

## Dental Implant 금속재료의 성분차이에 따른 세포독성에 관한 연구

\* : 경희대학교 치과대학

\*\* : 한국과학기술연구원 (KIST)

김태인\* \*\*한준현\*\* 이인석\* 이규환\*\* 신명철\*\* 최부병\*

### I. 서 론

인간의 평균수명의 증가와 더불어 기능이 상실된 뼈, 관절, 치아 등을 여러가지 생체재료를 이용하여 인공뼈, 인공 관절, 인공치아 등으로 수복할 수 있는 기회가 급속히 늘고 있다. 기존의 생체용 재료로서는 금속학적으로 금속과 비금속으로 구분할 수 있는데 금속재료로서는 주로 스테인레스강(SUS-316), Co-Cr합금, 순수 Titanium(Ti)등이 사용되어 왔으며<sup>1,11,21,32,33,56,59</sup> 비금속계통에서는 ceramic 제재, plastics, carbon 등이 생체적합성이 우수한 것으로 널리 알려져 있다<sup>30-32,35,53,54,57</sup>. 그 중에서 현재 많이 사용되고 있는 Titanium(Ti)은 원자번호 22, 원자량 47.9의 비중이 낮은 금속으로서(4.5 gm/cm<sup>3</sup>) 1700년대 초기에 발견되었으나 1930년대 후반에 이르러서야 상업적으로 실용 가능한 추출방법이 개발되었으며 Ti이 갖는 탁월한 부식저항능력과 생체적합성이 알려지면서 이 재료의 활발한 연구가 진행되었다<sup>9,38,39,54,61</sup>. 최근에는 가공기술의 진보로 인해서 응용범위가 더욱 크게 확대되어 현재에는 인공관절과 인공치아이식용 재료로서 널리 시도되고 있다<sup>39,46</sup>.

현재까지 진행된 실험실적 연구와 임상실험을 통하여 순 Ti는 다른 종류의 생체금속재료에 비하여 우수한 생체 적합성을 지니며 인체이식금속 재료로서 적합하다는 사실이 널리 받아들여지고 있다<sup>1,2,6,9,19,21,34,48,49</sup>. 그리고 순 Ti의 물리적 성질을 향상시키기 위해 순 Ti에 Aluminium, Vanadium, Molybdenum과 Palladium 등을 첨가한 Ti계 합금들이 개발되었고 이러한 Ti계 합금들 중의 일부는 생체적합성과 기계적 물리적 성질을 모두 만족시킬 수 있는 것으로 알려지고 있으며 순 Ti과 함께 향후 생체용 금속재료의 주류를 이룰 전망이다<sup>17,18,38,51,55,58,61</sup>. Ti계 합금으로는 여러가지의 합금들이 있으나 현재에는 Aluminium과 Vanadium이 첨가된 Ti-6Al-4V이 생체이식 금속재료로서 가장 주목받고 있으며 이 Ti-6Al-4V 합금은 비강도가 매우 높고 내식성이 우수하여 이미 순 Ti과 함께 정형외과용 인공관절, 치과용 인공치아등에 많이 사용되어지고 있다<sup>2,9,16,18,39</sup>. Ti-6Al-4V은 순 Titanium에 6%의 Aluminum과 4%의 Vanadium이 함유된  $\alpha + \beta$ 상의 합금으로서 Aluminium은  $\alpha$ -phase condition stabilizer로써 합금의 무게를 감소시키면서 강도를 증가시키고,

\* : 본 연구는 한국과학기술연구원 (KIST)의 K-2000 연구 프로그램 학술연구비에 의하여 이루어졌음.

Vanadium은  $\beta$ -phase stabilizer로써 부식저항 능력을 향상시켜 순 Ti에 비하여 피로강도가 높고 생체내에서 비교적 우수한 적합성을 나타내며 순 Ti과 유사한 양상의 골유착을 얻을 수 있는 것으로 알려져 있다<sup>38,39,17,51,58,59,61,62</sup>. 그러나 Vanadium(V)은 매우 강한 세포독성이 지적되고 있고 Aluminum(Al)은 알츠하이머형 치매와의 밀접한 인과관계가 의심되고 있으며 potential neurologic toxicity도 논의되고 있다<sup>2,16,31,63</sup>. 또한 지금 사용되고 있는 Ti계 합금들은 순 Titanium과는 같지 않은 조직반응을 나타낸다는 지적도 있다<sup>2</sup>. Johansson등은 인공치아와 골조직 계면에서의 미세구조적 분석을 이용하여 순 Ti과 Ti계 합금의 골유착의 차이점을 연구하여 Ti계 합금에서의 골유착이 순 Ti에서의 반응과 같지 않다고 보고하였다<sup>64</sup>. 순 Ti과 Ti계 합금의 생체적합성의 차이가 세포반응에 미치는 영향은 아직 논란의 여지가 많으며 앞으로도 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 세포독성이 지적되지 않은 Zr, Nb, Ta, Pd, In등의 합금원소들<sup>65</sup>을 Ti에 첨가하여 생물학적 안정성이 높으면서 고강도, 고연성의 기계적 특성을 갖는 Ti합금을 개발하기 위하여 항부식능력은 순수 Ti에 준하면서 기계적 특성은 Ti-6Al-4V에 도달하는 생체용 신 Ti계 합금의 개발을 목표로 하였다. 경조직 대체용 인체이식재료중 Ti계 합금들은 생체적합성 및 여러가지 물성이 뛰어나므로 앞으로 생체용 금속 재료의 주류를 이룰 전망이지만 국내의 Ti계 합금의 연구는 고가의 연구설비 및 기자재 미비로 극히 초보단계에 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 치과용 인공치아를 위한 Ti계 인체주입금속의 국산화에 관한 노력의 일환으로 한국과학기술원(KIST)에서 새로이 합금 설계

된 Ti계 인체이식금속에 대한 L929 섬유아세포의 금속표면 부착 및 세포증식양상을 평가하여 세포의 반응과 세포독성여부를 검토하여 다음과 같은 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 합금의 설계

세포독성이 지적되지 않은 Zr, Nb, Ta, Pd, In등을 Ti에 첨가하여 물리적 성질이 우수하며 생물학적 안정성이 보다 높은 Ti계 합금을 개발하는 것을 목표로 하였다(Table 1). 합금설계는  $\alpha/\beta$ 변태종료온도와 인장강도, 부동태화를 일으키기 위한 임계전류밀도에 미치는 합금원소의 영향을 다중 회기분석을 사용해서 얻은 식들을 이용하였다.

