

사람탈회상아기질 제작을 위한 탈회방법 비교연구 - 2% HNO₃과 0.6 N HCl 비교 -

황홍준, 김영욱, 모동엽, 이장렬¹, 김현철, 이상철

리빙웰치과병원 구강악안면외과, ¹구강악안면방사선과

Comparative study of mineralization methods for making human demineralized dentin matrix - comparison 2% HNO₃ and 0.6 N HCl -

Hong-jun Hwang, Yeong-wook Kim, Dong-yub Mo, Jang-yeol Lee¹, Hyoun-chull Kim, Sang-chull Lee

Departments of Oral and Maxillofacial Surgery, ¹Oral and Maxillofacial Radiology, LivingWell Dental Hospital, Goyang, Korea

Purpose: The aim of this study is finding more efficient demineralizing method through comparison 2% HNO₃ and 0.6 N HCl.

Materials and Methods: A human demineralized dentin matrix (DDM) was prepared from extracted molars. The molars were particulated and its size varied from 0.5 to 1 mm. The particles were demineralized by 2% HNO₃ or 0.6 N HCl. The weights of particles were measured and the radiographs were taken before and after the demineralization. And also decrement of inorganic matter was analyzed.

Results: Mean weight loss was 52.5%, 45% in HNO₃, HCl, respectively. Radiographically, the image of the particles in HNO₃ lost more radiopacity than the particles in HCl. 2% HNO₃ showed further reduction of inorganic components (Ca, P) more than 0.6 N HCl.

Conclusion: This result showed that HNO₃ is more efficient material than HCl for tooth demineralization. Further long term evaluation via prospectively designed studies are needed. (JOURNAL OF DENTAL IMPLANT RESEARCH 2012;31(1):20-25)

Key Words: Autogenous demineralized dentin matrix, 2% HNO₃, 0.6 N HCl

서 론

구강 악안면부의 골결손부에 쓰이는 골이식재료로는 자가골, 동종골, 이종골 및 합성골 등이 있지만 이 중 가장 이상적인 골이식재는 자가골임에 변함이 없다. 그러나 한정된 양과 수술 후 환자가 경험하는 동통을 포함한 불편감과 술 후의 합병증의 발생 가능성 때문에 다른 이식재료에 대한 연구가 계속되고 있다. 상아질의 무기질과 유기질의 구성비는 골과 유사하며 유기질의 경우 제1형 교원질이 대부분을 차지하여 상아질의 골유도에 대한 연구들이 지속되었고 상아질을 뼈이식재로 사용하기 위한 치아가공 과정 중 골유도 효과를 위해서 탈회과정은 매우 중요한 요소임이 보고 되었다¹⁾. 최근 치과계에서는 자가이식재료의 하나인 탈회상아기질의 관심이 증가하고 있

며 임상에 활용되기 시작하였다²⁾. 지금까지의 동물 및 임상 실험은 문들 대부분에서 HCl을 이용한 탈회를 시행하고 있지만 탈회시간이 장시간 요구되고 있어 임상활용 시 즉시 이식을 불가능케 하고 있다. 하지만 최근 2% HNO₃로 20분간 탈회한 상아질을 이식한 동물 및 임상실험에서 양호한 골형성이 보고되어^{3,4)} 발치 후 즉시 제작한 탈회상아기질을 임상에서 사용할 수 있을 것으로 기대되어진다. 이에 본 연구에서는 탈회시간을 감소시키기 위한 방법으로 치아 탈회 시 사용되는 0.6 N HCl과 2% HNO₃에 대한 비교연구를 통해 좀 더 효율적인 방법을 찾고자 하였다.

Received January 10, 2012. Revised January 31, 2012. Accepted February 10, 2012.

