

원저

대한구강보건학회지 : 제 30권 제 3호, 2006
J Korean Acad Dent Health Vol. 30, No. 3, 2006

나노 및 마이크로 수산화인회석 함유 구강양치액의 재광화 효과 비교

김민영, 권호근, 김백일

연세대학교 치과대학 예방치과학교실, 구강과학연구소, 구강악안면경조직재생센터

색인 : 나노 입자, 마이크로 입자, 수산화인회석, 재광화, 초기우식병소

1. 서 론

수산화인회석(hydroxyapatite, HAp)은 사람의 치아 및 골조직과 화학적으로 구성 성분이 유사하기 때문에 골 이식 및 재생치료 재료로써 광범위하게 사용되고 있다^[3]. 골조직에 대한 HAp의 연구와 함께 치과 분야에서는 손상된 치질을 수복하기 위한 치아 수복재료나^[4] 탈회된 치아표면의 재광화를 목적으로^[5] HAp를 활용해 오고 있다. HAp의 화학구조는 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 이며, 일반적으로 침상 구조를 갖고 있다^[6]. 사람의 치아 내에 있는 HAp는 1-2 μm 두께의 최외각 범랑질에 주로 분포하고 있으며, 구강 내에서 칼슘, 인, 수산화 이온들과 평형을 이루면서, 각종 이온들의 농도를 조절하고 있다^[7]. 따라서 HAp를 치약이나 구강양치액 등에 함유하여 사용했을 때, 범랑질에서 칼슘과 인 등이 소실된 부위의 무기질을 보충해 줌으로써 치아 보호 효과를 기대할 수 있다. HAp의 재광화 효과는 탈회된 범랑질 표면의

미세공극을 직접 메워주는 효과이외에 HAp의 주된 구성성분인 칼슘과 인이 용해됨으로써 무기질 이온을 공급하는 기전을 꼽을 수 있다. 범랑질 소주사이에 미세공극은 약 0.1 μm 이므로 기존에 주로 활용해 오던 0.2-0.3 μm 정도인 마이크로 크기의 HAp (micro-HAp)는 탈회된 범랑질 표면의 미세공극을 직접 메우는 것은 기대하기 어려운 실정이었다.

최근 부각되고 있는 신기술 중 하나인 나노 기술 (nano-technology)은 바이오 기술과 더불어 21세기의 새로운 산업을 이끌어 갈 핵심 기술로 각광을 받고 있다. 나노 기술을 통해서 기존의 물질과 화학적 조성은 동일하지만 단지 입자 크기를 마이크로에서 나노크기로 전환함으로써 과거에는 얻지 못했던 새로운 물리적 성질들을 창출해 낼 수 있다^[8-10]. 범랑질 표면에 존재하는 HAp 결정들의 평균 크기는 약 100 μm 여서 골조직이나 상아질의 결정들에 비해서 크기가 매우 큰 편이고^[11], 범랑질의 결정 구조들은 서로 평행하게 잘 정렬되어 있다. 그러나 범랑질은 골조

직과 상아질에 존재하는 콜라겐과 같은 유기물질을 함유하고 있지 않기 때문에¹²⁾, 인공 HAp를 제작할 때 기존의 법랑질과의 부착능력을 고려해야 한다. 그러므로 기존에 일반적으로 활용해왔던 마이크로 크기의 합성 HAp에 비해서 훨씬 작은 나노 입자크기를 갖는 HAp(nano-HAp)는 탈회된 법랑질 표면의 미세공극을 메우기 위해서 보다 뛰어난 효과를 보일 것으로 기대된다¹³⁾.

본 연구는 HAp 입자의 크기가 초기 우식증 병소의 재광화에 미치는 영향을 확인하기 위해서 기존의 마이크로 크기의 micro-HAp와 새롭게 나노기술을 적용해서 만든 nano-HAp를 이용하여 구강양치액을 제조한 뒤 이들 간에 재광화 효과를 비교하였다. 또한 micro-HAp와 nano-HAp를 이용하여 구강양치액을 만들 때 HAp 분말을 용해시키는 용매로써 중류수 및 0.05% 불화나트륨 용액을 사용한 뒤 각각 재광화 효과를 확인함으로써 불소와 nano-HAp간의 상승효과를 확인하고자 하였다.

2. 연구재료 및 방법

2.1. 법랑질 시편

육안으로 보아 법랑질 형성부전이나 치아우식의 흔적이 없는 전전한 법랑질 표면을 가진 사람의 대구치 치아 150개를 선택하였다. 모든 치아는 치관과 치근 부분을 나누어 치관 부분만을 취하였고, 가로 1.3 cm, 세로 1.9 cm 크기의 태플론 몰드에 아크릴릭 레진을 이용하여 포매하였다. 시편은 grinding machine에 장착된 미세사포에 의해 매끄럽게 연마되었다.

