

Ti-Ta-Nb계 합금의 세포독성과 생체적합성의 평가

전남대학교 치과대학 보철학교실, *전남대학교 의과대학 정형외과교실

최득철 · 방몽숙 · 윤택립*

I. 서 론

근래에 들어 치과 임플란트는 상실된 치아의 수복에 성공적으로 사용되고 있다. 치과 임플란트는 상실된 치아의 기능을 거의 완벽하게 회복시켜 줄 뿐만 아니라 기존의 국소의치나 총의치의 사용시 야기될 수 있는 저작력 감소와 불편감 등의 문제점을 해결할 수 있어 선호되고 있다. Branemark¹⁾는 1952년부터 골유착 임플란트에 대한 연구를 시작하여 1960년대 초에 나사 형태의 티타늄이 골과 강력하게 유합한다는 것을 발견하고 이를 바탕으로 골유착(osseointegration) 개념을 소개하였다. Albrektsson²⁾은 광학현미경하에서 임플란트와 주위골 사이에 섬유성 결합조직의 개재없이 골과 임플란트 계면이 직접 접촉된 상태를 골유착이라고 하였으며 골유착은 골조직이 임플란트와 구조적, 기능적으로 직접 결합되는 상태라고 정의하였다. 골유착성 임플란트가 임상에 사용되어 장기간의 성공률과 만족할 만한 결과들이 보고되고 있다.^{3,4)} 최근에는 골유착성 임플란트의 사용량이 많아짐에 따라 임플란트 재료의 생체적합성(biocompatibility)에 관한 관심이 점차 높아지고 있다.^{5,10)}

임플란트 재료로는 스테인레스(SUS 316L), Co-Cr 합금 및 Ti(titanium) 합금이 주로 사용되고 있으며, 특히 Ti 합금은 생체재료로서의 우수성을 인정받아 그 사용량이 급격히 증가하고 있는 추세이다. 순수

Ti은 우수한 부식저항성과 생체적합성을 가진 금속이지만 임플란트 재료로 사용하기에는 더 높은 기계적 성질이 요구되고 있으며 높은 용융점(1668°C)과 가공상의 어려움 때문에 사용이 제한되어 왔다.¹¹⁾ 반면에 Ti 합금은 비중이 낮으며 다른 생체재료에 비해 골조직의 탄성률과 가장 유사하고 표면에 TiO₂의 안정한 산화피막을 형성하며 골조직과의 직접적인 결합 등 생체적합성이 우수하여 인공관절이나 치과용 임플란트 등의 생체재료로서 많이 사용되고 있다.¹²⁾

생체용 Ti 합금으로는 Ti-6Al-4V, Ti-6Al-7Nb 합금 등이 있으며 Ti-6Al-4V 합금은 순수 Ti에 비해 피로강도가 우수하고, 순수 Ti와 유사한 골유착성, 높은 피로강도 및 우수한 부식저항성 때문에 생체재료로서 많이 사용되어 왔으나^{13,14)} 최근에 합금의 구성성분인 Aluminium(Al)과 Vanadium(V)의 생체 안정성에 대한 문제가 일부 연구자들^{15,17)}에 의해 제기되고 있다. 이러한 잠재적인 생체안정성의 문제점을 해결하기 위하여 최근에 새로운 Ti 합금의 개발이 시도되고 있다.^{17,18)} 즉, 근래에 많이 사용되는 Ti계 합금인 Ti-6Al-4V에 대한 V의 세포독성과 Al의 신경계 독성 가능성이 지적되면서 세포독성이 거의 없는 Zr, Nb, Ta, Sn, Pd, In 등을 Ti에 첨가하여 우수한 생체적합성과 고강도 및 고연성의 기계적 특성을 갖는 새로운 Ti 합금에 대한 연구가 활발히 시행되고 있다.^{12,26)}

* 본 연구는 한국과학재단 2000년 특정기초연구와 전남대병원 임상연구소 학술연구비(2002)의 지원에 의하여 이루어짐.

본 연구는 임플랜트 재료로서 많이 사용되는 Ti-6Al-4V 합금의 세포 독성 등의 문제점을 해결하기 위해 이 합금과 유사한 기계적 성질과 내식성을 가진 새로운 Ti 합금으로서 개발된 Ti-Ta-Nb 합금의 세포독성과 생체적합성 및 골유착을 조사하기 위하여 시행되었다. 본 연구에서 Ti 합금의 세포독성을 검사하기 위하여 L929 섬유아세포와 가토의 간엽줄기세포에 대한 세포 독성을 검사하고 Ti 합금 시편들을 가토의 대퇴골에 매식한 후 골유착을 관찰하여 Ti 합금들의 생체적합성을 평가하였다.

Ⅱ. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

세포 독성을 위한 Ti 합금 시편은 순수 Ti, Ti-6Al-4V, Ti-10Ta-10Nb, Ti-8Ta-3Nb 합금들을 선반 가공하여 직경 5 mm, 높이 5 mm의 원통형으로 각각 4개씩 제작하였다. 또한 조직학적 검사를 위한 매식용 시편은 순수 Ti, Ti-6Al-4V, Ti-10Ta-10Nb 합금들을 직경 3 mm, 높이 10 mm의 원통형으로 각각 1개씩 제작하고 사포 #100을 사용하여 각 임플랜트의 표면을 거칠게 형성하였다.

실험 동물로는 생후 5개월 이상 지나고 체중 3 kg 정도의 건강한 가토 3마리를 선택하여 임플랜트 매식 수술을 하기 전에 약 2주 동안 동일한 조건 하에서 사육한 후 실험에 사용하였다.

2. 실험방법

1) 실험군의 분류

세포독성 검사를 위한 실험군은 다음과 같이 5군으로 분류하였다. 즉, 신선한 배양액을 사용한 것을 대조군, 순수 Ti의 추출액을 사용한 것을 순수 Ti군, Ti-6Al-4V 합금의 추출액을 사용한 것을 Ti-6Al-4V군, Ti-10Ta-10Nb 합금의 추출액을 사용한 것을 Ti-10Ta-10Nb군, 그리고 Ti-8Ta-3Nb 합금의 추출액을 사용한 것을 Ti-8Ta-3Nb군으로 분류하였다.

조직학적 검사를 위한 실험군은 다음과 같이 3군으로 분류하였다. 즉, 순수 Ti 시편을 매식한 것을 순수 Ti군, Ti-6Al-4V 합금 시편을 매식한 것을 Ti-6Al-

4V군, 그리고 Ti-10Ta-10Nb 합금 시편을 매식한 것을 Ti-10Ta-10Nb군으로 분류하였다.

