

Titanium Phosphide 표면에 대한 세포독성 및 골친화성의 평가

이강진 · 김천석 · 김형수 · 염창엽 · 김병욱 · 한경윤

조선대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서 론

치아를 상실한 환자들에게는 단기 또는 장기적으로 잔존치아나 악골에 손상을 주지 않으면서 정상치열일 때와 동등하게 적절한 저작과 발음 그리고 심미적 기능을 유지할 수 있는 보철적 대체물이 요구되고 있는 바 기존의 일반적인 보철치료의 단점을 해소하며 이러한 요구에 부응할 수 있는 치료술식인 치과용 임플란트가 개발되었다.

치과용 임플란트는 그 외형에 따라 원주형, 나선형, 그리고 이 두종류의 혼합형으로 구분되며, 조직과의 접촉면적을 넓히고 기계적 유지를 증진시키고자 기본 외형에 홈, 구멍, 주름을 가하거나 다른 재료를 표면에 피복하는 표면처리방법 등이 응용되고있다^{1, 2)}. 이상적인 치과용 임플란트재료의 조건은 적절한 강도를 지니고, 충격강도에 충분히 저항하며, 숙주조직에 대한 강한 부착력과 함께 부작용이 없어야 하고 흡수되지 않아야 하는 바, 현재 치과용 임플란트의 재료로는 생체 적합성과 기계적인 성질이 우수한 금속인 titanium과 세라믹이 가장 널리 사용되고 있다. 골유착성 임플란트에 주로 사용되는 titanium은 공기 중에 노출되면 안정된 산화막이 형성되어 골

내 매식시 금속표면이 직접 골 조직과 닿지 않게 되기 때문에 생체내에서의 적합성, 부식 저항성이 강화되는데, 이러한 titanium의 안정된 부동태 피막은 임플란트 조성, 제작공정, 표면처리 등에 따라 변화된다고 보고되었다^{3, 4, 5, 6)}.

Titanium plasma sprayed 임플란트는 표면에 titanium을 플라즈마 분사법으로 처리한 것^{7, 8)}으로 임플란트 표면적이 넓어짐에 따라 이의 성공적인 임상증례가 보고되었으나^{9, 10)} 금속이온의 용해로 인하여 골형성에 장애를 줄 수 있으며^{11, 12)} 저작력이 가해지면서 titanium 입자가 분리되거나 피복층의 두께가 감소될 수 있음이 보고된 바 있다¹³⁾.

1970년대부터 Hench등^{14, 15)}, Ducheyne등¹⁶⁾ 및 Groot등¹⁷⁾ 여러 생체재료학 연구자들에 의해 이러한 금속재료의 문제점을 해결하기 위한 많은 연구가 이루어져 왔으며 바이오 글라스와 Hydroxyapatite(HA)와 같은 인산칼슘 화합물 등과 같은 생체활성 세라믹들의 활용 방안이 모색되었다. 초기연구는 이러한 재료들의 생체활성 기전을 규명하기보다는 골의 무기물 성분과 같은 원소들이 함유된 재료들을 사용하면 친화력이 좋을 것이라는 가정하에 직접 동물실험을 통해 주로 결과적인 현

상을 밝혀내는 연구를 시도하였다.

HA는 생체 골조직내 무기질의 주 구성성분이며, 골표면과 친화성이 뛰어나고 골조직과의 결합성이 타 재료에 비해 훨씬 높다고 알려져 있으나^{18, 19)} HA 소재들은 강도가 낮아 부스러지기 쉬워 지속적인 교합력을 받아야 하는 치과용 임플란트재료로는 그 사용에 한계가 있어 titanium표면에 조밀한 HA를 피복함으로써 임플란트의 초기 고정과 골유착의 증대를 도모하거나 교합압을 분산시키려는 다각적인 노력이 시도되었다^{10, 20)}. Kay등²¹⁾은 생화학적 결합을 증가시키기 위해 titanium에 HA를 도포한 경우가 도포하지 않은 경우보다 4배정도 결합력이 증가한다고 보고하였고, Benjamin등²²⁾과 Block등²³⁾에 의하면 titanium은 임플란트와 골조직 사이에 얇은 층의 섬유조직이 형성되어 골조직과 titanium이 직접 결합되지 않으나 HA-coated titanium은 골조직과 직접 연결되는 것으로 보고하였다.

HA의 피복기술로는 플라즈마분사법이 가장 널리 사용되고 있는데, 이 피복기술은 다른 피복기술에 비하여 고밀도의 HA층과 titanium의 결합력을 얻을 수 있으나, HA가 고온에서 용융상태로 titanium에 분사될 때 HA는 열분해반응에 의해 결정도가 낮아져 골조직내에 매식될 경우 인체 내에서 흡수가 빨리 일어나며, HA와 titanium간의 열팽창계수의 차이에 의해서 HA층에 금이 가고, HA와 titanium간의 낮은 결합력에 의해 피복층이 분리되며, 저작에 의한 반복하중시에 균일하지 못한 피복면에서 HA입자들이 분리되어 체액 내로 유입될 수 있고, 피복후 소독의 어려움 등 여러 문제점들이 지적되었다. titanium계면과 HA의 결합력을 보다 강화시키기 위한 방법으로 고온에서 진공소결(vacuum sintering)과 같은 열처리과정을 통하여 HA를 titanium에 피복하는 경우 HA내의 인과 같은 특정원소는 titanium과 친밀성

을 가지고 침투해 들어가는 “getter” 특성을 가지므로 원하는 HA의 결정구조 또는 화학적 조성을 유지하기가 거의 불가능함이 제시되었다^{24, 25)}. 이러한 HA 피복의 문제점을 해결하기 위하여 칼슘과 인이 함유된 다양한 glass세라믹, 금속 또는 고분자재료를 혼합한 복합재료 및 고압소결에 의한 HA소결체들이 개발되었으나 이들 역시 낮은 강도 때문에 하중 지지용 임플란트 재료로는 사용이 제한적일 수밖에 없다.

또한 titanium의 마모저항을 향상시키기 위해 TiN, TiC 피복과 같은 경화기술이 적용되어 titanium의 마모율을 현저히 줄일 수 있었으나, 부동태화처리에 의해 titanium 표면에 형성된 TiO₂와 마찬가지로 생체 비활성표면은 얻을 수 있어도 골성장을 촉진시킬 수 있는 생체활성을 갖는 표면은 얻을 수 없었다. 따라서 생체활성소재로 피복하지 않고 titanium소재의 물리적 특성은 보유하면서 생체활성표면을 갖는 임플란트소재 개발이 요구되어 왔다.