2.2. 탈회용액

탈회용액은 수산화인산칼슘(calcium phosphate; tribasic, Sigma, USA)이 50% 포화된 0.1 M 젖산(lactic acid, Sigma, USA)을 HCl 용액을 이용하여

pH 5.0을 계속 유지시키면서 0.55 μm 여과지를 이용하여 여과하였다. 여과된 용액을 0.5% Cabopol (ETD 2050, Noveon Inc, USA) 400 g과 회석하고, NaOH를 이용하여 최종 pH를 5.0으로 조절하였다.

2.3. 재광화 용액

재광화 용액은 인공타액과 사람의 자극성 타액을 1:1로 혼합하여 사용하였다. 인공타액은 2 l의 중류수에 위점액소(gastric mucin, Difco, USA) 0.22%, 염화칼륨(KCl) 0.1114%, 제2수화인산칼륨(KH_2PO_4) 0.0738%, 염화나트륨(NaCl) 0.0738%, 염화마그네슘(MgCl_2) 1.033%, 염화칼슘($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.0213%가 되도록 구성한 다음 pH 6.8로 조절하여 사용하였다. 자극성타액은 전신질환이 없는 20대 100명으로부터 0.5 g의 파라핀 왁스를 씹어서 채취한 후 원심분리하여 상층액만을 이용하였다.

2.4. 실험용 양치액의 조성

모든 실험은 실험용 양치액 30 ml와 재광화 용액 20 ml를 혼합하여 사용하였다. 실험용 양치액의 세부 조성은 중류수 또는 0.05%의 불화나트륨 용액에 마이크로 또는 나노 크기의 HAp 분말을 1%, 5%, 10%의 농도로 회석하여 제조하였다(Table 1). 본 연구에서 사용한 마이크로 및 나노 크기의 HAP는 Cerlectron 社에서 제조 공급한 분말을 사용하였다.

2.5. 인공초기우식병소형성

모든 시편은 탈회용액에 넣어 37°C 항온기에서 48시간 처리하여 인공 초기우식병소를 형성하였다. 탈회된 시편의 Vickers 경도(Vickers hardness number, VHN)를 측정하여 평균 VHN이 25-45 범위의 초기우식법랑질의 표면 경도를 갖는 시편만을 실험에 사용하였다.

Table 1. Compositions of control and experimental mouthrinse solutions

Group	Classification	Solution	Solute
1	Negative control group	DW	-
2	Experimental group	DW	1% HAp
3	Experimental group	DW	5% HAp
4	Experimental group	DW	10% HAp
5	Positive control group	0.05% NaF	-
6	Experimental group	0.05% NaF	1% HAp
7	Experimental group	0.05% NaF	5% HAp
8	Experimental group	0.05% NaF	10% HAp

DW is distilled water

HAp is nano-sized or micro-sized

2.6. 단순침적법

본 연구에서는 마이크로 및 나노 HAp 함유 양치액의 재광화효과를 평가하기 위해서 단순침적법을 사용하였다. 본 실험에서는 인공적으로 초기우식이 형성된 치아 시편을 계속해서 실험용 양치액에 담가놓는 대신에 실험 양치액에 12시간, 재광화 용액에 12시간 동안 처리한 후 미세경도를 측정하였고, 같은 과정을 한 번 더 반복한 후 미세경도를 측정하였다.

2.7. 치아표면 경도의 변화

법랑질 표면의 미세경도 변화를 관찰하기 위해서 Vickers diamond indenter가 부착된 미세경도측정기(JT, Toshi Inc, Japan)를 이용하여 시편 표면에 수직이 되게 200 g의 하중을 10초 동안 가하여 VHN을 측정하였다. 이때 시편 처리 전 VHN 측정부의 인접부위에서 실험용 양치액 처리 후의 VHN을 측정함으로써 측정 부위의 차이에서 발생할 수 있는 오차를 줄이도록 하였다.

2.8. TEM을 이용한 Micro-HAp와 nano-HAp의 결정구조비교

본 연구에서 평가한 micro-HAp와 nano-HAp의 미세 결정구조를 확인하기 위해 투과전자현미경(Transmission electron microscope, Jeol, Japan)을

사용하여 평가하였다. 투과전자현미경 분석을 위해 분말형태의 micro-HAp와 nano-HAp를 3차 증류수에 0.025%로 용해시키고 이 용액을 분석용 격자위에서 24시간동안 건조시켰다. 준비된 시편을 80 KV의 전압 하에서 미세 결정 형태를 확인하였고, 결정의 길이 및 형태를 측정하였다.

2.9. SEM을 이용한 양치액 처리 후의 미세구조 비교

양치액 처리 전후의 법랑질 시편 표면에 대한 미세구조를 분석하기 위해 주사전자현미경(Field emission-scanning electron microscope, FE-SEM, Hitachi, Japan)을 이용하였다. 주사전자현미경 측정을 위한 시편의 준비를 위해 단순침적법으로 처리된 시편을 이온 중착기(Ion sputter, Hitachi, Japan)를 이용하여 시편표면을 70 nm 두께로 코팅시켰다. 준비된 시편을 20 KV의 전압을 걸어 주사전자현미경을 이용하여 미세 표면 구조를 측정하였다.