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

교신저자: 김영욱, 411-838, 고양시 일산서구 주엽동 110 효원빌딩, 리빙웰치과병원 구강악안면외과

Correspondence to: Yeong-wook Kim, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, LivingWell Dental Hospital, Hyo Won Building, 110, Juyeop-dong, Ilsanseo-gu, Goyang 411-838, Korea. Tel: +82-31-916-8020, Fax: +82-31-916-8029, E-mail: Livingwell@paran.com

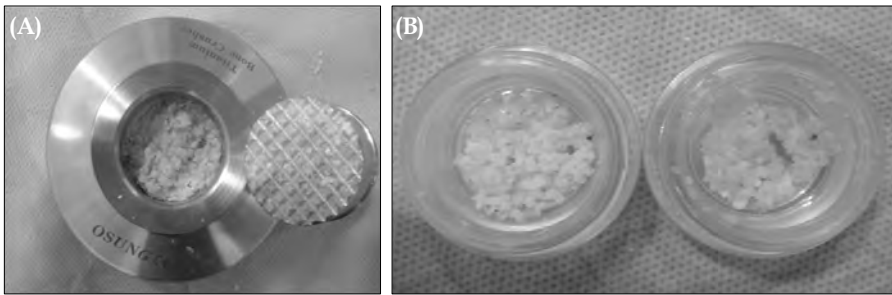


Fig. 1. (A) Extracted teeth were crushed by bone crusher. (B) Particles were demineralized by 2% HNO₃ (left) and 0.6 N HCl (right).

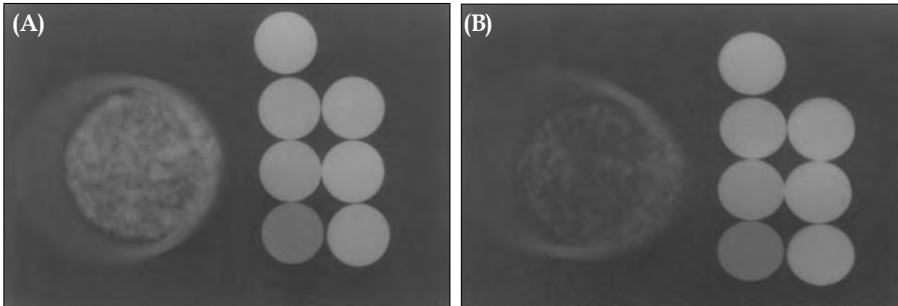


Fig. 2. Radiographic images of particles were taken. (A) Pre-demineralization. (B) Post-demineralization.



Fig. 3. Inorganic component (Ca, P) of teeth were measured by ICP/AES.



Fig. 4. Conjugated bases of HCl, HNO₃ were measured by Ion Chromatography System.

대상 및 방법

1. 사람탈회상아질의 준비 및 질량 측정

발거된 후 냉동보관된 우식 및 손상이 없는 치아를 선택하여 치석 및 치근주위 연조직을 제거하고 골분쇄기(OsungTM, Korea)를 이용하여 치아를 과립상으로 분쇄하였다.(Fig. 1A) 분쇄된 과립상의 치아를 0.5~1.0 mm로 여과하였으며 각 2.0 g씩 총 9개의 군으로 분류하였다. 9개의 군 중 하나는 비탈회군으로 분류하였고 나머지 8개군은 4°C의 2% HNO₃ (1L) 탈회군 4군과 0.6 N HCl (1L) 탈회군 4군으로 나누어 각각 20분간 탈회하였다.(Fig. 1B) 탈회 후 치아 입자들을 증류수로 10분간 세척하고 질량을 측정하였다.

2. 방사선 불투과도 측정

각 군의 과립상의 치아를 탈회 전, 후의 방사선 불투과도 측정을

위하여 7 mA, 70 kVp, 1.0 s의 동일 조건하에 표준 방사선 필름 위에 1~7 mm 두께의 titanium step wedge (1 mm 간격)와 함께 촬영하였다.(Fig. 2) 촬영한 필름은 자동현상기(PRO 200, Young Han. Co., Ltd., Korea)를 이용하여 현상하였으며 ROI 계측 Tool (π -view, Infinite, Korea)를 이용하여 방사선 불투과도를 측정하여 변화량을 Titanium 두께로 환산하였다.

