

화학적 처리가 티타늄의 생체활성도에 미치는 영향

전북대학교 치과대학 치과보철학교실 및 *치과생체재료학교실

민관식 · 이민호* · 안승근 · 박찬운

1. 서 론

현대의학에 있어서 생체 내 매식재료의 중요성이 증가하고 있는 반면에 매식재료의 생체적합성을 결정하는 요소에 대해서는 많이 알려져 있지 않다. 매식재료가 화학반응을 일으키지 않고 독성반응을 보이지 않는다고 하더라도 생체에 매식된 이후에 염증, 섬유형성, 응고작용 및 감염 등을 유발하는 것으로 알려져 있다. 매식재료의 표면과 일시적으로 결합하는 생체내의 단백질이 급성 염증반응을 결정하는 중요한 요소이며 약간의 경우에는 매식재료에 의해 야기된 염증반응, 즉 매식재료와 관련된 염증세포가 방출한 산화물에 의해, 재료자체의 분해를 유발할 수도 있는 것으로 보고되고 있다.¹⁾ 그 외에도 매식체 표면의 화학 성분이 사이토카인이나 콜라겐과 같은 섬유의 분비를 촉진하고 따라서 섬유성 막의 발달을 자극하는 것으로 알려져 있다.²⁾ 매식체 주위를 둘러싸는 섬유성 결합조직막은 매식체와 생체 사이의 장벽 역할을 하게 되며 이 장벽은 매식체의 생체적합성과 관련이 있다.²⁾ 이와 같이 매식된 재료에 대한 생체 조직의 반응을 이해하기 위해서는 적절한 조직학적 평가가 있어야 하는데, 이러한 과정의 일환으로 동물의 피하조직에 매식하였을 때 재료주위에 생성되는 결합조직막과 세포가 생체적합성 평가의 좋은 지표가 될 수 있다고 하였다.^{3,4)}

임상 전 단계에 있어서 매식재료의 생체적합성 평가는 조직의 용이성 때문에 동물의 피하조직이 이용되고 있다.⁵⁾ 기니아피그, 흰쥐, 사람을 실험재료로 하여 피하 결합조직에 매식체를 삽입하였을 때의 치유과정 혹은 결합조직의 반응은 근본적으로 유사한 경향을 보이기 때문에 동물에서 나타난 매식체 반응 결과는 사람에게도 그대로 적용할 수가 있다.²⁾

본 연구에서 생체적합성을 평가하고자 하는 티타늄 및 티타늄 합금은 우수한 생체적합성, 고강도 및 고인성의 기계적 성질 때문에 하중을 받는 부위의 임플란트 재료로 널리 사용되는 중요한 금속재료이다.⁷⁾ 그러나 자연적으로 생성된 티타늄 및 티타늄 합금의 산화피막은 불균일하고 치밀하지 못하며, 공식(pitting corrosion) 등이 발생하기 쉬운 여러 문제점이 있어 이런 어려움을 해결하기 위한 과정으로 상용 티타늄이나 그 합금 표면에 치밀한 부동태 피막을 형성함으로써 골과의 결합 촉진을 유도할 수 있는 표면처리에 관한 연구가 광범위하게 진행되고 있다. 또한 이러한 재료는 체내에 매식될 때 섬유조직으로 쌓여 있기 때문에 직접 골과 결합할 수 없다. 이러한 단점을 해결하기 위하여 생체활성 유리나 유리-세라믹 또는 인산칼슘 등으로 그 표면을 코팅하는 기술이 연구되고 있으나,^{8,9)} 코팅 층과 기판과의 결합이 약하고 성분이나 결정의 제어가 어렵다는 단점이 있다. 인공 생체재료가 골과 결합하기 위해서

※ 이 논문은 2005년도 교육인적자원부 지방연구중심대학육성사업 헬스케어기술개발사업단의 지원에 의하여 연구되었음.