2.10. 통계분석

입자크기에 따른 차이를 평가하기 위해서 nano-HAp와 micro-HAp를 사용한 양치액간의 재광화효과 비교는 t-검정을 이용해서 시행하였다. 또한, 동일 입자크기를 가지면서 용매 및 HAp 함량을 달리한 양치액들간의 비교는 일요인 분산분석 및 Duncan 검정을 이용하여 비교하였다. 이 모든 분석

Table 2. VHN values of micro-HAp and nano-HAp by simple immersion model for 24 hours

Group	N	Baseline (48 hours demin.)	Treatment 12 hours + Remineralization 12 hours		P-value*
			Nano-sized	Micro-sized	
D.W	6	36.3 ± 6.9 ^a	42.0 ± 2.7 ^a	42.0 ± 2.7 ^a	
D.W+1% HAp	6	35.4 ± 5.8 ^a	47.7 ± 8.0 ^a	39.0 ± 6.6 ^a	0.05
D.W+5% HAp	6	35.9 ± 7.3 ^a	63.3 ± 5.7 ^b	38.8 ± 7.9 ^a	0.02
D.W+10% HAp	6	36.3 ± 6.7 ^a	71.1 ± 7.9 ^{b c}	39.0 ± 7.0 ^a	0.01
NaF	6	36.1 ± 7.1 ^a	75.7 ± 9.6 ^c	75.7 ± 9.6 ^{b c}	
NaF+1% HAp	6	34.9 ± 5.8 ^a	76.7 ± 7.7 ^c	71.8 ± 9.6 ^{b c}	0.39
NaF+5% HAp	6	35.7 ± 8.2 ^a	79.0 ± 6.1 ^c	66.3 ± 12.2 ^b	0.01
NaF+10% HAp	6	36.3 ± 6.6 ^a	100.3 ± 13.1 ^d	77.1 ± 7.9 ^c	0.02

Values are reported as the Mean ± Standard deviation

Concentrations of all NaF are 0.05%

*Statistical comparison by t-test

^{a,b,c,d} The same letter indicates no significant difference at $\alpha = 0.05$ by Duncan's studentized range test

Table 3. VHN values of micro-HAp and nano-HAp by simple immersion model for 48 hours

Group	N	Baseline (48 hours demin.)	Treatment 24 hours + Remineralization 24 hours		P-value*
			Nano-sized	Micro-sized	
D.W	6	36.3 ± 6.9 ^a	49.9 ± 4.5 ^a	49.9 ± 4.5 ^a	
D.W+1% HAp	6	35.4 ± 5.8 ^a	50.8 ± 6.3 ^a	58.0 ± 11.2 ^a	0.28
D.W+5% HAp	6	35.9 ± 7.3 ^a	68.7 ± 4.0 ^b	58.0 ± 4.6 ^a	0.01
D.W+10% HAp	6	36.3 ± 6.7 ^a	76.5 ± 6.7 ^{b c}	65.7 ± 11.7 ^a	0.22
NaF	6	36.1 ± 7.1 ^a	88.3 ± 5.3 ^c	88.3 ± 5.3 ^b	
NaF+1% HAp	6	34.9 ± 5.8 ^a	90.3 ± 11.3 ^c	87.8 ± 15.2 ^b	0.71
NaF+5% HAp	6	35.7 ± 8.2 ^a	92.0 ± 6.1 ^c	87.7 ± 12.1 ^b	0.22
NaF+10% HAp	6	36.3 ± 6.6 ^a	113.4 ± 9.3 ^d	98.5 ± 7.2 ^b	0.01

Values are reported as the Mean ± Standard deviation

Concentrations of all NaF are 0.05%

*Statistical comparison by t-test

^{a,b,c,d} The same letter indicates no significant difference at $\alpha = 0.05$ by Duncan's studentized range test

은 SPSS 12.0 통계 package program을 이용하여 분석하였다.

3. 연구성적

3.1. 단순침적법에 의한 표면 미세경도의 변화량 비교

Micro-HAp와 nano-HAp를 함유한 구강양치액의 재광화 효과를 비교하기 위하여 인공적으로 초기우식병소가 형성된 범랑질 시편을 단순침적법에 의하여 처리하였다. 각종 구강양치액에 시편들을 24시간(Table 2)과 48시간 처리한 결과(Table 3) 전반적

으로 구강양치액 처리 후의 범랑질 표면 미세경도는 증가하는 경향이 있었으나 증가된 정도는 각 실험군마다 차이가 있었다.