Ducheyne등¹⁶⁾은 HA 임플란트에서 HA와 titanium의 결합력을 높이기 위해 진공소결시 HA피복층으로부터 titanium소재표면 내부로의 칼슘과 인이 확산(diffusion)됨을 실험적으로 밝혔으며, 확산에 의하여 얻어진 titanium소재 표면층은 칼슘과 인이 인산칼슘화합물 상태가 아님을 확인하였고, 칼슘의 경우 titanium최외각 표면에 미소량이 확산되며 그 양은 표면으로부터 점점 적어지는 양상을 보이고, 인은 titanium과의 친화력이 높아 titanium 표면내부로 깊이 확산되어 그 농도가 비대칭의 가우스 분포(Skewed Gaussian distribution)를 나타냄을 보고하였다.

지금까지 개발된 골결합능이 현저한 소재는 비록 화학적 조성은 다를지라도 모두 칼슘과 인을 함유하고 있다는 공통점이 있으며, 골과 접촉하고 있는 임플란트 표면으로부터 용출된 칼슘과 인의 이온양이 골 증식에 절대적

인 영향을 미치지 않는다는 연구보고들^{26, 27)}과 골내 혈액으로부터 공급된 무기물들의 침착 및 칼슘화의 핵형성을 용이하게 하여 골과 접촉시 초기에 이물반응을 일으키지 않는다는 선학들의 연구결과^{24, 26, 26, 27)}들을 고려할때 인을 확산시킨 titanium phosphide(Ti-P) 표면은 HA 피복을 대체할 수 있음을 시사하였다.

이상과 같은 선학들의 연구결과를 토대로하여 titanium소재를 조밀한 HA분말 내에 넣고 상변태온도(phase transition temperature) 이상에서 진공열처리하여 titanium의 표면에 인을 확산시킴으로써 Ti-P표면을 유도한 후 Ti-P, 316L stainless steel 및 titanium에 대한 세포독성반응과 골에 대한 친화성을 비교 분석함으로써 Ti-P로 표면처리된 임플란트의 임상적 활용 가능성을 평가하는데 목적을 두고 본 연구를 시행하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. Ti-P 의 표면처리

연구재료의 제조는 titanium(Grade2,

ASTM F-67)시편들을 ASTM(American Society of Testing and Material)규정에 따라 가공, 연마, 초음파세정한 후 55°C의 40% HNO₃ 용액 내에서 20분 동안 침수시켜 부동태화(passivation)를 유도한 다음 titanium시편들을 조밀한 HA 분말 내에 고정된 후 약 10⁻⁶ Torr의 진공 내에서 925°C로 2시간동안 가열하였다(그림 1).

2. Ti-P 표면에 대한 화학적 조성검사

표면분석기인 Auger Electron spectroscopy (AES, Perkin Elmer, Eden-Prairie, MN)를 사용하여 Ti-P에 대한 화학적 조성을 검사하였다. 이때 작동조건은 진공도를 10⁻⁹mmHg이하로, electron beam energy를 5 KeV로, 전자빔 전류밀도를 0.4μA/100×100μm²로, depth profiling을 위한 아르곤 이온 빔 에너지를 2 KeV로 하였으며, sputtering rate를 약 1nm/min 로 조정하였다.

Ti-P 표면층의 형성유무를 확인하기 위하여 AES검사로 titanium표면 내부로 확산된 인을 조사하였는데, 인이 titanium표면 내부로 확산되어 그 농도가 비대칭가우스분포

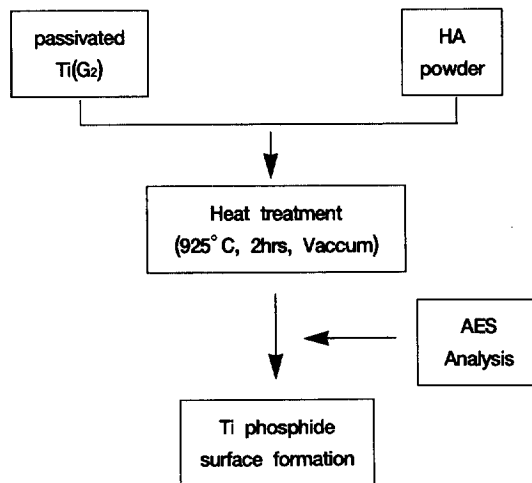


그림 1 Titanium-phosphide의 표면처리 과정

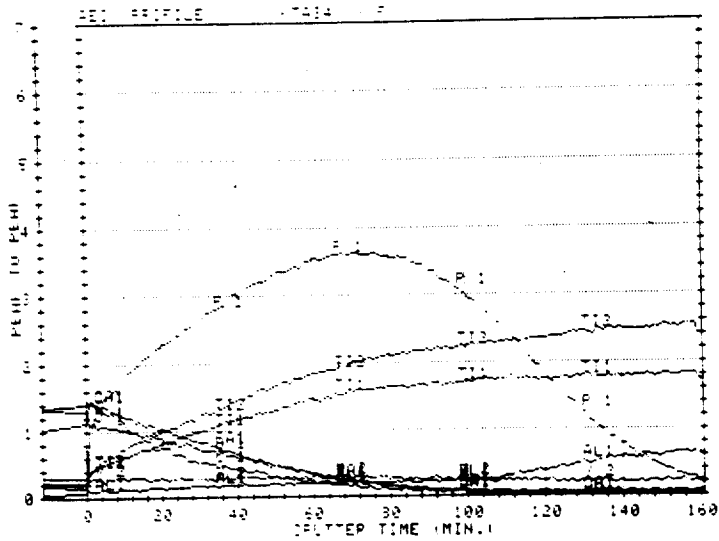


그림 2 Titanium-phosphide표면의 Auger electron spectroscopic survey(after 140min of argon sputtering)

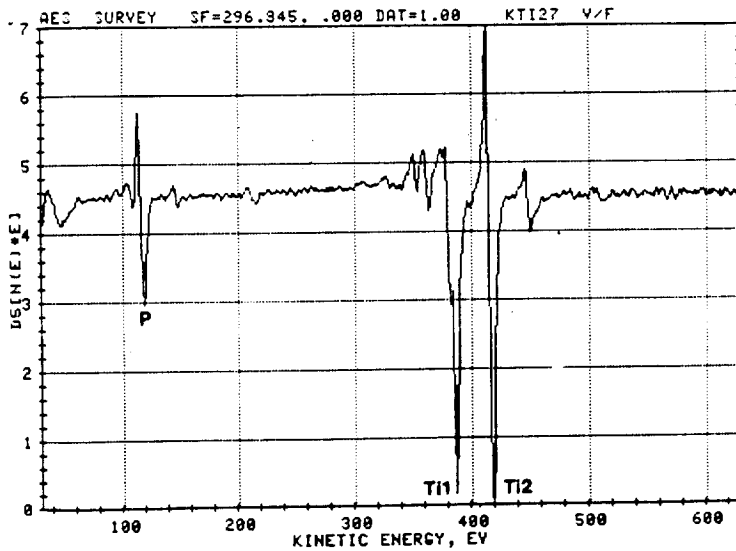


그림 3 Titanium-phosphide표면의 Auger electron spectroscopic survey(Depth profile on the titanium-phosphide surface)

(Skewed Gaussian distribution)를 나타내는가를 확인하였고(그림 2), AES에 의한 스펙트럼 분석을 통하여 phosphate내의 낮은 에너지 P peak가 112eV, 그리고 Ti-P내에서의 P peak가 120eV의 Auger energy로 에너지 shift

를 나타내는가를 확인하였다(그림 3, 4).