2) 세포 독성 검사(cytotoxicity test)

(1) 임플랜트 추출액(extract)의 준비

순수 Ti군, Ti-6Al-4V군, Ti-10Ta-10Nb군 및 Ti-8Ta-3Nb군에서 각 군당 4개씩의 시편들을 무혈 청 배지에 담궈 37°C 배양기에서 30일과 90일째에 각각 시편추출액을 채취하여 보관하였다. 이 추출액들에 대해 희석법에 의한 세포독성검사(indirect method)을 시행하였다.

(2) 세포배양(cell culture)

가. L929 섬유아세포(fibroblast) 배양

각 군의 시편들에 대한 세포 독성을 검사하기 위하여 L929 섬유아세포를 이용하였다. 세포는 10% fetal bovine serum을 포함하는 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM)에 37°C, 5% CO₂ 환경 하에서 배양하였고 세포들이 80% 정도 유착(confluent)된 상태가 되면 이를 trypsinization하여 세포 수를 측정하였다. 96-well plate에서 각 군당 4개씩의 well에 2 × 10⁴ cell을 분주하고 각 시편추출 희석액을 100 μl씩 첨가하였다. 이와 같이 추출액에 노출한 세포를 48시간동안 37°C, 5% CO₂ 환경에서 배양하였다. 대조군에서는 신선한 배양액에 노출된 L929 세포를 이용하였다.

나. 간엽줄기세포(mesenchymal stem cells : MSCs) 배양

체중 2~3 kg 정도의 가토에서 대퇴골을 천공하고 7 ml의 골수를 채취하였다. 채취된 골수에 Percoll Density Gradient를 이용하여 단핵구의 세포만을 분리 배양하였다. 5일 동안 배양한 후 상층액을 제거함으로써 부유하는 진존물과 조혈모세포군을 제거하고 배양 플라스크 바닥에 부착된 간엽줄기세포만을 선택적으로 배양하였다. 배양액은 10% fetal bovine serum을 포함한 DMEM을 이용하여 상기와 동일한 환경에서 배양하였다.

(3) 세포의 형태학적 변화

시편 추출액 대신 DMEM을 처리한 대조군과 30일

제 각 군의 시편 추출액에 48시간 동안 노출된 L929 섬유아세포(fibroblast)들에 대해 위상차 현미경(Olympus IMT-2-12, Japan)을 이용하여 세포의 형태학적 변화를 관찰하였다.

(4) MTT(Thiazolyl blue tetrazolium) Assay

MTT assay는 미토콘드리아 내막(inner membrane)의 succinate dehydrogenase의 활성도를 측정함으로써 생존 세포의 선택적인 활성에 대해 보랏빛의 침전형성을 통해 분석하는 방법으로서 세포 생존율을 측정하여 시편의 독성을 검사하는 방법이다. 각 군에서 시편 추출액을 1/2로 희석한 배지에 48시간 동안 배양된 세포에 MTT 용액으로 처리하고 4시간 동안 37°C, 5% CO₂ 환경에서 배양하였다. 이 과정에서 빛을 차단하여 MTT 처리효과를 최대화하였고 배양 후 세포배양 상층액을 제거하여 DMSO를 첨가한 후 glycine buffer를 첨가하여 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 비교 분석하였다.

3) 조직학적 검사

(1) 임플랜트 매식

임플랜트 매식을 위해 가토들을 Xylazine/Ketamine 1:10 혼합액을 근육주사 하여 전신마취하였다. 각 동물에서 우측 대퇴골 부위를 베타딘 용액으로 소독하고 대퇴골(femur)의 근위부와 원위부에 약 3 cm의 피부절개를 각각 가한 후 대퇴골을 노출하고 생리식염수 점적하에 직경 3 mm의 임플랜트 드릴을 이용하여 근위부에 1개의 시편 수용부와 원위부에 2개의 시편 수용부를 형성한 다음 각 군당 1개씩의 시편을 매식하여 각 동물에서 총 3개의 시편을 매식하였다. 창상을 3-0 비흡수성봉합사를 이용하여 총별 봉합하였다. 수술 부위의 감염 예방을 위해 술 후 3일 동안 항생제(Peracillin®, 삼성제약, 한국)를 근육주사하였다.

(2) 실험동물의 방사선적 검사

수술 직후와 술 후 2, 4, 8, 12주째에 임플랜트가 매식된 우측 대퇴골에 대한 방사선 사진을 촬영하였다.

(3) 실험동물의 임상적 및 조직학적 검사

술 후 4, 8, 12주째에 가토 피하에 10 cc이상의 공기를 주입함으로써 각각 1마리씩의 실험동물을 희생한 후 임플랜트 시편의 노출, 감염 등의 이상 소견에 대한 임상적 검사를 시행한 다음 조직학적 검사를 위해 임플랜트 시편이 매식된 우측 대퇴골에 절개를 가하여 골막하 박리하고 대퇴골을 노출하였다. 노출된 대퇴골에서 매식된 임플랜트의 위치를 확인하고 각 시편에 1개의 임플랜트가 포함되도록 임플랜트와 주위 골조직을 횡절단하였다. 채취된 시편조직을 10% 중성 포르말린(neutralized buffered formalin)에 1주일간 고정하고 Villanueva stan 용액에 6일간 침적하여 염색한 후 일련의 탈수과정을 거치여 완전 탈수하였다. 각 시편을 methylmethacrylate resin에 포매한 후 경조직절단기(Discoplan-TS, DAP-V, Struers Co. Ltd., Denmark)와 경조직연마기(DAP-V, Struers Co. Ltd., Denmark)를 이용하여 각 군당 3개씩 20~30 μm 두께의 시편을 제작하여 광학현미경(Axiophot, CarlZeis)을 이용해 임플랜트와 골조직과의 계면을 관찰하였다.

(4) 주사전자현미경(scanning electron microscopy, SEM) 관찰

술 후 12주째에 희생시킨 시편들에 대한 주사전자현미경 관찰을 위하여 상기방법과 동일하게 고정 및 탈수를 시행한 다음 절단된 일부 조직 시편을 isoamyl acetate에 담근 후 임계점 건조하여 건조된 시료를 이온 코팅한 후 시료판에 부착하여 JSN-5400(JEOL, Japan) 주사전자현미경으로 관찰하였다.