Nano-HAp를 추가한 실험용 양치액에 범랑질시편을 총 24시간동안 처리한 결과, 용매로써 중류수 또는 0.05% 불화나트륨 용액을 사용한 군 모두에서 nano-HAp의 농도에 비례하여 미세경도가 증가하였다(Table 2). nano-HAp와 micro-HAp간에 재광화 효과를 비교한 결과, 중류수가 용매인 경우는 HAp 농도가 1, 5, 10%, 불화나트륨 용액이 용매인 경우는 5, 10%에서 통계적으로 유의한 수준으로 nano-

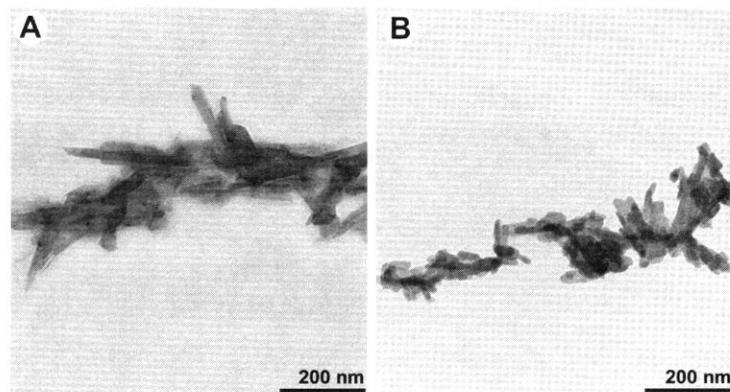


Fig. 1. TEM images of hydroxyapatite particles. Particles of HAp were micro-sized (A) and nano-sized (B)

HAp가 micro-HAp에 비해서 재광화 효과가 더 우수한 것으로 나타났다($p < 0.05$). 용매에 따른 재광화 효과 비교에서는 nano-HAp를 녹이는 용매로써 중류수를 사용한 군보다는 불화나트륨 용액을 사용한 군에서 미세경도가 더 높게 나타났다. 이러한 경향은 micro-HAp를 첨가한 실현양치액에서도 비슷한 결과가 나타났으나, micro-HAp로 처리된 시편들의 미세경도의 증가량은 nano-HAp로 처리된 시편에 비해서 작은 것으로 나타났다. 불화나트륨용액만 사용한 양치액과 HAp함유 양치액 간의 상승작용은 Nano-HAp를 10% 함유한 양치액에서만 확인할 수 있었다($p < 0.05$).

48시간동안 양치액과 재광화용액으로 처리한 시편의 미세경도는 24시간 처리한 시편에 비해서 더욱 증가된 양상을 보여주었다(Table 3). 5% 중류수 용매를 사용한 경우와 10% 불화나트륨용액을 용매로 사용한 경우에서 nano-HAp가 micro-HAp에 비해 통계적으로 유의한 수준에서 미세경도가 우수한 것으로 나타났다($p < 0.05$). 48시간 처리 시편 역시 24시간 처리 시편과 마찬가지로 중류수 용매군에 비해서 불화나트륨 용매군에서 미세경도가 높은 것으로 나타났다. 그러나 micro-HAp를 넣은 양치액들은 불화나트륨만 사용한 양치액에 비해서 다소 높은 미세경도를 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 없

었다. 그러나 nano-HAp 10% 양치액은 불화나트륨만 사용한 양치액에 비해서 통계적으로 유의한 수준으로 미세경도가 향상된 것으로 보아 불소와 nano-HAp간에 재광화 상승작용을 확인할 수 있었다.

3.2. TEM을 이용한 입자의 크기에 따른 미세구조 비교

입자의 크기가 다른 micro-HAp와 nano-HAp의 미세구조를 비교하기 위하여 투과전자현미경을 이용하였다. 그 결과, 각각의 결정의 모양과 크기에 차이가 있었다. Micro-HAp의 결정들은 침상구조(needle shape)를 나타냈으며(Fig. 1A) Nano-HAp도 micro-HAp와 비슷한 침상구조를 갖고 있었다. 그러나 Nano-HAp는 입자의 길이가 약 50 nm 정도인데 비해서(Fig. 1B) micro-HAp의 길이는 이보다 약 4.5배 정도 긴 0.2-0.3 μm 정도로 나타났으며, 그 두께도 두꺼웠다.

3.3. SEM을 이용한 법랑질 표면의 미세구조 분석

Nano-HAp를 이용하여 48시간 동안 단순침적법으로 처리한 법랑질 표면의 미세구조를 분석하기 위해 주사전자현미경을 이용하였다. 이 과정에서 건전치아군, 인공초기우식병소군, 0.05% 불화나트륨로 처리군, 중류수에 10% nano-HAp 첨가군, 0.05% 불화나트륨 용액에 10% nano-HAp 첨가군 등으로 나