3. 시편제작

(1) 세포 독성 시험용 시편

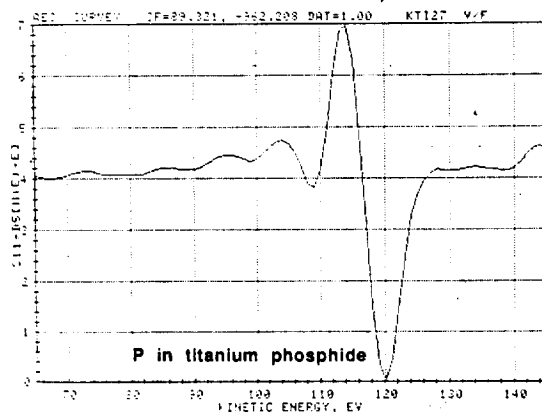
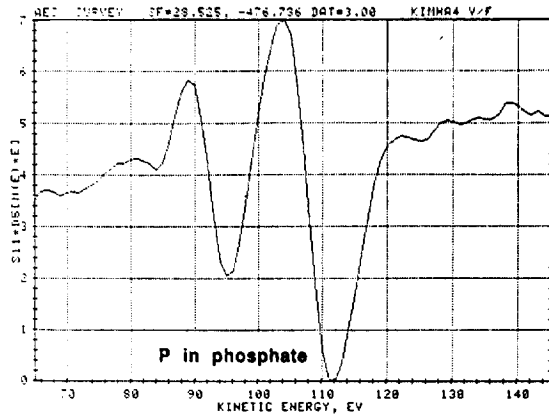


그림 4 Phosphate와 Titanium-phosphide에서 인에 대한 Auger spectra

직경 10mm, 높이 5mm의 크기로 316L stainless steel(18Cr-10Ni-2.5Mo-bal.Fe), titanium 및 Ti-P 환봉시편들을 제작하여 임플란트를 위한 ASTM규정에 따라 가공, 연

마, 초음파세정 과정을 거친 후 배양액에 침적하기 전에 가압멸균을 하였으며, 골아세포와 대식세포 배양실험을 위해 각각 20개씩 (총 60개)의 시편을 제작하였다(그림 5).

그림 5 본 연구를 위해 제작된 시편들(a: 316L SS, b: Titanium, c: Titanium-phosphide)

(2) 조직병리학적 실험용 시편

직경 5mm, 높이 10mm의 크기로 316L SS, titanium 및 Ti-P 원주형 시편들을 위에서 설명된 세포독성 반응 시편제작과 동일한 방법으로 각각 2개씩 제작한 후 매식전에 가압멸균 하였다.

4. 세포독성실험

(1) 골세포

① 골세포의 추출과정

부화기에서 38°C로 11일간 배양된 가계 우정란 미숙골(embryo)중 대퇴부에서 골을 취하여 잘게 세절하고, digestion buffer(0.8g NaCl, 5mg NaH₂PO₄, 20mg KCl, 150mg collagenase in 100ml distilled water)를 넣고 1시간 동안 교반하였다. 그후 섬유아세포와 기타 잔여 조직 세포를 제거하기 위하여 상층액은 버리고 다시 digestion buffer를 첨가하여 1시간동안 상온에서 교반한 다음 그후 상층액을 취하여 800xg에서 10분간 원심분리한후 골세포를 취하여 10%의 우태아혈청(fetal bovine serum, Gibco, U.S.A)이 함유된 RPMI 1640 medium(Gibco, U.S.A)으로 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

② 세포독성실험

배양된 골세포들을 Hemocytometer로 측정하여 1.8×10^6 cells/well의 세포 밀도로 6 well 배양접시(Corning, USA)에 접종하고 3종의 실험시편들을 침수시켰으며 매일 새로운 배양액으로 교체하면서 배양하였다. 이때 대조군은 시편없이 배양접시에 골세포만을 접종하여 배양하였다. 배양 10일 후 각 well 내의 세포 형태를 관찰하고 MTT방법에 따라 대조군을 기준으로 다음과 같은 세포 생존률(%) = 실험군 well의 적정 세포농도/대조군의 적정 세포농도 $\times 100$ 의 공식에 의해 세포 생존률을 환산한후 각 군간의 차이를 Chi-square

test로 검증하였다.

(2) 대식세포

① 대식세포의 추출과정

5ml의 1% thioglycollate(Gibco, USA)를 7주령된 백서(Sprague dowley)의 복강 내로 주사하고 3일 후에 RPMI 1640 medium을 50ml씩 복강으로 주입한 후 복강내 세포들을 회수하였다. 순수한 대식세포를 분리하기 위하여 T-75 flask에서 10시간 동안 배양하고 부착되지 않은 세포들은 RPMI 1640 medium으로 2회 세척함으로써 제거하였고, 부착된 세포들을 배양하였다.

② 세포독성실험

3종의 실험 시편들이 배양된 대식세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 먼저 well당 2×10^5 cells의 세포 밀도로 6 well내에 접종하고, 각 3종의 시편들을 넣고 RPMI 1640 medium으로 배양하였다. 배양 10일째 그 배양상층액을 취하여 50ml의 MTT용액(1mg/ml in PBS, Sigma, USA)을 각 well에 처리하고 48시간 동안 배양한 후 배양상층액을 제거한 상태에서 isopropanol을 각 well당 100ml씩 첨가하여 불용성의 Formazan을 녹이고 ELISA reader 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정함으로써 세포의 생존률을 평가하였으며, 각 군간의 차이를 Chi-square test로 검증하였다.