III. 결 과

1. 세포의 형태학적 변화 소견

대조군에서 세포는 수축, 피사되는 변화 없이 활성화되지 않은 구형의 세포양상을 나타냈다(Fig. 1A). 순수 Ti군에서는 대조군에 비해 세포의 숫자가 약간 감소되어 있었고 일부의 세포들이 약간 활성화되어 있었으며 마름모 또는 다각형의 양상을 나타냈다(Fig. 1B). 그 외 Ti-6Al-4V군, Ti-10Ta-10Nb군 및

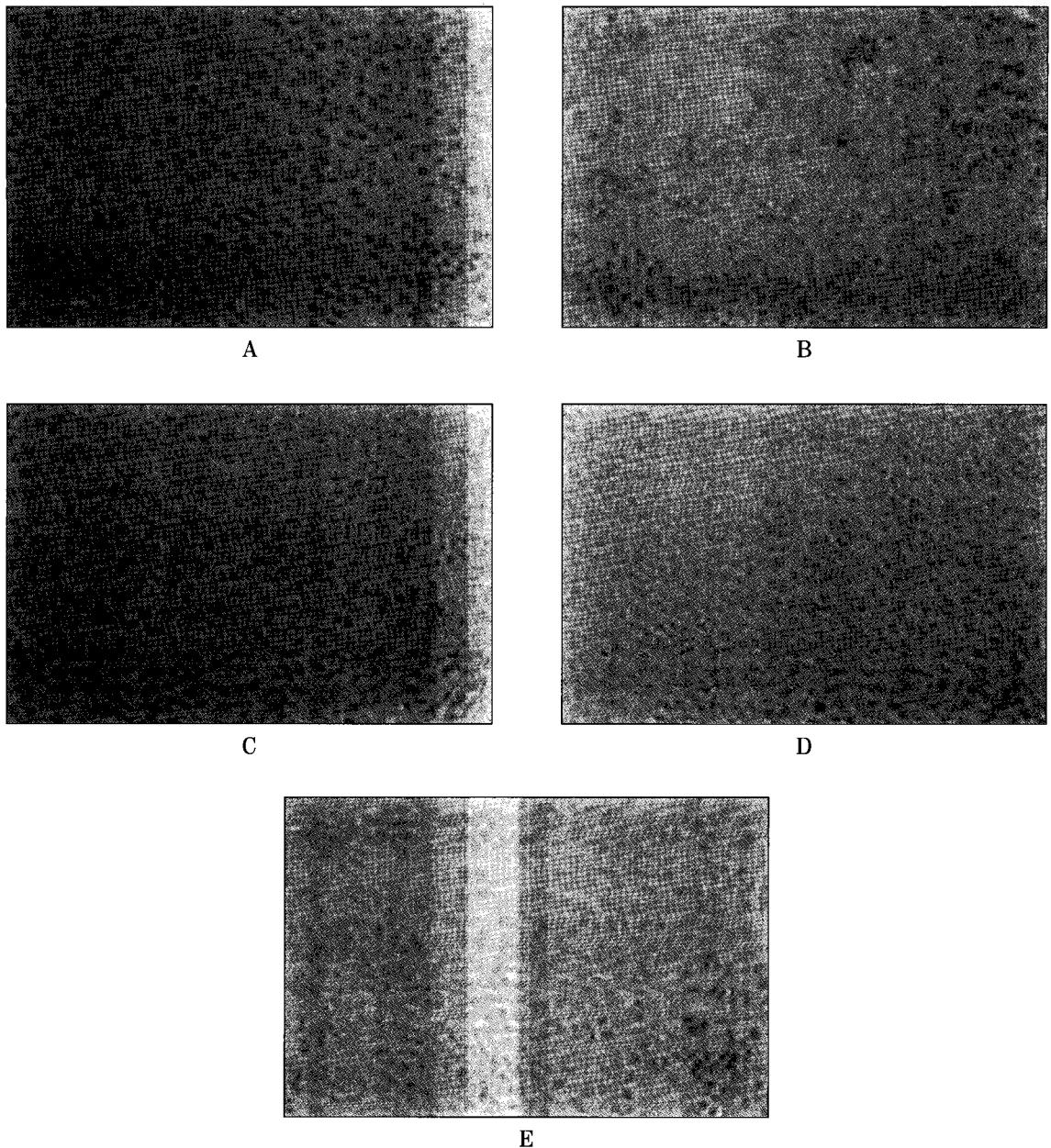


Fig. 1. Microscopic findings of L929 fibroblasts ($\times 300$).

- A : Control group showed normal round shaped cells.
B : pure Ti group showed most normal shaped cells, but there was slight decrease in number of cells and some polygonal shaped cells.
C : Ti-6Al-4VB group showed most normal shaped cells, but there was a few polygonal shaped cells.
D : Ti-10Ta-10Nb group showed most normal shaped cells, but there was a few polygonal shaped cells.
E : Ti-8Ta-3Nb group showed most normal shaped cells, but there was a few polygonal shaped cells.

Ti-8Ta-3Nb군 모두에서 일부 세포들은 약간 활성화된 다각형의 세포양상을 나타냈으나 대부분 대조군과 거의 유사한 세포형태를 나타냈다(Figs. 1C-1E). 또 Ta나 Nb의 조성에 따른 세포의 형태학적 변화는 큰 차이 없이 유사한 양상을 나타냈다.

2. 세포 독성 검사 소견

30일째 시편 추출 회석액으로 처리한 L929 cell line과 MSCs을 이용한 MTT assay 결과 모든 군에서 양호한 세포 생존율을 나타냈으며 각 군간의 차이는 거의 관찰되지 않았다.

90일 시편 추출 회석액으로 처리한 L929 섬유아세포에서는 대조군의 세포 생존율을 100%로 나타낼 경우에 순수 Ti군에서는 70.4%의 생존율을 나타냈으며 Ti-6Al-4V군에서는 56%의 생존율을, 그리고 Ti-10Ta-10Nb군과 Ti-8Ta-3Nb군에서는 각각 88%의 생존율을 나타냈다.

90일 시편 추출회석액으로 처리한 MSCs에서는 순수 Ti군의 경우 76%의 생존율을 보였고 Ti-6Al-4V군의 경우 85%의 생존율을 나타낸 반면에 Ti-10Ta-10Nb군과 Ti-8Ta-3Nb군의 경우 95%가 넘는 생존율을 나타냈다(Figs. 2, 3).