$$T_{\beta}/K = 1121 - 4.2[\% Zr] - 5.5[\% Ta] - 6.3[\% Nb] - 76[\% Pd] + 1.6[\% Sn] + 343[\% O] + 600[\% N]$$

$$T_{\beta}/K = 1145 - 7.7[\% Mo] - 4.3[\% Zr] - 12.4[\% V] - 14.3[\% Cr] + 8.4[\% Fe] + 23.4[\% Al] + 32.1[\% Si]$$

$$\text{cuts/GPa} = 10^{-3}(487 + 28.2[\% Sn] + 10.9[\% Nb] + 4.9[\% Nb] + 2.9[\% Ta] + 514[\% O] + 1491[\% N])$$

$$I_c/Am^{-2} = 10^{-2}\{98 - 89.5[\% Pa] - 9.5[\% Ta] - 3.4[\% Na] - 0.67[\% Zr] + 8[\% Sn]\}$$

다중회기 분석에 의해 얻은 식들을 이용하여 세종류(A : Ti-20Zr-WNb-XTa-YPd-ZIn, B : Ti-20Zr-WNb-XTa-YPd, C : Ti-15Zr-WNb-XTa-YPd)의 합금이 설계되었다. 설계된 합금

Table 1. Alloy design of New Titanium alloy

	Zr	Nb	Ta	Pd	In
Improvement of mechanical property	*				
Improvement of corrosion resistance			*	*	
Improvement of hot workability		*	*		
Prevention of brittle phase			*	*	

을 진공 아아크 용해로에서 용해한 후 1373K에서 2시간 유지 후  $\beta$ 단조, 1223K로 재가열 후  $\alpha/\beta$ 단조를 실시하였다. 단조 후 내부결함을 제거하기 위하여 973K 진공에서 2시간 소둔처리를 시행하였다.

## 2. 세포독성 실험방법

본 실험을 위해서 특별히 제작된 합금 3종류(A : Ti-20Zr-WTa-XNb-YPd-ZIn, B : Ti-20Zr-WTa-XNb-YPd, C : Ti-15Zr-WTa-XNb-YPd)를 실험군으로 사용하고 음성대조군으로 순 titanium(Ti)과 Ti-6Al-4V(Ti-6-4)합금을, 양성대조군으로는 Nickle(Ni)를 사용하였다. 각각의 금속은 지름 5mm, 높이 2mm, 원형의 금속시편 형태로 4개씩 제작하여 서로 다른 표면처리(No treatment,  $O_2$  treatment,  $N_2$  treatment, Passivation)를 하였다. 그리고 올바른 세포배양실험을 확인하기 위한 또 다른 대조군으로 동일한 조건하에서 금속 시편을 집어넣지 않은 배양 접시에 세포배양을 시켰다. 표면처리된 금속 시편들은 세포배양 실험을 위하여 초음파세척후 autoclave(121°C, 15기압, 20min)를 시행하여 멸균처리하였다. 표면처리와 멸균처리가 끝난 금속시편들은 오염방지를 위해서 titanium forcep만을 이용하여 다루어졌다. 본 실험에서 사용한 세포는 L929 섬유아 세포로서 한국 세포주 은행(Korea Cell Line Bank)에서 공급받아 계대배양하였다. L929세포의 배양액은 10% FBS(Fetal Bovine Serum)가 들어있는 RPMI 1640 Solution에 Penicillin 및 Streptomycin을 각각 100units/ml, 100 $\mu$ g/ml 첨가하여 준비하였다. L929 세포는 배양 후 수집하여 중앙에 시편을 위치시킨 35mm dish 에 각각  $5 \times 10^4$  cells가 포함되도록 분주하였다(사진 1). 배양기에서 세포들을 배양시키면서 2-3 일마다 media change를 시행하였다(2, 2, 3day interval). 각 시편에 의한 배양세포의 형태학적 영향을 관찰하기 위하여 배양 후 2일째 및 7일째 각 dish들을 배양기에서 꺼내어 광학현미경하에서 100배로 관찰하고 사진촬영하여 각 시편간의 세포독성상태와 세포증식양상을 비교, 검토하였다. 배양 후 2일째 및 7일째 각 dish

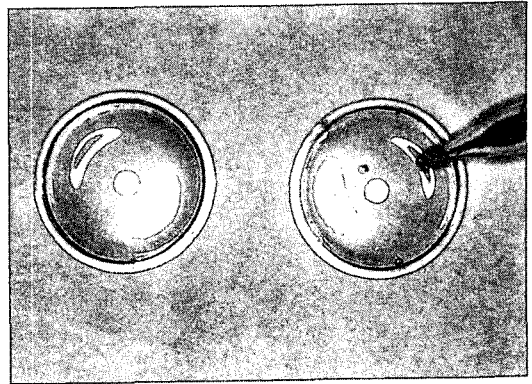


사진 1. L-929 Cell seeding on cell culture dish with metal

들을 배양기에서 꺼내어 각 dish별로 그동안 증식된 세포들을 collection하여 세포수를 비교하여 보았다. 배양 후 2일 및 7일째, 각 dish들을 incubator에서 꺼내어 배양액을 aspiration한 후 HBSS(Hank's balanced salt solution) 1ml로 dish에 증식되어 있는 세포들을 1회 washing하였다. 각 dish에 Trypsin-EDTA용액(0.05% Trypsin-0.53mM EDTA 4Na)을 1ml 넣고 3분간 기다린 후, pasteur pipet으로 cell을 collection하여 이미 2ml의 배양액이 들어있는 15ml centrifuge tube로 옮겼다. 1ml의 Trypsin-EDTA용액을 dish에 넣고 잔류 cell들을 한번 더 collection하여 centrifuge tube에 첨가한 후 centrifuge(200 $\times$ g, 5min)를 시행하였다. 상청액을 aspiration하고 2일 배양의 경우에는 RPMI 1640 배양액 200 $\mu$ l씩을, 7일 배양의 경우에는 4ml씩을 centrifuge된 cell이 들어 있는 centrifuge tube에 넣고 vortexing한 후, pipetman으로 90 $\mu$ l을 green tube에 옮겨 담았다. Green tube에 0.4% trypan-blue 용액 10 $\mu$ l를 넣고 mix한 후, hemocytometer에서 cell counting을 시행하였다. Count된 세포수를 이용하여 dish당 총 세포수를 환산하였다. 실험이 끝난 금속시편들은 금속시편표면에 부착되어 있는 단백질의 분해를 위하여 24시간동안 Haemosol solution(Haemo-Sol Inc. Baltimore, USA)에 넣은 후 running water로 1분간 세척하고 distilled water로 세척한 다음, 실험의 유효성을 검증하고자 표면연마후 다시 표면처리, 멸균

소독을 시행하여 실험을 2회 더 반복하였다.