3. 무기질량 및 짝염기 변화 분석

치아의 무기질 중 가장 큰 비중을 차지하는 Ca, P의 탈회 전과 후의 변화량을 측정하기 위해 유도결합 플라즈마 방출 분광기(ICP/AES) (Flame Modula S, Spectro, Germany)를 이용하였으며 (Fig. 3) 세정 후 염산과 질산의 짝염기인 Cl⁻와 NO₃⁻의 변화량을분

석하기 위해 이온크로마토그래피(Ion Chromatography System) (DX-600, Dionex, USA)를 이용하였다.(Fig. 4) 비탈회균을 포함하여 HCl과 HNO₃ 탈회균에서 각각 2개를 임의로 선택하여 총 5개균을 실험하였다. 실험결과로 나온 ppm 수치를 시료 1,000 g당 포함된 Ca, P, Cl⁻, NO₃⁻량으로 환산하였다.

결 과

방사선 불투과도 측정결과 2% HNO₃으로 탈회(68.68%) 시 0.6 N HCl으로 탈회(52.13%) 하였을 때보다 16.5% 정도의 불투과도가 더욱 감소하였다(Table 1).(Fig. 5) HNO₃으로 탈회 시 52.5%

의 질량 감소가 보여 HCl의 경우(45%)보다 7.5% 더 많은 질량 감소가 나타났다(Table 2).(Fig. 6) 치아 무기질중 P는 탈회 전 71.66 (g/1,000 g)만큼 존재하였으나 0.6 N HCl로 탈회한 경우 잔존량이 48.76, 48.41로 줄었으며(평균 32.22%), 2% HNO₃로 탈회한 경우에는 잔존량이 45.31, 42.37로 줄어들어(평균 38.91%) 2% HNO₃군이 평균 6.7% 더 많은 감소를 보였다. Ca의 변화량 또한 탈회 전 140.32 (g/1,000 g)에서 0.6 N HCl로 탈회한 경우에 잔존량이 93.51, 93.24로 평균 33.44% 감소가 보였고 2% HNO₃로 탈회한 경우의 잔존량은 87.34, 81.93로 평균 39.69% 감소하여 2% HNO₃군에서 약 6.2% 더 많은 감소가 보였다(Table 3).(Fig. 7) 탈회 전후의 짝염기의 변화는 두 가지 산에서 다른 양상

Table 1. Radiopacity of pre & post-demineralized particles.

	Pre-demineralization (mm)	Post-demineralization (mm)	Decrement (%)
G1 (HNO ₃)	1.45±0.25	0.49±0.16	66.2
G2 (HNO ₃)	1.81±0.25	0.86±0.22	52.5
G3 (HNO ₃)	1.32±0.34	0.34±0.1	74.24
G4 (HNO ₃)	1.54±0.26	0.28±0.13	81.8
G5 (HCl)	1.13±0.2	0.56±0.16	50.4
G6 (HCl)	1.33±0.26	0.82±0.21	38.34
G7 (HCl)	1.43±0.31	0.67±0.17	53.1
G8 (HCl)	1.17±0.23	0.39±0.22	66.7

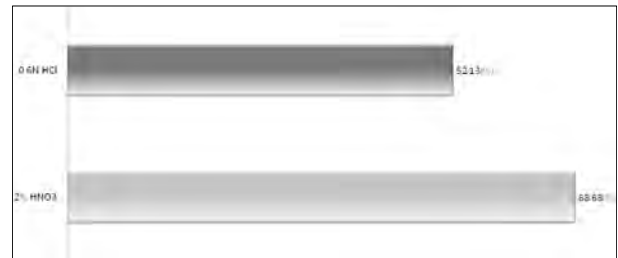


Fig. 5. Average decrement of radiopacity by demineralization material.

Table 2. Mass decrement of pre & post-demineralized particles.

	Pre-demineralization (g)	Post-demineralization (g)	Decrement (g)
G1 (HNO ₃)	2.0	1.1	0.9
G2 (HNO ₃)	2.0	0.9	1.1
G3 (HNO ₃)	2.0	0.9	1.1
G4 (HNO ₃)	2.0	0.9	1.1
G5 (HCl)	2.0	1.1	0.9
G6 (HCl)	2.0	1.0	1.0
G7 (HCl)	2.0	1.1	0.9
G8 (HCl)	2.0	1.1	0.9

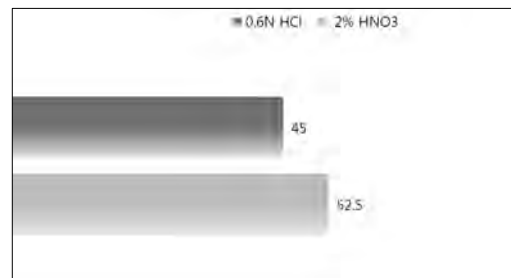


Fig. 6. Average decrement of mass by demineralization material.