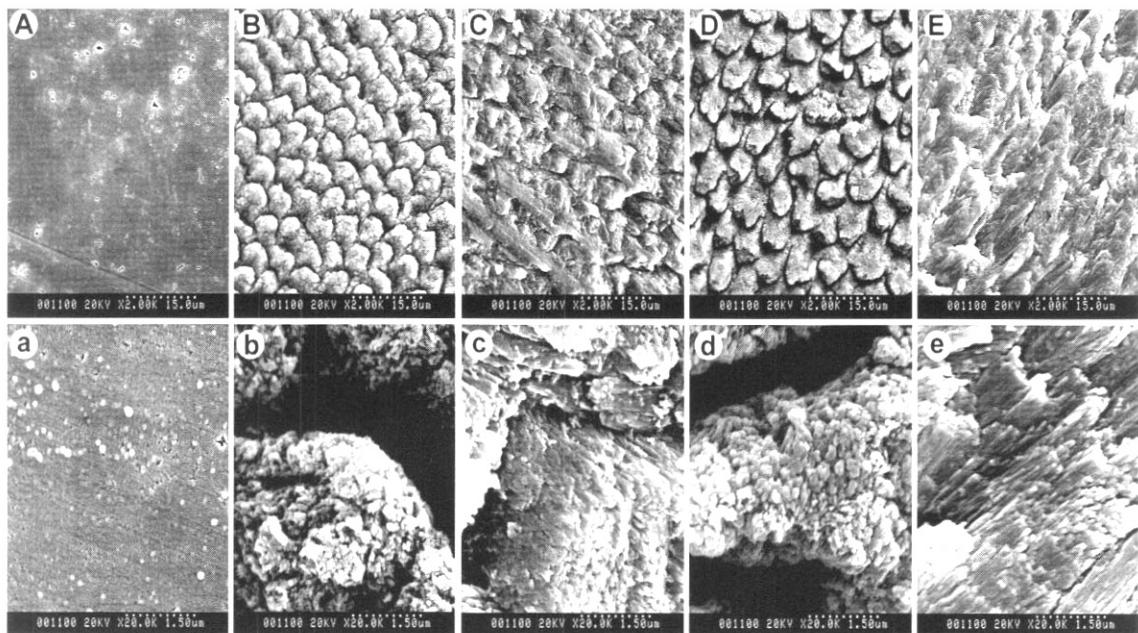


Fig. 2. SEM images of enamel surfaces which were treated several methods. Specimens were sound tooth (A, a), artificial incipient caries lesion tooth (B, b) and were treated for 48 hours with distilled water added 10% nano-HAp (C, c), 0.05% NaF solution (D, d), and 0.05% NaF solution added 10% nano-HAp (E, e). Magnifications were $\times 2,000$ (A-E) and $\times 20,000$ (a-e).

누어 법랑질 표면의 미세구조를 2,000배와 20,000배의 배율로 평가하였다.

건전 치아의 경우 법랑질 표면은 모든 배율에서 매우 매끈한 표면상태를 나타냈다(Fig. 2A, 2a). 반면에 인공적으로 초기우식병소가 형성된 치아의 표면은 법랑소주(enamel rod)의 가장자리가 하얗게 탈색되었고, 그 주변 부위에 무기질 소실이 나타났으며(Fig. 2B), 결정의 길이가 매우 짧아졌음을 확인할 수 있었다(Fig. 2b). 한편 0.05% 불화나트륨으로 처리한 법랑질의 표면은 탈회된 시편의 표면과 거의 비슷한 형태로써 탈회된 시편에서 하얗게 탈색되었던 법랑소주의 가장자리가 주변의 정상적인 색조로 회복되었고(Fig. 2D), 법랑소주 결정들의 소실 부위에 구형의 불화칼슘 알갱이들이 침착된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2d).

한편 중류수 용매에 10% nano-HAp를 넣은 실험군으로 처리한 법랑질 시편의 미세표면 구조는 불화

나트륨만 사용한 실험군에 비해서 매끄러운 표면을 나타냈고 법랑소주 주변의 미세공극이 미세결정에 의해서 채워져 있는 형태를 나타냈다(Fig. 2C). 또한 고배율로 관찰한 결과 이 실험군의 미세표면은 불화나트륨만 사용한 실험군에서 보였던 구형의 알갱이보다는 상대적으로 길이가 긴 결정들로 구성되어 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 2c). 이와 같은 양상은 0.05% 불화나트륨 용액에 10% nano-HAp를 첨가한 실험군에서 더욱 확연히 나타났다. 법랑질시편의 미세표면은 중류수 용매에 10% nano-HAp를 첨가한 군에 비해 더욱 매끄러운 형태를 나타내었고(Fig. 2E), 미세공극의 채운 결정들의 길이도 더욱 길어졌다(Fig. 2e).

4. 고 안

최근 20-30년 전부터 서구 선진국을 중심으로 치

아우식증 유병률이 급속히 감소하고 있어서 과거에는 크게 부각되지 않았던 초기 우식증에 대한 관심이 크게 증가하고 있다. 또한 전 세계적으로 초기 우식증을 조기 탐지할 수 있는 진단 장비의 개발 및 상품화 역시 급속하게 진행되고 있다. 그 결과 첨단 장비에 의해 조기 탐지된 초기우식병소를 원래 상태의 치질로 회복 시킬 수 있는 재광화 유도 후보 물질에 대한 탐색이 활발히 진행되고 있다. Raynold¹⁴⁾는 우유에서 채취한 단백질인 Casein phospho-peptide와 칼슘과 인이 풍부한 무기물질인 Amorphous calcium phosphate를 나노 입자 처리를 통해서 새로운 형태의 재광화 유도 물질인 CPP-ACP를 개발하였고, 이후 이물질을 활용한 껌¹⁵⁾이나 구강 도포 용 페이스트¹⁶⁾가 상품으로 개발되었다. 재광화 유도 후보물질 중에서 인간의 치아와 화학적인 구성성분이 매우 유사한 수산화인회석은 높은 생체 적합성 때문에 그 활용 가능성이 기대되는 물질이다. 이러한 수산화인회석에 최근 부각되고 있는 나노 기술을 적용할 경우 보다 향상된 재광화효과를 기대할 수 있었다.

