

열산화 처리된 Ti-Ag 합금의 세포적합성

연세대학교 치과대학 보철과학교실*
연세대학교 치과대학 치과생체재료공학교실/연구소**
(주)바이오머테리얼즈코리아***

김호중* · 오근택** · 이지현*** · 김경남* · 한동후*

I. 서 론

골내 임플란트 시스템에서 임플란트 고정체와 골 사이의 생체적 결합, 즉 골유착(osseointegration)은 매우 중요한 개념이다. 치과용 임플란트로 주로 사용되고 있는 Ti에 생성되는 표면 산화물 TiO_2 는 골유착에 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있으며 1960년대 Brånemark의 골유착(osseointegration) 개념 도입을 계기로 현재 대부분 치과용 임플란트 재료에 적용되고 있다.¹⁾ 골유착은 임플란트 표면의 미세 형상과 임플란트 고정체의 거시적 형태에 의하여 절대적인 영향을 받는다. 이 표면 특성에 따라 표면 에너지가 결정되며 이것이 골아세포 증식을 촉진하기 때문에 골접합성 향상을 위하여 형상 및 표면 처리에 많은 개선이 이루어져 오고 있다.

표면처리를 통하여 표면특성을 향상하기 위해서는 임플란트와 그 주위 연조직과의 밀폐(soft tissue seal)와 접합 문제, cp-Ti 자체가 지닌 낮은 기계적 특성 문제, 표면처리에 따른 임플란트 물성 저하, Ti6Al4V 합금의 독성 문제 등이 우선적으로 해결되어야 한다. cp-Ti 또는 Ti 합금 표면을 처리한 제품은 골조직과 임플란트간의 접합 특성을 향상시키나, 반

복하중 및 지속적인 부식 환경에 노출되는 구강환경 내에서는 부식피로, 진동부식, 틈부식, 파절, 그리고 마모 저항성이 낮아지기 때문이다. 이로 인하여 임플란트 자체가 파절되거나 주변에 부식 산물이 축적되면 2차적인 외과 시술이 필요하게 된다. 따라서 매식재로서 기능을 다하기 위하여는 추가적인 수술 없이 장기간 인체 내에서 견딜 수 있는 소재 자체와 그 소재의 표면특성 개선이 반드시 필요하다. 또한 기계적 특성과 전기화학적 안정성이 확인된 후, 체액 내 이온용출 정도, 세포독성, 그리고 세포증식도가 반드시 평가되어야 하며 이것은 추후, 동물실험과 인체에 대한 직접적인 임상 실험 수행의 바탕이 되는 기본적인 정보를 제공하게 된다.

기존의 Ti와 Ti 합금이 갖는 낮은 가공성 및 주조성, 낮은 경도 및 강도, Ti6Al4V에서 Al과 V의 독성이온 용출 등의 단점을 보완하기 위하여 Ag를 첨가한 Ti-Ag 계 합금이 최근 개발되어 우수한 기계적 특성과 생체 적합성이 확인되었다. Ti-Ag 계 합금에서는 Ag 첨가량이 증가할수록 cp-Ti에 비하여, 인장 강도, 항복 강도 및 경도가 증가함이 알려져 있다.²⁾ Ag가 첨가된 Ti은 비교적 안정된 부동태 피막을 형성하여 내식성이 증가하였으며 세포 독성 실험의 결과도

* 본 연구는 2004년도 두뇌한국 21 사업 연세대학교 의과학 사업단 및 한국과학재단 MRC 프로그램(R13-2003-013)에 의하여 지원되었음.

none 또는 mild로 나타났다.²⁻⁴⁾ 다른 연구에서는 0-20 wt%까지 Ag함량을 높여도 cp-Ti에 비하여 생체 적합성이나 부식 저항성이 낮아지지 않음을 보고하였다.⁵⁾ 그러나 Ti-Ag 합금의 열산화 특성에 관한 연구는 전무한 상태이다. 이 합금이 임플란트 재료로서 사용되기 위해서는 골유착 특성이 개선되고 일련의 세포실험을 통하여 생체적합성이 평가되어야 한다.

본 연구에서는 Ti-Ag 계 합금 및 cp-Ti, Ti6Al4V 시편에 대하여 온도(untreated, 400, 600, 800℃) 및 시간(untreated, 0.5, 1, 4 hr)을 변수로 열산화(thermal oxidation)처리한 후 색도 측정, 산화물 종류 및 성분을 비교하기 위한 XPS 분석, 시편의 세포 생존률, 세포증식도 평가를 통한 세포독성 및 세포 적합성 실험 등을 행함으로써 Ti-Ag 계 합금이 임플란트 재료로 사용될 수 있는 가능성을 확인해보고자 하였다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 연구 재료

실험군인 Ti-Ag 합금 설계를 위하여 sponge Ti(순도 99.99%)과 입상 Ag(순도 99.99%)를 합금 용해를 위한 원소재료로 사용하였고, Ag 함량은 각각 2.0과 3.5 at%로 하였다. 계량한 재료를 아크로에서 30 g 씩 용해하였고 이것을 3회씩 반복하였다. 주물은 조성 균질화를 위하여 950℃의 온도를 유지하는 진공로에서 72 시간 동안 균질화 열처리하였다. 이것을 950℃에서 열간 압연하여 약 1 mm의 균일한 두께로 만들고 이 때 생성된 산화물(scale)을 산세(불산:질산:증류수의 비, 1:3:7)하여 제거하였다. 이것을 10×10 mm 크기로 절단하고 열간 압연시 발생될 수 있는 석출물 등을 제거하기 위해 다시 950℃의 진공로에서 1 시간 동안 용체화 처리(solution annealing)한 후 상온의 수중에서 냉각(quenching)하였다. 이렇게 제조된 시편을 600번 emery paper로 연마한 후 아세톤 및 에틸 알코올로 초음파 세척하였다. 대조군 시편으로 cp-Ti(Grade II, Allegheny, Pittsburgh, Pennsylvania, US)과 Ti6Al4V(ELI, RMI, Ashtabula, Ohio, US)를 사용하였다.