는 임플란트 재료를 체내에 매식했을 때 재료 표면에 골유사 아파타이트 층이 형성되어야 하며,⁹⁾ 많은 연구자들이 아파타이트 형성 방법에 관하여 여러 가지로 검토해왔다.¹⁰⁻¹²⁾ Tengvall 등¹²⁾은 과산화수소의 수용액에서 티타늄 표면에 티타니아 겔 층을 형성하였으며, 이 티타니아 겔 층이 유사체액에서 아파타이트 층의 형성에 기인한다고 하였다. Lee¹³⁾는 H₂O₂와 TaCl₅의 금속 염화물이 혼합된 수용액에 티타늄 및 티타늄 합금의 표면에 티타니아 겔 층을 형성하였으며, 이 티타니아 겔 층이 유사체액에서 아파타이트 층의 형성에 기인한다고 하였다. 그러나 생체 내에서 이들 표면처리한 금속 시편에 대한 생체적합성에 관한 연구는 아직 미흡한 실정이다. 이에 본 연구에서는 현재 인공 임플란트 재료로 널리 사용되고 있는 상용 순 Ti의 표면에 활성을 부여하기 위해 97% H₂SO₄와 30% H₂O₂의 혼합수용액으로 표면처리를 실시하여 생체활성도에 미치는 영향을 조사하였다. 또한, 상용 순티타늄 및 화학적으로 표면처리한 티타늄에 대하여 마우스 복부 피하조직에 이러한 시편을 삽입하여 시편 매식체 주위에 형성된 섬유성 결합조직 막을 조직학적인 방법으로 분석하여 생체적합성에 대한 평가를 하였으며, 시편의 구조적인 변화는 OM, XRD, SEM-EDX 및 XPS 등을 이용, 분석하였다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 시편준비

본 연구에 사용한 시편은 공업용 순 티타늄 판(N 0.006, C 0.014, H 0.002, Fe 0.08, O 0.130, Ti bal., Titania Co, ITALY)을 10×10×1 mm의 크기로 절단하여 사용하였다. 준비한 시편을 #240-#1200의 emery paper로 연마 후 모든 시편을 48% HF, 62% HNO₃ 및 증류수 1 : 1.5 : 6(vol%)으로 용액

을 제조하여 상온에서 2분 동안 산세한 후, 증류수에서 초음파 세척하여 실험에 사용하였다.

한편 본 실험에서는 화학적 표면처리의 영향에 의한 상호 생체활성을 평가하기 위해 상용 순 티타늄에 대해 97% H₂SO₄와 30% H₂O₂의 1:1(vol %) 혼합수용액에서 40℃로 1시간 동안 화학적으로 표면처리를 실시하였다. 표면처리 후 시편을 증류수에서 세척한 후 60℃에서 24시간 건조하여, 승온속도를 5℃/min으로 400℃에서 1시간 동안 열처리하였다.

시편에서 아파타이트상 형성에 따른 생체활성 평가실험은 pH와 이온농도가 사람의 혈장과 거의 유사하게 제조된 HBSS(Hanks' Balanced Salts Solution, Sigma, H2387)에 calcium chloride dihydrate 0.185 g/L, magnesium sulfate 0.09767 g/L, sodium hydrogen carbonate 0.350 g/L를 첨가하여 사용하였다. 준비한 시편은 121℃에서 20분간 고압멸균 처리 및 건조 후, 5% CO₂ Incubator에서 15일 동안 침적하였으며, pH는 7.40, 온도는 36.5℃로 하였다. 또한, HBSS의 농도 변화를 방지하기 위해 2일 간격으로 용액을 교환하여 사용하였다. Table I은 실험조건에 대한 내용을 나타낸 것이다.

소정의 실험이 종료된 시편에서 아파타이트 형성 과정은 thin film장치가 부착된 X-선회절기(XRD, Rigaku DmaxIII-A type)를 이용하여 분석하였고, 표면의 거칠기는 표면조도측정기(Mitutoyo, SV-3000)로, 형태학적 미세구조는 EDX가 부착된 주사전자현미경(SEM, JEOL, JSM-6400)을, 표면원소의 화학적 조성 및 전자구조를 X-선 광전자분석기(XPS, MX-PEOBE)를 이용, 분석하였다.

2. 실험동물

본 실험에 사용된 실험동물은 평균무게가 33 g인 생후 10주된 ICR계 마우스 암컷 12마리로 사육상자 당 3마리씩 넣어 사육하였다. 실험동물의 먹이로는

Table I. Various surface treatments employed in the study

Treatment Code	Treatment Process
A	immersion in 97% H ₂ SO ₄ and 30 wt% H ₂ O ₂ solution at 40℃ for 1 h
B	after A, heat treatment at 400℃ for 1 h
C	after B, immersion in HBSS for 15 days

실험용 펠레트 사료와 식이용 물로서 일차 증류수를 공급하였다. 사육실은 온도 $21 \pm 3^\circ\text{C}$ 와 상대습도 $50 \pm 10\%$ 를 유지하였고 조명시간은 12시간을 주기로 하였다.

