

나노 크기의 칼슘이 치조골 형성에 미치는 영향

복성철, 최동주

한림대학교 의과대학 구강악안면외과학교실

The effect of nano-sized calcium on the bone regeneration of defected area

Seong-Chul Bok, Dong-Ju Choi

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Medicine, Hallym University

Corresponding Author: Dong-Ju Choi

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Medicine,
Hallym University, 158, Yangnyeongsi-ro, Dongdaemun-gu, Seoul, 02490, KOREA.
Tel: +82-2-3299-3400, Fax: +82-2-3299-3434, E-mail: djcdavid@hanmail.net

ABSTRACT

Dental implant has become as a very important treatment option in dental field and the needs are growing explosively. But unfortunately, all patients are not candidate for implant treatment. Especially if he is a man who has poor bone conditions, surgical options are greatly restricted. So the quality and quantity of bone is most important factors when selecting the cases.

The quality and quantity of bone influencing to the implant during surgical procedure and even after it is inserted. Lack of bone makes difficult to install the implant itself. After extraction of teeth, new bone is forming and filling the defect of extraction socket and the degree of filling bone is differed by the surrounding condition such as the inflammation.

Usually clinicians use various methods for control the defect. Bone graft, separation of alveolar bone, narrow implant, and use other site for implants are the methods for overcome the difficulties.

Grafted bone is work as scaffold of bone growth and for the success graft, the ability of bone making is important. Various types of bone are used for graft, autogenous, allogenic bone, xenogenic bone, alloplastic graft materials are them. And they are used by clinicians by their favor.

Grafted bone must have good ability for bone regeneration and has no inflammatory effect, convenient to use and reasonable price.

Recently alloplastic graft materials are increasing to use instead of using allograft or xenograft which has cross infection. And ingredients of calcium are the main contents of those materials. These kinds of materials have advantages of chief process and can get plentiful amount, but have disadvantage of lack of bone making ability and problems related to the resorption.

In this study nano-sized calcium is used and this material evokes little inflammation and little remnants when grafted. So we use this for conform the ability of bone formation.

Key words: Nano-sized calcium, Bone regeneration, Remnants of graft.

I. Introduction

임플란트가 치과 치료의 중요한 영역으로 자리 잡아 가고 있지만 골량이 부족하거나 골질이 약한 경우에는 예후가 좋지 않은 한계를 드러내기도 한다. 치조골의 골량(quantity)과 골질(quality)은 모두가 임플란트를 식립 할 때 그리고 이미 심겨진 임플란트에 영향을 미치게 되며 특히 골량의 부족은 임플란트를 식립 하는 시술 자체를 어렵게 만든다. 발치를 하고 나면 이곳에 새로운 골이 형성 되는데 발치 시의 염증의 유무에 따라서 형성되는 골의 양에서 차이가 나타나게 된다¹⁾. 골량이 부족할 때에 이를 해결하기 위해서 여러 가지 방법들을 사용하게 되는데 골이식술을 비롯하여 치조골 분리술, 가는 임플란트의 사용, 임플란트 식립 위치의 변경 등의 방법을 사용하는데 그 중 가장 보편적이고 장기간 예후를 보장 받게 되는 방법이 바로 골이식 술이다. 그러나 골이식술은 시술 자체가 어려울 뿐 아니라 초기에 감염이 생기지 않도록 주의할 해야 하며 한번 실패를 한 경우에는 연조직의 치유 능력이 떨어지고 탄력이 줄어들어 2차 골 이식을 어렵게 하는 경우도 발생하게 된다.

따라서 1차 골이식 시 정확한 수술을 통해서 골이식술을 시행하는 것이 중요한 것이다. 이 외에도 이식된 골의 성향에 따라서 골이 형성되는 정도가 다르게 되는데 일반적으로 자가 골을 사용하는 경우가 아니라면 결손부에 이식된 골은 골 형성을 위한 비계 (scaffold)로서 기능을 하게 되는데 이때 이식된 골이 얼마나 효과적으로 골 형성을 도와주는지가 중요한 것이라 할 수 있게 된다²⁾. 골이식술을 위해서는 다양한 종류의 골이 사용 되고 있다. 자가골, 동종골, 이종골, 합성골 등이 사용되고 있으며 각각의 종류에 따른 특징을 가지고 있어 사용자의 선호도에 따라서 그리고 결손의 종류에 따라서 다르게 사용된다.