2. 연구 방법

상기 과정에 의해 준비된 Ti-Ag 합금 및 대조군을 대기 중 muffle furnace 안에서 400, 600, 800℃에서 각각 0.5, 1, 4 시간 동안 유지한 후 공냉함으로써 열산화처리하였다. 시편 표면의 산화정도에 따른 색의 변화를 관찰하기 위하여 광학현미경을 이용하였다. 산화물의 종류 그 구성성분을 확인하기 위하여 XPS(Φ 5700 ESCA System, Perkin-Elmer, MN, US)로 시편 피막을 정량 분석하였다. X-ray source 는 Al K α (1486.6 eV), 분석기의 투과능은 23.5 eV이었다. 분석하는 동안 기본 기압은 $1-5 \times 10^{-10}$ torr, 조사각은 45°로 하였으며 각 원소들의 결합에너지는 adventitious C1s (285 eV)를 기준으로 보정되었다. 30 초씩 ion sputtering하여 전조사 스펙트럼을 관찰한 후 오염된 탄소층이 현저히 감소된 상태에서 분석함으로써 시편 표면의 탄소 오염층이 전체 신호를 약화하는 것을 방지하였다. 모든 자료는 Savitsky와 Golay의 방법으로 smoothing 처리하였으며 Shirley background signal을 제거함으로써 저 에너지 전자에 의한 산란에 의한 기여를 없앤 후 Gaussian-Lorentzian 법으로 곡선을 구성하였다. 스펙트럼은 ± 0.1 eV의 범위 내에서 분석하였다.

세포 독성을 측정하기 위해 쥐(mouse)의 섬유아세포인 L-929세포(fibroblast connective tissue of 100-day old male mouse)를 사용하여 MTT 실험을 행하였다. 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco, NY, US)이 첨가된 RPMI(Gibco, NY, US)를 배지로 사용하여 37℃, 5% CO₂, 100% 습도를 유지하는 CO₂ 배양기 내에서 세포를 배양하였다. 시편을 10×10×1 mm로 절단한 후, 600번 사포까지 연마하여 각각 400, 600, 800℃에서 1 시간 열처리하고 에탄올과 증류수 안에서 각각 초음파 세척한 후 증류수에서 멸균 처리하여(121℃, 1 시간) 이온 용출물을 만들었다. 섬유아세포의 농도를 2.0×10^5 cell/ml로 분산하고, 각 0.18 ml씩 96-well에 분주하여 상기 CO₂ 배양기 내에서 24 시간 배양하였다. 배양 후 용출물을 well당 0.02 ml씩 분주하여 배양기에서 다시 5 시간 동안 배양하였다. 대조군에는 RPMI 배지 0.02 ml만을 분주하였다. 다시 PBS(phosphate-buffered saline)에 녹인 MTT(3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)

용액 (5.0 mg/ml) 0.05 ml을 각 well에 넣고 4 시간 동안 배양한 후 배지와 MTT 용액을 버리고, 여기에 dimethylsulfoxide 0.05 ml를 각 well에 넣고 결정이 남아 있지 않도록 잘 흔든 후 ELISA plate reader로 570 nm에서 각 시편의 흡광도(optical density)를 측정하여 세포 독성도를 대조군과 비교 평가하였다.

골아세포의 증식을 측정하기 위해 유사전구골모세포인 MC3T3-E1 (Dr. Kumegawa, Meikai Dental University, Japan)을 사용하였다. 10% FBS (fetal bovine serum)와 1% antibiotic-antimycotic (Gibco, NY, US)이 첨가된 α -MEM (alpha modified Eagle's minimum essential medium, Gibco, NY, US)을 배지로 사용하여 세포독성실험에 쓰인 것과 동일한 CO₂ 배양기 내에서 배양하였다. 시편을 10×10×1 mm로 절단한 후, 600번 사포까지 연마하여 400, 600, 800℃에서 1 시간 동안 열처리하였고, 세포 배양접시 (polystyrene petri dish)를 실험군의 시편과 동일한 크기로 잘라 만든 것을 음성 대조군으로 사용하였다. 실험군은 절단 후 각각 에탄올과 증류수로 초음파 세척하였으며, 대조군 시편은 증류수 세척하였다. 모든 시편은 시험 전 E-O gas로 소독하였다. 골아세포 증식 시험에 사용된 총 시편은 대조군 6개, 시험군 72개로, 배양 2, 4 일에 각각 3개씩의 시편과 세포를 처리하였다. 시편 위에서 세포를 배양하기 위하여 원심 분리하여 수집한 세포의 초기 농도를 1.0×10⁵ cell/ml로 분산하였다. 6-well plate 안에서, 200 μ l의 세포현탁액을, 흘러내리지 않도록 시편 표면에 떨어뜨린 다음 배양기 내에서 2 시간 배양하였다. 배양 후, 광학 현미경 (CK 2, Olympus, Japan)으로 세포 부착을 확인하고 1.8 ml의 배양액을 첨가하였다. 매 2 일마다 배지를 교환하였으며 세포 증식도를 평가하기 위해 배양 2, 4 일에 세포수를 측정하였다. 각 측정 시기에 배양액을 제거한 후 0.05% trypsin-EDTA (Gibco, NY, US)로 세포와 시편을 동시에 처리하고 hemocytometer를 이용하여 광학현미경 하에서 세포수를 측정하였다.

III. 연구 결과

1. 색 상

모든 시편에 대해서 열처리 온도에 따른 색의 변화

가 뚜렷하였고, 시편의 종류에 따라 색이 달랐다 (Fig. 1). 400℃에서 열처리된 경우는 모든 시편에서 황색 또는 금색을 보였으며 열처리 시간이 증가함에 따라 색이 진해지는 경향을 관찰 할 수 있었다. 600℃의 경우, 시편의 종류에 따라 서로 다른 색을 띠는 경향이 분명하였다. Ti6Al4V은 청색 또는 남색을 띠었고, Ti, Ti2.0Ag, Ti3.5Ag은 황색, 자주색, 청색, 녹색 등이 열개 혼합된 양상을 보였다. 800℃의 경우, Ti과 Ti-Ag 합금은 회색을 띠었고, 열처리 시간이 증가함에 따라 밝기가 감소하였다. 한편, Ti6Al4V은 이 온도에서 짙은 갈색을 띠었고, 열처리 시간이 증가함에 따라 색이 점차 짙어졌다. 산화속도가 매우 빠르거나 열처리 시간이 매우 긴 경우, 불투명한 흰색으로 변화되는 경우도 관찰되었다.