### III. 실험결과

양성대조군을 제외한 모든 금속시편들의 경우, 7일간의 배양 후 배양접시 전체에 골고루 세포가 증식하였음을 관찰할 수 있었으며 그 세포들의 형태와 증식양상은 완전한 정상 상태를 광학현미경을 통하여 확인할 수 있었다(사진 2-11). Nickle을 사용한 양성대조군의 경우에는 금속시편주위로 뚜렷한 growth-inhibition zone을 관찰할 수 있었다(사진 12). 한편, Trypan blue exclusion test에서 죽은 세포는 거의 보이지 않았다. 6가지의 서로 다른 금속들(A, B, C, Ti, Ti-6-4, Ni)에서 배양된 세포의 수를 계산하여 각 Group 별로 통계학적 유의성을 검증하였다. 우선 각 group들간의

유의성을 t-test를 통하여 분석하여 보았다. 2-day, 7-day 모두 실험군들(A, B, C)간의 차이는 유의성이 없었고( $p \geq 0.01$ ), 음성대조군들(Ti, Ti-6-4)간의 차이도 유의성이 없었다( $p \geq 0.01$ ). 실험군과 음성대조군, 양성대조군을 각각 t-test로 상호 비교한 결과, 2-day, 7-day 모두 실험군과 음성대조군의 비교에서는 유의성이 없었으나(2-day ;  $p=0.065$ , 7-day ;  $p=0.307$ ) 실험군과 양성대조군, 음성대조군과 양성대조군의 비교에서는 통계학적 유의성을 확인할 수 있었다(2-day ; 각각  $p=0.03$ ,  $p=0.01$ , 7-day ; 각각  $p \leq 0.01$ ,  $p \leq 0.01$ ). 실험군과 대조군들의 분산분석을하여 본 결과 각 group들간의 차이가 매우 큰 것이 확인되어 (2-day ;  $p=0.0026$ , 7-day ;  $p=0.0001$ ) Duncan 분석법을 이용하여 실험군과 음성대조군, 양성대조군을 각각 비교하여 보았다. 실험군과 양성대조군(Ni)과의