골이식재의 조건은 골형성 능력이 좋아야 하고 염증반응 등의 부작용이 없어야 하며 사용상의 편리함과 합리적인 가격 등이 요구된다.

최근 합성골은 수술의 어려움이 있는 자가골이나 교차 감염의 위험성이 있는 동종골 또는 이종골의 여러 문제점들을 보완하는 의미에서 종류가 다양해지고 사용 빈도가 증가하고 있는 추세이다. 현재 사용 되고 있는 합성골은 칼슘 성분이 주가 되는 제품들이며 각 제품 마다 고유한 특성을 보이며 임상가의 선호에 따른 골이식재로서 사용되고 있다. 이러한 합성골은 저렴한 가격에 많은 양을 얻을 수 있는 장점이 있는 반면에 골형성 능력에 대해서는 여전히 부족하다는 평을 받고 있는 실정이며 특히 흡수가 전혀 일어나지 않거나 때로는 지나치게 빠른 흡수로 인해서 골형성이 미처 일어나지 않는 등의 문제점들을 보이고 있는 경우도 있다. 본 연구에서는 일반적인 물질이 나노화 되면 그 고유한 성상이 변화되는 것을 알게 되었고 나노 칼슘을 이용한 이식재가 기존의 칼슘의 성상과는 다른 골형성 양상을 보이고 있을 것이라는 사실에 착안 하여 칼슘을 주성분으로 하는 나노 크기의 합성골을 만들어서 기존의 재료들과는 달리 염증 반응을 최소화 시키고 합성골의 단점인 잔존물이 남지 않는 특성을 이용하여 골 형성을 촉진하는 결과를 얻어 보고자 한다.

II. Materials and methods

Sprague Dawley 계 Rat을 실험동물로 사용하였으며 12주령의 380 g으로 성장 시킨 후 사용을 하였다. 마취는 Zolletil : Lumpun 을 1.5 : 1로 섞어서 1 mm/kg의 용량으로 주입하였다. 쥐의 양측 두개골을 사용하기 위하여 통법에 따라 쥐의 두개골을 노출 하였으며 trephine bur를 이용하여 두개골에 직경 5 mm의 결손부를 형성하고 나



Fig. 1. Sprague Dawley Rat (12weeks, 380g) was used. Both side of skull was opened as usual operation methods. Critical sized defect(5mm) was prepared using trephine bur. And each defected site was filled with nano-sized calcium, Bio-Oss, and without filling for control site.