3. 방사선적 소견

시편 매식 후 2, 4, 8, 12주째에 촬영한 방사선 사진에서 모든 군에서 임플랜트 시편과 주위골 사이에

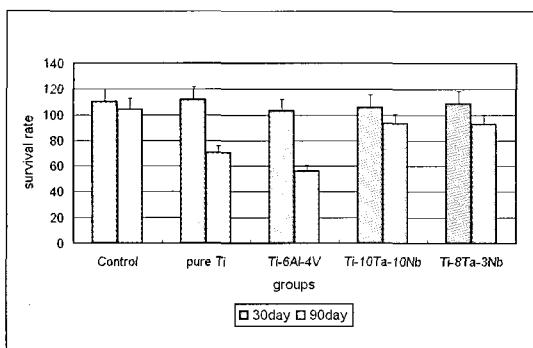


Fig. 2. Comparison of cytotoxicity using MTT assay in L929 fibroblasts.

방사선불투과성 소견이 관찰되지 않아 방사선적으로 임플랜트와 골조직 사이에 골유착이 잘 일어나고 있음을 간접적으로 관찰할 수 있었다. 방사선적 소견에서 각 군간의 차이는 볼 수 없었다(Figs. 4A-4E).

4. 육안적 소견

육안적으로 임플랜트 시편들이 매식된 부위는 12주 동안 상처의 열개나 감염 및 골절 등의 소견없이 잘 치유되어 있었다. 임플랜트 시편들이 외부로 노출되거나 특이한 염증 소견없이 골내에서 잘 치유된 소견을 보였다.

5. 조직학적 소견

임플랜트 매식 후 4주, 8주, 12주째에 광학현미경을 이용하여 조직학적 검사를 실시한 결과 모든 군에서 양호한 골유착 소견을 관찰할 수 있었다. 임플랜트 시편의 표면을 따라 대부분 치밀골(compact bone)이 접촉하고 있었으며 부분적으로 골과 임플랜트 시편 사이에 골이 직접 부착되지 않은 소견을 보였다. 각 군간의 조직학적 차이는 거의 보이지 않았다. 매식후 8주째부터는 숙직골(woven bone)들이 점차 성숙된 층판골(lamellar bone)로 변화되는 양상을 나타냈으며 시편 주위의 성숙골은 주위의 해면골과 연결되어 있었다(Figs. 5-7).

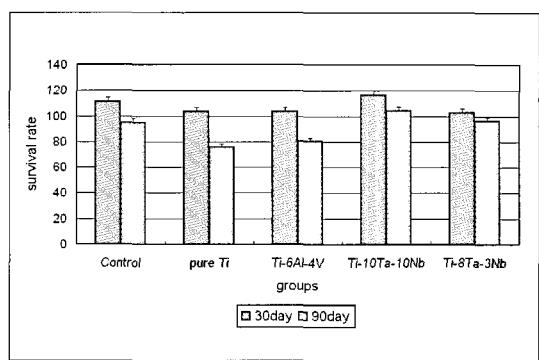
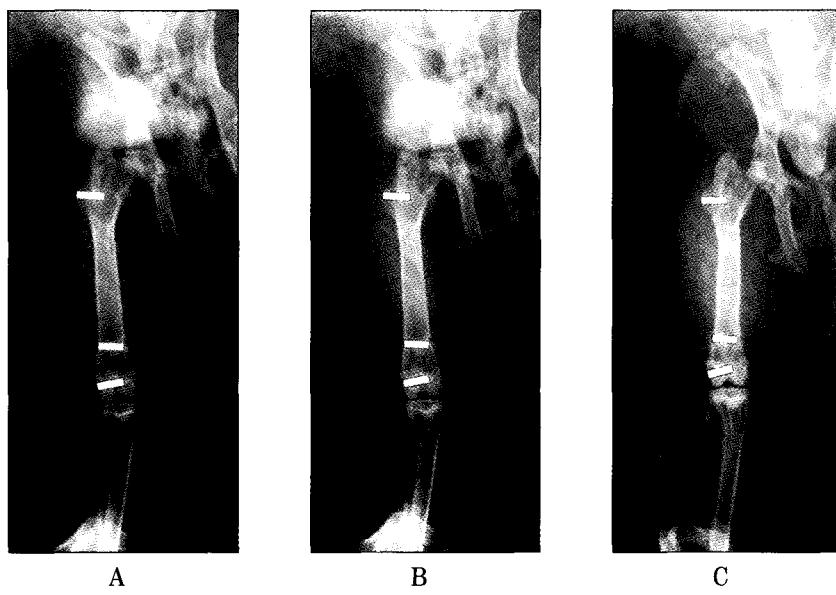


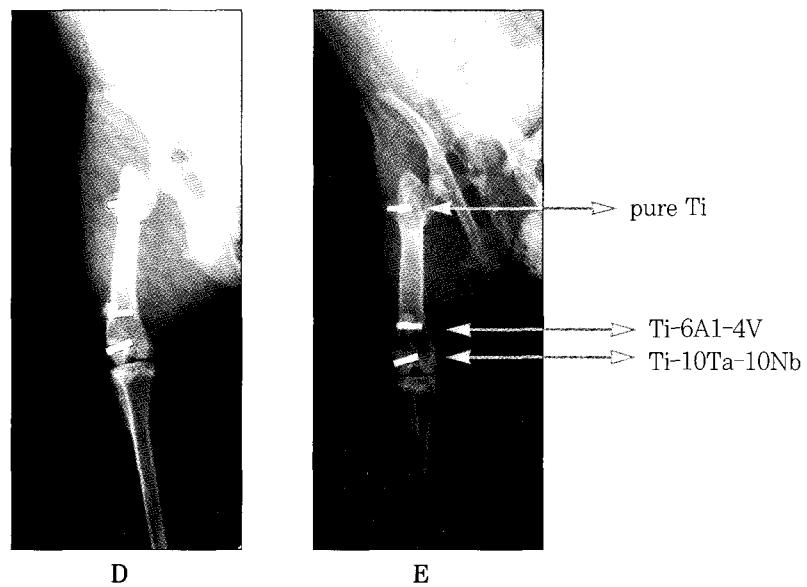
Fig. 3. Comparison of cytotoxicity using MTT assay in MSCs.



A

B

C



D

E

Fig. 4. Radiographs of the femus which the alloys were placed.

A : Radiograph was taken immediately after implantation.

B : Radiograph was taken 2 weeks after implantation.

C : Radiograph was taken 4 weeks after implantation.

D : Radiograph was taken 8 weeks after implantation.