3. 금속시편 매식

실험동물에 주입된 시편들은 $3 \times 3 \times 1$ mm의 크기로 표면처리하지 않은 순 티타늄, 본 실험에서 적용한 화학적 표면처리를 실시한 순 티타늄, 비교군으로 알루미늄 및 스테인레스 강 316L의 4종이었으며, 상기 시편들을 실험동물에 주입하기 전에 70% 에탄올에 2시간 담가두어 소독한 다음 멸균기에 넣어 가압 멸균처리하여 사용하였다. 실험동물에 사용된 마취제는 sodium pentobarbital로 50 mg/kg의 농도로 복강에 주입하여 마취시켰다.

한편 실험동물에 대한 시편의 주입은 완전히 마취된 쥐의 복부 털을 제거한 다음, 소독용 가위를 이용 피부 한 군데를 금속시편이 들어갈 수 있는 3 mm 크기로 절개하여, 피부와 복부근육의 결합조직 부위에 멸균된 시편 1개를 넣었으며, 절개부위를 봉합사로 봉합하였다. 또한 금속시편이 주입된 실험동물들의 염증을 방지하기 위하여 항생제 doxycycline (tetracycline 계열)을 20 mg/kg 농도로 3일간 복강에 주사하였다. 금속 1 종류마다 3개의 시편을 만들었고 마우스 1마리에 시편 1개를 삼입하였기 때문에 금속 1 종류에는 마우스 3 마리가 배당되어 본 실험에 사용된 마우스는 총 12마리를 배당하여 4주간 사육하였다.

4. 생체조직 처리

금속시편이 주입된 실험동물에서 금속시편의 채취와 현미경 관찰은 소정의 사육기간 인 4주가 완료된 실험동물을 에테르로 마취시켜 희생하였다. 희생된 쥐를 눕혀서 고정하고 다시 자라난 복부의 털을 제거한 다음 시편이 들어 있는 부위를 중심으로 복부 피부와 근육을 동시에 잘라내어 4% glutaraldehyde 용액에 48시간 고정하였다. 핀셋으로 결합조직에 있는 금속시편을 빼낸 다음 잘라낸 복부 조직을 동일한 고정 용액인 4% glutaraldehyde에, 포매하기

전까지 보관하였다. 증류수로 복부 조직 샘플을 수세하고 알코올 탈수과정을 거친 다음 glycol methacrylate resin에 포매하였다. 마이크로톱으로 $3.0 \mu\text{m}$ 두께의 절편을 만들어 슬라이드에 올렸다. 조직 염색방법인 hematoxylin-eosin을 사용하여 염색하고 현미경으로 관찰하였다.

5. 영상 처리 및 결합조직 막 두께 측정

염색한 복부 조직 절편을 광학현미경으로 관찰하고 현미경에 부착된 IMT 디지털 카메라로 촬영하여 Adobe Photoshop (Adobe System, Inc., San Jose, CA)에 저장하였다. 조직적합성을 평가하기 위하여 현미경 상에 나타난 금속시편 매식재료를 둘러싸는 섬유성 결합조직 막의 두께를 IMT Software (Size Analysis Program)를 이용 측정하였다. 섬유성 막 두께 측정은 1 마리의 마우스 복부조직 절편에서 10군데 씩 측정하여 한 시편당 총 30군데의 섬유성 결합조직 막의 두께를 측정하여 Excel 프로그램을 이용, 그 평균값과 표준편차 값을 구하였다. 각 금속 종류간의 유의한 차이는 one-way ANOVA 방법을 이용하였으며 t-test에서 $P(0.05)$ 일 때 유의한 차이가 있는 것으로 하였다.