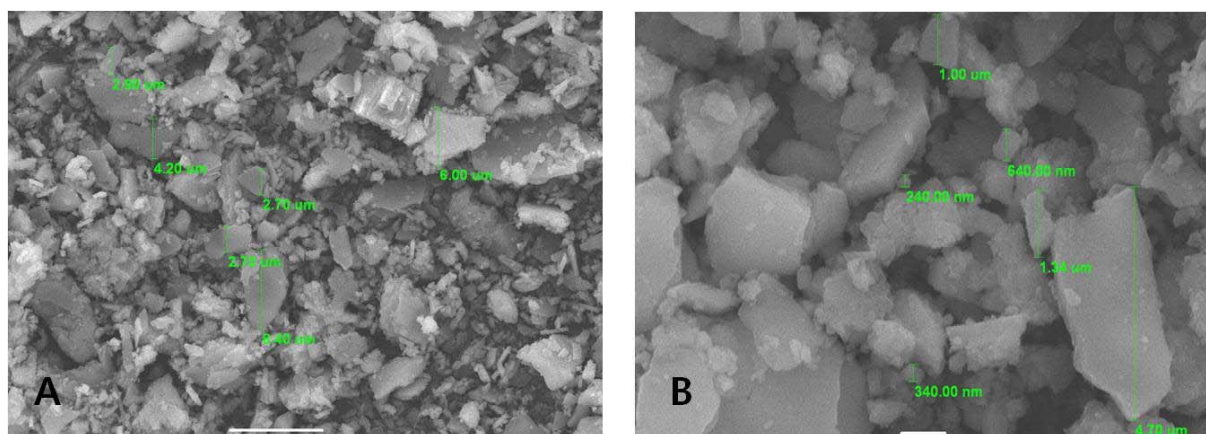


Fig. 2. Relatively irregular and large sized particle can be seen on A side

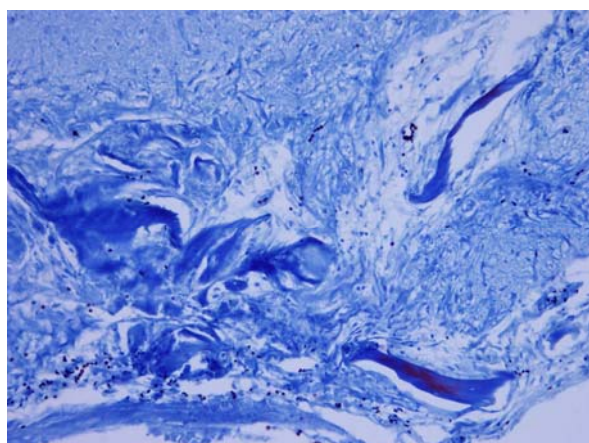


Fig. 3. Histological slide of the site without filling, shows no bone formation.

노 칼슘, Bio-Oss를 각각 결손부에 이식하였다. 대조군으로는 결손부에 이식재를 넣지 않은 상태로 하였다 (Fig. 1). 각각의 실험은 5마리씩 시행 하였으며 4주 후 rat를 희생시키고 육안적인 관찰과 함께 조직 표본을 만들어서 골 형성 정도를 관찰 하였다.

나노 칼슘은 기존 상품으로 판매가 되고 있는 NANO CALCIUM 2 (ma myer, USA)를 사용하여 1차 실험을 시행 하였고 이의 결과와 헝가리 부다페스트 연구소에서 제조한 나노 칼슘을 사용하여 그 효과를 비교 하였다. 두 종류의 나노 칼슘은 전자 현미경을 통해서 구조를 확인 하였고, 또한 흡광 분석기를 이용하여 나노 크기를 확인 하였다. 1차 실험에서 사용한 NANO CALCIUM 2와는 달리 2차 실험에 사용한 나노 칼슘은 입자가 고르고 원형의 상태를 보였다 (Fig. 2).

Table. 1. Quantitative analysis of nano calcium.

Element	Contents
Ag	4.14
Al	102.51
B	5.82
Ca	355241.38
Fe	58.68
K	196.65
Li	7.80
Mg	270.24
Na	4638.31
P	ND
Si	241.13
Sr	1231.88
Zn	0.72

III. Results

처음 사용 하였던 나노 칼슘은 골 형성이 거의 일어나지 않은 상태로 육아 조직만 관찰 되었으며 이것은 아무것도 넣지 않은 대조군과 육안적으로 차이가 없었다. 따라서 이 제품은 골 형성에 거의 영향을 주지 않는 것으로 판단되었다. 본 실험에서 사용된 제품의 성분의 분석 결과 일반 칼슘성분을 위주로 하는 이식재와는 다르게 성분 중에 phosphate가 전혀 발견 되지 않는 것을 볼 수 있다. 2차 실험은 헝가리 부다페스트 연구소에서 제작하여 사용 중인 나노 칼슘을 이용해서 골 형성 정도를 측정해보았으며 대조군과의 사이에서 유의한 결과를 얻을 수 있

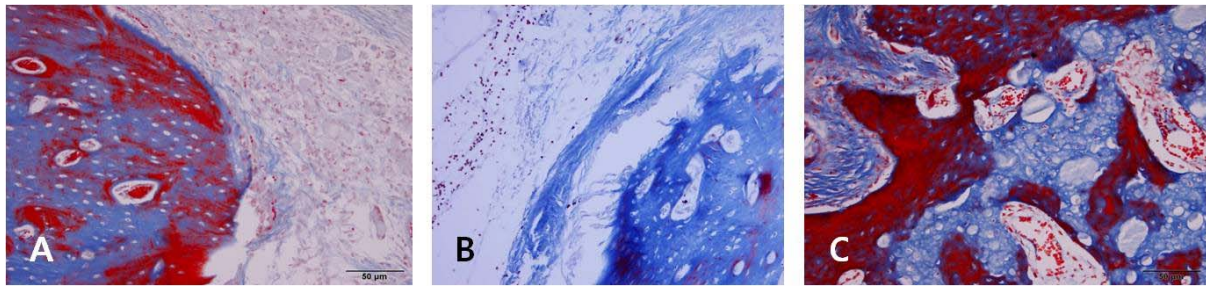


Fig. 4. A: New bone formation around Bio-Oss after 4 weeks, B: Bone formation around nano calcium after 2 weeks, C: New bone formation around nano calcium after 4 weeks.

