

2% 질산을 이용한 사람 치아 Block을 탈회하기 위한 적정시간 비교 연구

이종선, 김영옥¹, 모동엽¹, 심우현¹, 황홍준¹, 이장렬¹, 김현철¹, 이상철¹

리빙웰 이종선 치과의원, ¹리빙웰치과병원 치의학연구소

Comparative study of proper demineralization time for using the human teeth block as graft material after demineralization by 2% HNO₃

Jong-seon Lee, Yeong-wook Kim¹, Dong-yub Mo¹, Woo Hyun Shim¹, Hong-jun Hwang¹, Jang-yeol Lee²,
Hyoun-chull Kim¹, Sang-chull Lee¹

Lee Jong-seon LivingWell Dental Clinic, Hwaseong, ¹Institute of Dental Research, LivingWell Dental Hospital, Goyang, Korea

Purpose: Some studies have reported that Autogenous demineralized dentin matrix (ADDM) granules which were demineralized with 2% HNO₃ for 20 minutes have osteoinduction and osteoconduction. The aim of this study is finding out the proper demineralization time for using ADDM block as the graft material in comparison previous studying that evaluate the proper demineralization time ADDM granules which were demineralized with 2% HNO₃.

Materials and Methods: The enamel of crown was removed and the dentin was shaped as a rectangular parallelepiped for making tooth block (8×8×5 mm). In tooth-blocks, 1 mm diameter holes were formed every 1 mm intervals. Each tooth-blocks were demineralized in 2% HNO₃ solution for 1, 2, 3 hours. The change of weight, radiological density and minerals (Ca, P) were measured.

Results: This result has showed that ADDM block which was demineralized by 2% HNO₃ is needed to have 2 hours demineralization time. But when applying this to clinical cases, we should consider that it is needed to take subdivided times for the better efficient, economical and stable demineralization time and histological studies through additional animal test.

Conclusion: These results of ADDM blocks were compared with the results of ADDM granules that were already confirmed to evaluate proper demineralization time for using the ADDM block as graft material. (JOURNAL OF DENTAL IMPLANT RESEARCH 2012;31(2):44-48)

Key Words: Autogenous demineralized dentin matrix, 2% HNO₃, Tooth block

서 론

최근 자기골을 대체하기 위한 이식재로서, 생체 유래 재료에 대한 안전성에 대한 관심이 높아지며 자가 혈액이나 자가 세포 및 조직을 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이런 노력들 중 탈회상아기질 (Demineralized Dentin Matrix)은 Urist에 의해서 처음으로 동물실험이 이루어졌으며¹⁾ 골유도 효과가 있음이 보고되었다. 탈회상아기질을 이용한 다른 동물 실험들에서도 신생골 형성이 되었다는

보고되었으며²⁻⁶⁾ 최근 임상에 활용되기 시작하였다^{7,8)}. 하지만, 앞서 언급한 논문들에서는 0.6 N 염산을 이용한 탈회시간이 장시간 요구되고 있어^{9,10)} 임상 활용시 발치한 치아를 즉시 탈회상아기질로 제작 후 즉시 이식하기에는 제약이 있었다. 그러나 2% 질산을 이용해 20분간 탈회하는^{11,12)} 방법이 소개됨으로써 임상에서의 활용이 유용할 것으로 사료된다.

최근 본 연구소에서도 발거된 치아를 과립상으로 분쇄하여 2% 질산을 이용한 실험에서 20분간 탈회시킨 탈회상아기질에 대한 분석

Received May 1, 2012. Revised May 25, 2012. Accepted June 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: 이종선, 445-330, 화성시 반월동 100-12번지, 리빙웰 이종선 치과의원

Correspondence to: Jong-seon Lee, D.D.S., Lee Jong-seon LivingWell Dental Clinic, 100-12, Banwol-dong, Hwaseong 445-330, Korea. Tel: +82-31-202-2790, Fax: +82-31-202-2791, E-mail: implant001@naver.com

결과를 보고하였으며 임상에서도 발치 후 즉시 동일한 방법으로 제작된 자가 탈회상아기질을 골 이식재로 사용해 양호한 임상결과 및 조직학적 소견을 보고하였다. 이번 연구는 과립상의 상아질을 2% 질산으로 탈회 후 측정된 질량, 방사선 불투과도 및 무기질 변화량을 통해 탈회상아기질을 block 형태로 사용하기 위한 적절한 탈회시간을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 사람탈회상아기질의 block의 준비 및 질량 측정