Table 3. Change of inorganic component of teeth.

	Non-demineralized	0.6 N HCl - 1	0.6 N HCl - 2	2% HNO ₃ - 1	2% HNO ₃ - 2
P (g/1,000 g)	71.66	48.76	48.41	45.31	42.37
Ca (g/1,000 g)	140.32	93.51	93.24	87.34	81.93

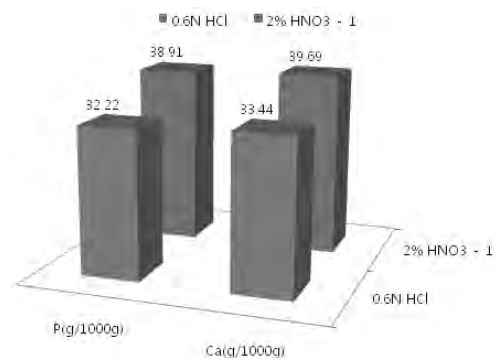


Fig. 7. Average decrement of inorganic components by demineralization material.

Table 4. Change of conjugate base.

	Non-demineralized	0.6 N HCl - 1	0.6 N HCl - 2	2% HNO ₃ - 1	2% HNO ₃ - 2
Cl ⁻ (g/1,000 g)	72.78	106.38	76.03	32.15	44.5
NO ₃ ⁻ (g/1,000 g)	401.68	121.36	131.88	279.58	346.26

을 보였다. HCl의 짝염기인 Cl⁻은 탈회 전 치아에서 72.78 (g/1,000 g)만큼의 양이 존재하였지만 0.6 N HCl로 탈회하고 세정 후에 106.38, 76.03로 더 늘어나 평균 25.3% 증가함을 보였으나 2% HNO₃로 탈회한 경우 짝염기인 NO₃⁻는 탈회전 401.68 (g/1,000 g)에서 탈회, 세정 후 279.58, 346.26으로 줄어 평균 22.1% 감소함을 볼 수 있었다(Table 4).

고 찰

지금까지 많은 논문들에서 골유도 및 골전도를 위한 여러가지 종류의 골이식재들에 대해 연구되어지고 있다. 골과 비슷한 성분비를 가지는 치아를 골이식재로 사용하기 위한 노력들이 이어지고 있으며 탈회상아기질과 치아회분말에 대해서 연구되었다. Kim 등⁵⁾ (1993)은 개의 하악에 1×1 cm의 골결손부를 만들어 치아회분말을 이식하여 양호한 골생성이 있었음을 보고하였고 Kim 등⁶⁾ (1996)은 사람에서 낭종적출, 과잉치 발치, 치근단 절제술 후의 골결손부에 치아회분말을 이식하여 양호한 결과를 보고하였다. 하지만 치아회분말의 경우 열처리 과정을 통해 얻어지는 재료로 상아질을 구성하는 제1형 교원질 및 비교원질성 단백질, BMP 등의 유기질 성분은 변형되거나 제거되고 법랑질을 대부분 구성하는 HA (hydroxyapatite) 등의 무기질 성분만이 남아 골 생성에 관여하게 됨으로 골유도능은 없으며 골전도능만 가지는 한계점을 가지는 것으로 알려져 있다.

탈회상아기질의 골유도능에 대해 Yeomans와 Urist⁷⁾가 1967년 토끼의 상아질을 0.6 N HCl을 이용하여 탈회하고 동결건조하여 근육 내 이식 후 4주 안에 이소성 골유도 현상이 있음을 보고하였고 동시에 탈회하지 않은 상태에서 동결건조만 이루어진 상아기질에서는 이식 후 8~12주 후에도 이식재의 흡수가 관찰되지 않으며 골유도 과정이 식립한 이식재에서 지연되어 나타남을 보고하였다. 상아질을 탈회처리하면 항원성이 낮아지게 되고⁴⁾ Yasaku¹⁾의 보고에 의하면 상아질에 존재하는 무기 성분이 그 유도능을 방해하고 상아질에 대한 탈회처리가 골유도능발현에 중요하다.