2. XPS 분석 결과

열처리를 하지 않은 경우 모든 시편의 표면에서 Ti²⁺, Ti³⁺, Ti⁴⁺가 혼재되어 존재함이 관찰되었다. 열처리 온도가 증가함에 따라 Ti²⁺는 감소하고, Ti⁴⁺는 증가하는 경향을 보였다. Ti-Ag 합금의 경우, Ti³⁺와 Ti⁴⁺의 혼재 비율이 약 25:75로 나타났으며, cp-Ti과 Ti6Al4V은 대부분 Ti⁴⁺로 존재하였다 (Table I). 산소는 O²⁻, OH, H₂O의 형태로 존재함이 관찰되었다. Ti-Ag 합금과 cp-Ti의 경우, O²⁻는 열처리 온도에 따라 증가하고, OH는 감소하는 경향을 나타내었다. 이를 Ti에 관한 스펙트럼의 결과와 종합한 결과, Ti이 산화물 형태를 이루면서 증가하는 것으로 분석되었다. Ti6Al4V은 cp-Ti과 Ti-Ag 합금에 비해 O²⁻는 감소하고 OH는 증가하였다. 또한 Ti6Al4V의 경우 H₂O가 다소 많이 존재하는 것으로 분석되었다 (Table II). Ti과 O에 관한 분석결과, Ti²⁺, Ti³⁺, Ti⁴⁺는 각각 TiO, Ti₂O₃, TiO₂ 산화물 형태로 존재하는 것으로 나타났다.

Al과 V에 관한 스펙트럼 분석은 Ti6Al4V 합금에 대해서만 행하였다. 열처리를 하지 않은 경우, Al은 metallic 상태의 Al과 Al³⁺가 혼재된 상태를 보였다. 열처리 온도에 따라 Al 분율은 증가, Ti 분율은 감소하였다. V에 관한 스펙트럼 분석결과, V³⁺, V⁴⁺, V⁵⁺ 형태로 합금 표면에 존재하였으며, 열처리 온도가 증가함에 따라서 V⁴⁺가 O와 반응한 VO₂ 산화물이 증가하는 경향을 나타냈다 (Table III). Ti-Ag 합금에

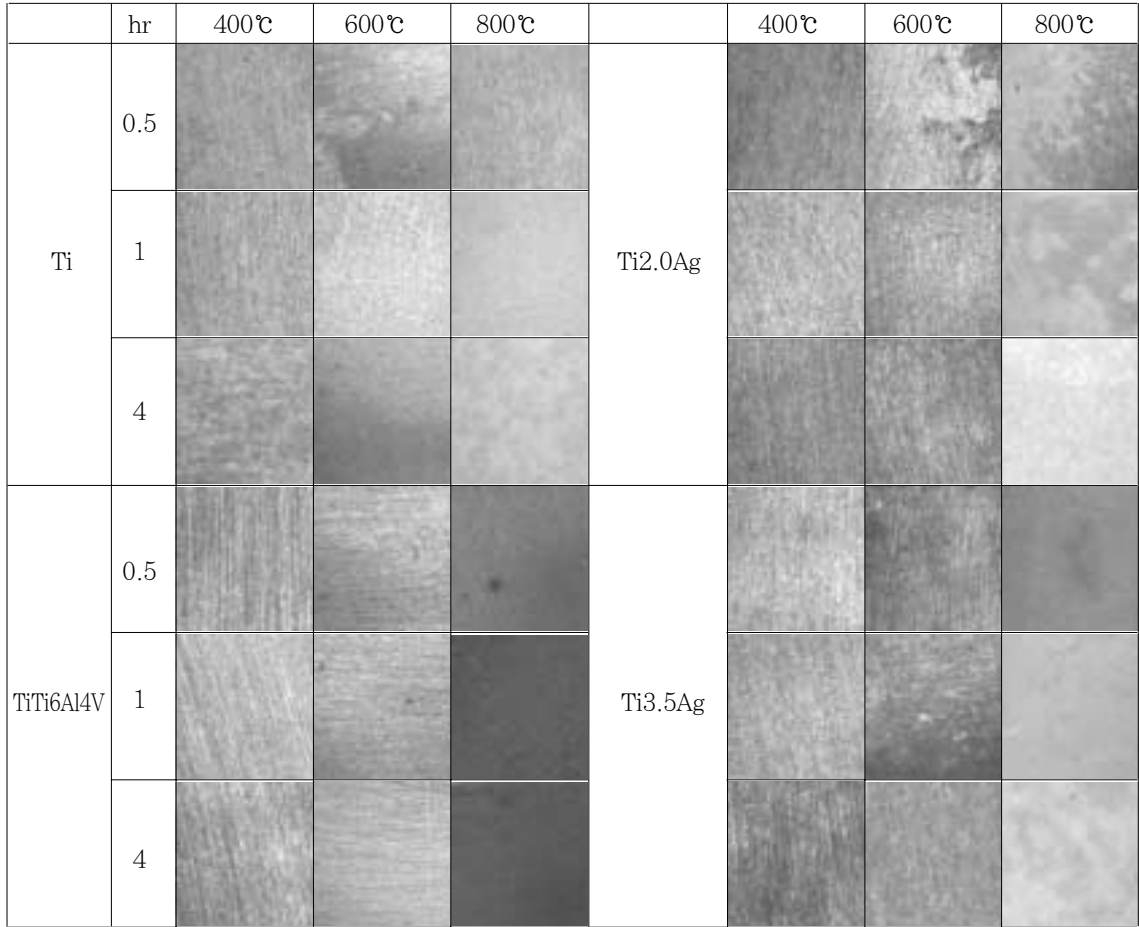


Fig. 1. Appearance of specimens observed with optical microscope.