발거한 후 냉동 보관한 우식 및 손상이 없는 치아를 선택하여 치관

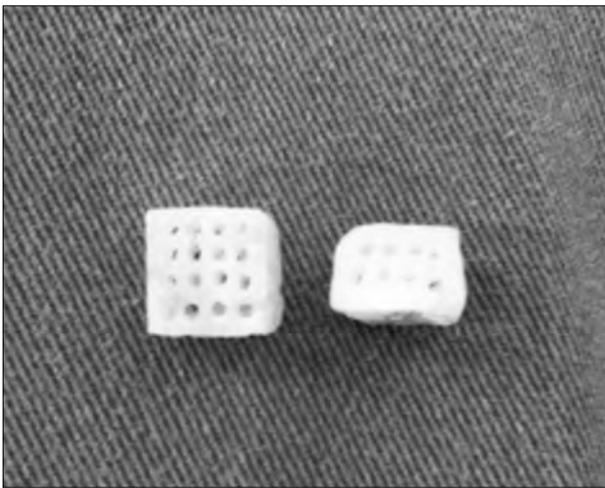


Fig. 1. The enamel of crown was removed and the dentin was made a rectangular shape with 1 mm diameter holes formed every 1 mm intervals.



Fig. 2. Dentin blocks were demineralized using magnetic stirrer.

부에서 법랑질을 제거하고 상아질 부분을 노출하여 직육면체 형태의 block (8×8×5 mm)을 만들었다. 만들어진 block에 1 mm 직경의 구멍을 1 mm 간격으로 형성하고(Fig. 1) 질량을 측정하였다.

4°C의 2% 질산(1 L)을 이용하여 각각 1, 2, 3시간 동안 교반기를 이용하여 탈회하였으며(Fig. 2) 각 군은 따로 탈회되었다. 탈회 후에 탈회 상아질 block을 멸균 증류수로 세척하고 질량을 측정하였다.

2. 방사선 불투과도 측정

각 군의 치아 block의 탈회 전, 후의 방사선 불투과도 측정을 위하여 7 mA, 70 kVp, 1.0 s의 동일 조건하에 표준 방사선 필름 위에 1~6 mm 두께의 titanium step wedge (1 mm 간격)와 함께 촬영하였다.(Fig. 3)

촬영한 필름은 자동현상기(PRO200, Young Han Co. Ltd., Korea)를 이용하여 현상하였으며 ROI 계측 Tool (p-view, Infinite, Korea)를 이용하여 방사선 불투과도를 측정하여 변화량을 Titanium 두께로 환산하였다.

3. 무기질량의 변화 분석

치아의 무기질 중 가장 큰 비중을 차지하는 Ca, P의 탈회 전과 후의 변화량을 분석하기 위해 유도결합 플라즈마 방출 분광기

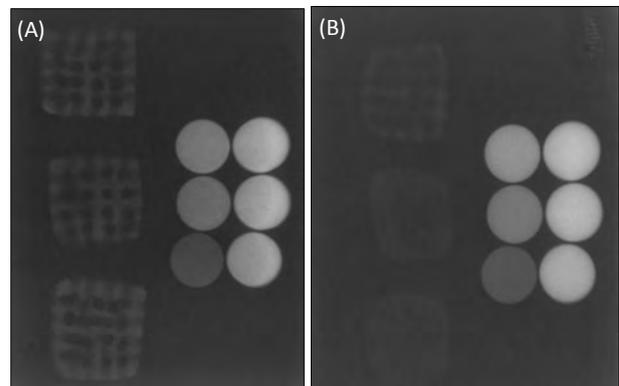


Fig. 3. Radiographic images of particles were taken. (A) Pre-demineralization. (B) Post-demineralization.

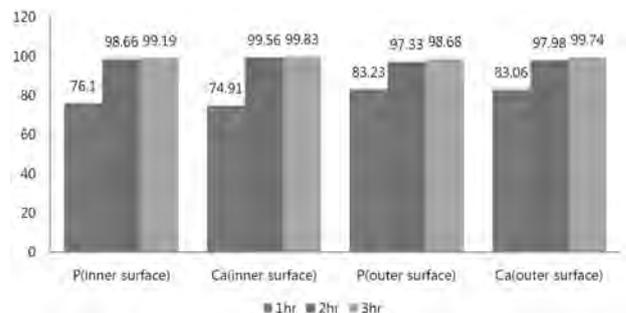


Fig. 4. Average decrement (%) of inorganic components by demineralization material.