III. 연구 결과

Fig. 1은 상용 순 티타늄 시편의 표면처리 조건에 따른 주사전자현미경 조직과 EDX 분석 결과를 나타낸 것이다. Fig. 1의 (a)는 상용 순 티타늄에 대하여 48% HF, 62% HNO_3 및 증류수 1 : 1.5 : 6(vol%)으로 용액을 제조하여 상온에서 2분 동안 산세한 후, 증류수에서 초음파 세척한 시편의 주사전자현미경 사진으로, 부식으로 인하여 입내의 표면이 매끄러운 면을 가진 큰 결정립이 관찰되었다. Fig. 1의 (b)는 97% H_2SO_4 와 30% H_2O_2 의 1:1(vol %) 혼합 수용액에서 60°C 로 1시간 동안 화학적으로 표면처리한 시편의 사진으로서 결정립계를 따라 부식의 양상과 결정립 내에서의 표면의 거칠기가 증가된 형태를 보이고 있으며, 400°C 에서 1시간 동안 열처리한 시편에서도 같은 경향을 보이고 있다.(Fig. 1의 (c)) Fig. 1의 (b)와 (c)의 오른쪽 모서리에 나타난 Fig.는

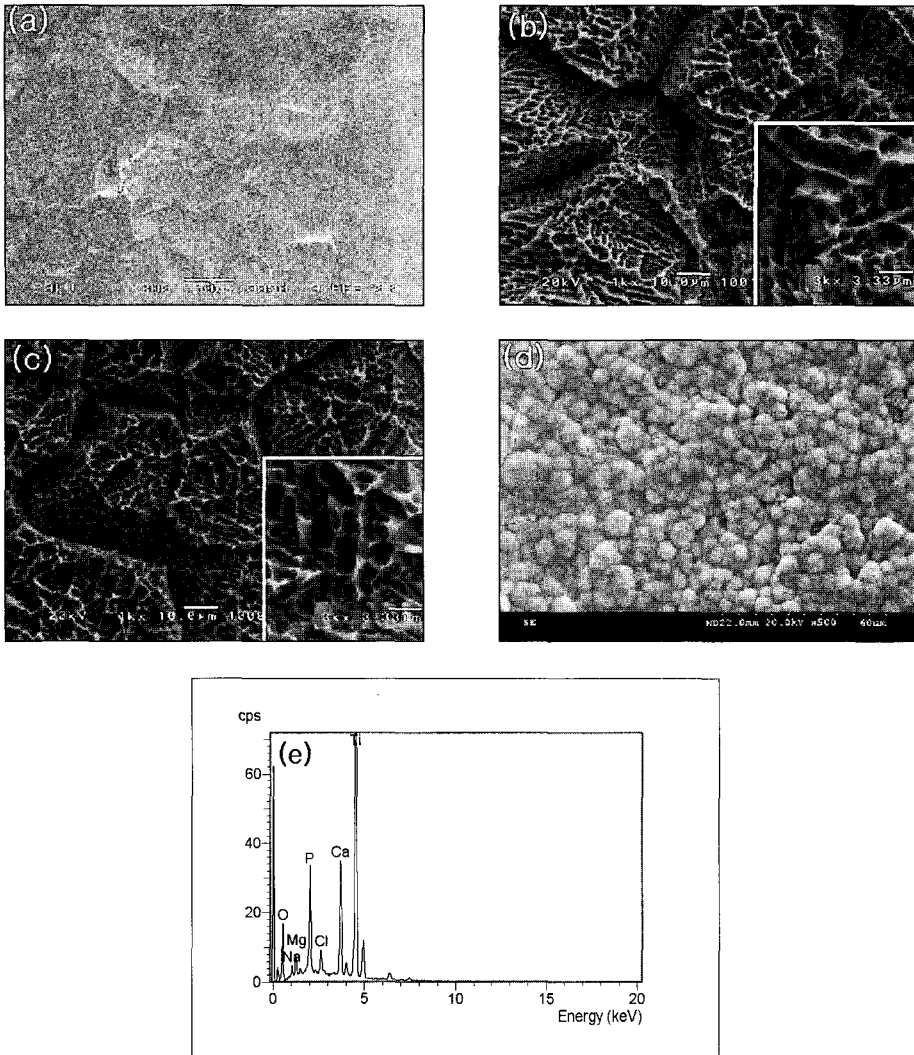


Fig. 1. SEM images and EDX analysis of commercially pure titanium surface after various surface treatments. (a) After acid etching, (b) A treatment of Table II, (c) B treatment of Table II, (d) C treatment of Table II, (e) EDX analysis of (d) image.

고배율을 나타낸 것이다. Fig. 3의 (d)는 표면처리와 열처리를 실시한 후 HBSS에 15일 동안 침적한 시편의 사진으로서 시편 표면에 구형입자형태의 아파타이트 상이 형성되어 있음을 관찰할 수 있다. 또한 Fig. 1의 (e)는 97% H₂SO₄와 30% H₂O₂의 1:1(vol %) 혼합수용액에서 40℃로 1시간 동안 화학적으로 표면처리한 후 HBSS에 15일 동안 침적한 시편의 EDX 분석결과로서, 시편 표면에 아파타이트의 주성분인 Ca과 P 이온이 검출되고 있음을 확인할 수 있다.