Table I. Area fractions of chemical species obtained from Ti2p spectra of Ti alloys

		Untreated	400°C	600°C	800°C
cp-Ti	Ti ²⁺	2.72	0.00	0.01	0.01
	Ti ³⁺	6.70	1.91	0.09	0.09
	Ti ⁴⁺	90.58	98.08	99.9	99.90
Ti6Al4V	Ti ²⁺	0.01	0.02	0.02	0.02
	Ti ³⁺	1.59	0.01	0.01	0.01
	Ti ⁴⁺	98.39	99.97	99.97	99.97
Ti2.0Ag	Ti ²⁺	33.70	0.78	0.42	0.01
	Ti ³⁺	22.03	33.31	25.42	24.36
	Ti ⁴⁺	44.27	65.91	74.17	75.64
Ti3.5Ag	Ti ²⁺	36.06	0.85	0.03	0.31
	Ti ³⁺	28.31	25.36	24.12	23.60
	Ti ⁴⁺	35.63	73.79	75.85	76.09

Table II. Area fractions of chemical species obtained from O1s spectra of Ti alloys

		Untreated	400°C	600°C	800°C
cp-Ti	O ²⁻	61.93	77.15	82.56	76.90
	OH	35.62	17.53	14.73	10.34
	H ₂ O	2.46	5.33	2.72	12.76
Ti6Al4V	O ²⁻	64.51	62.35	57.71	52.03
	OH	28.52	32.12	38.68	43.20
	H ₂ O	6.97	5.54	3.61	4.77
Ti2.0Ag	O ²⁻	71.18	87.31	89.15	89.20
	OH	28.44	12.24	10.80	10.73
	H ₂ O	0.38	0.45	0.06	0.07
Ti3.5Ag	O ²⁻	75.00	85.57	86.86	88.42
	OH	24.35	14.04	12.54	11.50
	H ₂ O	0.65	0.38	0.60	0.09

Table III. Area fractions of chemical species obtained from Al2p and V2p spectra of Ti6Al4V alloys

	Untreated	400°C	600°C	800°C	
Al	39.01	0.08	0.08	0.07	
Al ³⁺	60.99	99.92	99.92	99.93	
Ti6Al4V	V ³⁺	67.87	18.02	12.95	10.25
	V ⁵⁺	0.00	50.86	7.32	9.36
	V ⁴⁺	32.13	31.11	79.73	80.39

Table IV. O/Ti and O/(Ti+Al+V) ratio

	Untreated	400°C	600°C	800°C
cp-Ti	2.24	2.44	2.17	3.06
Ti6Al4V*	1.93	2.96	1.8	1.81
Ti2.0Ag	1.92	1.79	1.78	1.92
Ti3.5Ag	1.79	1.72	1.87	1.79

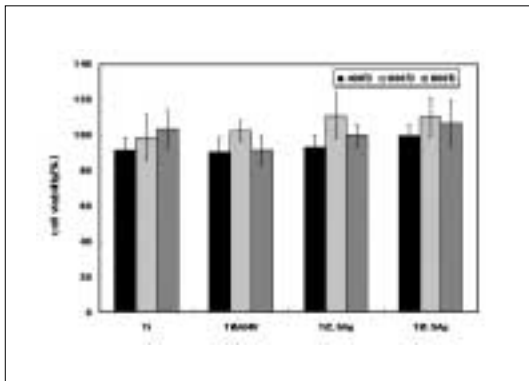


Fig. 2. Cytotoxicity of thermally oxidized specimens to L929 evaluated by the MTT test.

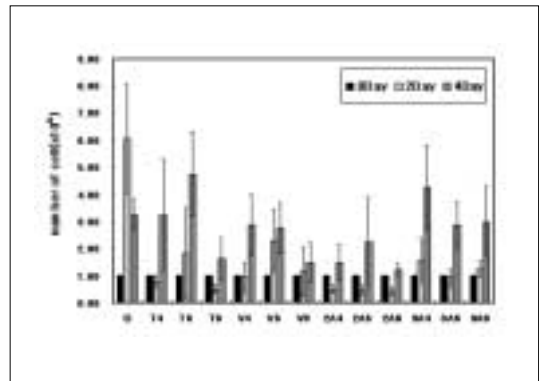


Fig. 3. Result of cell proliferation of MC3T3-E1 on the thermally oxidized specimens.

C: control, T: cp-Ti, V: Ti6Al4V, 2A: Ti2.0Ag, 3A: Ti3.5Ag, 4: 400°C, 6: 600°C, 8: 800°C

첨가된 Ag는 합금 표면에 metallic silver 형태로 존재 함이 관찰되었다. Table IV는 각 시편에 대해 survey spectrum 상에서 얻은 주요 원소 농도(atomic concentration)를 이용하여, O와 결합하는 Ti 및 (Ti+Al+V)의 원소 농도 비율을 정리한 것이다. cp-Ti은 O/Ti 비가 2.17-3.06, Ti6Al4V 합금은 O/(Ti+Al+V)의 비가 1.80- 2.96, Ti-Ag 계 합금은 O/Ti 비가 1.72-1.92를 나타내었다. Ti 산화물의 경우, TiO₂는 O/Ti비를 2, Ti₂O₃는 1.5로 표현 할 수 있으며, Ti-Ag 합금은 TiO₂와 Ti₂O₃가 혼재되어 있음을 확인할 수 있었다.

3. 섬유아세포의 세포독성도 (MTT test)

열산화된 Ti 계 합금이 섬유아세포 독성에 미치는 영향을 측정하기 위하여 섬유아세포인 L-929에 대한 세포 독성을 MTT 실험을 통하여 평가한 결과 용

출액을 첨가한 모든 실험군에서 섬유아세포의 생존률이 90%이상으로 나타났다(Fig. 2). Ti(400°C), Ti6Al4V(400°C), Ti6Al4V(800°C) 및 Ti2.0Ag(400°C)는 91~92%, Ti(600°C), Ti2.0Ag(800°C) 및 Ti3.5Ag(400°C)는 99% 가량의 세포 생존률을 보였다. Ti(800°C), Ti6Al4V(600°C), Ti2.0Ag(600°C), Ti3.5Ag(600°C) 및 Ti3.5Ag(800°C)는 100%를 다소 넘는 세포 생존률을 보였다. 본 연구에서 사용된 Ti 계 합금의 용출물은 섬유아세포의 생존에 거의 영향을 미치지 않았다.

4. 골아세포 세포증식도

시편에 세포를 접촉시켜 MC3T3-E1 세포를 배양 하면서 각각 2, 4 일에 세포수를 측정 한 결과, 대조군(polystyrene petry dish)에서는 2 일차에 세포수가 크게 증가하다 4 일차에서 감소하는 경향을 보였

고, 실험군에서는 대체적으로 시간이 경과함에 따라 세포수가 증가되는 경향을 보였다(Fig. 3). Ti(400℃), Ti(800℃), Ti_{2.0}Ag(400℃), Ti_{2.0}Ag(600℃) 및 Ti_{2.0}Ag(800℃)에서는 2일차에 세포수가 감소하다 4일차에는 다시 증가하는 경향을, 다른 실험군에서는 대체적으로 시간이 경과함에 따라 세포수가 증가하는 경향을 보였다. Ti_{3.5}Ag의 경우, 400℃에서 열처리한 시편에서 가장 많은 세포수를 보였지만 그 외 모든 합금계에서는 600℃에서 열처리 한 시편에서 가장 많은 세포수 증가를 보였다.