E : Radiograph was taken 12 weeks after implantation.

6. 주사전자현미경적 소견

임플랜트 매식 후 12주째에 주사전자현미경을 이용하여 골과 임플랜트 시편 사이의 계면을 관찰한 결과 모든 군에서 양호한 골유착을 관찰할 수 있었다(Figs. 8A-8C).

IV. 고 찰

최근 치과 임플랜트가 임상에서 많이 사용되고 있으나 성공률을 더욱 높이기 위한 노력들이 시도되고 있다. 특히 임플랜트 재질의 특성과 생체적합성을 향상시키기 위한 연구들이 활발히 진행되고 있다. 순수 Ti은 우수한 부식저항성과 생체적합성을 가진 안정된 금속으로 평가되지만 치과 임플랜트 재료로 사용하기에는 더 높은 기계적 성질이 요구되고 있다.¹¹⁾ 임플랜트 재료로서 우수한 생체적합성과 골유착성을 보이는 Ti계 합금이 현재 많이 사용되고 있으며 그중 Ti-6Al-4V 합금이 강도가 높고 내식성이 우수하여 가장 널리 사용되고 있다. 그러나 근래에 들어 이 합금의 구성 성분인 Al과 V의 생체 안정성에 대한 문제가 제기되고 있어 새로운 합금에 대한 연구가 필요한 실정이다.¹⁵⁻¹⁷⁾ 최근에 Ti-Ta-Nb 합금 소재가 Ti-6Al-4V 합금처럼 우수한 기계적 성질과 순수 Ti과 유사한 내식성을 갖추고 있는 것으로 연구결과 나타났으나 이 합금에 대한 세포 독성 검사 등을 포함한 생체 안정성에 대한 연구가 미진한 상태이다. 본 연구는 우수한 기계적 성질과 내식성을 가진 Ti-Ta-Nb 합금에 대한 세포독성과 생체적합성 및 골유착 등을 검사하기 위해 시행하였다.

세포독성 검사는 생체 안정성 검사 방법 중에서 초기 검사법에 속하는 방법으로서 직접 접촉법, 간접 접촉법, 추출물 희석법이 있으며 이들 방법들은 모두가 재료와 세포간에 최대한의 접촉을 허용하기 때문에 그 감수성에 있어서 놀라울 정도로 크게 나타나며 방법에 따른 결과는 큰 차이가 없다.¹⁹⁾ 특히 추출물 희석법은 재료로부터 유리되어 나온 물질의 농도에 따른 세포독성을 확인할 수 있는 장점이 있고 screening test로서 유용한 방법이므로¹⁹⁾ 본 연구에서 추출물 희석법을 사용하였다.

세포독성 실험에 어떤 특정 세포를 사용해야 한다

는 제한은 없으며 NCTC(인간 피부상피세포), BHK-21(햄스터 신장세포), 3T3(생쥐 섬유아세포) 등의 세포를 이용한 임플랜트 재질에 대한 독성평가에 대한 연구가 많이 보고되고 있다.^{20,22)} ISO(international Organization Standardization)에서는 생체 재료가 사용되는 부위에 따라 다른 세포주를 사용할 것을 권장하고 있다.²³⁾ 본 연구에서 임플랜트의 재료에 대한 세포 독성을 통한 유해성을 검사하기 위해 표준화된 L929(섬유아세포주)와 초기 배양 세포인 MSCs(간엽줄기세포)을 사용하여 임플랜트 시편 재질에 따른 세포형태 변화 및 세포생존율을 관찰하였다. 지금까지의 세포 독성 실험에서 L929는 생체 재료의 독성을 검사할 때 많이 사용된 세포이나 MSCs는 거의 사용되지 않고 있다. 본 연구에서 생체재료가 골에 매식되기 때문에 골을 이루고 있는 골세포에 대한 영향이 중요하다고 사료되며 MSCs가 골세포로 분화되는 세포이기 때문에 임플랜트의 독성에 민감한 영향을 받을 것으로 생각하여 MSCs을 이용한 세포 독성 검사를 시행하였다. 같은 개체에서 나온 MSCs를 이용한 독성 검사를 할 경우 같은 조건이기 때문에 다른 생체 재료간의 비교에 좋은 방법이라고 생각되나 세포주로 확립된 것이 아니므로 다른 결과들과의 비교가 어려운 면이 단점이라고 생각된다.

본 연구에서 시편 추출액(extract)을 1/2배 희석하여 세포에 첨가한 경우의 MTT assay 결과 30일째에 시편추출 희석액으로 처리한 모든 군에서 대조군에 비해 L929 cell line과 MSCs에서 특별한 세포독성이 관찰되지 않았다. 반면에, 90일째에 시편추출 희석액으로 처리한 군들에서는 L929 cell line에서 Ti-Ta-Nb 군들은 모두 88%의 가장 양호한 생존율을 보였고, 순수 Ti군은 70.4%의 생존율을, Ti-6Al-4V 군은 56% 생존율을 보였다. 또 MSCs에서도 Ti-Ta-Nb군들은 모두 95%의 가장 양호한 생존율을 보였고, 순수 Ti군은 76%의 생존율을, Ti-6Al-4V군은 85%의 생존율을 보였다. 이 등²⁴⁾은 L929 Cell을 이용한 Ti 합금의 장기간의 세포 독성 연구에서 세포들이 Ti합금 주위로 집중되어 증식되는 것을 관찰하고 Ti계 재료가 장기간의 배양시에도 세포에 대한 독성이 낮다고 하였다. 본 연구에서 Ti-Ta-Nb계 합금이 기존에 사용되고 있는 Ti계 합금 보다 양호한 세포

안정성을 보였다. Ti-Ta-Nb계 합금의 구성 성분에 따른 차이는 없었다. 세포 독성 검사 결과로 볼 때 Ti-Ta-Nb계 합금이 기존의 Ti계 재료보다 더 생체 안정성이 좋은 재료라고 생각된다.

Castlemane 등²⁵⁾은 개를 이용한 동물실험에서 Ti계 합금들이 인접 주위조직반응과 골유착 등을 검사한 결과 Ti계 합금들이 생체재료로서 유용하게 이용될 수 있다고 하였다. Davidson 등²⁶⁾은 세포 독성이 있는 Al, V등 대신에 Nb, Zr등을 이용할 경우에 인접 골조직과의 생체적합성을 향상시킬 수 있다고 하였다. 본 연구에서 조직학적 검사 결과 Ti-Ta-Nb계 합금도 순수 Ti과 Ti-6Al-4V 합금과 유사하게 동물 조직내에서 부식성도 없었고 이물반응을 나타내지 않았으며 유사한 골유착 소견을 나타냈다.