Fig. 2는 본 실험에서 사용한 상용 순 티타늄의 표면처리 조건에 따른 X-선회절 분석 결과이다. Fig. 2의 (a)는 상용 순 Ti 시편을 HBSS에 15일 동안 침적한 후 얻어진 시편의 X-선회절 결과로 표면에 원시료인 Ti 외에 다른 피크는 전혀 관찰되지 않았다. 반면 Fig. 2의 (b)는 상용 순 Ti 시편을 97% H₂SO₄와 30% H₂O₂의 1:1(vol %) 혼합수용액에서 40℃로 1시간 동안 화학적으로 표면처리한 시편의 X-선회절 결과로서, 원 Ti 시편의 피크 외에 2θ가 25°와 48°범

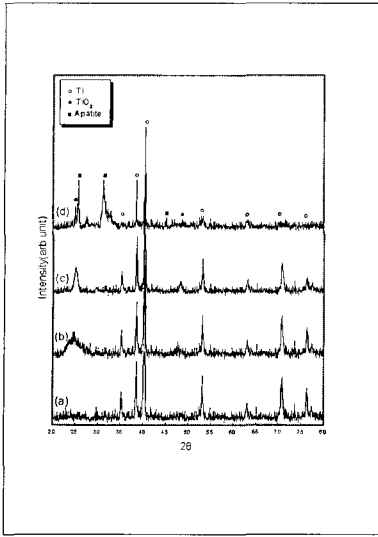


Fig. 2. TF-XRD patterns of commercially pure titanium surface after various surface treatments. (a) untreated, (b) A treatment of Table II, (c) B treatment of Table II (d) C treatment of Table II.

위에서 넓은 비정질 피크가 형성된 것으로 보아 본 실험에 적용한 표면처리에 의해 비정질 titania가 형성되었음을 알 수 있다. 더욱 이 비정질 층을 400°C에서 1시간 동안 열처리를 하면 anatase 결정상으로 변화됨을 Fig. 2의 (c)에서 관찰할 수 있다. Fig. 2의 (d)는 화학적 표면처리와 열처리를 한 후 HBSS에 15일 동안 침적한 시편의 X-선회절 결과로서 시편 표면에 기지인 Ti, TiO₂ 및 아파타이트 결정이 석출되었음을 알 수 있다.

Fig. 3은 97% H₂SO₄와 30% H₂O₂ 1:1(vol %)의 혼합수용액에서 40°C로 1시간 동안 화학적으로 표면처리와 400°C에서 1시간 동안 열처리를 수행한 후 HBSS에 15일 동안 침적한 XPS의 결과로서, 피막층에는 모재의 Ti와 Ca와 P 및 O의 피크가 관찰되었다.

Fig. 4는 원시편 및 화학적 표면처리한 시편의 표면거칠기를 나타낸 것으로, 원시편, 97% H₂SO₄와 30% H₂O₂의 1:1(vol %) 혼합수용액에서 40°C로 1시간 동안 화학적으로 표면처리한 시편 및 표면처리 후 400°C에서 1시간 동안 열처리한 시편의 평균 거칠기는 각각 0.189±0.02 μm, 2.251±0.21 μm 및 2.175±0.21 μm로 나타났다.

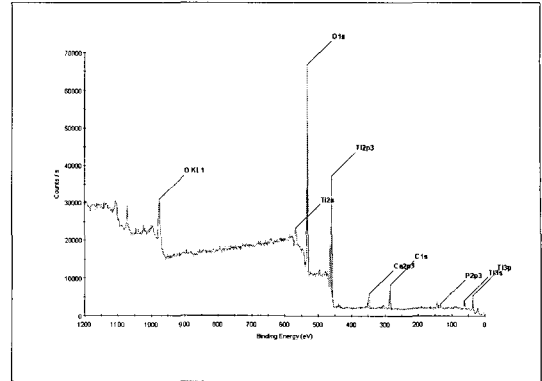


Fig. 3. XPS spectra obtained from the chemical surface treated pure titanium after immersion in the HBSS for 15 days.