IV. 총괄 및 고찰

Ti 및 Ti 합금계로 제작된 임플란트는 많은 임상시험에서 우수한 생체적합성을 보여왔다.⁶⁻⁸⁾ 인체로부터 제거된 임플란트에 관한 연구를 통하여 금속의 부식과 조직 반응사이의 관계가 규명되었고, 이온 용출이 금속 산화물을 통하여 생체내로 확산하는 금속 이온의 속도와 산화물의 해리속도에 의존한다는 점에서 골의 치유 위치에서 세포의 반응에 영향을 줄 수 있다는 것이 확인되었다.⁹⁻¹¹⁾ 속도론적 이동 현상인 금속 이온 용출에는 금속의 기전력¹²⁾, 산화물의 결정과 결합 구조^{13,14)}, 산화물을 통한 금속 양이온의 이동¹⁵⁾, 산화물의 수화 속도¹⁶⁾, 산화물 표면으로부터 수화된 층으로의 용해 산물의 전이 속도^{17,18)}, 농도 경계층을 통한 용해 산물의 이동¹⁶⁾ 등이 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다. Healy와 Ducheyne은 부동태 피막 용해 속도는, 계면 율속 반응인 산화물의 수화에 의하여 지배된다고 하였다.¹⁶⁾ 그러나 Chang과 Lee는 이온 용출의 율속단계가 산화물의 수화가 아니라 금속 산화물 피막의 두께를 통한 금속 이온의 이동이 될 수 있다고 하였다.¹⁹⁾ Ti이 우수한 내식성을 보이는 것은 얇고 안정한 TiO₂ 부동태 산화물층의 존재 때문이다.²⁰⁾ Ti은 대기중에 노출되는 즉시(9~10 sec 이내) 표면에 산화물 층을 형성하여 1초 내에 2-10 nm 가량의 두께를 이룬다. 산화물에 흡착된 양쪽성 OH group과 산화물의 두께 측면에서도 금속 산화물의 nano scale 표면 특성은 재료의 생체적합성에 있어서 매우 중요하다.^{16,21,22)} 수화된 TiO₂층 표면에는 적어도 두 종류의 수산화 그룹(hydroxyl group), 즉 두배로 배위된 산소를 갖는 acidic OH와 단일 배위된 basic Ti-OH이 존재하는데 acidic

hydroxyl group은 양이온의 교환 위치로, basic hydroxyl group은 음이온의 교환위치로 각각 작용하려는 경향이 있다.^{16,23-28)} 전해질 용액 내에서 산화물 두께가 증가하는 것은 산화물 표면에 음이온이 흡착되기 때문이다. 산화물-전해질 계면을 통하여 음이온 O²⁻의 역확산이 이루어지는데 이렇게 함으로써 전기장이 형성되어 금속 양이온의 이동이 가능해진다.²⁹⁾ Healy와 Ducheyne은 H₃O⁺, Ca²⁺, OH⁻, HPO₄²⁻ 그리고 H₂PO₄⁻가 이렇게 흡착된 종들이라고 제안하였다.^{16,30)} 산화물 두께가 증가하면 형성된 전기장 크기가 작아지고 금속 양이온의 수송이 감소하며 두께 증가 속도가 감소하게 된다. 또, 산화물 두께가 증가하면 구성 원소의 해리 속도가 감소하게 된다. 동물 실험에서도 Ti의 산화물 두께가 매식 기간이 증가함에 따라 증가하지만 그 속도는 감소하는 것으로 밝혀졌다. 그러나 금속 재료의 생체 내 거동에 관한 연구에서 국부적 조직 부작용과 알려지 반응은 임플란트 금속 이온의 해리가 주원인일 가능성^{10,11,31-33)} 때문에 해리된 금속 이온의 독성에 대하여는 임플란트 매식 초기 단계에서 더욱 주의를 기울여야한다는 주장이 있었다.¹⁹⁾ 이 때, 부동태화 처리를 통하여 산화물 두께를 증가시키면 금속 이온 용출이 감소되어 Ti의 생체 적합성을 향상시킬 수 있다.

Ti6Al4V의 경우 SBF 내에서 Al이 우선 용출되는 것은 Al-Ti 갈바닉 쌍에서 알루미늄이 상대적으로 기전력(EMF)이 높아 우선 부식되기 때문이다. Ti6Al4V의 용출 거동에 대한 부동태화 방법의 효과는 Browne과 Gregson¹³⁾ 그리고 Wisbey 등¹⁴⁾에 의하여 연구되었다. 이에 의하여 anatase-rutile 간 상전이에 의하여 이온용출 속도가 크게 감소함이 확인되었으나 산화물 두께의 역할은 불확실하였다. 그러나 Chang은 다른 표면처리 방법, 즉 SBF에 16일간 침적되었을 때 Ca와 P가 흡착하는 기구에 관한 연구에서 산화물의 두께가 용출 거동에 큰 영향을 미치지 않는다고 하였다. 유리관 실험상 Ti의 생체적합성에 대한 연구에서 산화물의 두께와 탄소의 오염정도가 단백질 흡착과 contact activation에 미치는 영향은 없는 것으로 나타났다.²²⁾ Ti 임플란트의 골유착에 대한 표면 특성의 영향은 Buser 등³⁴⁾에 의하여 연구되었는데, 결론적으로 골유착 정도에 가장 큰 영향을 주는 것은 표면 형상이며 산화물의 영향에 관하여는 판단하기 힘들다고 하였다. Ti과 titania 세라믹

의 유리관 및 동물실험을 통하여 Li³⁵는 titania가 Ti과 동일한 조직 반응을 갖는다고 결론지었다. Titania 산화물 두께가 Ti의 산화층 두께에 비하여 매우 크기는 하나 각 경우 TiO₂ 층이 형성되기만 하면 생체 불활성이 확립되기 때문인 것으로 보고되었다.