⑤ 골 계면에 대한 조직 병리학적 관찰

실험동물은 체중 약 10Kg내외의 잠견 2마리를 대상으로 하였으며, 2.5cc의 xylazine(RompunR, Bayer Vetchem-Korea Co.)와 15mg/kg의 Ketamine(KetaraR, 유한양행)을 근주하여 전신마취를 유도하고 기관내 삽관을 통해 할로탄과 산소로 마취 상태를 유지하였다. 실험 동물의 좌우 대퇴부에 직경 5.5mm의 드릴로 천공한 후 가압멸균된 3종류의 원주형 시편을 각각 매식하였으며, 술후 3

일간 항생제(PeracillinR, 1g/day, 삼성제약)를 근주하였다. 매식 6주후에 실험동물을 희생시켜 각 조직표본들을 탈회한 후 통법에 따라 파라핀포매 표본을 제작하여 시편들과 골 계면에서의 조직병리학적 특징을 광학현미경하에서 관찰하였다.

III. 연구성적

1. 세포 독성 실험

(1) 골세포 배양실험(표 1, 그림 6)

Ti-P시편군과 titanium시편군의 경우 배양된 골세포는 대조군과 비교할 때 변이된 이상세포가 발견되지 않았고, 생존률 검사(viability assay)에서도 대조군과 유의성있는 차이를 보이지 않았다($p>0.1$). 그러나 316L SS시편군의 경우 골세포의 생존률은 다른 3

군에 비해 통계학적으로 유의성있게 낮게 나타났다($p<0.05$).

표 1 골세포 생존률의 비교(%), 평균±표준편차

시편군	골아세포률
316L stainless steel	81.6±5.7*
titanium	95.6±4.8
Ti-P	97.7±3.9
대조군	100±0.0

* $p<0.05$

(2) 대식세포 배양실험(표 2, 그림 7)

Ti-P, titanium, 316L stainless steel시편들과 각각 10일간 배양된 대식세포의 생존률과 대조군의 대식세포 생존률을 각각 비교했을 때 각 군간의 차이에 모두 통계학적 유의성이

그림 6 배양된 골세포(magnification x100)(a: 316L stainless steel, b: Titanium, c: Titanium phosphaide, d: control)

표 2 대식세포 생존률의 비교(%), 평균±표준편차)

시편군	대식세포
316L stainless steel	102.4±6.3
titanium	101.3±4.9
Ti-P	100.6±5.2
대조군	100±0.0

없었다(p>0.1).

2. 조직 병리학적 관찰(그림 8)

매식기간 6주 후 각 시편들과 골 계면에 대한 조직병리학적 특성을 광학현미경하에서 관찰한 결과 316L stainless steel 시편(그림 8-a)은 골계면과 시편사이에 시편을 둘러싸고 있는 두꺼운 섬유성 피막층이 형성되었고, titanium시편(그림 8-b)의 경우 골계면과 시

편사이에 비교적 얇은 섬유성 피막층이 관찰되었으나, Ti-P 시편(그림 8-c)에서는 섬유성 조직의 개재없이 신생골의 형성이 뚜렷하였다.

IV. 총괄 및 고안

Branemark에 의한 골유착 개념의 확립과²⁸⁾ 기본적인 생체재료인 titanium 및 ceramics의 도입, 임플란트 경부와 치은조직과의 생물학적 폐쇄(biological seal)개념의 정립²⁹⁾은 치과 임플란트의 빠른 발전과 임상적용을 확대시키는 계기가 되었다. 골유착이란 교합력이 가해진 상태의 임플란트와 골조직이 구조적, 기능적으로 직접 결합되어 있는 상태를 의미하며³⁰⁾, 이러한 골유착에 영향을 미치는 인자로는 임플란트 재료의 생체적합성^{31, 32, 33)}, 외과적 술식, 임플란트의 형태 및 표면처리^{32, 34)},

그림 7 배양된 대식세포(magnification × 200)(a: 316L stainless steel, b: Titanium, c: Titanium phosphaide, d: control)

그림 8 매식 6주후 시편과 골계면에 대한 광학현미경 사진(magnification $\times 200$) (a; 316L stainless steel, b; Titanium, c; Titanium phosphide) FT; fibrous tissue NB; newly formed bone

임플란트에 가해지는 하중^{31, 35)} 및 임플란트 매식부의 조직상태^{36, 37)} 등을 들 수 있다.

골유착성 임플란트는 연조직의 개재 없이 살아있는 골조직에 의하여 결합되는 것을 특징³⁸⁾으로 하며, 매식체와 치은상피간에는 반교소체로 연결되어 있고³⁹⁾, 상피하방의 결합조직은 매식체와 긴밀한 접촉을 이루고 있다. 임플란트와 연조직간의 이러한 부착은 임플란트를 구강내 세균으로부터 보호하여 골유착을 유지하는데 중요하다고 알려져 있다^{40, 41)}.

골유착성 임플란트재료로는 titanium과 titanium합금이 주로 사용되는데 다양한 연구^{42, 43)}를 통하여 titanium은 다른 종류의 생체재료에 비하여 우수한 생체적합성을 지니며 자연치아에서와 유사한 결합조직의 부착이 가능하다고 보고되었다^{44, 45, 46)}. 그러나 이러한 우수한 재료적 특성을 지녔음에도 불구하고 titanium은 인체라는 특수한 환경 내에서 매식체의 취약부에서의 부식에 의해 생성되는 미세한 물리적 결합이 매식체파절의 원인이 되기도 하여 골조직과 직접 결합에 문제점을 야기하기도 하며⁴⁷⁾, titanium hydroxide형태로 불용성화합물로 용출되어 근접한 국부조직에 축적될 수도 있고, titanium로부터 용출된 titanium hydroxide가 주위 골조직과의 직접적인 결합에 악영향을 미치기도 한다^{48, 49)}.

골 성장을 유도할 수 있는 생체활성표면 소재인 인산칼슘화합물로는 화학적 조성이 고결정도인 HA, 칼슘과 인의 용해도를 높게 하기 위해 결정도를 낮춘 Ca-deficient HA 또는 결정구조를 다르게 제조한 tricalcium phosphate 등이 있다.

HA는 골조직과 친화성이 뛰어나 골조직과의 결합성이 타 재료에 비해 현저히 높다고 알려져 있지만^{18, 19, 21, 50)} HA의 물리적 특성 때문에 계속적인 교합압이 작용하는 치과용 임플란트의 재료로 사용하기에는 한계가 있어 titanium표면에 HA와 같은 생체활성 세라

믹을 피복하여 생체활성도를 강화하는데 응용되었다. 지금까지 적용된 기술에 의해 피복된 HA/Ti소재는 계면에서의 결합력이 약하여 하중전달에 의한 전단력이 작용하는 경우 피복면과 임플란트가 분리되거나 고온에서의 진공소결과 같은 열처리를 함에 따라 원하는 HA의 결정구조 또는 화학 조성을 유지하기가 거의 불가능하다는 문제점이 제기되었다.