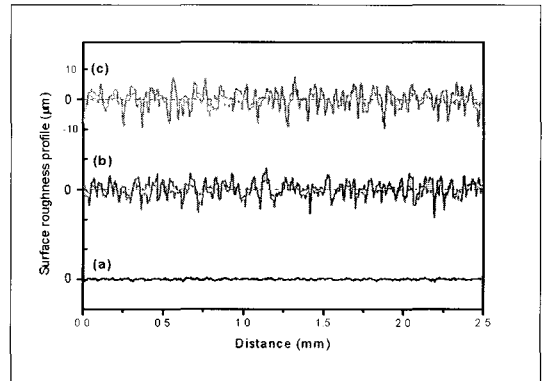


Fig. 4. Surface roughness of commercially pure titanium surface after various surface treatments. (a) untreated, (b) A treatment of Table II (c) B treatment of Table II.

Fig. 5와 Table II는 무처리 티타늄 시편, 화학적 표면처리한 시편, 비교군으로 알루미늄 및 스테인레스강 316L 시편들의 상호 생체적합성을 평가하기 위해 상기 시편들을 실험동물인 마우스의 복부 부위에 매식한 뒤, 4주 동안 사육하여 조직학적으로 평가한 Fig.와 결합조직 막의 두께를 나타낸 Table이다. 마우스의 복부 부위에서는 피부와 결합조직으로 구성된 피하조직이 hematoxylin과 eosin에 이중 염색되어 잘 관찰되었다. 전체적으로 삽입된 금속 시편을 둘러싸는 새롭게 형성된 결합조직 막은 시편 삽입 전

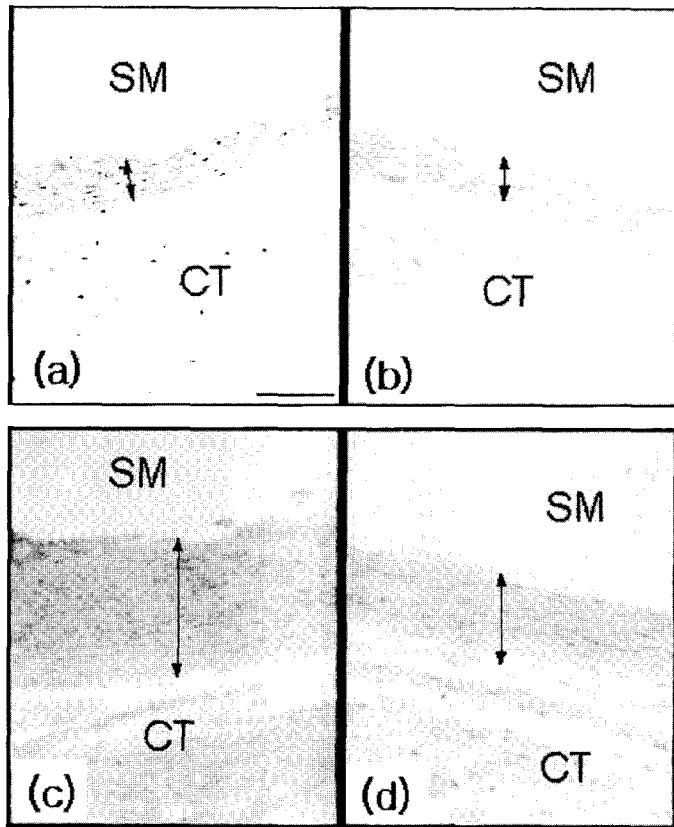


Fig. 5. Optical micrographs of cryostat sections obtained from abdominal tissue of the mouse: (a) untreated Titanium, (b) chemical treated Titanium, (c) Aluminium, (d) stainless steel. Double arrow indicates the thickness of fibrous capsule surrounding the implanted specimen. Scale bar is 100 μm . Abbreviations used: CT, connective tissue; SM, site of implanted metal.

Table II. Mean thickness of fibrous capsule surrounding the metal implants in connective tissue of abdomen (unit: μm)

Specimens	Thickness
Pure Ti	52.20 \pm 13.39
Chemical Treated Ti	46.98 \pm 23.73
Aluminium	168.65 \pm 45.10
Stainless Steel	100.95 \pm 30.50

의 기존 결합조직과는 뚜렷하게 구분되었다. 새롭게 형성된 결합조직 막에는 섬유 사이사이에 비교적 규칙적으로 섬유모세포 혹은 섬유세포가 배열되어 있

었으며 대식세포도 관찰되었다. 섬유성 막 아래에 있는 기존의 결합조직은 섬유와 세포들이 성글게 배열되어 있는 것이 특징이었다. 따라서 시편 매식체가 들어 있던 빈 공간과 그 매식체를 둘러싸는 섬유성 막이 현미경상으로 확실하게 구분되었다. 막의 두께는 일정한 경우도 있었지만 금속 시편에 따라 두께의 차이가 있는 것도 관찰되었다.