각 시편이 나타내는 색은 반사광이 간접한 결과이고 따라서 결정질 표면 산화물 층의 상대적인 두께와 관련이 있을 수 있다. Ellipsometry를 이용한 Fukuzuka 등의 보고³⁶⁾에 의하면 Ti의 표면 산화물층 두께가 100 Å 이하인 경우 무색, 100-250 Å, 250-700 Å, 700-1700 Å 그리고 1700 Å을 초과한 경우 각각 황색, 청색, 청색-녹색, 그리고 흰색을 띤다고 하였다. 따라서 시편 표면의 반사를 분석하여 산화물층의 두께를 간접적으로 예측하는 것이 가능할 것이다. 본 연구의 400°C 열처리 시편은 전반적으로 황색 혹은 금색(yellow or golden yellow)을 띠었고 열처리 시간이 증가함에 따라 채도가 증가하고 명도는 감소하였다. 800°C 열처리 시편의 경우 Ti6Al4V를 제외하면 전반적으로 회색을, 600°C 시편들은 400과 800°C 사이의 전이특성을 띠고 있었다. 그러므로 400, 600, 800°C 시편군은 각각 100-250, 250-700, 1700 Å 이상 두께로 산화물을 형성한 것으로 판단된다. 600°C에서 여러 색이 혼합되어 일종의 전이 현상을 보이는 것은 한 시편 상에 국부적으로 다른 두께의 산화물이 형성되었기 때문인 것으로 추측된다. 또한 표준 시편으로 사용한 10 mm × 10 mm 과 비교했을 때 5 mm × 5 mm 시편은 훨씬 균일한 색조를 나타냈는데 이것 역시 해당 시편이 균일한 산화물 층 성장을 가능하게 하는 넓이로 제작되었기 때문이라고 생각된다. 이는 열처리 과정에서 균일한 열구배를 형성하기 위하여 갖춰져야 할 시편의 최적 형상 조건과 온도 및 열처리 시간이 존재한다는 것을 의미하며 이것에 대한 연구가 추후에 진행되어야 할 것이다.

Ti2p에 대한 XPS 분석 결과 cp-Ti 및 Ti6Al4V의 경우, TiO₂나 Ti(OH)₄를 형성할 수 있는 Ti⁴⁺의 비율이 절대적으로 많았고 그 수치는 열처리 온도가 증가할수록 100%에 가깝게 높아졌다. 이에 비해 Ti-Ag 계 합금 시편은 TiO와 Ti(OH)를 형성할 수 있는 Ti²⁺가 열처리하지 않은 경우 약 35%에서 800°C 열처리를 마친 경우 0.1%까지 낮아졌고 열처리 후에는 Ti⁴⁺가 75%, Ti³⁺가 25%를 차지하고 있었다. 동

시에 O1s에 대한 분석의 결과 cp-Ti 및 Ti6Al4V의 경우, 각각 TiO₂, TiO, Ti₂O₃:Ti(OH)₂, Ti(OH)₃, Ti(OH)₄:Ti(H₂O)를 형성할 수 있는 O²⁻:OH⁻:H₂O의 비율이 대략 52-82:10-43:2-12였다. 이에 반하여 Ti-Ag 계 합금의 경우 열처리 온도가 높아짐에 따라 O²⁻의 비율이 상대적으로 더 높아졌고 H₂O는 1% 미만의 작은 값을 보였다. 따라서 cp-Ti와 Ti6Al4V은 TiO₂나 Ti(OH)₄를, 대조적으로 Ti-Ag 계는 Ti₂O₃, TiO₂나 Ti(OH)₃, Ti(OH)₄를 형성할 확률이 높으며 산화물을 형성할 확률은 Ti-Ag 계 합금이 훨씬 높게 된다.

Ti6Al4V의 경우 H₂O의 비율이 상대적으로 높는데 이는 모재와 alumina 및 titania 층 사이의 미세한 틈에 열처리 중 간헐, 특히 공냉 중 응결한 수분에 의한 영향인 것으로 추측된다. cp-Ti과 Ti6Al4V이 상대적으로 많은 수화물을 함유하고 있으며, 대조적으로 Ti-Ag는 그 피막에 주로 산화물의 형태로 산소를 포함하고 있다는 근거는 O/Ti 및 O/(Ti+Al+V) 비율에서도 확인된다. 즉, cp-Ti과 Ti6Al4V에서 나타나는 대략 2.3의 비는 TiO₂에서의 산소비보다 더 큰데 이것은 H₂O와 OH가 기여하는 잉여 산소를, Ti-Ag 계 합금에서 나타나는 약 1.8의 비는 TiO₂와 Ti₂O₃가 포함하는 산소의 대략적인 평균치를 나타내는 것으로 추측된다. Ti6Al4V의 경우, O와 금속 원소인 Ti, Al, V의 비를 구하였으며 스펙트럼 분석 결과를 통하여 볼 때, Al 산화물과 Ti 산화물이 혼재되어 있음을 확인할 수 있었다. Ti6Al4V을 열처리하였을 때 400°C, 600°C에서는 Ti 산화물이 주로 형성되었으나 800°C, 4 h에서는 Ti 산화물과 함께 alumina가 시편 최외곽에 형성되는 것을 확인할 수 있었다. cp-Ti의 경우, TiO₂의 비보다 더 큰 O/Ti값을 보였으며 따라서 OH 혹은 H₂O 상태로 잉여 산소가 존재하는 것으로 여겨진다. 그러나, 표면 개질된 임플란트 표면에 존재하는 불안정한 OH가 그 높은 표면 에너지로 인하여 높은 생체적합성을 나타낼 수 있을 것이라는 일 반론은 본 연구의 경우 직접적으로 적용하기 힘든 것으로 판단된다. 연구 결과의 자료와 이하의 생체적합성에서 기술하는 바와 같이 OH radical이 거의 없이 산화물로만 표면이 형성된 Ti-Ag 계 합금 시편의 생체적합성 실험 결과가 Ti6Al4V 보다는 양호하였기 때문이다. 따라서 골유착에 큰 영향을 미치는 표면 형상 등의 변수에 대한 체계적인 연구가 이루어

어져야 할 것이다.