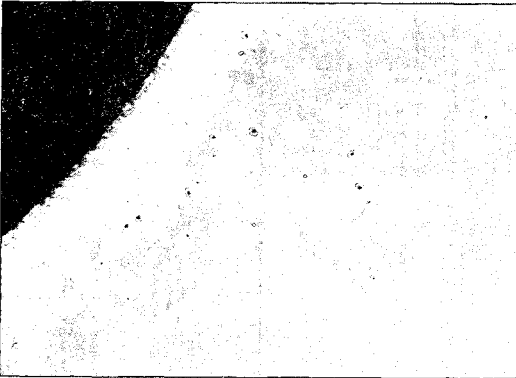


사진 2. 2-day cell culture with titanium

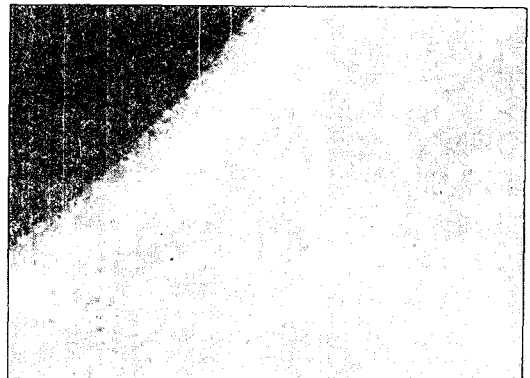


사진 3. 2-day cell culture with Ti-6Al-4V

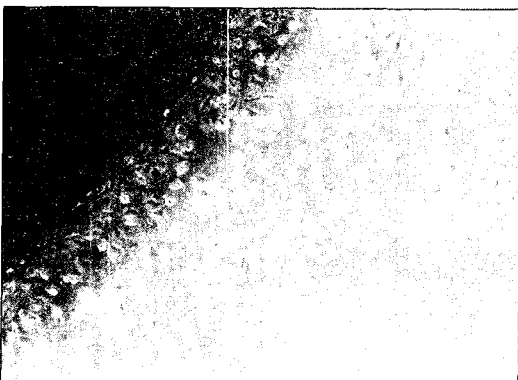


사진 4. 2-day cell culture with Ti-20Zr-WNb-XTa-YPd-ZIn

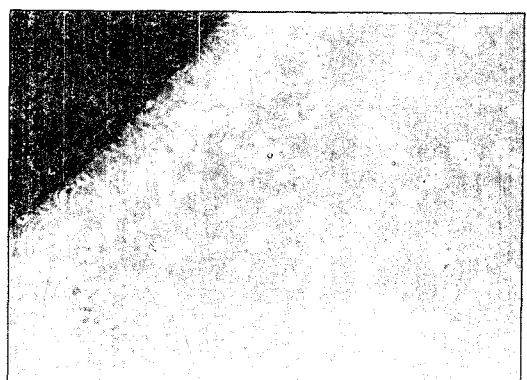


사진 5. 2-day cell culture with Ti-20Zr-WNb-XTa-YPd

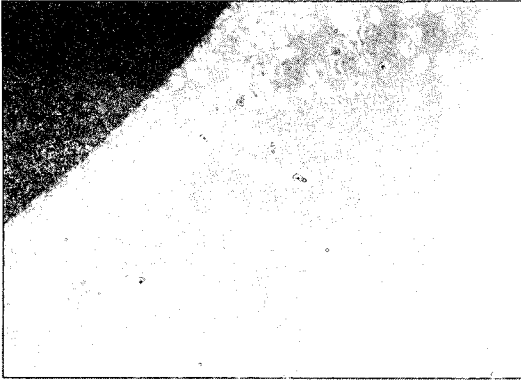


사진 6. 2-day cell culture with Ti-15Zr-WNb-XTa-YPd

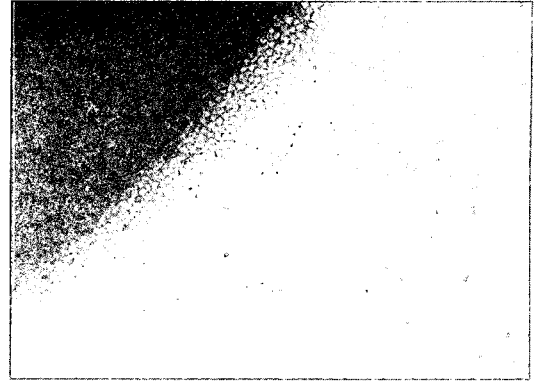


사진 7. 7-day cell culture with titanium

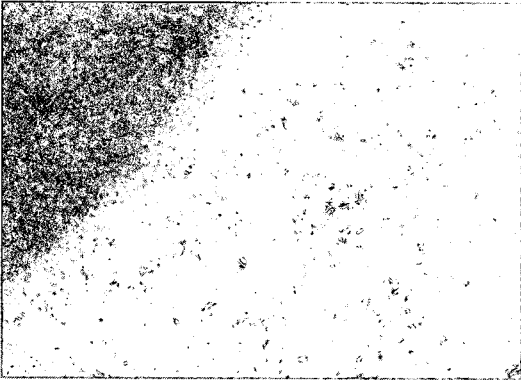


사진 8. 7-day cell culture with Ti-6Al-4V

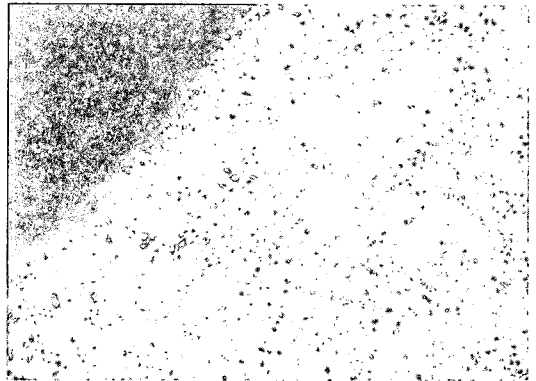


사진 9. 7-day cell culture with Ti-20Zr-WNb-XTa-YPd-ZIn

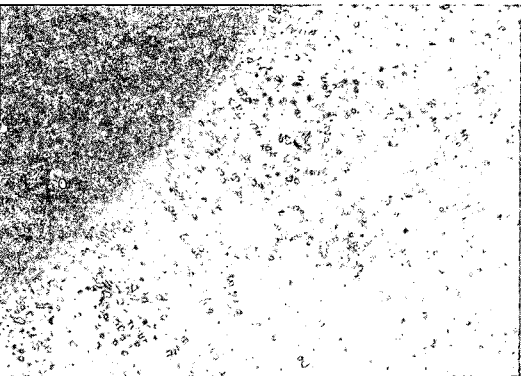


사진 10. 7-day cell culture with Ti-20Zr-WNb-XTa-YPd

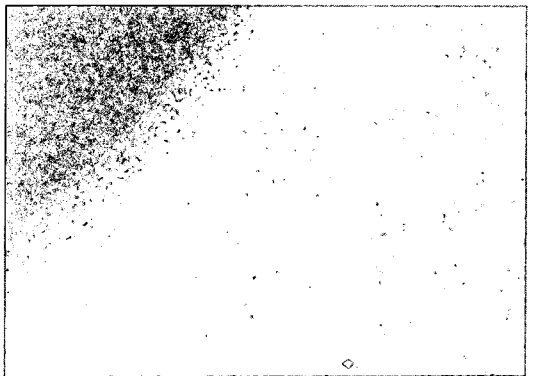


사진 11. 7-day cell culture with Ti-15Zr-WNb-XTa-YPd

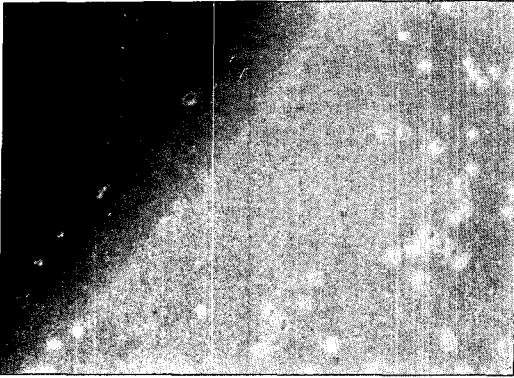


사진 12. 2-day cell culture with nickle with inhibition zone

비교에서는 확실한 통계학적 유의성을 검증할 수 있었고(2-day ;  $p \leq 0.05$ , 7-day ;  $p \leq 0.01$ ) 실험금속들과 음성대조군들(Ti, Ti-6-4)과는 통계학적 유의성이 없이 서로 유사한 세포증식 양상을 나타내었다(2-day ;  $p \geq 0.05$ , 7-day ;  $p \geq 0.01$ )(Table 2, 3). 따라서 개발된 신 합금들은 현재 사용되고 있는 순수 Ti, Ti-6Al-4V 합금과 유사한 정도의 생물학적 적합성을 갖고 있는 것으로 보여지며 nickle금속을 이용한 양성대조군에서는 뚜렷한 세포증식억제현상을 볼 수 있었다. 또한 본 실험에서는 표면처리에 따른 세포들의 부착정도, 증식정도가 통계학적으로 보았을 때 차이가 없는 것으로 나타났으며 ( $p \geq 0.05$ ) 이와 관련된 심도 깊은 연구가 앞으로도 계속 필요할 것으로 사료된다.

#### IV. 고 찰

상실된 치아를 수복하여 심미적, 기능적 그리고 정신적인 회복을 얻기 위한 인류의 노력은 끊임없이 되어 왔고 최근에 와서는 인공치아의 이식을 이용하여 상실된 치아를 수복하는 치료술식이 많이 연구, 시도되고 있다. 인공치아 이식술은 1980년대에 들어와서 시술의 보편화가 가속되는 추세이며 미주 지역에 소개되는 인공치아만도 30개 이상의 회사들에서 24종 이상의 dental implants가 제작, 판매되고 있는 것으로 알려져 있다<sup>30</sup>. NIH에서 발표한 수치를 보면 미국에서 시술된 치과 implant의 전체 수는