게 되었다. 또한 Bio-Oss와 비교를 한 실험군에서는 양측 모두 비슷한 정도의 골 형성이 관찰 되었다. 조직 표본을 만들어서 MT 염색을 통해 확인 한 결과에서는 결손부에 아무 것도 넣지 않고 실험을 진행시킨 군과 나노 칼슘을 넣은 군에서 4주째에 뚜렷한 골 형성 량에 차이를 보이고 있으며 매우 우수한 골의 구조를 보이고 있는 것을 알 수 있다 (Fig. 3, 4).

IV. Discussion

골 결손부에 이식하는 골 대체물은 오래 전부터 지속적으로 연구 되어 왔으며 이 중 자가골은 이전부터 지금까지 이식재의 황금 기준 (gold standard)으로 여겨지고 있다. 자가골을 이식하는 경우 이식 부위에서 골형성, 골유도, 골전도의 세 가지 반응이 일어나면서 신생골이 형성되게 된다³⁾. 그러나 자가골은 채취하는 과정에서 추가적인 수술을 해야 하는 부담이 있고 또한 골의 흡수가 예상보다 많이 일어나기도 하는 단점이 있어서 사용이 제한되고 있는 실정이다. 특히 자가골 중 구강 외에서 채취하는 장골의 경우 흡수가 심한 것으로 알려져 있으며 이부 혹은 하악지에서 채취하는 경우 흡수는 비교적 적게 일어나지만 이식을 위해서 채취할 수 있는 골의 양이 제한되는 단점이 있다^{4,5)}.

자가골 이식재를 대신해서 사용되는 것으로 동종골과 이종골이 있다. 이들은 모두 사전 처리 없이 이식재로 사용할 때 면역적인 거부 반응을 보이기 때문에 이를 해결하기 위해서 동결건조 (freeze-dried or lyophilized)시키거나 탈회동결건조 (demineralized freeze-dried) 등의 처리 과정을 거치게 된다. 또한 이종골은 숙주에 면역반응을 일으키지 않기 위해서 화학적인 방법을 통해서 유기성분을 제거하는데 과거에는 쥐나 돼지 등의 여러 종의 동물을 사용했으나 이들 동물들에서 다양한 면역적인 문제점들이 발견 되면서 요즘은 거의 대부분을 소의 뼈에서 추출한 제품들을 사용하고 있다. 그러나 최근 소의 뇌경막을 이용하여 사람의 뇌 결손부를 치료했던 환자들에서 인간 광우병이라 불리는 심각한 면역성 질환이 발생하는

보고가 계속해서 나오고 있어 향후 이의 사용 여부에 대한 귀추가 주목되고 있다.

이종골이나 동종골 모두는 골전도성 만을 가지고 있으며 이 때문에 이식재에 의한 골형성 능력은 자가골에 비해서 부족하게 되며 보조적인 골형성 능력만을 가지게 된다. 특히 이종골의 경우는 이식 후에도 거의 흡수가 일어나지 않는 특징을 가지고 있게 되는데 이것이 새로운 골을 형성하는 것을 방해하여 제한된 골형성만이 가능하게 되는 요인이 된다⁶⁾. 더욱이 동종골의 경우는 HIV 등의 교차 감염의 위험성이 제기 되었고 공여자의 나이나 개인적인 상태에 따라서 이식재의 골형성 능력에 대한 편차가 심하게 나타나기도 한다는 사실이 알려져 있다⁷⁾. 이종골의 경우에도 최근 불거지고 있는 광우병에 대한 두려움 외에도 면역적인 문제의 발생 가능성 때문에 사용을 꺼리는 경우가 있으며 특히 일본의 경우에는 그 사용이 허가되지 않을 정도로 엄격하게 규제가 되고 있는 실정이다.

최근에는 bone morphogenetic protein (BMP)에 대한 연구가 활발해 지고 있으며 이물질이 골형성을 촉진하는 것으로 알려져 있어서 이를 자가골이나 혹은 기타 골 이식재들과 혼합하여 사용함으로 효과적으로 결손부를 재건하려는 연구가 활발히 진행 중에 있다⁸⁾. 골형성을 촉진하는 물질로는 BMP와 더불어 PepGen P-15라는 물질이 있으며 이와 더불어 다른 많은 연구진들에 의해서 골형성을 촉진하는 물질도 연구 중이며 좋은 결과들을 보고하고 있다⁹⁾. 골형성에 여러 가지 요인이 작용하기는 하지만 가장 중요한 것은 혈액의 공급이기 때문에 수술 시 혈관의 재형성이 잘 일어나도록 하는 것이 필요하다¹⁰⁾. Seibert 등은 골형성을 정상적으로 이루기 위해서는 수술 시 연조직과 경조직의 처치가 모두가 중요한 것으로 발표했다¹¹⁾.