상아질에서 유기질은 약 20%를 차지하고 이 중 90% 정도인 제1형 교원질은 apatite의 증가효과(epitaxy)로 작용하여 석회화 기전에 관여한다. 교원질 외에도 상아질에는 석회화에 관여하고 있는 osteocalcin이나 osteonectin 등의 뼈와 유사한 비교원질성 단백질과 상아질 특유의 비교원질성 단백질인 phosphophoryn이나 dentin sialoprotein, 상아질 특이 세포외 기질 단백질(dentine-specific extracellular matrix protein) 등이 존재한다^{8,9)}. 특히 phosphophoryn은 제1형 교원질과 결합되어있는 상태로 비교원질성 단백질 중에서 양이 가장 많고 석회화에 관여한다고 여겨지고 있다⁹⁾. Phosphophoryn은 전체 아미노산의 80%가 serine과 aspartic acid로 된 특이한 조성을 가져 칼슘 및 인산 이온을 끌어들이는데 알맞으며 일정한 형태가 없는 인산 칼슘이 apatite 결정으로 전환되는 것을 촉진한다는 보고도 있다¹⁰⁾. Phosphophoryn은 상아

질을 탈회하기 전에서는 guanidine-HCl로 추출해도 잘 용출되지 않으나 EDTA로 탈회하면 용이하게 유리되어 가용성이 된다¹⁰⁾. Sfeir 등¹¹⁾ (2011)은 정상적인 석회화 기질을 생성하지 못하는 섬유모세포에서 phosphophoryn의 발현은 기질의 석회화를 촉진한다고 보고하였다.

상아기질에는 transforming growth factor-beta (TGF-beta), fibroblast growth factor (FGF), platelet-derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF) 같은 성장인자들이 풍부하다^{12,13)}. 이런 TGF-β나 bFGF, IGF 등의 성장 인자는 골형성을 증강시키는 것으로 알려져 있다. 이외에도 상아질에는 골형성단백질(Bone morphogenetic protein, BMP)이 존재하며 Bessho 등¹⁴⁾ (1991)은 사람 상아질로부터 BMP양 물질을 부분 정제하였고 이것은 사람 골유래 BMP와 비교시 valine, isoleucine, tyrosine의 함유량에 차이가 있으나 같은 효과를 나타낸다고 보고하였다. Butler¹⁵⁾ (1977)는 백서의 상아질에서 탈회후에도 용해되지 않고 기질에 남아있는 BMP (bone morphogenetic protein)가 있으며 골과 유사한 활성을 가짐을 보고하였고 이 외에도 세가지의 구분되는 비교원질성 단백질이 교원질과 결합되어 소량 남아 있음을 확인하였다. Ike와 Urist¹⁶⁾는 탈회상아기질내의 BMP의 역할 뿐 아니라 탈회상아기질이 rhBMP-2의 운반체로서 사용이 가능한 것을 보고했다. BMP는 수용성이며 반감기가 짧으므로, 임상적으로 단독 사용시 이식 부위에 BMP의 유지와 계속적인 분비가 매우 어려워 유지, 분비를 위한 적절한 매개체(Carrier)가 필요하다. 이러한 매개체중 β-TCP (β-Tricalcium Phosphate), 흡수성 교원질(Absorbable collagen sponge)에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 임상적으로도 유용함이 보고되고 있다¹⁷⁾. Saito 등¹⁸⁾은 상아질의 phosphophoryn이 rhBMP-2 골유도능 발현을 촉진 시키며 phosphophoryn과 제1형 교원질의 복합체는 rhBMP-2의 생체적합적이며 생체분해도가 있는 유용한 carrier임을 보고하였고 Murata 등⁴⁾도 탈회치근상아기질과 rhBMP-2를 함께 쥐의 피하 및 근육 내에 이식한 경우에서 탈회치근상아기질을 단독으로 이식한 경우보다 더 많은 연골 및 골유도를 보였음을 보고하였다. 임상에서 rhBMP-2의 carrier로서의 활용도 기대가 되며 본원에서도 자가탈회상아기질과 rhBMP-2를 함께 사용하여 양호한 결과들이 보여지고 있다.