1983년에서 1987동안 4배가 증가하였고, 같은 기간동안 치과 implant를 시술하는 의사들의 수는 10배로 증가하였으며 1992년까지 미국에서 시술된 치과 implant의 수는 약 30만개로 추산된다<sup>37</sup>. 또한 경제발전에 따른 국민소득의 증가는 인공치아 이식술에 대한 수요의 증가를 가져오게 되었으며 앞으로는 계속 그 필요성이 증대되리라 사료된다<sup>44,51</sup>. 역사적으로 볼 때 고대 이집트인들이 동물의 뼈 등을 이용하여 상실된 치아의 대치물로 사용하였고 마야문명 시대의 skull에서는 돌을 조각하여 인공치아로 이식한 치아이식의 고고학적 증거들이 발견되고 있는 것으로 보아 인공치아 이식술은 새롭고 독특한 방법은 아니다<sup>3,35</sup>. 역사적으로는 오래되었지만 인공치아 이식술이 시행착오적으로 시도되어 온 기본적인 문제는 일차적으로 재료의 생체적합성에 있었다. 생체재료는 기능성과 함께 생체내에서 독성이 없이 안정성을 유지해야 한다는 것이 절대적인 조건이며, 지금까지 인공생체기관의 개발이 늦어진 이유는 기계적 강도, 기능성 등에 문제가 있어서가 아니라 재료의 생체친화성이 결여된 것이 원인이라고 보는 것이 옳을 것이다. 좋은 생체재료의 선택은 인공치아 이식의 성공과 예후에 큰 영향을 미치게 되므로 올바른 생체 재료의 설계와 개발은 매우 중요한 의미를 갖는다고 하겠다<sup>9</sup>. 인공치아는 생체내에 이식되는 물질로써 환자에게 시술하기 전에 충분한 임상적 실험과 관찰을 필요로 한다. Implant의 성공요건인 implant의 확실한 고정을 얻기 위해서는 생체적합성과 생역학적인 분석을 통해서 인접조직의 반응과 응력분산등을 사전에 고려해야 한다.<sup>10,22,29,37,45</sup>. 기능을 수행하기 위한 기계적 성질이 아무리 좋아도 그 재료나 부산물이 체내에서 수용되지 않고 독성이나 자극, 이물반응을 일으킨다면 생체재료로서 가치가 없다고 보아야 할 것이므로 이러한 재료들의 생체적합성에 대한 임상적인 연구에 더 관심이 집중되고 있다.<sup>1,19,33,37,40</sup>.

<sup>60</sup>. 생체적합성이란 생체조직과 이식체가 접촉 시에 나타나는 조직반응을 말하는 것이므로 생체금속에 대한 조직세포들의 반응을 살펴봄으로써 생체적합성의 정도를 간접적으로 알아

볼 수 있다. 세포배양법을 통하여 생체내에서와 유사한 환경하에서 특정 생체물질에 대한 특정세포들의 반응을 관찰함으로써 재료의 독성 여부, 생체재료에 대한 세포들의 부착, 확산과 증식 등을 확인해 볼 수 있다<sup>22,24,26,27</sup>. 인공치아의 재료가 생물학적 요건을 충족시키기 위해서는 독성과 주위조직에 자극성이 없어야 하며 구강내에서 변형되거나 부식되지 않고 발암성 등의 염려가 없어야 된다고 강조되고 있다<sup>1,11,16,31,37,39,56,59</sup>. 세포독성이라함은 생체내에서 화학적 또는 물리적으로 유해한 반응을 나타내는 것을 말하는 것으로서 새로운 재료가 개발되어 사용되기 위해서는 필수적으로 인체유해성과 안정성등이 심각하게 고려되어야만 한다<sup>5,11,14,26</sup>. 생체물질에 대한 조직반응의 기전은 아직 명확히 밝혀져 있지 않은 부분이 있으나 일반적으로 생체물질의 물리적, 화학적 성질과 표면상태, 수술중의 외상, 수술후의 감염여부등에 따라서 달라질 수 있다<sup>1,2,6,10,12,13,42,52</sup>. 인공치아 이식후 가장 문제가 되고 있는 것은 이식된 이물질에 대해 생체조직이 어떠한 반응을 보이는가 하는 점으로서<sup>29,36,41,43,62</sup>, 이를 위한 기초연구는 주로 세포배양을 이용한 세포독성실험을 통해 이루어지고 있다<sup>4,5,7,8,23,24,31,40,52</sup>. Akagawa 등은 생체금속재료의 선택시 고려해야 할 사항들이 부식성, 기계적 피로도, 독성 그리고 치유를 방해하는 성질 등이라고 하였다<sup>1</sup>. Autian은 새로운 재료가 개발되어 사용될 때는 생체적인 부작용의 가능성에 대해 주된 관심을 가져야 하며 생물학적 관점에서 독성여부를 검사해야 한다고 하였다<sup>5</sup>. 특히 치과용 implant의 개발과 관련하여 Brunski는 재료의 표면특성, 부식산물의 방출, 산화막의 안정성등이 지속적으로 고려되어야 하며 implant 재료의 검사뿐 아니라 implant의 형태, 외과적 수술, 보철 등도 종합적으로 고려되어야 한다고 하였다<sup>10</sup>. Castlman 등은 개를 이용한 동물실험에서 Ti계 합금들의 인접 주위조직 반응, 골융합반응 등을 종합적으로 검토한 결과 이러한 합금들이 기계적 성질을 유지하면서 생체금속재료로서 사용될 수 있는 높은 가능성을 갖고 있다고 하였다<sup>11</sup>. Young도 순수 Ti은 치과용 implant로 사용