Ti-P로 표면처리된 소재가 HA피복을 대체할 수 있는가를 평가하기 위해 시행된 본 연구에서는 Ti-P, titanium, 316L stainless steel을 상호 비교하는 것으로 이루어 졌는데, 본 연구에서 사용한 Ti-P 소재는 진공소결시 HA피복층으로부터 titanium 표면 내부로 칼슘과 인 확산됨을 확인한 Ducheyne¹⁶⁾ 등의 연구보고에 근거하여 압축된 HA분말 내에서 titanium소재를 넣고 상변태온도 이상에서 진공열처리하여 얻었다. 316L stainless steel은 오우스테나이드계 스테인레스강중 가공이 용이하고 기계적 강도도 높으며 대체적으로 부식강도도 커서 1926년 생체재료 분야에서 응용한 이래, 현재는 내식성을 갖는 몰리브덴을 첨가하고 부식저항을 높이기 위해 최대 탄소함량을 무게비 0.08%에서 0.03%로 제한하여 인공관절, 접골용 금속판, 등 체내이용 생체재료로 널리 쓰이는 재료중의 하나로 인정되고 있기 때문에 본 연구에서 실험재료로 선택되었다. titanium은 치과용 임플란트에 가장 많이 사용되는 재료이며 이미 선학들의 많은 연구가 있었기에 본 연구의 실험재료로 선택하여 이상의 3가지 소재를 상호 비교하였다.

매식체와 골조직간의 생체적합성평가는 다양한 매식체들의 표면과 생체조직 계면에서 일어나는 화학적현상을 이해하기 위하여 단일 원자층수준까지 화학적 조성을 규명할 수 있는 표면 분석기들이 필수적으로 응용되어 왔다. 재료 표면으로부터 원자들의 여기(excitation)를 검출하는 방법에 따라 개발된 주사전자현미경, 투과전자현미경, X-ray

Diffraction, Ultra Violet Photoelectron Spectroscopy(UPS), X-ray Photoelectron Spectroscopy(XPS), Auger Electron Spectroscopy(AES) 등의 다양한 표면분석기들이 각각의 장점을 이용해 생체재료와 경조직의 계면에서 일어나는 현상을 규명하는데 이용되고 있다⁵¹⁾.

1925년 프랑스 사람인 Pierre Auger가 X선에 의한 불활성가스의 반응연구중에 Auger Electron을 발견하였고, 이를 이용하는 AES는 1953년 Lander에 의해서 초기 여기원(excitation source)으로 X선 대신 전자빔을 사용함으로써 처음으로 실험적으로 가능성을 제시하였다^{3, 7, 51)}. 그 후 AES는 Auger Electron을 탐지할 수 있는 기술이 발달하면서 실용화되어 고체표면의 화학적 조성 및 변화를 조사할 수 있는 중요한 표면분석기계로 발전하였다. 이는 금속의 산화, 표면의 불순물침입, 오염도, 특정화합물에서 다른 특정 화합물로 변화될 때 일어나는 미세한 표면의 화학적 변화까지도 세밀히 관찰할 수 있는 광전자 분석기로서 다른 표면분석기에 비교하여 낮은 에너지에서도 수 Å단위까지도 분석할 수 있기 때문에 titanium표면으로부터 특정 깊이까지 화학적 조성비를 분석할 수 있으리라 판단되어 본 연구에서는 AES를 이용하여 화학적 조성검사를 시행하였다.

HA 분말속에서 진공열처리된 titanium을 AES에 의하여 조사한 결과 titanium표면 내부로 확산된 칼슘과 인을 확인할 수 있었으며, 인은 titanium과 친화력이 높아 titanium표면 내부로 확산되어 그 농도가 비대칭 가우스분포(Skewed Gaussian distribution)를 보이는 특징을 확인함으로써 titanium표층에 인이 확산되어 Ti-P표면이 얻어졌음을 인정하였다. 또한 Ti-P층을 AES에 의하여 표면분석한 결과 phosphate내의 인 peak는 112eV, Ti-P내에서 인의 peak는 120eV의 Auger energy를 나타냄으로써 HA내의 인이 titanium내로 확산

되고 화학적 변화를 일으킨 결과로 인의 peak가 약 8eV의 에너지 shift를 나타낸 것을 확인하였다. 이러한 결과로써 titanium의 표면에는 HA내의 phosphate와 다른 Ti-P가 형성되었음을 인정하였다.

본 연구에서는 골형성과 성장에 중요한 역할을 담당하는 골세포와 염증과 면역반응에 관여하는 대식세포의 배양실험을 통하여 316L stainless steel, titanium, Ti-P시편에 대한 골형성에 대한 영향을 포함하는 생체적합성을 비교 평가하였는데, 본 연구에서 골세포에 대한 세포독성실험결과 titanium군 및 Ti-P시편군에서의 골세포 생존률은 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의성이 있는 차이가 없었고($p>0.1$), 변이된 이상 세포도 발견되지 않았으므로 골형성에 유해로운 작용을 미치지 않음을 시사하였다. 그러나 316L stainless steel시편군에서의 골세포의 생존률은 대조군에 비해 유의성있게 낮았는데($p<0.05$), 이는 316L stainless steel를 인체내에 매식한 후 부식에 의하여 생성된 니켈이 이온화된 상태로 체내에 쉽게 용해되고 생체막을 통과하여 근접해 있는 골조직 또는혈액속으로 유입됨에 따라 여러 형태의 독성반응을 일으킨다고 한 Hilderbrand⁵²⁾의 보고와 관계깊은 결과로 사료된다. 대식세포에 대한 세포독성실험결과에서는 316L stainless steel시편군, titanium시편군, Ti-P시편군 모두 대식세포세포 생존률에 유의성있는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났는데($p>0.1$), 이는 3종의 시편들에 대한 생체적합성이 양호하여 이물반응이 나타나지 않는 것으로 사료되나 세포독성반응 실험방법에서 실험기간이 짧았던 점에서 기인된 결과일 수도 있음을 배제하기는 어렵다.

임플란트와 골조직 계면관계에는 섬유성유착과 골유착이 있는데 종전의 섬유유착성 임플란트에서는 섬유성 결합조직이 골조직과 임플란트 사이에 존재해서 생리학적으로 충격을 흡수하여 자연치의 치주인대와 유사한

기능을 하므로 자연치와 연결하여 사용할 때는 오히려 골유착성 임플란트보다 유리하다는 주장도 있다^{53, 54}). 그러나 섬유유착성 임플란트의 경우는 섬유성 결합조직을 통해 세균이 침입하기 쉽고 이로 인해 염증이 확산되기 쉬워 현재로는 골유착성 이론이 임상적으로 우수한 것으로 인정되고 있다^{55, 56, 57}). 따라서 지금까지 임플란트와 골과의 직접적인 골결합능을 평가하는데 가장 직접적인 방법중의 하나로 골과 임플란트 계면에서의 섬유성 피막의 형성 여부를 조사하여 왔다.