Urist의 연구 이후 여러 연구들^{19,20)}에서 동물 탈회상아기질의 골유도능에 대해 보고 되었고 Kim 등²¹⁾은 사람탈회상아기질을 무홍선 마우스의 피하 이식하고 4주 후에 연골과 골을 독립적으로 유도했음을 보고하였다. 현재 국내에서는 자가치아뼈은행을 통해 자가탈회상아기질의 임상 활용이 늘어나고 좋은 결과들을 보여주고 있지만²⁾ 골유도능 활성을 위해 중요한 치아 탈회 과정은 대부분의 연구에서 0.6 N HCl을 이용하여 3시간²²⁾에서 길게는 1주일까지 장시간 요구²³⁾되며 발치 후 즉시 제작하여 이식하는 것이 불가능한 것으로 여겨졌다. Murata 등²⁴⁾은 2% HNO₃으로 20분간 탈회한 사람유래 탈회상아기

질을 이식하였을 경우에 이소성 골유도능이 있음을 처음으로 보고 하였고 동물 실험 및 임상³⁾에서 좋은 결과를 보였으나 발치 후 즉시 탈회상아기질을 제작하여 이식한 연구는 아직까지 없다.

이처럼 치아 탈회 방법으로 보고되어진 두 가지 산의 같은 시간 동안 탈회 정도에 대한 본 비교 실험에서 2% HNO₃가 0.6 N HCl에 비해 방사선불투과도 감소에서 16.5%, 질량 감소에서는 7.5% 더 많은 감소를 보였다. 또한 무기질 성분 변화량을 분석에서도 2% HNO₃이 0.6 N HCl에 비해 P는 6.7%, Ca는 6.2% 더 많은 감소를 보였다. 이에 2% HNO₃이 좀더 효율적인 탈회 방법이라고 여겨진다.

Apatite의 결정격자를 형성하고 있는 이온은 표면에 흡착되어 있는 이온과 활발한 이온교환을 하고 있고 이는 동종 이온교환과 이종 이온교환으로 나뉜다. 이종 이종 이온교환은 격자 속의 Ca²⁺이 Na⁺, Mg²⁺, K⁺, Sr²⁺ 등과 OH가 F, Cl 등의 음이온으로 치환되는 경우이며¹⁰⁾ 본 실험에서 세정 후 남아있는 짝염기량의 변화가 0.6 N HCl에서는 25.3% 증가했으나 2% HNO₃에서는 22.1% 감소한 것을 통해 확인할 수 있었다. 또한 이를 통해 2% HNO₃를 이용한 탈회방법이 세정이 더 잘 이루어질 것이라 여기지며 2% HNO₃은 N 농도로 환산 시 약 0.032 N로 0.6 N HCl 농도보다 더 낮은 점을 미루어 2% HNO₃이 0.6 N HCl에 비해 탈회상아기질 제작시 환자에게 좀더 안전한 방법으로 사용을 할 수 있다고 보여진다.

결 론

이번 연구를 통해 2% HNO₃으로 사람치아를 탈회 시 0.6 N HCl에 비해 더 많은 무기질 감소 및 질량, 방사선불투과도, 짝염기의 감소를 보였기 때문에 골유도능의 발현을 위한 상아질 탈회 과정에서 2% HNO₃이 좀더 효율적이고 안전한 방법으로 여겨진다. 하지만 좀 더 나은 임상적용을 위해 두 가지 산을 이용한 탈회방법 및 시간에 따른 이소성 골유도능 실험이 필요하다고 사료된다.