하기에는 기계적 성질이 부족할 수 있으며 이러한 단점을 극복할 수 있는 적절한 생체적합성을 지니면서 향상된 물리적 성질을 갖는 합금의 개발이 필요하다고 하였다<sup>51</sup>. 그리고 Davidson 등은 세포독성이 있는 Co, Cr, Mo, Al, V 등 대신에 Nb, Zr 등을 이용하여 합금을 제작하면 부식저항능력을 우수하게 개선시켜 골조직과의 생체적합성을 향상시킬 수 있다고 하였다. 이러한 신태합금들은 우수한 생체적합성뿐 아니라 정형외과적으로도 사용할 수 있을 정도의 좋은 기계적, 물리적 성질을 갖고 있는 것으로 발표되었다<sup>16</sup>. Kawahara도 생체적합성, 금속의 안정성, 물리적 성질 등을 고려할 때 앞으로 여러종류의 Ti계 합금들이 생체금속재료로서 연구할 가치가 높은 것으로 서술하였다<sup>31</sup>. 또한 여러학자들은 implant 표면특성에 따른 세포반응에 대한 다각도의 고찰을 통하여 implant의 표면특성과 구성성분이 특정세포들의 기능에 영향을 미칠 수 있으며, 결과적으로 세포와 implant 표면간의 부착기전에 영향을 줄 수 있다고 하였다<sup>8,19,28</sup>. Thomas 등은 12종류의 서로 다른 종류의 implants를 이용한 동물실험을 통하여 implant의 재료와 모양보다는 표면상태가 골융합과정에서 중요한 요건이라고 하였다<sup>47</sup>. 그리고 Wennerberg 등은 Topscan 3D system을 이용하여 현재 사용중인 13종류의 치과용 implants의 모양과 표면상태를 분석하였는데 각 회사의 제품에 따라서 implant의 표면상태가 다르며 골융합에 가장 적절한 표면상태에 관한 연구가 앞으로 필요하다고 하였다<sup>50</sup>. 생체재료란 체내의 생체조직이나 장기를 대체하고 수복하는 이식재료이므로 기계적 성질, 부식저항뿐 아니라 생체적합성 검사는 매우 중요한 단계이다<sup>59</sup>. Itakura 등은 implant의 새로운 재료의 생체적합성을 검사하기 위하여 osteogenic cell line을 이용한 새로운 검사법을 개발하기도 하였다<sup>22</sup>. 세포독성 실험은 인공이식재료의 생체친화성을 검사하는 여러 방법 중에서 가장 기본적이고 필수적인 검사법으로서 Agar Diffusion, Fluid Medium, Agar Overlay, Flask Dilution 등등의 방법이 있다<sup>4,5,26,59</sup>. 본 실험에서 사용한 검사방법은 Guess 등이 1965

년도에 소개한 L929 mouse Cell을 이용하는 검사법으로서 배양접시 중앙에 검사할 시편을 위치시키고 배양액과 세포를 넣고 일정기간 동안 세포를 배양시킨 다음 세포의 수, 형태, 증식양상 등을 관찰하여 검사시편의 독성여부와 생체친화성 정도를 관찰하는 검사법이다<sup>4,5,59</sup>. 개발된 신 합금의 생물학적인 적합성을 연구하는 첫번째 단계로써 조직배양법에 의한 세포독성을 검토하여 임상실험을 시행하기 위한 기초적인 연구자료로 삼고자 하였다. 이와 같은 관점에서 생물학적 규격화의 필요성이 강조되어 이러한 검사법으로 첫째, 임상전단계에서 생체재료의 구성성분검사를 위한 시험관내에서의 조직배양에 의한 생물학적 검사법(level I), 둘째, 동물의 생체조직을 대상으로 한 검사법(level II), 그리고 마지막으로 임상에서의 관찰(level III) 등의 생체적합성 여부를 알아보기 위한 단계적인 검사가 필요하다고 하였다<sup>6,15,59</sup>. 따라서 인공치아 재료에 대한 생체적합성을 검사하는 Toxikon Biocompatibility Tests중에서 본 연구에서는 L929 세포를 이용한 세포배양실험을 시행하였고, 임상실험을 통해서 생체친화성이 확인된 신 합금들을 이용하여 치과용 인공치아를 설계, 제작하는 것이 앞으로의 과제가 될 것이다. Young은 치과 implant의 장래 연구 분야는 세포생물학과 재료적인 측면을 연결시킨 방향으로 나아가야 하며 implant는 생체조직의 한 부분으로 이해하고 접근해야 할 것이라고 하였다<sup>61</sup>. 생체재료의 화학적, 기계적 그리고 생물학적 특성을 이해하는 것은 새로운 생체재료개발의 시작이며 앞으로의 방향을 제시해 줄 수 있다. 이는 인공치아를 주로 수입에만 의존하고 있는 현 상황에서 반드시 해결해야 할 문제로 사료되며 따라서 본 연구의 최종목표인 국산형 Ti계 합금을 이용한 인공치아 및 그 제작기술의 개발은 한국 의료계의 장기적인 발전을 위해서 매우 중요한 의의를 갖는다고 하겠다. 세계적으로 지적 소유권제도의 강화로 인하여 각 국가는 자체적인 과학기술의 발전이 시급한 현 상황에서 인체적합성이 뛰어난 Ti계 합금의 개발과 더불어 이를 이용한 국산형 Ti계 합금 인공치아의 개발을

통하여 한국의 치과의료 산업 기술수준을 한층 더 향상시킬 수 있을 것으로 사료된다.

## V. 결 론

생체내 세포독성이 지적되지 않고 생물학적 안정성이 우수한 원소인 Zr, Ta, Pd, Nb, In을 Ti에 첨가하여 제조된 합금들에 대한 세포독성을 검사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 광학현미경상의 관찰에서 Nickle을 사용한 양성대조군에서는 금속시편주위로 뚜렷한 growth-inhibition zone을 관찰할 수 있었다. 하지만 실험군 금속들의 인접면에서는 정상적인 세포의 증식과 부착양상을 보였다.

2. 통계학적 분석결과, 2일 및 7일간의 배양기간 모두 세포증식에 있어서 실험군과 양성대조군, 및 음성대조군과 양성대조군간의 통계학적 유의성을 관찰할 수 있었지만, 실험군과 음성대조군간에는 유의성있는 차이를 보이지 않았다.

3. Duncan 분석결과, 실험군과 양성대조군간의 비교에서는 세포증식에 있어서 확실한 통계학적 유의성을 검증할 수 있었고, 실험군과 음성대조군들간에는 서로 유사한 세포증식 양상을 나타내었다.

4. 세포배양법을 이용한 세포독성실험결과 세 가지 신합금들은 순 Ti, Ti-6Al-4V과 유사한 생물학적 적합성을 갖고 있는 것으로 나타났다.

5. 세포배양법을 이용한 세포독성실험에서 각기 다른 표면처리에 따른 세포들의 부착정도, 세포 증식정도의 차이는 통계학적 유의성을 나타내지 않았다.

## 참고문헌

1. Akagawa Y., Hashimoto M., Kondo N., Yamasaki A., Tsuru H. : Tissue reaction to implanted biomaterials. J Prosth Dent 53(5) : 681-686, 1985.
2. Albrektsson T., Jacobsson M. : Bone-metal interface in isseointegration. J Prosth Dent 57(5) : 597-607, 1987.