본 연구중 조직 병리학적인 관찰을 위한 동물실험에서는 성견의 좌우대퇴부에 직경 5.5mm의 드릴을 사용하여 천공한 후 직경 5.0mm의 시편들을 매식하였는데, 이는 시편과 골 계면과의 사이에 미세한 공간을 허용해 줌으로써 시편재료에 따른 치유반응의 차이를 보다 용이하게 관찰하기 위한 착상이었다. 성견의 대퇴골을 선택한 이유는 손상없는 대퇴골에 임플란트를 매식한 후 치밀골, 잘 발달된 해면골, 그리고 골수 조직과 접해서 계면을 형성하는 과정을 쉽게 관찰할 수 있으리라 예견되었기 때문이다.

대부분의 스테인리스강 및 코발트 합금은 골내에 매식시 거부반응에 의하여 빠른 속도로 섬유성 피막이 형성되는 것으로 보고되었고⁵⁸), titanium소재는 매우 안정된 산화막 특성 때문에 표면의 불활성 정도가 거의 생체 비활성 바이오세라믹과 유사한 특성을 갖고 있다고 알려져 있다⁵⁹). 본 연구에서 매식기간 6주 후 각 소재들과 골 계면에 대한 조직학적 특성을 광학현미경으로 관찰한 결과 316L stainless steel과 titanium은 시편과 골계면 사이에 섬유성 피막층이 관찰되었는데, 316L stainless steel 시편의 경우 골아세포에 대한 세포배양실험의 결과와 일관성 있는 결과로 사료된다. 그리고 titanium시편과 골조직사이의 섬유성 피막의 개재는 조직 내에서 titanium은 titanium hydroxide형태의 불용성

화합물로 용출되어 근접한 국부조직에 축적될 수 있는 titanium의 특성^{48, 49}) 그리고 실험 부위로 사용된 대퇴골의 불량한 골질 및 시편과 골 계면 사이에 의도적으로 약간의 공간을 허용하면서 초래된 시편의 부적절한 초기고정 등과 관련되어 나타난 결과로 사료된다.

그러나 Ti-P시편의 경우 동일한 매식조건임에도 불구하고 섬유성피막의 개재없이 왕성한 신생 골조직의 형성이 뚜렷하였는데, 이는 Ti-P 표면의 경우 TiO₂표면층보다 titanium 용해도를 낮추고, 표면에 확산되어 있는 칼슘과 인의 영향에 의하여 신생골의 형성을 촉진한 결과로 추정되며, 이러한 결과는 Boyne⁶⁰), Gottlander등⁶¹) 및 Ducheyne등⁶²) 이 HA피복임플란트와 골계면 사이에서 관찰한 골형성 양상과 유사한 것으로 사료된다.

결론적으로 본 연구에서 Ti-P시편의 경우 단기간 세포독성반응실험 결과 대식세포 및 골아세포의 배양에 전혀 악영향을 미치지 않고, 골 계면에서 섬유성 피막이 형성되지 않고 신생골 형성으로 치유되는 관찰결과는 Ti-P로 표면처리된 인공치근이 골친화성이 우수하여 골유착을 가속화시킬 수 있음을 시사하고 있다. 그러나 Ti-P소재를 인체에 적용하기 위해서는 향후 보다 장기간의 세포독성반응 및 생체조직반응에 대한 추가적인 연구가 필요하며, 또한 Ti-P소재의 제작시 열처리과정으로 초래될 수 있는 물리적 강도의 저하를 비롯한 물성변화에 관한 체계적인 연구가 계속되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

Titanium Phosphide(Ti-P)로 표면처리된 인공치근의 생체적합성과 골친화성을 평가하는데 본 연구의 목적을 두고 직경 10.0mm 높이 5.0mm의 Ti-P, titanium, 316L stainless steel 시편들을 제작하여 골세포와 대식세포에 침

수시킨 후 10일간 배양하여 세포독성반응을 비교하고, 성견의 대퇴골에 직경 5.5mm의 드릴로 천공한 후 직경 5.0mm, 길이10.0mm의 크기로 제작된 3종의 원주형 시편들을 각각 6주간 매식한후 시편 소재차이에 따른 골친화성을 비교함으로써 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 골세포 생존률을 비교한 결과 Ti-P 표면 처리군과 titanium군은 대조군과 유의성 있는 차이가 없었으나($p>0.1$), 316L stainless steel군은 대조군 보다 유의성있게 낮았다 ($p<0.05$).
2. 대식세포 생존률에서는 세 군 모두 대조군과 유의성있는 차이가 없었다($p>0.1$).
3. 생체내 매식실험결과 titanium군과 316L stainless steel군은 시편과 골계면 사이에 섬유조직이 개재하였으나, Ti-P 표면처리군은 섬유조직의 개재없이 신생골형성이 관찰되었다.

이상과 같은 연구결과는 titanium phosphide가 양호한 생체적합성과 골친화성을 지니고 있음을 나타냈으며, titanium phosphide로 표면처리된 임플란트는 골유착을 가속화시키는데 활용할 수 있음을 시사하였다.

참고 문헌

1. Orr, R.D., de Bruijn, J.D., and Davies, J.E.: Scanning electron microscopy of the bone interface with titanium, titanium alloy and hydroxyapatite. *Cell Mater.*, 2, 241-254, 1992.
2. Jansen, J.A., van de Waerden, J.P.C.M., Wolke, J.G.C., and de Groot, K.: Histologic evaluation of osseous adaptation to titanium and hydroxyapatite-coated titanium implants. *J. Biomed. Mat. Res.*, 23, 973-989, 1991.
3. Osborn, J.F., Willich, P., and Meenen, N.: The release of titanium in to human bone from a titanium implant coated with plasma-sprayed titanium. *Adv. Biomater.*, 9, 75-80, 1990.
4. Hentrich, R.L.: An evaluation of inert and resorbable ceramics for future clinical orthopedic applications. *J. Biomed. Mater. Res.*, 5, 25-51, 1971.
5. Babbush, C.A.: *Dental implants: Principles and practice*. Philadelphia, WB. Saunders Co. pp 67-106, 1991.
6. Block, M.S., Kent, J.N., and Kay, J.F.: Evaluation of hydroxyapatite-coated titanium dental implants in dogs. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 45, 601-607, 1987.
7. Barrie, A.: In *Hand book of X-ray and ultraviolet photoelectron spectroscopy*. D. Briggs(Ed). Heyden, London, 1977.
8. Ducheyne, P., Hench, L.L., Kagan, A., Martens, M., Bursens, A. and Mulier, J.C.: Effect of hydroxyapatite impregnation on skeletal bonding of porous coated implants. *J. Biomed. Mat. Res.*, 14, 225-237, 1980.
9. Ducheyne, P., Radin, S., Heughebaert, M., and Heughebaert, J.C.: Calcium phosphate ceramic coatings on metallic porous surfaces; the effect of structure and composition on the electrophoretic deposition, vacuum sintering and in vitro dissolution behavior. *Biomaterials*. 11, 244-254, 1990.
10. Kasemo, B.: Biocompatibility of titanium implant surface science aspect. *J. Prosthet. Dent.*, 4, 832-837, 1983.
11. Wagner, W.C.: A brief introduction to advanced surface modification technologic