한편 합성골을 사용하는 빈도가 점차 증가 추세에 있는데 이는 이전에 주로 사용하던 hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)는 골형성 능력이 거의 없으며 체내에 잔존하면서 많은 문제점들을 유발하여 이를 대신하는 많은 물질들이 개발되었다. Al_2O_3 , 황산칼슘 (calcium sulfate), 탄산칼슘 이식재 (calcium carbonate)의 한 종류인 Biocoral¹²⁾ 등이

사용되기도 하였으나 매우 제한적으로 사용되다가 현재는 그 사용이 거의 중단된 상태이다. 최근 사용량이 증가하고 있는 cerasorb는 제3인산칼슘 (tricalcium phosphate)의 한 종류로서 자연 상태에서는 존재하지 않는 형태의 인산칼슘이다. 이것의 일부는 체내에서 결정형 수산화인회석으로 변화 되는 것으로 알려져 있기도 하다¹³⁾.

Schouten등은 나노 크기의 인산칼슘을 임플란트에 부착시켜 이들이 표면을 거칠게 한 다른 임플란트 (large grit, acid etched)와 비교 해 보았을 때 임플란트의 고정 강도나 치유 과정에서 거의 차이가 없었다는 보고를 하였다¹⁴⁾. 일반적으로 나노 물질은 100 nm이하의 크기를 가진 물질을 말하는데 금속의 나노 크기 물질은 인체에서 감염에 대한 저항성이 있는 것으로 알려져 있다^{15,16)}. 이러한 성상을 바탕으로 Reigstad 등은 임플란트에 hydroxyapatite와 흡수성 인산칼슘을 표면 처리하여 식립 한 후에 결과를 관찰 한 결과 성공률이 증가하는 것을 관찰하였다¹⁷⁻¹⁹⁾. 한편 Meirelles 등은 임플란트를 식립하고 틈이 남는 모델을 이용해서 나노 수산화인회석이 표면 처리된 임플란트를 식립 해본 결과 이들이 전기적으로 처리된 표면과의 차이가 거의 없이 치유가 일어나는 것으로 되어 있으며²⁰⁾, Yang 등의 보고에서도 나노 크기의 수산화인회석을 사용한 것이 기존의 sandblast후 산 처리한 표면에 비해서 뚜렷한 장점이 있지 않다고 보고하고 있다²¹⁾. 그러나 나노 수산화 인회석은 최근 연구에서 흡수가 빨리 일어나고 칼슘 방출을 빨리 한다는 보고를 하였다²²⁾.

본 연구에서는 나노 칼슘의 구성 성분이 골형성에 중요한 역할을 하는 것을 알게 되었으며 나노 칼슘의 구성이 골 형성에 유리한 상황이라면 잔존 물질이 남지 않는 상황에서 골 형성을 촉진하고 있기 때문에 골 이식재로서 충분한 가치를 가지고 있을 것으로 판단하는 바이다

V. Conclusions

1. 나노 형태의 골이식재인 나노 수산화 인회석은 이식된 부위에서 우수한 골형성 능력을 보여 주고 있으며 현재 가장 보편적으로 사용되고 있는 골이식재인 Bio-Oss와 비교 할 때 골형성 정도가 유사한 육안적인 소견 상을 보이고 있다
2. 이식되는 골 대체물로 칼슘의 존재가 가장 중요한 구성물로 생각되었으나 실험의 예에서 볼 수 있듯이 인산의 존재가 골형성에 매우 중요한 요소임을 알 수 있게 된다
3. 치아는 골과 비슷한 구조와 무기물 및 유기물을 가지고 있는데 이것을 분석해 보면 칼슘과 인산의 비율이 약 1.5 : 1 의 비율로 존재함을 알 수 있다. 따라서 이 비율을 가지고 있는 골이식재를 사용하는 것이 골형성을 촉진하는데 매우 유리할 것으로 판단된다.
4. 본 실험에 사용 된 나노 수산화 인회석은 주변에서 쉽