3. Andrews R.R. : Prehistoric crania from central america. *Odont Society Pennsylvania* 914-917, 1983.
4. ASTM Committee on Medical and Surgical Materials and Devices : Standard practice for selecting generic biological test methods for materials and devices. Designation : F748-82. p282-286, 1982.
5. Autian J. : General toxicity and screening tests for dental materials. *Int Dent J* 24 : 235-250, 1974.
6. Branemark P.I. : Osseointegration and its experimental background. *J Prosth Dent* 50(3) : 399-410, 1983.
7. Brunette D.M., Kenner G.S., Gould T.R.L. : Grooved titanium surfaces orient growth and migration of cells from human gingival explants. *J Dent Res* 62(10) : 1045-1048, 1983.
8. Brunette D.M. : The effects of implant surface topography on the behavior of cells. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 3 : 231-246, 1988.
9. Brunski J.B., Mocclia Jr. A.F., Poliack S.R., Korostoff E., Trachtenberg D. : Investigation of surfaces of retrieved endosseous dental implants of commercially pure titanium. *American Society for Testing and Materials*. 189-205, 1983
10. Brunski J.B. : Biomaterials and Biomechanics in dental implant design. *Int J Oral Maxillofac Implants* 3 : 85-97, 1988.
11. Castleman L.S., Motzkin S.M., Alicandri F.P., Bonawit V.L. : Biocompatibility of nitinol alloy as an implant material. *J Biomed Mat Res* 10 : 695-731, 1976.
12. Clark A.E., Hench L.L., Paschall H.A. : The influence of surface chemistry on implant interface histology : A theoretical basis for implant materials selection. *J Biomed Mat Res* 10 : 161-174, 1976.
13. Cook S.D., Klawitt J.J., Weinstein A.M. : A model for the implant-bone interface characteristics of porous dental implants. *J Dent Res* 61(8) : 1006-1009, 1982.
14. Council on Dental Materials and Devices : Council reaffirms position on dental endosseous implants. *JADA* 90 : 670-671, 1975.
15. Council on Dental Materials and Devices : Current evaluation of dental endosseous implants. *JADA* 88 : 394-395, 1974.
16. Davidson J.A., Mishra A.K., Kovacs P., Poggie R.A. : New surface-hardened, low-modules, corrosion-resistant Ti-13Nb-13 Zr alloy for total hip arthroplasty. *Bio-Med Mat Eng* 4(3) : 231-243, 1994.
17. Deporter D.A., Watson P.A., Pilliar R.M., Chipman M.L., Valiquette N. : A histological comparison in the dog of porous-coated vs threaded dental implants. *J Dent Res* 69(5) : 1136-1145, 1990.
18. Deporter D.A., Watson P.A., Pilliar R.M., Melcher A.H., Winslow J., Howley T.P., Hansel P., Maniatopoulos C., Rodriguez A., Abdulla D., Parisien K., Smith D.C. : A histological assessment of the initial healing response adjacent to porous-surfaced, titanium alloy dental implants in dogs. *J Den Res* 65(8) : 1064-1070, 1986
19. Edgerton M., Levin M.J. : Biocompatibility : Its future in prosthodontic research. *J Prosthet Dent* 69(4) : 406-415, 1993.
20. Fenton A. : The role of dental implants in the future. *JADA* 123 : 37-42, 1992.
21. Hansson H.A., Albrektsson T., Branemark P.I. : Structural aspects of the interface between tissue and titanium implants. *J Prosth Dent* 50(1) : 108-113, 1983.
22. Itakura Y., Kosugi A., Sudo H., Yamamoto S. : Development of a new system for evaluating the biocompatibility of implant materials using an osteogenic cell line (MC3T-E1). *J Biomed Mat Res* 22 :

- 613-622, 1988.
23. Jansen J.A., de Wijn J.R., Wolters-lutgerhorst J.M.L., van Mullem P.J. : Ultrastructural study of epithelial cell attachment to implant materials. *J Dent Res* 64(6) : 891-896, 1985.
  24. Jansen J.A., van der Waerden J.P.C.M., de Groot K. : Fibroblast and epithelial cell interactions with surface-treated implant materials. *Biomaterials* 12 : 25-31, 1991.
  25. Johansson C., Lausman J., Ask M., Hansson M.A., Albrektsson T. : Ultrastructural differences of the interface zone between bone and Ti-6Al-4V or commercially pure Ti. *J Biomed Eng* 11 : 3-8, 1989.
  26. Johnson H.J., Northup S.J., Seagraves P.A., Garvin P.J., Wallin R.F. : Biocompatibility test procedures for materials evaluation in vitro. I. Comparative test system sensitivity. *J Biomed Mat Res* 17 : 571-586, 1983.
  27. Kasemo B. : Biocompatibility of titanium implants : Surface science aspects. *J Prosth Dent* 49 : 832-837, 1983.
  28. Kasemo B. : Biomaterial and implant surfaces : On the role of cleanliness, contamination, and preparation procedures. *J Biomed Mat Res* 22(A2) : 145-158, 1988.
  29. Kavanagh P., Gould T.R.L., Brunette D.M., Weston L. : A rodent model for the investigation of dental implants. *J Prosth Dent* 54(2) : 252-257, 1985.
  30. Kawahara H., Yamagami A., Imanishi Y., Nishida T. : Studies of the bioadaptability of metallic and ceramic implants by means of tissue culture and animal examinations. *J Dent Res (Supplement)* 52(3) : 1006-1007, 1973.
  31. Kawahara H. : Cellular responses to implant materials : biological, physical and chemical factors. *Int Dent J* 33(4) : 350-375, 1983.
  32. Lemons J.E. : Dental implant biomaterials. *JADA* 121 : 716-719, 1990.
  33. Linder L., Obrant K., Boivin G. : Osseointegration of metallic implants. II. Transmission electron microscopy in the rabbit. *Acta Orthopaedica Scandinavica* 60(2) : 135-9, 1989.
  34. Linkow L.I., Dorfman J.D. : Implantology in Dentistry. A brief historical perspective. *N Y State Dent J* June/July 31-35, 1991.
  35. Manski R. : A synopsis of recent literature concerning the dental implant. *J Oral Implantol* 10(2) : 275-288, 1982.
  36. Meffert R.M., Block M.S., Kent J.N. : What is osseointegration? *Int J Perio Res Dent* 4 : 9-21, 1987.
  37. National Institutes of Health : National Institutes of Health Consensus development conference statement. *JADA* 117 : 509-513, 1988.
  38. Park J.B., Lakes R.S. : Biomaterials : An introduction. Chapter 12. Soft tissue replacement : Blood-interfacing implants. 2nd Ed., Plenum Press, New York & London, 1994.
  39. Parr G.R., Gardner L.K., Toth R.W. : Titanium : The mystery metal of implant dentistry. Dental materials aspects. *J Prosth Dent* 54(3) : 410-414, 1985.
  40. Rae T. : The biological response to titanium and titanium-aluminium-vanadium alloy particles. II. Long-term animal studies. *Biomaterials* 7(1) : 37-40, 1986.
  41. Roberts W.E., Smith R.K., Zilberman Y., Mozsary P.G., Smith R.S. : Osseous adaptation to continuous loading of rigid endosseous implants. *American J Orth* 86(2) : 95-111, 1984.
  42. Roberts W.E., Simmons K.E., Garetto L.P., DeCastro R.A. : Bone physiology and metabolism in dental implantology : risk factors for osteoporosis and other metabolic