본 연구에서는 인공적으로 초기 우식 병소를 형성 시킨 치아 시편을 사용하여 입자크기에 따른 재광화 효과를 비교하기 위해서 nano-HAp와 micro-HAp를 이용한 구강양치액을 비교하였고, 양치액을 구성하는 용매에 따른 상승작용을 평가하기 위해서 중류수와 0.05% 불화나트륨 용액을 용매로 사용하여 재광화 효과를 비교하였다. 이 과정에서 시편들의 미세 정도는 실험용액에 12시간, 재광화 용액에 12시간 씩 총 24시간 동안 침적한 뒤 미세경도를 측정하였고, 이 과정을 1회 더 반복하여 총 48시간 경과 후에 한 번 더 미세경도를 평가하였다. 그 결과, 모든 실험군에서 처리 시간이 길어질수록 재광화 효과가 증가하였고, nano-HAp의 농도가 높아질수록 미세 경도의 수치가 증가하였다. 이러한 nano-HAp의 재광화 효과는 용매가 중류수보다는 불화나트륨 용액일

경우 더 크게 나타나서, 48시간 동안 처리하였을 경우 용매가 중류수인 경우에 비해서 불화나트륨에 10% nano-HAp를 혼합시켰을 경우 약 2배 정도의 높은 미세 경도를 나타냈다. 이러한 결과는 Jeong 등⁸⁾이 nano-HAp가 함유된 치약을 이용한 연구와도 동일한 결과로써, nano-HAp의 재광화 효과는 불화나트륨에 의해 상승 작용을 유발한다는 것을 알 수 있었다.

Nano-HAp와 0.05% 불화나트륨 용액을 이용한 재광화 과정에서 법랑질 표면의 미세구조 역시 많은 변화가 확인되었다. 주사전자현미경을 이용하여 미세 구조를 분석한 결과 건전 치아 시편은 균일하고 매끄러운 표면을 나타내지만, 탈회과정을 거친 후에 거친 굴곡으로 이루어진 불규칙한 표면 상태를 나타냈으며, 법랑 소주간 공극(inter crystalline space)부위의 무기질 손실이 크게 증가하였다. 또한 법랑질을 구성하고 있는 결정들의 길이가 짧아졌고 그 구조가 심하게 손상되었다. 한편 0.05% 불화나트륨 용액을 이용하여 재광화를 유도한 시편은 탈회된 시편에 비해 무기질 손상 부위가 다소 회복되었으나 법랑소주간 공극이 완전히 메워지는 않은 상태였다. 반면에 nano-HAp가 첨가된 실험군의 법랑질 표면은 무기질 손상이 일어났던 대부분의 미세공극 부위가 nano-HAp의 입자들로 메워져서 보다 매끄러운 형태를 나타냈다. 또한 법랑질을 구성하고 있는 결정들은 nano-HAp를 사용하지 않은 실험군의 결정에 비해 길이가 긴 형태를 나타냈고, 특히 0.05% 불화나트륨 용액에 nano-HAp를 넣은 실험군의 결정들이 더욱 길어진 것을 확인할 수 있었다. 주사전자현미경에서 재광화된 법랑질 표면의 미세 결정 구조가 투과전자현미경을 이용하여 확인한 nano-HAp의 결정과 유사했기 때문에 nano-HAp의 결정이 탈회된 법랑질의 미세공극을 직접 메웠을 것으로 추측할 수 있었다. 또한 양치액의 용매로써 0.05% 불화나트륨 용액을 사용한 경우 nano-HAp의 결정 구조

가 좀더 길어진 양상을 보였기 때문에 불화나트륨과 nano-HAp간에는 재광화효과의 상승 작용을 유발하는 것으로 사료되었다.

HAp의 입자의 크기에 따른 재광화 효과를 비교한 결과, 인공 초기우식이 유발된 치아시편의 재광화에 있어서 nano-HAp가 micro-HAp보다 높은 재광화 촉진 효과를 보이는 것으로 나타났다.