(ICP/AES) (Flame Modula S, Spectro, Germany)를 이용하였으며 각 시간군에서 block의 내부와 외부의 무기질 변화량을 측정하였다. 실험결과는 ppm 값을 시료 1,000 g당 포함된 Ca, P량으로 환산 하였다.(Fig. 4)

결 과

만들어진 상아질 block의 탈회 전 질량은 모두 0.5 g이었으며 2% 질산으로 탈회한 모든 시간군에서 0.2 g으로 60%의 질량 감소가 보였다(Table 1).

방사선 불투과도는 2시간(61.43%), 3시간(75.76%) 탈회군에서 1시간 탈회군(37.32%)에 비해 유의한 감소가 보였으며(Table 2), 탈회 전, 후 무기질 변화에서 1시간 탈회군(내부: 74~76%, 외부: 83%)에 비해 2시간 탈회군(내부: 98~99%, 외부: 97~98%)과 3시간 탈회군(내부: 99%, 외부: 98~99%)에서 유의한 감소가 보였으며 2시간과 3시간 탈회군 사이에서는 유의한 차이가 없었다. 그리고 block의 외부와 내부의 무기질 변화차이는 2시간 이상 탈회 시 유의한 차이가 보이지 않았다(Table 3).

고 찰

사람의 치아 상아질에는 중량비로 약 20~30%의 유기질이 존재하며 그 주성분은 골조직과 같은 type 1 collagen이다. 또한 상아질 안에는 골 형성을 유도하는 비콜라겐성 단백질들이 포함되어 있다는 것이 알려져있다¹³⁻¹⁹. 상아질을 골 이식재로 사용하려는 많은 연구들을 통해 탈회한 상아질은 이식 후 bone remodeling 과정에서 흡수가 일어나며 신생골 형성이 보인 것에 반해²⁰⁻²³, 탈회하지 않은 상아질은 비흡수성으로 나타났으며 또한 골 형성도 잘 되지 않는 것으로 나타났다²⁴. 이는 상아질 내의 hydroxyapatite cris-

tal이 BMP 및 성장인자들의 분비를 방해하며 상아질의 콜라겐 흡수도 억제하기 때문이라 여겨진다^{25,26}.

또한, 탈회된 상아질의 또 다른 장점으로는, 무기질 탈회를 통해 type 1 collagen과 상아세관이 노출되어 표면적이 증가하고, 세포 성분이 제거되어 항원성이 낮아지며²⁷, 탈회 후에도 상아질에 존재 하던 BMP 성분들은 기질에 남아 결합되어 있다라는 점이다^{13-17,28}. 따라서 상아질의 탈회는 골이식재로서의 필요조건인 만큼 얼마나 충분한 탈회를 하는가는 매우 중요한 요소라 할 수 있을 것이다.

이식재 탈회는 Urist가 1965년에 0.6 N 염산으로 탈회시킨 골을 토끼의 근육 내에 이식한 연구가 있었으며¹, 1967년 Yeomans와 Urist는 0.6 N 염산으로 탈회시킨 토끼의 탈회 상아질 기질을 이용해서 근육 내에서 미분화간엽계 세포를 골로 유도시킴을 발표하였다²⁴.

이후 여러 논문들에서, 0.6 N의 염산으로 탈회한 동물 및 사람치아의 상아질을 골 이식재로 한 실험에서 신생골 형성에 양호한 결과들을 보였다^{2-6,20-23,29}.

하지만 3시간에서⁹ 길게는 1주일까지¹⁰ 걸리는 탈회시간은 임상에서 발치 당일 이식함에 어려움이 있어 유용성이란 또 다른 문제점이 있었다.

이런 문제점에 대한 대안으로 Murata 등¹²은 2% 질산으로 20분간 탈회한 상아기질을 이용하여 이소성 골유도를 조직학적으로 관찰하였으며 Tazaki 등¹¹은 이 방법으로 임상에 적용하여 양호한 결과를 보였다. 또한 본 연구소에서는 최근 2% 질산과 0.6 N 염산을 이용한 치아탈회에 대한 비교연구를 통해 0.6 N 염산보다 2% 질산이 상아질 탈회에 있어 더 효율적임을 실험을 통해 보고하였고³⁰ 2% 질산으로 20분간 탈회한 상아기질을 임상에 적용하여 양호한 결과를 보였음을 발표하였다³¹.