- bone disease. *Implant Dent* 1 : 11-21, 1992.
43. Salthouse T. : Some aspects of macrophage behavior at the implant interface. *J Biomed Mat Res* 18 : 395-401, 1984.
  44. Schnitman P.A. : Implant dentistry : where are we now? *JADA* 124 : 39-47, 1993.
  45. Skalak R. : Biomechanical considerations in osseointegrated prostheses. *J Prosth Dent* 49(6) : 843-848, 1983
  46. Solar R.J., Pollack S.R., Korostoff E. : In vitro corrosion testing of titanium surgical implant alloys : An approach to understanding titanium release from implants. *J Biomed Mat Res* 13 : 217-250, 1970.
  47. Thomas K.A., Cook S.D. : An evaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition. *J Biomed Mat Res* 19 : 875-901, 1985.
  48. Weiss M.B., Rostoker W. : Development of a new endosseous dental implant. Part I : Animal studies. *J Prosth Dent* 46(6) : 646-651, 1981.
  49. Weiss M.B., Rostoker W. : Development of a new endosseous dental implant. Part II : Human studies. *J Prosth Dent* 47(6) : 633-645, 1982.
  50. Wennerberg A., Albrektsson T., Andersson B. : Design and surface characteristics of 13 commercially available oral implant systems. *Int J Oral Maxillofac Implants* 8(6) : 622-633, 1993.
  51. Young F.A. : Future directions in dental implant materials research. *Int J Oral Implant* 5 : 81-83, 1988.
  52. 김종호, 최목균 : 멸균방법에 따른 티타늄 표면에 대한 세포반응. 대한 구강 악안면 임플란트 학회지, 1(1) : 29-39, 1995.
  53. 박금수, 배 창, 최목균, 김홍기, 김광현 : 성견하악골에서 Titanium 및 Carbon-coated blade-vent 인공치아의 주위조직반응. 대한 치과 임플란트 학회지, 7(1) : 10-17, 1986.
  54. 박영준, 양규호 : 생체친화성 세라믹의 합성과 수중 임플란트 금속재료에의 코팅에 관한 실험적 연구. 대한치과기재학회지, 17(2) : 123-157, 1990.
  55. 안창영, 김영수 : 타이타늄 치근형 매식체에 대한 골유착 과정에 관한 조직학적 연구. 대한치과보철학회지, 28(2) : 1-28, 1990.
  56. 이재신, 강홍구, 김홍기 : 국산 K-L Blade를 이용한 골내 임플란트의 증례 보고 및 임상적 고찰. 대한치과 임플란트 학회지, 8(1) : 27-32, 1988.
  57. 이철원 : 골내 인공치아의 문헌적 고찰. 대한치과 임플란트 학회지, 9(1) : 51-58, 1989.
  58. 조형준, 이준희, 이상윤 : Ti-6Al-4V합금의  $\beta$ 결정립 성장 및 용체화처리에 의한  $\gamma$ 상의 미세조직 변화. 대한금속학회지, 32(2) : 1467-1473, 1994.
  59. 최병철 : 치과용 임플란트에 사용되는 생체 재료. 대한치과 임플란트 학회지, 10(1) : 58-67, 1990.
  60. 최부명, 신명철 : 도재소부용 Ni-Cr합금의 적합성과 세포독성에 관한 연구. 대한치과 보철학회지, 20(1) : 7-13, 1982. 치과생체재료학 자료집 : 치과 생체재료의 안정성. 서울대학교 치과대학교 치과생체재료학교실, 현대의학사 1994.
  62. 황병각, 배 창 : 티타늄과 니켈-티타늄 합금의 입자들이 생쥐의 복강내 대식세포에 미치는 영향. 대한치과 임플란트 학회지, 10(1) : 5-15, 1990.
  63. 岡崎義光, 伊藤喜昌, 伊藤郭夫, 立石哲也 : 生體用新Ti合金の材料開發(I) 組織と機械的性質. 機械技術研究所所報, 46(5) : 1-20, 1992.
- 세포독성실험과 자료정리에 많은 도움을 주신 홍동희 선생님, 주정석 선생님 그리고 한국임플란트 연구회의 이윤덕씨에게 감사드리고 통계학적 유의성을 검증하여 주신 서울대학교 통계학연구소의 이강현선생님께 감사드립니다.

Abstract

A STUDY ON CYTOTOXICITY OF THE NEW TITANIUM ALLOYS  
FOR DENTAL IMPLANT MATERIAL<sup>†</sup>

Tae-In Kim\* \*\*Jun-Hyun Han\*\* In-Seok Lee\* Kyu-Hwan Lee\*\*  
Myung-Chul Shin\*\* Boo-Byung Choi\*\*

\* : *Kyung Hee University, School of Dentistry*

\*\* : *Korea Institute of Science and Technology*

Today, dental implants are an acceptable alternative, capable of providing bone-anchored fixed prostheses for improved quality of life and self esteem for many patients. Research advances in dental implantology have led to the development of several different types of materials, and it is anticipated that continued research will likewise lead to advanced dental implant materials. Currently used pure titanium has relatively low hardness and strength which possibly limits its ability to resist the functional loads as a dental implant. Ti-6Al-4V also has potential problems such as corrosion resistance, bone biocompatibility etc. The carefully selected Zr, Nb, Ta, Pd, In constituents could improve mechanical strength, corrosion resistance, and biocompatibility compared to that of currently used implant metals. On the basis of the totality of the data from our study, it can be concluded that new titanium alloys containing Zr, Nb, Ta, Pd, In are able to provide improved mechanical properties, corrosion resistance and biocompatibility to warrant further investigation of it's potential as new biomaterials for dental implants.

---

† This study was supported by K-2000 program Fund of Korea Institute of Science and Technology(KIST).