Nano-HAp 함유 양치액의 우수한 재광화 효과는 사용한 입자들의 나노 크기에 기인한다고 사료되었다. 탈회된 법랑질은 무기질의 손실로 인해 법랑소주 주변에 크고 작은 미세공극들이 생성되어 다공질의 형태를 나타낸다. 이때 형성된 미세공극의 크기는 약 0.5-1 μm 정도인데, 본 연구에서 사용했던 나노 HAp 입자의 크기는 50-90 nm 정도여서 미세공극의 침착에 유리하게 작용했을 것이다. 또한 미세 공극에 침착된 nano-HAp의 입자들은 무기질 이온 평형을 통해서 법랑질 표면으로부터 용출되는 칼슘의 이동을 방해하는 효과도 얻을 수 있게 될 것이다. Fig. 2에서 제시하고 있는 법랑질 표면의 미세구조 사진에서 법랑소주 사이의 미세공극이 다른 종류의 입자에 의해서 메워진 형태는 이러한 사실을 뒷받침 할 수 있다. 또한 입자의 크기가 작을수록 표면적이 증가하고 그 결과 입자들이 표면에 달라붙는 흡착도는 높아지게 된다. 따라서 현재 가공할 수 있는 가장 작은 크기를 가지고 있는 nano-HAp는 매우 큰 흡착력을 가지게 되고, 법랑질 표면과 공극 사이에 침투하여 높은 결합력으로 부착할 수 있을 것이다.

치아 법랑질의 주성분인 수산화인회석의 조성과 유사한 성분을 가지는 nano-HAp의 입자들은 미세공극에 침착한 후에 무기질을 침전시키는데 있어서 큰 역할을 할 수 있을 것이다. 치아의 법랑질은 미량 원소들을 제외하면 HAp와 거의 유사한 성분들로 구성되어 있다. 이러한 구성 성분의 유사성으로 인해 법랑질의 미세공극으로 침투하여 침전된 nano-HAp는 재석회화를 촉진할 수 있을 것이다. 따라서

위에서 언급한 것처럼 nano-HAp의 강한 흡착력과 법랑질과의 성분 유사성이 nano-HAp의 재광화 효과의 주된 원인이라고 사료된다.

또한 본 연구에서 얻어진 결과인 불화나트륨 용액과 nano-HAp간의 상승작용의 원인으로는 pH 증가를 예상할 수 있다. 불화나트륨은 수산화인회석의 수산화기를 불소 이온으로 치환시키는 역할을 한다. 본 실험에서 사용된 0.05% 불화나트륨 용액 안에서도 이러한 반응이 나타날 수 있다. 불소 이온으로 치환되어져 나온 수산화이온들의 양이 증가함에 따라 용액의 pH가 높아지게 되어 법랑질의 재광화를 촉진할 수 있다. 또한 nano-HAp에서 불화나트륨 용액으로 칼슘이나 인산이온들이 용출될 수도 있다. 이러한 이온들의 용출은 불화나트륨 용액 내에서 무기이온들의 포화 상태를 야기하고 이온 기울기에 의해 칼슘 및 인 이온들은 무기질이 소실된 탈회 법랑질 내로 침투하여 재광화를 일으킬 수도 있다.

본 실험을 통해 불소와 nano-HAp를 병용한 양치액의 재광화효과는 입증되었지만, 이것은 구강 내 조건을 고려하지 않은 *in vitro* 상에서 단순침격법을 이용한 결과이다. 따라서 향후 연구에서는 구강 내 환경을 모사한 pH 순환모형을 이용하거나 사람을 대상으로하는 *in situ* 모형 등을 통해서 불소와 nano-HAp의 재광화효과를 평가하는 추가 연구가 필요하다고 사료된다.

5. 결 론

본 연구의 목적은 HAp 입자의 크기가 초기 우식 중 병소의 재광화에 미치는 영향을 확인하기 위해서 기존의 마이크로 크기의 micro-HAp와 새롭게 나노 기술을 적용해서 만든 nano-HAp를 이용하여 구강 양치액을 만든 뒤 이들 간에 재광화 효과를 비교하였다. 또한 micro-HAp와 nano-HAp를 이용하여 구강양치액을 만들 때 HAp 분말을 용해시키는 용액

으로 중류수 및 0.05% 불화나트륨 용액을 사용한 뒤 각각 재광화 효과를 확인함으로써 불소와 nano-HAp의 상승효과를 평가하여 다음과 같은 결과를 얻게 되었다.

1. HAp의 입자 크기에 따른 재광화효과를 비교해본 결과, 새롭게 개발된 nano-HAp가 기존의 micro-HAp보다 초기우식병소를 재광화 시키는 능력이 우수했다. 또한 nano-HAp의 재광화 효과는 사용 농도 및 처리시간이 증가함에 따라 상승하는 것으로 나타났다.

2. nano-HAp는 양치액 제조 시 용매로써 중류수보다는 0.05% 불화나트륨 용액을 사용했을 때 더욱 큰 재광화 효과를 나타냈다.
3. 0.05% 불화나트륨 용액에 10% nano-HAp를 넣은 경우 0.05% 불화나트륨 용액만을 사용한 경우에 비해서 보다 향상된 재광화 효과를 나타내서, 10% 이상의 nano-HAp를 사용한다면 불소와의 상승작용을 기대할 수 있을 것으로 사료되었다.