- J. Oral Implantol., 18, 231-235, 1992.
12. Groot, K., Greesink, R.G., Klein, T., and Serekian, P.: Plasma sprayed coating of hydroxyapatite. *J. Biomed. Mat. Res.*, 21, 1475-1381, 1987.
 13. Healy, K.E. and Ducheyne, P.: The mechanisms of passive dissolution of titanium in a model biological environment. *J. Biomed. Mater. Res.*, 26, 319-338, 1992.
 14. Kay, J.F., Manley, M.T., Stern, M.S., Yoshima, S., and Stulberg, B.N.: The effect of hydroxyapatite coatings on the fixation of metallic devices : a preliminary study. *European congress on Biomaterial sep. 14-17, 1986.*
 15. Hench, L.: Bioactive ceramics, in bioceramics material characteristics versus in vivo behavior. Eds., Ducheyne, P. and Lemons, J.E.. *ANN. N.Y. ACAD.SCI. VOL. 523, 54-71, 1988.*
 16. Schoeder, A., Zypen, E., Stich, H., and Sutter, F.: The reactions of bone connective tissue and epithelium to endosteal implants with titanium-sprayed surface. *J. Maxillfac. Surg.*, 9, 15-25, 1981.
 17. Kasemo, B. and Lausmaa, J.: Biomaterial and implant surfac : A surface science approach. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 3, 247-259, 1988.
 18. Hench, L.C. and Ethridge, E.C.: *Biomaterials : An interfacial approach.* Academ. press : 1982.
 19. Friberg, B., Jenct, T., and Lekholm, U.: Early failures in 4641 consecutively placed Branemark dental implants. : A study from stage I surgery to the connection of completed prostheses. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 6, 142-146, 1990.
 20. Bucheyne, P. and Hasings, G.W.: *Metal and Ceramic Biomaterials. Vol. 1 and 2,* Bocaaton, Florida, CRC press, 1984.
 21. Klauber, C., Lensz, L.J., and Henty, P.J.: Oxide Thickness and Surface Contamination of Six Endosseous Dental Implants Determined by Electron Spectroscopy for Chemical Analysis : A preliminary Report. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 5, 264-271, 1990.
 22. Weiss, C.M.: Fibro-osteal and osteal integration : A comparative analysis of blade and firxture types dental implants supported by clinial trial. *J. Dent. Educ.*, 52, 706-711, 1988.
 23. Golec, T.S. and Krauser, J.T.: Long-term retrospective syudies on hydroxyapatite- coated endosteal and subperiosteal implants. *Dent. Clin.. North Am.*, 36, 39-65, 1992.
 24. Parr, G.R., Gardner, L.K., and Toth, R.W.: Titanium the mystery material of implant dentistry. *Dental material aspects. J. Prosthet. Dent.*, 54, 410-414, 1985.
 25. Ducheyne, P., Van Raemdonck , W., Heughebaert, J.C. and Heughebaert, M.: Structural Analysis of hydroxyapatite coating on titanium. *Biomaterials*, 7, 99-103, 1986.
 26. James, R.A.: Peri-implant considerations. *Dent. Clin. North Am.*, 24, 415-420, 1980.
 27. Weiss, C.M.: A comparative analysis of fibro-osteal and osteal integration and other variables that affcct long term bone maintenrance around dental

- implants. *J. Oral Implantol.*, 13, 467-487, 1987.
28. Buser, D., weber, H.P., Donath, K., Fiorellini, J.P., Paguette, D.W., and Williams, R.C.: Soft tissue reactions to non-submerged unloaded titanium implants in beagle dogs. *J. Periodontol.*, 63, 226-235, 1992.
 29. Jarcho, M.: Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin Orthop. Related Res.*, 157, 259-278, 1981.
 30. Kokubo, T.: Surface chemistry of bioactive glass-ceramics. *J. Non-Cryst. Soild.*, 120, 138-151, 1990.
 31. Gould, T.R.L. and Brunette, D.M.: Ultrastuctual study of the attachment of human gingiva to titanium in vivo. *J. Prosthet. Dent.*, 52, 418-420, 1984.
 32. Bruck, S.D.: Properties of biomaterials in the physiological environment. CRC Press, 1980.
 33. Brunski, J.B.: Biomaterials and biomechanics in dental implant design. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 3, 85-97, 1988.
 34. Cook, S.D., Kay, J.F., Thomas, K.A., and Jarcho, M.: Interface mechanics and histology of titanium and hydroxyapatite coated titanium for dental implant applications. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 2, 15-22, 1987.
 35. Listgarten, M.M., Buser, D., and Steinemann, S.G.: Light and transmission electron microscopy of the intact interfaces between non-submerged titanium-coated epoxy resin implant and bone or gingiva. *J. Dent. Res.*, 71, 364-371, 1992.
 36. Steflik, D.E.: Hydroxyapatite coatings on dental implants : Benefits and Risks. *J. Oral Implantol.*, 20, 198-200, 1994.
 37. Hoshaw, S.J., Brunski, J.B., and Cochran, G.V.B.: Mechanical loading of Branemark implants affects interfacial bone modeling and remodeling. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 9, 345-359, 1994.
 38. Hilderbrand, H.F., Veron, C., and Martin, P.: Nickel,Chromium, Cobalt - dental alloys and allergic reactions : an overview. *Biomaterials*, 10, 545-548, 1989.
 39. Kasemo, B. and Lausmaa, J.: Biomaterial and implant surface : on the role of cleanliness, contamination and preparation procedure. *J. Biomed. Mat. Res.*,: *Applied Biomaterials*, 22, 145-158, 1988.
 40. Krish, A. and Ackermann, K.L.: The IMZ osteointegrated implant system. *Dent. Clin. North Am.*, 33, 733-791, 1989.
 41. Ducheyne, P. Beight, J, Cuckler, J., B, Evans. and S, Radin.: The effect of calcium phosphate coating characteristics on early postoperative bone tissue in growth. *Biomaterials*, 11, 531-540, 1990.
 42. Johansson, C., Lausmaa, J., Ask, M.O., Hansson, H.A., and Albroktsson, T.: ultra structural defferences of the interface zone between bone and Ti-6Al-4V or commercially pure Ti. *J. Bromed.. Eng.*, 11, 3-8, 1989.
 43. Albrektsson, T., and Sennerby, L.: Direct bone anchorage of oral implants: Clinical and experimental considerations of the concept of osseointegration. *Int. J. Prosthodont.*, 3, 30-41, 1990.
 44. Hench, L.H.: Bioceramics and the origrn

