에 의한 것임을 추정해 볼 수 있다.

참고문헌

1. Axeleson P, Lindhe J : The effect of a preventive program on dental plaque, gingivitis and caries in schoolchildren. Results after one and two years. J Clin Periodontol, 1: 126-138, 1974.
2. Busscher HJ, Mulder AFJM, van der Mei HC : In vitro adhesion to enamel and in vivo colonization of tooth surfaces by lactobacilli from a Bio-Yoghurt. Caries Res, 33: 403-404, 1999.
3. Caufield PW, Gibbons RJ : Suppression of *Streptococcus mutans* in the mouth of humans by a dental prophylaxis and topically-applied iodine. J Dent Res, 58:1317-1326, 1979.
4. Frost MR, Harris MPW : An in vitro study to assess the efficacy of antiplaque agents in mouthwash formulations. Microbios, 79:101-108, 1994
5. Hatta H, Truda K, Ozeki M, et al. : Passive immunization against dental plaque formation in human : Effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies(IgY) specific to *Streptococcus mutans*. Caries Res, 31:268-274, 1997.
6. Loesche WJ, Bradbury DR, Woolfolk MP : Reduction of dental decay in rampant caries individuals following short term kanamycin treatment. J Dent Res, 56:254-265, 1977.
7. Lumikari M, Soukka T, Nurmi S, et al. : Inhibition of the growth of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Lactobacillus casei* by oral peroxidase systems in human saliva. Archs Oral Biol, 36:155-160, 1991.
8. Woods R : The short-term effect of topical fluoride applications on the concentration of *Streptococcus mutans* in dental plaque. Aust Dent J, 16 :152-155, 1971.
9. Stern RH, Sognnaes RF : Laser beam effect on dental hard tissue. J Dent Res, 43:873-878, 1964.
10. Lobene RR, Bjuhsy BR, Fine S : Interaction of car-

- bon dioxide laser irradiation with enamel and dentin. J Dent Res, 47:311-317, 1968.
11. Goodman B, Kaufman H : Effect of an argon laser on the crystalline properties and rate of dissolution in acid of tooth enamel in the presence of sodium. J Dent Res, 56:1201-1211, 1977.
 12. Yamamoto H, Sato K : Prevention of dental caries by acosto- optically Q-switched Nd:YAG laser irradiation. J Dent Res, 59:137-145, 1980.
 13. Tagomori S, Morioka T : Combined effects of laser and fluoride on acid resistance of human dental enamel. Caries Res, 23:225-233, 1989.
 14. 이상호, 이종갑 : 레이저 조사의 치아우식 억제효과에 관한 실험적 연구. 대한소아치과학회지, 18(2):11-19, 1991.
 15. 손홍규, 이영순 : 펄스형 Nd:YAG 레이저 조사에 의한 범랑질 내산성 증가 기전에 관한 연구. 대한소아치과학회지, 23(3):640-658, 1996.
 16. Hooks TW, Colonel L, Adrian JC, et al. : Use of the carbon dioxide laser in sterilization of endodontic reamers. Oral Surg, 49:263-265, 1980.
 17. Stabholz A, Kettering J, Neev J, et al. : Effects of the XeCl Excimer Laser on *Streptococcus mutans*. J Endod, 19:232-235, 1993.
 18. Burns T, Wilson M, Pearson GJ : Sensitization of cariogenic bacteria to killing by light from a helium-neon laser. J Med Microbiol, 38:401-405, 1993.
 19. Schultz RJ, Harver GP, Fernandez-Beros ME : Bactericidal effects of the Neodymium:YAG laser: in vitro study. Lasers Surg and Med, 6:445-448, 1986.
 20. Wilson M : Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases. Int Dent J, 44:181-189, 1994.
 21. Burns T, Wilson M, Pearson GJ : Killing of cariogenic bacteria by light from a gallium aluminium arsenide diode laser. J Dent, 22:273-278, 1994.
 22. Dederich DN, Pickard MA, Vaughn AS : Comparative bacterial exposure for selected oral bacteria using carbon dioxide laser radiation. Lasers Surg Med, 10:591-594, 1990.
 23. Mehl A, Folwaczny M, Haffner C, et al. : Bactericidal effects of 2.94 μ m Er:YAG-Laser radiation in dental root canals. J Endod, 25:490-495, 1999.
 24. Moritz A, Schoop U, Goharkhay K, et al. : The bactericidal effect of Nd:YAG, Ho:YAG, Er:YAG laser irradiation in the root canal. J Clin Laser Med and Surg, 17: 161-164, 1999.
 25. Rooney J, Midda M, Leeming J : A laboratory investigation of the bactericidal effect of a Nd:YAG laser. Br Dent J, 176:61-64, 1994.
 26. 김삼근 : 저출력 레이저조사가 *Streptococcus mutans*의 증식에 미치는 효과 에 관한 실험적인 연구. 단국대학교 석사논문, 1991.
 27. Iwase T, Saito T, Nara Y, et al. : Inhibitory effect of He-Ne laser on dental plaque deposition in hamsters. J Periodont Res, 24:282-283, 1989.
 28. Okamoto H, Iwase T, Morioka T : Dye-mediated bactericidal effect of He-Ne laser irradiation on oral microorganisms. Lasers Surg Med, 12:450-458, 1992.
 29. Nikolopoulos S, Naoumidou I, Manousaki A, et al. : Safety of the ArF 193 excimer laser for the removal of dental plaque and calculi: An in vitro histological study. J Clin Laser Med & Surg, 18:295-300, 2000.
 30. Saito IT, Morioka NY : Inhibitory effect of He-Ne laser on dental plaque deposition in hamsters. J Perio Res, 24:282-283, 1989.
 31. Zakariasen KL, Dederich DN, Tulip J, et al. : Bacteriocidal action of carbon dioxide laser radiation in experimental dental root canals. Can J Microbiol, 32:942-946, 1986.
 32. Karu TL : Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser irradiation. Lasers Life Sci, 2:53-74, 1988.
 33. Moan J : Porphyrin-sensitized photodynamic inactivation of cells: A review. Lasers Med Sci, 1:5-12, 1986.
 34. Martinetto P, Gariglio M, Lombard GF : Bacteriocidal effects induced by laser irradiation and hematoporphyrin against gram positive and gram negative microorganism. Drugs Exp Clin Res, 12:335-342, 1986.