Murata는 2010년 논문에서 2% 질산으로 탈회한 치근 block을 백서 근육에 이식 시 BMP를 첨가한 경우에 탈회한 치근 block을 단독으로 이식한 경우에는 관찰되지 않았던 이소성 골형성이 있음을

Table 1. Mass decrement of pre & post-demineralized dentin blockes.

	Pre-demineralization (g)	Post-demineralization (g)	Decrement (g)
1 hr	0.5	0.2	0.3
2 hr	0.5	0.2	0.3
3 hr	0.5	0.2	0.3

Table 2. Average decrement of radition density by demineralization material.

	Pre-demineralization (mm)	Post-demineralization (mm)	Decrement (%)
1 hr	0.67±0.11	0.42±0.06	37.32
2 hr	0.7±0.17	0.27±0.1	61.43
3 hr	0.66±0.07	0.16±0.05	75.76

Table 3. Change of inorganic components by demineralization material.

(g/1,000 g)	Outer surface		Inner surface	
	P	Ca	P	Ca
Non-demineralization	126.4	308.48	126.4	308.48
1 hr	21.2	52.26	30.18	77.39
2 hr	3.378	6.229	1.723	1.342
3 hr	1.67	0.8	1.034	0.522

보고하였다²⁵⁾. 앞서 언급한 논문은 BMP 효과를 입증하기 위한 실험이지만 치근 탈회를 위한 시간이 주어지지 않은 한계점이 있으며 block 형태의 치근에 구멍을 형성하지 않았기 때문에 골 형성 효과를 얻을 수 있는 적절한 탈회의 정도가 치근의 내부와 외부에 이루어졌는지에 대한 확인이 필요할 것으로 생각되어진다.

DDM block을 이용한 이번 실험에서, 탈회 후 측정된 DDM block의 질량 변화에서 1시간, 2시간, 3시간 모두에서 60%의 질량 변화를 보였는데 이는 과립상의 20분간 탈회한 DDM 과립형의 52.5%³⁰⁾보다 더욱 감소된 값을 보여주고 있다. 하지만, 이는 탈회 시간의 차이 및 교반기를 이용한 기계식 회전을 이용하여 보다 효율적인 탈회가 되었기 때문이라 여겨진다.

그리고 1시간 탈회한 실험군은 무기질 함량의 변화가 75~83%로 잔존 무기질량이 높았고 2시간과 3시간 탈회한 실험군은 97~99%의 변화로 잔존 무기질량이 거의 제거되어 두 군 사이에 유의한 차이는 보이지 않았다. 2시간 이상 탈회한 block보다 1시간만 탈회한 block에서 유연성이 많이 부족한 것에서도 확인할 수 있었다.

또한 본 실험에서 준비한 DDM block은 탈회 시간 절약 및 내부와 외부가 균일하게 탈회하기 위해서 1 mm 간격으로 1 mm 직경의 구멍을 형성하였지만 1시간 탈회군에서는 균일한 탈회가 보이지 않았으며 2시간 이상 탈회한 경우 내부 및 외부의 균일한 탈회가 관찰되었다.

그리고 방사선 불투과도에서도 2시간(61.43%), 3시간(75.76%) 탈회군에서, 2% 질산으로 20분간 탈회된 상아질 과립상의 방사선 불투과도(68.68%)³⁰⁾와 유의한 차이가 없었다.

따라서 2시간과 3시간 실험군에서 임상에 유용한 탈회정도가 얻어질 수 있다고 추측할 수 있었다.

결 론

이번 연구 결과 2% 질산에 탈회하여 만들어진 DDM block을 골 이식재로써 사용하기 위해서 약 2시간 이상의 탈회시간이 필요하다고 생각된다. 그러나 임상에 적용 시 좀 더 효율적이고 경제적이며 안정적인 탈회 시간을 찾기 위해 시간을 세분화하여 측정하고 추가적인 동물실험을 통해 조직학적인 고찰이 필요할 것으로 생각한다.