REFERENCES

- Shigeru Y. Experimental studies of cartilage and bone induction by acid treated dentin transplant. The Journal of the Tokyo Dental College Society 1985;85:135-65.
- Kim YK, Kim SG, Byeon JH, Lee HJ, Um IU, Lim SC, et al. Development of a novel bone grafting material using autogenous teeth. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2010;109:496-503.
- Tazaki J, Murata M, Yusa T, Akazawa T, Ito K, Hino J, et al. Autograft of human tooth and demineralized dentin matrices for bone augmentation. Journal of the Ceramic Society of Japan 2010;118:442-5.
- Murata M, Kawai T, Kawakami T, Akazawa T, Tazaki J, Ito K, et al. Human acid-insoluble dentin with BMP-2 accelerates bone induction in subcutaneous and intramuscular tissues. Journal of the Ceramic Society of Japan 2010;118:438-41.
- Kim YK, Yeo HH, Ryu CH, Lee HB, Byun UR, Cho JH. An experimental study on the tissue reaction of toothash implanted in mandible body of the mature dog. J Korean Assoc Maxillofac Plast Reconstr Surg 1993;15:129-36.
- Kim SG, Yeo HH, Kim YK. The clinical study of implantation of toothash combined with plaster of Paris: long-term follow up study. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 1996;18:771-7.
- Yeomans JD, Urist MR. Bone induction by decalcified dentin implanted into oral osseous and muscle tissues. Arch Oral Biol 1967;12:999-1008.
- Anders L. Dentin matrix proteins: composition and possible functions in calcification. The Anatomical Record 1989;224:154-66.
- Ritchie HH, Ritchie DG, Wang LH. Six decades of dentinogenesis research. Historical and prospective views on phosphoryn and dentin sialoprotein. Eur J Oral Sci 1998;106:211-20.
- Park KK. Oral biochemistry. 1st ed. Seoul: Koonja, 1999.
- Sfeir C, Lee D, Li J, Zhang X, Boskey AL, Kumta PN. Expression of phosphoryn is sufficient for the induction of matrix mineralization by mammalian cells. J Biol Chem 2011;286:20228-38.
- Bessho K, Tagawa T, Murata M. Purification of rabbit bone morphogenetic protein derived from bone, dentin, and wound tissue after tooth extraction. J Oral Maxillofac Surg 1990;48:162-9.
- Bessho K, Tagawa T, Murata M. Comparison of bonematrix-derived bone morphogenetic proteins from various animals. J Oral Maxillofac Surg 1992;50:496-501.
- Bessho K, Tanaka N, Matsumoto J, Tagawa T, Murata M. Human dentin-matrix-derived bone morphogenetic protein. J Dent Res 1991;70:171-5.
- Butler WT, Mikulski A, Urist MR, Bridges G, Uyeno S. Noncollagenous proteins of a rat dentin matrix possessing bone morphogenetic activity. J Dent Res 1977;56:228-32.
- Ike M, Urist MR. Recycled dentin root matrix for a carrier of recombinant human bone morphogenetic protein. J Oral Implantol 1998;24:124-32.
- Son HJ, Kim YW, Hwang HJ, Kim HC, Lee SC, O SH, et al. Bone inducing effect by recombinant human bone morphogenetic protein-2 and collagen carrier in maxillary sinus of the rabbit. Journal of Dental Implant Research 2011;30:115-22.
- Saito T, Kobayashi F, Fujii T, Bessho K. Effect of phosphoryn on rhBMP-2-induced bone formation. Arch Oral Biol 2004;49:239-43.
- Huggins C, Wiseman S, Reddi AH. Transformation of fibroblasts by allogeneic and xenogeneic transplants of demineralized tooth and bone. J Exp Med 1970;132:1250-8.
- Inoue T, Deporter DA, Melcher AH. Induction of cartilage and bone by dentin demineralized in citric acid. J Periodontal Res 1986;21:243-55.
- Kim HC, Murata M, Akazawa T. Bone induction of human particulated demineralized dentin matrix in nude mice. Journal of Dental Implant Research 2011;30:9-15.
- Koike Y, Murakami S, Matsuzaka K, Inoue T. The effect of

- Emdogain on ectopic bone formation in tubes of rat demineralized dentin matrix. *J Periodontal Res* 2005;40:385-94.
23. Yagihashi K, Miyazawa K, Togari K, Goto S. Demineralized dentin matrix acts as a scaffold for repair of articular cartilage defects. *Calcif Tissue Int* 2009;84:210-20.
24. Murata M, Akazawa T, Takahata M, Ito M, Tazaki J, Hino J, et al. Bone induction of human tooth and bone crushed by newly developed automatic mill. *Journal of the Ceramic Society of Japan* 2010;118:434-7.