본 연구에서 우수한 기계적 성질과 내식성을 가진 Ti-Ta-Nb 합금에 대한 세포독성과 생체적합성 및 골유착 등을 검사한 결과 임상에서 많이 사용하고 있는 Ti-6Al-4V 합금과 유사한 골유착 효과와 보다 양호한 생체 안정성을 확인할 수 있었다. 본 연구에서 세포독성 검사를 생체 외에서 실시한 것이므로 실제 임상에서 환자 구강내에서 사용했을 경우의 생물학적 반응과 반드시 일치한다고 볼 수 없다. 그러므로 향후 이 합금이 구강내 조직 혹은 인체 전반에 미치는 영향과 세포독성과의 상관 관계에 관한 연구가 진행되어야 한다고 생각된다.

임플랜트의 임상적 성공 기준은 고정체의 동요가 없고, 방사선상 임플랜트 주위에 방사선 투과성이 없어야하며 변연골 흡수가 이식 1년 후부터는 0.2 mm이하이며 지속적인 통증이나 염증이 없고 보철 시 만족스러운 결과를 가져야 하며 5년 간 85% 성공율을 가져야 한다는 것이다.²⁷⁾ 본 연구에서 우수한 생체 안정성을 가진 것으로 Ti-Ta-Nb계 합금이 임상에서 임플랜트 재료로서 성공적으로 사용되기 위해서는 실제 환자에 매식한 후 장기간에 걸친 추적 조사가 필요할 것이라 사료된다.

V. 결 론

본 연구는 임플랜트 재료로서 많이 사용되는 Ti-6Al-4V 합금의 세포 독성 등의 문제점을 해결하기 위해 이 합금과 유사한 기계적 성질과 내식성을 가

진 새로운 Ti 합금으로서 개발된 Ti-Ta-Nb 합금의 세포독성과 생체적합성 및 골유착을 조사하기 위하여 시행되었다. 본 연구에서 Ti 합금의 세포독성을 검사하기 위하여 L929 섬유아세포와 가토의 간엽줄기세포에 대한 세포 독성을 검사하고 Ti 합금 시편들을 가토의 대퇴골에 매식한 후 골유착을 관찰하여 다음과 같은 결과들을 얻었다.

1. 모든 군에서 세포의 형태는 수축 또는 괴사 등의 이상변화 없이 대조군과 유사한 정상적인 형태를 보였다.
2. MTT assay의 결과에서 30일 시편 추출 희석액으로 처리한 L929 cell line 및 MSCs에서는 모든 군에서 양호한 세포생존율을 나타냈다. 90일 시편 추출 희석액으로 처리한 L929 cell line에서 Ti-Ta-Nb 군들이 모두 88%의 가장 양호한 생존율을 보였고, 순수 Ti군은 70.4%의 생존율을, Ti-6Al-4V군은 56% 생존율을 보였다. 또 MSCs에서는 Ti-Ta-Nb군들이 모두 95%의 가장 양호한 생존율을 보였고, 순수 Ti군은 76%의 생존율을, Ti-6Al-4V군은 85%의 생존율을 보였다.
3. 조직학적 검사 결과 모든 군에서 유사한 골유착 소견을 나타냈다.

이상의 결과에서 현재 생체재료로 많이 이용되고 있는 Ti-6Al-4V 합금에 비해 Ti-Ta-Nb 합금이 장기적인 세포 독성이 적고 생체적합성이 높음을 시사한다.

참고문헌

1. Branemark PI. Osseointegration and its experimental background. J Prosthet Dent 1983;50:399-410.
2. Albrektsson T. Osseointegrated titanium implants. Acta Orthop Scand 1981;52:155-170.
3. Adell R, Lekholm U, Branemark PI. A 15 year of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Int J Oral Surg 1981;10:387-416.
4. Albrektsson T, Dahl E, Enbom L. Osseointegrated oral implants: A Swedish

- multicenter study of 8139 consecutively inserted Nobelpharma implants. *J Periodontol* 1988;59:289-296.
5. Gross DM. Biocompatibility The interaction of biomaterials and host response. *J Dent Educ* 1988;52:798-803.
 6. Kasemo B. Biocompatibility of titanium implants: Surface science aspects. *J Prosthet Dent* 1983;49:832-837.
 7. Ducheyne P. Titanium and calcium phosphate ceramic dental implants, surfaces, coatings and interfaces. *J Oral implantol* 1988;14:325-340.
 8. Rahal MD, Branemark P-I. Response of bone marrow to titanium implants: Osseointegration and the establishment of a bone marrow-titanium interface in mice. *Int J Oral Maxillofac implants* 1993;8:573-579.
 9. Santavirta S, Garistina A, Konttinen VT. Cemented versus cementless hip arthroplasty: A review of prosthetic biocompatibility. *Acta Orthop Scand* 1992;63:225-232.
 10. Piattelli A, Trisi P, Emanuelli M. Bone reactions to hydroxyapatite-coated dental implants in humans: Histologic study using SEM, light microscopy and laser scanning microscropy. *Int J Oral Maxilofac implants* 1993;8:69-74.
 11. Qingzhi WU, Zuochen LI. The Effect of Adding Elements on Corrosion Resistance of Ti-Ta Alloy. *Titanium 95 science and technology* 1995;3:2061-2067.
 12. Deporter DA, Watson PA, Pilliar RM, et al. Ahistological assessment of the initial healing response adjacent to porous-surfaced, titanium alloy dental implants in dogs. *J Den Res* 1986;65(8):1064-1070.
 13. Petrunko AN, Anokhin VM. Titanium in Medicine, Food Industry and Ecology. *Titanium 95 science and technology* 1995; 2:1816-1767.
 14. Bordji K, Jouzeau JY, et al. Cytocompatibility of Ti-6Al-4V and Ti-5Al-2.5Fe alloys according to three surface treatments, using human fibroblasts and osteoblasts. *Biomaterials* 1996;17(9):929-940.
 15. Farrar G et al. Defective gallium-transferrin binding in Alzheimer disease and Down syndrome: possible mechanism for accumulation of aluminium in brain. *Lancet* 1990; 335:747-750.
 16. Landsberg JP, McDonald B, Watt F. Absence of aluminium in neuritic plaque cores in Alzheimers disease. *Nature* 1992;360:65-68.
 17. Ahmed T, Long M, Silvestri J. A New Low Modulus, Biocompatible Titanium Alloy. *Titanium 95 science and technology* 1995; 2:1760-1767.
 18. ITO Y, ITO A, et al. New Titanium Alloys for Medical Implants. *Titanium 95 science and technology* 1995;2:1776-2065.
 19. Shayne CG. Safety evaluation of medical devices. now York : Marcel Dekker, 1997.
 20. Helgeland K, Leirskar J . Silicate cement in a cell culture system. *Scand J Dent Res* 1973;81(3):251-259.
 21. Tyras MJ. A method for the in vitro toxicity testing of dental restorative materials. *J Dent Res* 1977;56:1285.
 22. Hanks CT, Anderson M, Craig RG. Cytotoxic effects of dental cements on two cell culture system. *J Oral Pathol* 1981;10:101-102.
 23. ISO 10993-5, 1997 : Biological evaluation of medical devices part 5 : Tests for cytotoxicity : in vitro methods.
 24. Lee HJ, Lee SC, Huh WS, et al. A study on mechanical properties and cytotoxicity of the new titanium alloys for implant material. *Korean Academy of implant Dentalstry* 1999;18(1):10-22.
 25. Castleman LG, Motzkin SM, et al. Biocompatibility of ni-tinal alloy as an implant