Reprint request to:

Nan-Young Lee, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

Department of Pediatric Dentistry, College of Dentistry, Chosun University

375 Seosuk-Dong, Dong-Gu, Gwangju 501-759, Korea

E-mail : nandent@chosun.ac.kr

Abstract

INHIBITORY EFFECT OF Er:YAG LASER ON THE GROWTH OF
STREPTOCOCCUS MUTANS

Gwang-Chul Song, Chang-Seop Lee, Sang-Ho Lee, Nan-Young Lee

Department of Pediatric Dentistry, College of Dentistry, Chosun University

The purpose of this study is to investigate the sterilization effect of Er:YAG laser against the intraoral acid producing bacterium, *S. mutans*, by irradiating the culture solution containing *S. mutans* KCTC 3065 with Er:YAG laser having a 650 μ m diameter beam through the non-contact method. We obtained the following results after examining the temperature changes of the culture solution, numbers of bacterial colonies, and acid-producing ability and attaching ability on teeth by measuring the amount of extracellular polysaccharide produced by *S. mutans*.

The number of bacterial colony was decreased in 10 μ l culture solution irradiated with laser in overall compared to the control solution. The number decreased as the irradiation intensity and pulse repetition rate were larger and as the exposure time was increased. However, it did not change significantly in 100 μ l culture solution compared to the control solution.

Although the acid-producing ability of *S. mutans* was inhibited for a certain duration after laser irradiation in 10 μ l bacterial culture solution, it did not change in 100 μ l solution compared with the control solution.

The amount of extracellular polysaccharide synthesized by *S. mutans* was partially decreased through laser irradiation in 10 μ l culture solution but did not change in 100 μ l culture solution.

Based on these findings, we concluded that Er:YAG laser has an sterilization effect on *S. mutans* in which we presume that the mechanism is through the heat effect rather than the mechanical effect from development of ultrasound.

Key words : Er:YAG laser, *Streptococcus mutans*