본 연구에서는 이미 강도와 내식성이 cp-Ti 보다 우수한 것으로 확인되고 있는 Ti-Ag 계 합금을 실험군으로 사용하여 1차적으로 단기간 동안의 생체적합성을 평가하고자 하였다. MTT 실험 결과 모든 실험군의 섬유아세포 생존률은 90%를 상회하였다. 따라서 산화피막이 형성된 Ti 합금으로부터 용출된 이온은 섬유아세포에 대한 독성이 없는 것으로 판단되었다. cp-Ti를 제외한 모든 시편군에서, 세포 증식 실험과 마찬가지로 600°C 열처리 시편들에서 가장 높은 세포 생존률이 나타났다. 역시 단기간 세포적합성 실험을 통해서 산화피막이 형성된 Ti, Ti6Al4V 및 Ti-Ag 계 합금은 섬유아세포 성장에 영향을 미치지 않는 것으로 판단할 수 있었다. 골아세포 MC3T3-E1 세포의 증식이 일어나 대체적으로 세포수가 증가하는 것으로 볼 때 열처리를 통하여 산화피막이 형성된 Ti, Ti6Al4V 및 Ti-Ag 계 합금들이 세포 증식에 미치는 영향은 미미한 것으로 판단된다. 따라서 산화 피막이 형성된 시편 표면에서는 MC3T3-E1 세포에 대한 독성이 거의 없는 것으로 결론지을 수 있었다. Ti3.5Ag를 제외한 모든 시편군에서는 600°C에서 열처리한 시편이 가장 높은 세포 증식률을 보였는데 이것으로 미루어 볼 때 600°C 열처리를 통하여 가장 안정한 산화 피막이 생성되는 것으로 판단되었다. 장기간 안전성을 규명하기 위하여 장기간 동안 생체 재료에 처리된 배양상등액이 섬유아세포 및 골아세포 등에 미치는 독성반응에 대한 연구가 필요할 것이다.

V. 결 론

1. 열산화 처리된 시편의 색상으로 유추되는 산화물 층의 두께는 400, 600, 800°C 시편군 각각의 경우 100-250, 250-700 및 1700 Å 이상이었다.
2. XPS로 각 시편의 Ti2p 및 O1s spectrum을 분석하고 O/Ti 및 O/(Ti+Al+V) 원자 비율을 구한 결과, cp-Ti와 Ti6Al4V은 Ti-Ag에 비하여 상대적으로 많은 수화물을 함유하고 있었으며, 대조적으로 Ti-Ag는 그 피막에 주로 산화물의 형태로 존재하는 것으로 확인되었다.
3. 섬유아세포 L-929에 대한 MTT 실험 결과 용출액을 첨가한 모든 실험군 내에서 생존률이 90%를

상회하였다. 특히 Ti-Ag 계 합금은 100%의 생존률을 보였다.

4. 골아세포 MC3T3-E1의 증식 실험 결과 실험군의 세포수는 2 일 내지 4 일후 모두 증가하였다. Ti과 Ti2.0Ag의 경우, 600°C에서 열처리한 시편에서 가장 높은 증식률을 보였다.

결론적으로 열처리 조건으로는 시간보다 온도가 더욱 중요한 것으로 나타났고 최적 열처리 온도는 600°C였으며 또한, Ti-Ag 계 합금은 Ti나 Ti6Al4V에 비해 생체적합성을 향상하는 데에 필요한 산화물을 더 잘 형성하였다. 따라서, 표면 열산화 연구에서 확인된 결과를 종합할 때 Ti-Ag 합금계를 600°C에서 열처리 한 시편에 대해 더욱 우수한 표면 특성을 지니는 임플란트 재료를 개발할 수 있을 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Brånemark P-I, Breine U, Adell R, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson A. Intraosseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental Studies. Scand Reconstr Surg 1969;3:81-100.
2. Keun-Taek Oh, Hyung-Min Shim, Chung-Ju Hwang, Kyoung-Nam Kim. Properties of Ti-Ag alloy for dental application. The Journal of the Korea Research Society for Dental Materials. 2003;29(3):221-228.
3. Gee-Ho Park, Young-Kyu Ryu. Effect of silver addition to titanium alloys for orthodontic application. Yonsei graduate school. Seoul. 2001.
4. Jae-Young Woo, Chung-Ju Hwang. Properties of titanium-silver alloy for manufacture of orthodontic skeletal anchorage system. Yonsei graduate school. Seoul. 2003.
5. Takahashi M, Kikuhci M, Takada Y. Mechanical Properties and Microstructures of Dental Cast Ti-Ag and Ti-Cu Alloys.

- Dental Materials Journal 2002;21(3):270-280.
6. Davies JE, Lowenberg B, Shiga A. The bone-titanium interface in vitro. *J Biomed Mater Res* 1990;24:1289-1306.
 7. Chehroudi B, Goud TRL, Brunette DM. A light and electron microscopic study of the effects of surface topography on the behavior of cells attached to titanium-coated percutaneous implants. *J Biomed Mater Res* 1991;25:387-405.
 8. Long M, Rack HJ. Titanium alloys in total joint replacement—a materials science perspective. *Biomaterials* 1998;19:1621-1639.
 9. Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, Kasemo B, Larsson K, Lundstrom I, McQueen DH, Salak R. The interface zone of inorganic implants in vivo: titanium implants in bone. *Ann Biomed Eng* 1983;11:1-27.
 10. French HG, Cook SD, Haddad RJ. Correlation of tissue reaction to corrosion in osteosynthetic devices. *J Biomed Mater Res* 1984;18:817-828.
 11. Finnegan M. Tissue response to internal fixation devices. *Crit Rev Biocompat* 1989;5:1-11.
 12. Jones DA. Principles and prevention of corrosion. 1992a, pp. 42-44, Macmillan Publishing Co., New York.
 13. Browne M, Gregson PJ. Surface modification of titanium alloy implants. *Biomaterials* 1994;15:894-898.
 14. Wisbey A, Gregson PJ, Peter LM, Tuke M. Effect of surface treatment on the dissolution of titanium-based implant materials. *Biomaterials* 1991;12:470-473.
 15. Jones DA. Principles and prevention of corrosion. 1992b, pp. 411-416, Macmillan Publishing Co., New York.
 16. Healy KE, Ducheyne P. The mechanisms of passive dissolution of titanium in a model physiological environment. *J Biomed Mater Res* 1992a;42:319-338.
 17. Tengvall P, Elwing H, Lundstrom I. Titanium gel made from metallic and hydrogen peroxide. *J Colloid Interface Sci* 1989;130:405-13.
 18. Vetter KJ, Gorn F. Kinetics of layer formation and corrosion processes of passive iron in acid solution. *Electrochim Acta* 1973;18:321-6.
 19. Chang E, Lee TM. Effect of surface chemistries and characteristics of Ti6Al4V on the Ca and P adsorption and ion dissolution in Hank's ethylene diamine tetra-acetic acid solution. *Biomaterials* 2002;23:2917-25.
 20. Kasemo B, Lausmaa J. Biomaterial and implant surfaces: a surface science approach. *Int J Oral Maxillofac Implant* 1998;3:247-259.
 21. Albrektsson T, Hansson HA. An ultrastructural characterization of the interface between bone and sputtered titanium or stainless steel surface. *Biomaterials* 1986;7:201-205.
 22. Walivaara B, Aronsson BO, Rodahl M, Lausmaa, Tengvall P. Titanium with different oxides: in vitro studies of protein adsorption and contact activation. *Biomaterials* 1994;15:827-834.
 23. Boehm HP. Acidic and basic properties of hydroxylated metal oxide surfaces. *Disc Faraday Soc* 1971;52:264-275.
 24. Kasemo B. Biocompatibility of titanium implants. surface science aspects. *J Prosthet Dent* 1983;6:832-837.
 25. Lausmaa GJ, Mattsson L, Rolander U, Kasemo B. Chemical composition and morphology of titanium surface oxide. *Mater Res Symp Proc* 1986;55:351-367.
 26. Lausmaa GJ, Kasemo B, Mattsson H. Surface spectroscopic characterization of ti-