- material. J Bio-med Mat Res 1988;10:695-97.
26. Davidson JA, Mishra AK, Kovacs P. New surface-hardened, low-modules, corrosion-resistant Ti-13Zr-13Nb alloy for total hip arthroplasty. Biomed Eng 1994;114:231-243.
27. Smith DE, Zarb GA. Critiera for success of osseointegrated endosseous implants. J Prosthet Dent 1989;62:567-577.

Reprint request to:

Mong-Sook Vang, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

Department of Prosthodontics, College of Dentistry, Chonnam National University
5, Hak-Dong, Dong-Gu, Gwangju, 501-757, Korea
msvang@hanmail.net

사진부도 설명

Fig. 5. Photomicrographs of control group.

A. The specimen is taken 4 weeks after implantation. Some new bone is attached to the implant surface in the marrow space (original magnification, $\times 100$). B. The specimen is taken 8 weeks after implantation. More mature new bone is attached to the implant surface in the marrow space. Some fibrous tissue is also attached to the implant surface (original magnification, $\times 100$). C. The specimen is taken 12 weeks after implantation. Mature new bone is attached to the implant surface in the marrow space (original magnification, $\times 100$). D. The specimen is taken 12 weeks after implantation. Mature new bone surrounds the implant surface in the marrow space (original magnification, $\times 40$).

Fig. 6. Photomicrographs of Ti-6Al-4V group.

A. The specimen is taken 4 weeks after implantation. Immature new bone is attached to the implant surface (original magnification, $\times 100$). B. The specimen is taken 8 weeks after implantation. More mature new bone is attached to the implant surface (original magnification, $\times 100$). C. The specimen is taken 12 weeks after implantation. Mature new bone is attached to the implant surface in the marrow space. The new bone is connected with bone trabecule (original magnification, $\times 100$). D. The specimen is taken 12 weeks after implantation. Mature compact bone surrounds the implant surface in the marrow space (original magnification, $\times 40$).

Fig. 7. Photomicrographs of Ti-Ta-Nb group.

A. The specimen is taken 4 weeks after implantation. New bone is attached to the implant surface (original magnification, $\times 100$). B. The specimen is taken 8 weeks after implantation. More mature new bone is attached to the implant surface (original magnification, $\times 100$). C. The specimen is taken 12 weeks after implantation. Mature new bone is attached to the implant surface in the marrow space. The new bone is connected with bone trabecule (original magnification, $\times 100$). D. The specimen is taken 12 weeks after implantation. Mature compact bone surrounds the implant surface (original magnification, $\times 40$).

Fig. 8. Photomicrographs of SEM findings. of pure Ti(A) group, Ti-6Al-4V(B) group and Ti-10Ta-10Nb(C) group shows good bone implants contact all groups (original magnification, $\times 1000$, $\times 3500$, $\times 3000$).

A : pure Ti group 12weeks (original magnification, $\times 1000$).

B : Ti-6Al-4V group 12weeks (original magnification, $\times 3500$).

C : Ti-10Ta-10Nb group 12weeks (original magnification, $\times 3000$).