REFERENCES

1. Urist MR. Bone formation by autoinduction. *Science* 1965; 150:893-9.
2. Yeomans JD, Urist MR. Bone induction by decalcified dentin implanted into oral osseous and muscle tissues. *Arch Oral Biol* 1967;12:999-1008.
3. Huggins CB, Urist MR. Dentin matrix transplantation: rapid induction of alkaline phosphatase and cartilage. *Science* 1970;167: 896-8.
4. Huggins CB, Wiseman S, Reddi AH. Transformation of fibroblasts by allogeneic and xenogeneic transplants of demineralized tooth and bone. *J Exp Med* 1970;132:1250-8.
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.
6. Inoue T, Deporter DA, Melcher AH. Induction of cartilage and bone by dentin demineralized in citric acid. *J Periodontal Res* 1986;21:243-55.
7. 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.
8. Gomes MF, Abreu PP, Morosolli ARC, Araujo MM, Goulart MG. Densitometric analysis of the autogenous demineralized dentin matrices on the dental socket wound healing process in humans. *Braz Oral Res* 2006;20:324-30.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Bang G, Urist MR. Recalcification of decalcified dentin in the living animal. *J Dent Res* 1967;46:722-30.
14. Yeomans JD, Urist MR. Bone induction by decalcified dentine implanted into oral, osseous and muscle tissues. *Arch Oral Biol* 1967;12:999-1008.
15. Urist MR. Bone histogenesis and morphogenesis in implants of demineralized enamel and dentin. *J Oral Surg* 1971;29:88-102.
16. Inoue T, Deporter DA, Melcher AH. Induction of chondrogenesis in muscle, skin, bone marrow, and bone matrix in vivo and in vitro. *J Dent Res* 1986;65:12-22.
17. Finkelman RD, Mohan S, Jennings JC, Taylor AK, Jepsen S, Baylink DJ. Quantitation of growth factors IGF-I, SGF/IGF-11, and TGF-O in human dentin. *J Bone Miner Res* 1990;5:7.
18. 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.
19. Bessho K, Tagawa T, Murata M. Comparison of bone matrix-derived bone morphogenetic proteins from various animals. *J Oral Maxillofac Surg* 1992;50:496-501.
20. Gomes MF, Silva MJS, Nogueira TO, Tavano O, Catanzaro-Guimaraes SA. Implantation of dentin matrix in skull defects using amniotic membrane. *J Dent Res* 1999;78:363.
21. Gomes MF, Silva MJS, Nogueira TO, Catanzaro-Guimaraes SA. Histologic evaluation of the osteoinductive property of autogenous demineralized dentin matrix on surgical bone defects in

- rabbit skulls using human amniotic membrane for guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001;16:563-71.
22. Catanzaro-Guimaraes SA, Catanzaro-Guimaraes B, Garcia RB, Alle N. Osteogenic potential of autogenic demineralized dentin implanted in bony defects in dog. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1986;15:160-9.
 23. Catanzaro-Guimaraes SA. Possibility to reinforce bone repair with decalcified dentin matrix. In: *Gesellschaft fur Orale Implantologie* (ed). *Jahrbuch fur Orale Implantologie*. Berlin: Quintessenz, 1993:33-4.
 24. Yeomans JD, Urist MR. Bone induction by decalcified dentin implanted into oral osseous and muscle tissues. *Arch Oral Biol* 1967;12:999-1008.
 25. Masaru M, Tatsushi K, Toshiyuki K, Toshiyuki A, Junichi T, Katsutoshi I, 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.
 26. 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.
 27. Aizawa M. Transplanted bone and transplantation immunity. *Proceeding of Japanese Society of Pathology* 1973;62:69-98.
 28. Urist MR, Iwata H, Ceccotti PL, Dorfman RL, Boyd SD, McDowell RM, et al. Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. *Proc Nat Acad Sci* 1973;70:3511-5.
 29. Kim HC, Murata M, Akazawa T. Bone induction of human particulated demineralized dentin matrix in nude mice. *Journal of the Korean Academy of Implant Dentistry* 2011;30:9-15.
 30. Hwang HJ, Kim YW, Mo DY, Lee JY, Kim HC, Lee SC. Comparative study of mineralization methods for making human demineralized dentin matrix - comparison 2% HNO₃ and 0.6 N HCl. *Journal of the Korean Academy of Implant Dentistry* 2012;31:20-5.
 31. Hwang HJ, Kim YW, Mo DY, Lee JY, Kim HC, Lee SC, et al. Case report and histologic study of maxillary anterior bone augmentation using autogenous demineralized dentin matrix which was made immediately after extraction. *Journal of the Korean Academy of Implant Dentistry* 2012;31:9-14.