- of life. *J. Biomed. Mater. Res.*, 23, 685-703, 1989.
45. Arvidson, K., Bystedt, H., and Ericsson, I.: Histometric and ultrastructural studies of tissue surrounding Astra dental implants in dogs. *Int. oral maxillofac. Implants*, 5, 127-134, 1990.
 46. Boyne, P.J.: Hydroxyapatite coating on dental Implants (Bone response to hydroxyapatite) *J. Oral Implantol.*, 20, 227-231, 1994.
 47. Ducheyne, P., Bianco, P.D., and Kim, C.S.: Bone tissue growth enhancement by calcium phosphate coatings on porous titanium alloys : the effect of porous titanium alloys ; the effect of shielding metal dissolution product. *Biomaterials*, 13(9), 617-624, 1992.
 48. Babbush, C.A.: *Dental implants: Principles and practice*. Philadelphia, WB. Saunders Co. pp 67-106, 1991.
 49. Gottlander, M. and Albrektsson, T.: Histomorphometric studies of hydroxyapatite-coated and uncoated C. P titanium threaded implants in bone. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 6, 399-404, 1991.
 50. Bolender, C.L.: Indications and contraindications for different type of implant therapy. *J. Dent. Educat.*, 52, 757-759, 1988.
 51. Hobo, S., Ichida, E., and Garcia, L.T.: *Osseointegration and occlusal Rehabilitation*, Quintessence, p.p 33-54, 1989.
 52. Kasemo, B. and Lausmaa, J.: Metal selection and surface characteristics, In Branemark, Zarb, G.A., Albrektsson, T. (eds) : *Tissue-Integrated prostheses*. Chicago, Quintessence Publ Co. pp 99-116, 1985.
 53. Hansson H.A., Albrektsson, T., and Branemark, P.I. : Structural aspects of the inter face between tissue and titanium implants. *J. Prosthet. Dent.*, 50, 108-113, 1983.
 54. Hansson H.A., Albrektsson, T., and Branemark, P.I. : Structural aspects of the inter face between tissue and titanium implants. *J. Prosthet. Dent.*, 50, 108-113, 1983.
 55. Kasemo, B.: Biocompatibility of titanium implants: surface science aspects. *J. Prosthet. Dent.*, 49, 832-837, 1983.
 56. Branemark, P.I., Hanson, B.O., and Adell, R.: Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous Jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J. Plast. Reconst. Surg.*, 16, 7-13, 1977.
 57. Babbush, C.A.: Titanium Plasma spray screw implant system for reconstruction of the edentulous mandible. *Den. clin. North Am.*, 30, 117-131, 1986.
 58. Benjamin, L.S., and Block, M.S.: Histologic evaluation of a retrieved human HA-coated subperiosteal implant: Report of case. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 4, 63-66, 1989.
 59. Branemark, P.I., Zarb, G.A., and Albrektsson, T.: *Tissue-integrated Prostheses*. Quintessence book., 11-108, 1985.
 60. Adell, R., Eriksson, B., Lekholm, U., Branemark, P.I., and Jerit, T.: A long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of the totally edentulous Jaws. *Int. J. oral Maxillofac. Implants*, 5, 347-359, 1990.

61. McNamara, A. and Williams, D.F.: Scanning electron microscopy of the metal-tissue interface. *J. Biomaterials*, 3, 160-175, 1982.
62. Mckinney, R.V., Steflik, D.E., and Koth, D.L.: Evidence for junctional epithelial attachment to ceramic dental implants. *J. Periodontol.*, 56, 579-591, 1985.
63. Albrektsson, T., Branemark, P.I., Hansson, H.A., and Lindstrom, J.: Osseointegrated titanium implants. *Acta. Orthop. Scand.*, 52, 155-170, 1981.

Evaluation of cytotoxicity and bone affinity on the surface of a titanium phosphide

Kang-Jin Lee, Chun-Seok Kim, Hyung-Soo Kim,
Chang-Yup Yum, Byung-Ock Kim, Kyung-Yoon Han
Department of Periodontology, School of Dentistry, Chosun University

Dental implants have been developed for enhancement of osseointegration. Biocompatibility, bone affinity and surface characteristics of dental implants are very important factors for osseointegration.

The aim of the present study was to determine the cytotoxicity and the bone affinity of titanium phosphide(Ti-P) implant material. The Ti-P surface was obtained by vacuum sintering of titanium within compacted hydroxyapatite powder. The composition and the chemical change of the surface were determined by Auger electron spectroscopy. The in vitro cytotoxicity was evaluated by the viability of the bone cells and macrophages obtained from chicken embryo and rat, s peritonium, respectively. For the comparative evaluation, 316L stainless steel, commercially pure titanium and Ti-P materials, prepared in size of 10.0mm in diameter and 5.0mm in height, were immersed separately in bone cells and macrophages for 10 days.

For the evaluation of the in vivo bone affinity, 316L stainless steel, commercially pure titanium and Ti-P materials, prepared in size of 5.0mm in diameter and 10.0mm in length, were implanted after drilling in diameter 5.5mm in femurs of 2 dogs weighing 10Kg more or less. Six weeks after implantation the specimens were prepared for histopathological examination and were observed under light microscope.

In comparison of in vitro bone cell viability, Ti-P and commercially pure titanium groups were not significantly different from control group($p>0.1$), but 316L stainless steel group was significantly lower than control group($p<0.05$). There was no statistical difference in the viability of macrophages between 3 different groups and control group($p>0.1$).

In comparison of in vivo study, 316L stainless steel and commercially pure titanium showed fibrous encapsulation, but Ti-P showed remarkable new bone formation without any fibrous tissue.

The results demonstrate that Ti-P has favorable biocompatibility and bone affinity, and suggest that dental implants with Ti-P surface may enhance osseointegration.