사진부도 ①

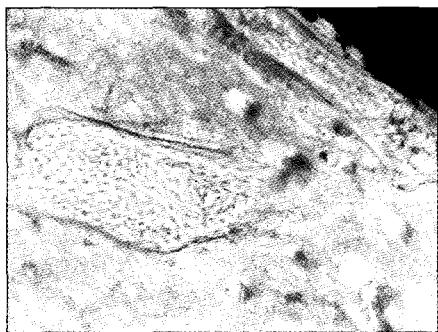


Fig. 5A

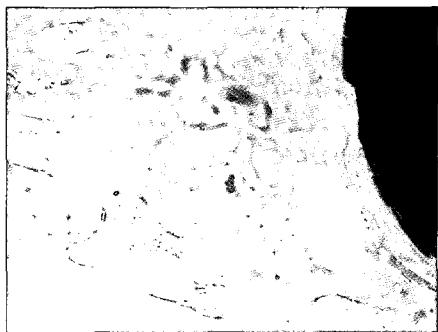


Fig. 5B



Fig. 5C

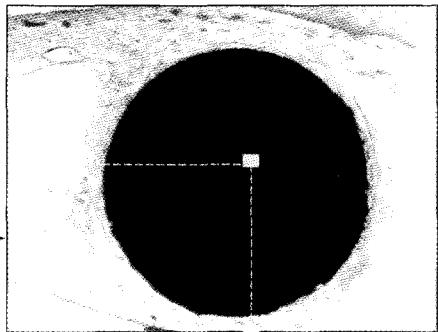


Fig. 5D

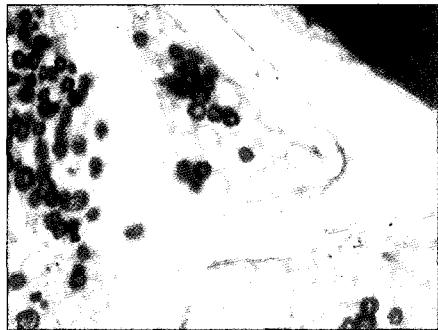


Fig. 6A



Fig. 6B

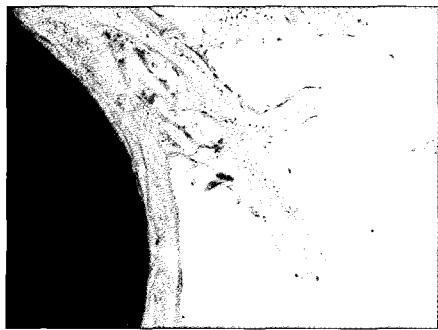


Fig. 6C

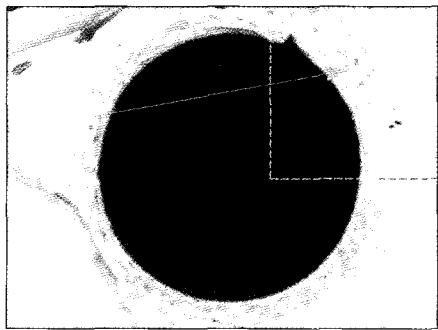


Fig. 6D

사진부도 ②

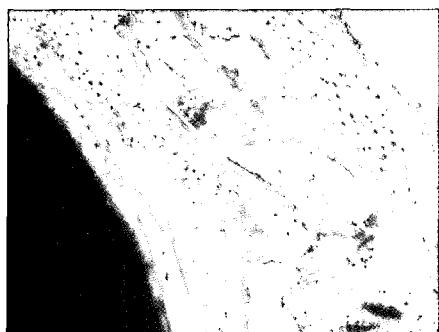


Fig. 7A



Fig. 7B



Fig. 7C

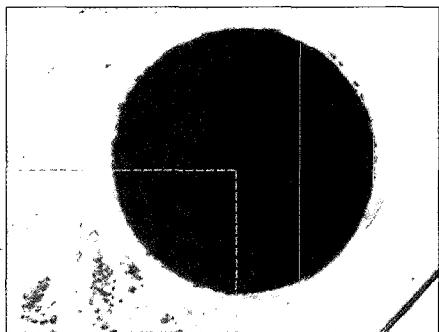


Fig. 7D

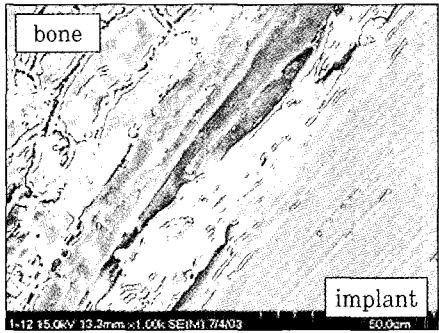


Fig. 8A

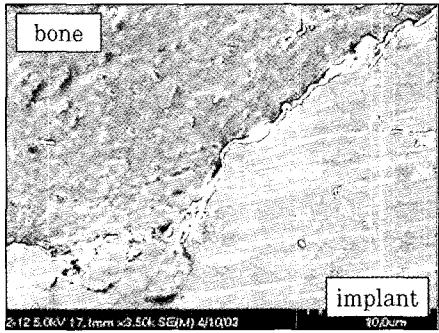


Fig. 8B

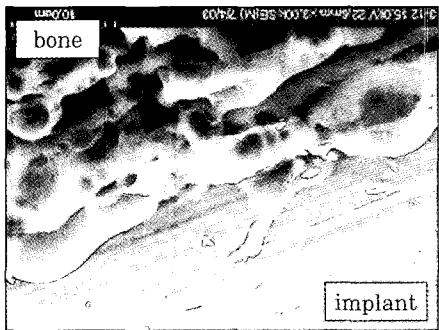


Fig. 8C

ABSTRACT

THE EVALUATION OF CYTOTOXICITY AND BIOMATERIALS OF Ti-Ta-Nb-BASE ALLOY

De-Zhe Cui, D.D.S., M.S.D., Mong-Sook Vang, D.D.S., M.S.D., Ph.D.,
Taek-Rin Yoon, D.M.D., Ph.D.*

Department of Prosthodontics, College of Dentistry, Chonnam National University

**Department of Orthopedics, College of Medicine, Chonnam National University*

Statement of problem: Ti-alloy has been used widely since it was produced in the United States in 1947 because it has high biocompatibility and anticorrosive characteristics.

Purpose: The pure titanium, however, was used limitedly due to insufficient mechanical characteristics and difficult manufacturing process. Our previous study was focused on the development of a new titanium alloy. In the previous study we found that the Ti-Ta-Nb alloy had better mechanical characteristics and similar anticorrosive characteristics to Ti-6Al-4V.

Material and methods: In this study, the cytotoxicity of the Ti-Ta-Nb alloy was evaluated by MTT assay using MSCs(Mesenchimal stem cells) and L929 cells(fibroblast cell line). The biocompatibility of the Ti-Ta-Nb alloy was performed by inserting the alloy into the femur of the rabbits and observing the radiological and histological changes surrounding the alloy implant.

Results:

1. In the cytotoxicity test using MSCs, the 60% survival rate was observed in pure titanium, 84% in Ti-6Al-4V alloy, and 95% in Ti-10Ta-10Nb alloy.
2. In the animal study, the serial follow-up of the radiographs showed no separation or migration revealing gradual bone ingrowth surrounding the implants. Similar radiographic results were obtained among three implant groups: pure titanium, Ti-6Al-4V alloy and Ti-10Ta-10Nb alloy.
3. In the histologic examination of the bone block containing the implants. the bone ingrowth was prominent around the implants with the lapse of time. There was no signs of any tissue rejection, degeneration, or inflammation. Active bone ingrowth was observed around the implants. In the comparison of the three groups, the rate of bone ingrowth was better in the Ti-10Ta-10Nb alloy group than those in pure titanium group or Ti-6Al-4V alloy group. In conclusion, Ti-10Ta-10Nb alloy revealed better biocompatibility in survival rate of the cells and bone ingrowth around the implants. Therefore we believe a newly developed Ti-10Ta-10Nb alloy can replace currently used Ti-6Al-4V alloy to increase biocompatibility and to decrease side effects.

Conclusion: In conclusion, Ti-10Ta-10Nb alloy revealed better biocompatibility in survival rate of the cells and bone ingrowth around the implants. Therefore we believe a newly developed Ti-10Ta-10Nb alloy can replace currently used Ti-6Al-4V alloy to increase biocompatibility and to decrease side effects.

Key words : Ti-Ta-Nb-base Alloy, Biocompatibility, Cytotoxicity, Evaluation