게 구할 수 있는 계란 껍데기에서 얻은 것으로 쉽게 재료를 구할 수 있다는 장점이 있으며 좀 더 진행된 연구를 통해서 임상에 매우 유용하게 사용이 가능 할 것으로 생각 된다

Reference

1. Ahn JJ, Shin HI. Bone tissue formation in extraction socket from sites with advanced periodontal disease: a histomorphometric study in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2008; 23,1133-8.
2. Hoester DL. Bone regeneration graft materials. *J Oral Implantol* 2002;28:290-4.
3. Misch CE, Dietsh F. Bone-grafting materials in implant dentistry. *Implant Dent* 1993;2:158-67.
4. Koole R, Bosker H, Dussen FN. Late secondary autogenous bone grafting in cleft patient comparing mandibular (ectomesenchymal) and iliac crest (mesenchymal) grafts. *J Craniomaxillofac Surg* 1989;17(suppl):28-30.
5. Proussaefs P, Lozada J, Kleinman A, Rohrer MD. The use of ramus autogenous block grafts for vertical alveolar ridge augmentation and implant placement: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002;17:238-48.
6. Pinholt EM, Bang G, Haanaes HR. Alveolar ridge augmentation in rats by Bio-Oss. *Scand J Dent Res* 1991;99:154-61.
7. Hislop WS, Finlay PM, Moos KF. A preliminary study into the uses of anorganic bone in oral and maxillofacial surgery. *Br J Oral Maxillofa Surg* 1993;31:149-53.
8. Misch CM. The use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 for the repair of extraction socket defects: a technical modification and case series report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2010;25:1246-52.
9. Bhatnagar RS, Qian JJ, Wedrychowska A, Sadeghi M, Wu YM, Smith N. Design of biomimetic habitats for tissue engineering with P-15 a synthetic peptide analogue of collagen. *Tissue Eng* 1999; 5:53-65.
10. Yukna RA. Clinical evaluation of coralline calcium carbonate as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects. *J Periodontal* 1994;65:177-85.
11. LeslieHamack H, Exxecking WF. Comparative

- Vascularization of Autogenous and Homogenous-Bone Transplants. *J Bone Joint Surg* 1960;42:811-7.
12. Seibert JS, Salama H. Alveolar Ridge Preservation and Reconstruction. *Periodontol* 1996;11:69-84.
 13. Lane JM. Bone graft substitutes. *West J Med* 1995;163:565-6.
 14. Schouten C, Meijer GJ, Beucken JJ, Leeuwenburgh SCG, Jonge LT, Wolke GC, Spauwen PHM, Jansen. In vivo bone response and mechanical evaluation of electrosprayed CaP nanoparticle coatings using the iliac crest of goats as an implantation model. *Acta Biomater* 2010;6:2227-36.
 15. Allerker RP. The use of nanoparticles to control oral biofilm formation. *J Dent Res* 2010;89:1175-86.
 16. Yoon CS. Potential Health Risks and Issues of Nanoparticles. *BMB Reports*. 2007;17: 7-19.
 17. Reigstad O, Johansson C, Stenport V, Wennerberg A, Reigstad A, Rokkum M. Different Patterns of Bone Fixation with Hydroxyapatite and Resorbable CaP Coating in the Rabbit Tibia at 6, 12, and 52 weeks. *J Biomedic Medic Research* 2011;8:1-7.
 18. Meirelles L, Melin L, Petrolia T. Effect of Hydroxyapatite and Titania Nanostructures on Early in Vivo Bone Response. *Clin Implant Dent Relat Res* 2008;7:1-9.
 19. Yang GL, He F, Hu J. Effects of Biomimetically and Electrochemically Deposited Nano-hydroxyapatite Coatings on Osseointegration of Porous Titanium Implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;107:782-9.
 20. Meirelles L, Albrektsson T, Kjellin P, Arvidsson A, Franke-Stenport V, Andresson M, Currie F, Wennerberg A. Bone reaction to nano hydroxyapatite modified titanium implants placed in a gap-healing model. *Int J Biomed Master Res* 2008;87A:624-31.
 21. Yang GL, He FM, Ba JH, Wang Xx, Zhao SF. Effect of biomimetically and electrochemically deposited nano-hydroxyapatite coating on osseointegration of porous titanium implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;107:782-9.
 22. Murugan R, Ramakrishna S. Aqueous mediated synthesis of bioresorbable nanocrystalline hydroxyapatite. *J Cryst Growth* 2005;274:209-13.