참고문헌

1. Marcacci M, Kon F, Zaffagnini S, et. al. Reconstruction of extensive long-bone defects in sheep using porous hydroxyapatite sponges. *Calcif Tissue Int* 1999;64(1):83-90.
2. Suchanek W, Yashima M, Kakihana M, Yoshimura M. Hydroxyapatite ceramics with selected sintering additives. *Biomaterials* 1997;18(13):923-933.
3. Ma PX, Zhang R, Xiao G, Franceschi R. Engineering new bone tissue *in vitro* on highly porous poly(alpha-hydroxyl acids)/hydroxyapatite composite scaffolds. *J Biomed Mater Res* 2001;54(2):284-293.
4. Santos C, Clarke RL, Braden M, Guitian F, Davy KW. Water absorption characteristics of dental composites incorporating hydroxyapatite filler. *Biomaterials* 2002;23(8):1897-1904.
5. Anderson P, Bollet-Quivogne FR, Dowker SE, Elliott JC. Demineralization in enamel and hydroxyapatite aggregates at increasing ionic strengths. *Arch Oral Biol* 2004;49(3):199-207.
6. Bouyer E, Gitzhofer F, Boulos MI. Morphological study of hydroxyapatite nanocrystal suspension. *J Mater Sci Mater Med* 2000;11(8):523-531.
7. Gasser P, Haikel Y, Voegel JC. Role of adsorbed fluoride ions on the dissolution of synthetic hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med* 1995;6(2):105-109.
8. Jeong SH, Jang SO, Kim KN, Kwon HK, Park YD, Kim BI. Remineralization potential of new toothpaste containing nano-hydroxyapatite. *Key Eng Mater* 2006;309-311:537-540.
9. Kim BI, Jeong SH, Jang SO, Kim KN, Kwon HK, Park YD. Tooth whitening effect of toothpastes containing nano-hydroxyapatite. *Key Eng Mater* 2006;309-311:541-544.
10. Suzuki S. *In vitro* wear of nano-composite denture teeth. *J Prosthodont* 2004;13(4):238-243.
11. Klocke A, Tadic D, Kahl-Nieke B, Epple M. An optimized synthetic substrate for orthodontic bond strength testing. *Dent Mater* 2003;19(8):773-778.
12. Lowenstam HA, Weiner S. On biominerization. Oxford: Oxford University Press;1989.
13. Huang M, Feng J, Wang J, Zhang X, Li Y, Yan Y. Synthesis and characterization of nano-HA/PA66 composites. *J Mater Sci Mater Med* 2003;14(7):655-660.
14. Reynolds EC. Anticariogenic complexes of amorphous calcium phosphate stabilized by casein phosphopeptides: a review. *Spec Care Dentist* 1998;18(1):8-16.
15. Itthagaran A, King NM, Yiu C, Dawes C. The effect of chewing gums containing calcium phosphates on the remineralization of artificial caries-like lesions *in situ*. *Caries Res* 2005;39(3):251-254.
16. Yamaguchi K, Miyazaki M, Takamizawa T, Inage H, Moore BK. Effect of CPP-ACP paste on mechanical properties of bovine enamel as determined by an ultrasonic device. *J Dent* 2006;34(3):230-236.

Abstract

The comparison of remineralizing effect on mouthrinse containing nano sized or micro sized hydroxyapatite

Min-Young Kim, Ho-Keun Kwon, Baek-Il Kim

*Department of Preventive Dentistry & Public Oral Health, Oral Health Research Center,
Research Center for Orofacial Hard Tissue Regeneration College of Dentistry, Yonsei University*

Key Words: early caries lesion, micro-hydroxyapatite, nano-hydroxyapatite, remineralization

Objectives: The aims of this study were to compare the remineralizing effect of hydroxyapatite depending on the particle size and to evaluate the combined effects of nano-HAp and fluoride on an early caries lesion in human enamel.

Methods: Forty-eight specimens with average VHN of 25-45 were selected from the demineralized enamel and assigned to 8 groups. The treatment solutions consisted of experimental and remineralizing solution and specimens were incubated in a simple infusion model. The treatment solutions consisted of 0%, 1%, 5%, and 10% nano-HAp in distilled water or the same concentrations in a 0.05% NaF solution. In order to verify the remineralizing effect on the microhardness of enamel, each specimen was immersed into the treatment and the remineralizing solution for 12 hours each(total 24 hours) and the VHN was evaluated. This step was repeated making a total of 48 hours. Transmission and scanning electron microscope were used to identify the change in the enamel surface. Statistical significance was identified by one-way ANOVA followed by a Duncan's studentized range test using the Window SPSS 12.0 statistical package program.

Results: The degree of remineralization according to the VHN values was higher in the NaF groups than in the distilled water groups. The remineralizing effect increased with increasing treatment and remineralizing time. In addition, the VHNs of the demineralized enamel increased with increasing HAp concentration. The remineralizing effect was more observed in nano-HAp than micro-HAp($P < 0.05$).

SEM showed that the microstructure of the enamel surface was changed by NaF and nano-HAp. In particular, the enamel surfaces in the nano-HAp groups showed filling of the micro pore structure.

Conclusions: Nano-HAp has more remineralizing effect than micro-HAp. In addition, HAp appears to have a synergistic remineralizing effect with the fluoride.