- tanium implant materials. *Appl Surf Sci* 1990;44:133-146.
27. Lee PA, Stork KF, Maschoff BL, Nebensy KW, Armstrong NR. Oxide formation on Fe and Ti thin films and on Fe thin films modified with ultrathin layers of Ti. *Surf Interface Anal* 1991;17:48-56.
 28. Tummler H, Thull R. Model of the metal/tissue connection of implant made of titanium or tantalum. In *Biological and biomedical performance of biomaterials*. Christel P, Meunier A, Lee AJC, eds., 1986. pp. 403-8, Elsevier, Amsterdam.
 29. Shams AM, Hammoud AA. Oxide film formation and thickening of titanium in water. *Thin Solid Films* 1988;167:269-280.
 30. Healy KE, Ducheyne P. Oxidation kinetics of titanium thin films in model physiological environments. *J Colloid Interface Sci* 1992b;150:404-417.
 31. Albrektsson T, Jacobson M. Bone-metal interface in osseointegration. *J Prosthet Dent* 1987;57:597-607.
 32. Blumenthal NC, Cosma V. Inhibition of apatite formation by titanium and vanadium ions. *J Biomed Mater Res* 1989;23[Al]:13-22.
 33. Friberg L, Nordberg, Vouk V, editors. *Handbook on the toxicology of metals*, 2nd ed. 1986, Elsevier, Amsterdam.
 34. Buser D, Shenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res* 1991;25:889-902.
 35. Li J. Behaviour of titanium and titania-based ceramics in vitro and in vivo. *Biomaterials* 1993;14:229-232.
 36. Fukuzuka T, Shimogori K, Hiroshi S, Kamikubo F. On the beneficial effect of the titanium oxide film formed by thermal oxidation. In *Titanium '80-Science and Technology Proceedings of the Fourth International Conference on Titanium*. Kimura H, Izumi O, eds., 1980, pp. 2783-2792, Metallurgical Society of AIME, Warrendale, PA.

Reprint request to:

Dong-Hoo Han, D.D.S., Ph.D.

Department of Prosthodontics, College of Dentistry, Yonsei University
134, Shinchon-dong, Seodaemoon-gu, Seoul 120-752, Korea
donghooan@yumc.yonsei.ac.kr

ABSTRACT

CYTOCOMPATIBILITY OF THERMALLY OXIDIZED TI-AG ALLOYS

Ho-Joong Kim, D.D.S., Ph.D.** , Keun-Taek Oh, Ph.D.* , Zi-Whan Ee, M.Sc.*** ,
Kyoung-Nam Kim, D.D.S., Ph.D.* , Dong-Hoo Han, D.D.S., Ph.D.**

Dept./Res. Inst. of Dent. Biomaterials and Bioengineering, Col. of Dentistry, Yonsei Univ .
Dept. of Prosthodontics, College of Dentistry, Yonsei University**
Biomaterialskorea, Inc.****

Statement of problem: In its preceding work, change in surface characteristics were investigated in consideration that both microtopography and macroscopic configuration of implants surface are two of the most important factors, in that they can construct agreeable environment by raising surface energy, to affect osseointegration and biocompatibility explained by cell proliferation.

Purpose: This study focused on examining cytocompatibility of dental implants materials Ti-Ag alloys, of which mechanical and electrochemical superiority to cp-Ti or Ti6Al4V were verified, in comparison with that of cp-Ti, and Ti6Al4V.

Materials and methods: In this regard, MTT tests for L-929, the fibroblast connective tissues and cell proliferation tests for osteoprogenitor cells, MC3T3-E1 were performed on cp-Ti, Ti6Al4V, and Ti-Ag alloys following thermal oxidation according to appropriate heat treatment temperature(untreated, 400, 600, 800°C) and heat treatment duration(untreated, 0.5, 1, 4 hr).

Results: The MTT tests on fibroblasts L-929 resulted in cell viability of over 90% in all experimental group entities, where, especially, the 100% of the viability for Ti-Ag alloys specimens accounted for the slightest adverse effect of ions release from those alloys on the cell. In MC3T3-E1 proliferation tests, the population of cells in the experimental group was roughly increased as experimentation proceeded, after two to four days. Proliferation showed highest viability for most of specimens, including Ti2.0Ag, treated at 600°C.

Conclusion: In conclusion, it is the heat treatment temperature, not the duration that has considerable effects on thermal oxidation of specimens. Ti-Ag alloys treated at 600°C proved to have the best surface morphology as well as cytocompatibility when compared with Ti or Ti6Al4V for short-term biocompatibility tests.

Key words : Dental implants, Ti-Ag alloys, Surface characteristics, Thermal oxidation, Osseointegration, Surface topography, Cytocompatibility, Cell proliferation, Cell viability