표면처리하지 않은 순수한 티타늄을 마우스의 복부에 삽입한 경우, 시편 주위에 형성된 결합조직 막의 두께가 52.20 μm 로 나타났다.(Fig. 3(a)) 97% H_2SO_4 와 30% H_2O_2 의 1:1(vol %) 혼합수용액에서 40 $^\circ\text{C}$ 로 1시간 동안 화학적으로 표면처리를 실시한

후, 400°C에서 1시간 동안 열처리한 시편의 경우, 표면 처리하지 않은 시편보다 더 얇은 46.93 μm 로 나타났다.(Fig. 3(b)) 이들 막은 금속 시편을 복부 결합조직 부위에 삽입한 이후에 새로이 형성된 조직이다. 따라서 이 막의 구조는 아래의 느슨한 기존의 결합조직과 명확하게 구별되었으며 막의 섬유를 형성하는 섬유모세포 및 세포활동성이 적은 섬유세포가 막 내에 존재하였다. 또한 비교군으로 삽입한 알루미늄과 스테인레스 강 316L을 삽입한 경우, 각각 168.65 μm 및 100.95 μm 로 나타나 실험군인 티타늄에 비해 유의한 차이를 보였다.(Fig. 3(c, d))

비교적 섬유성 막의 두께가 얇게 형성된 티타늄 및 화학적으로 표면처리한 시편의 조직을 보면 막의 두께가 얇은 것은 물론 막 자체의 결합 조직도 두꺼운 막이 형성된 알루미늄이나 스테인레스 강에 비해서 섬유 조직이 성글고 또 섬유 사이에 있는 섬유모세포나 혹은 섬유세포의 수량도 적게 나타났다.

IV. 고 찰

뼈처럼 단단하지 않은 연한 조직에 매식체를 삽입할 경우 그 매식체를 둘러싸는 섬유성 결합조직 막이 형성된다는 사실은 잘 알려져 있으며 이 막의 두께를 측정하여 생체적합성을 평가할 수 있다는 것도 또한 잘 확립되어 있다.¹⁴⁾ 따라서 매식체가 오랫동안 체내에 위치하고 그 기능을 유지하는지를 연구하기 위해서는 둘러싸는 섬유성 막이나 혹은 막의 형성과정을 이해하는 것이 중요하다.¹⁵⁾ 막의 형성과정을 보면, 매식체를 삽입했을 때 대식세포가 먼저 매식체의 표면으로 접근하고 이 대식세포의 자극에 의해 섬유모세포와 결합조직이 증식하여 결국 매식체 주위를 둘러싸는 섬유성 결합조직 막을 형성하게 된다.¹⁶⁾ 티타늄과 같은 금속 매식체에 대한 피하 결합조직의 조직학적 반응은 생체적합성 평가에 중요한 부분이며 또한 결합조직 막에 있는 세포가 생체적합성 평가의 좋은 지표가 될 수 있다고 알려져 있다.^{4,6)} 이처럼 매식체를 둘러싸는 섬유성 막은 생체적합성 평가에 잘 이용될 수 있다. 본 실험에서는 표면 처리하지 않은 순수한 티타늄 시편을 삽입한 경우, 형성된 막의 두께는 52.20 μm 이며, 97% H_2SO_4 와 30% H_2O_2 의 1:1(vol %) 혼합수용액에서 40°C로 1시간 동안

화학적인 표면처리를 실시한 후, 400°C에서 1시간 동안 열처리한 시편의 경우, 표면 처리하지 않은 시편보다 더 얇은 46.93 μm 로 나타나 유의한 차이를 보이지 않았다.(Fig. 3(b)) 또한 비교군으로 삽입한 알루미늄과 스테인레스 강을 삽입한 경우, 각각 168.65 μm 및 100.95 μm 로 나타나 실험군인 티타늄에 비해 유의한 차이를 보였다. 이런 결과는 Lee^{17,18)}가 보고한 내용에서도 볼 수 있는데 순수한 티타늄보다 티타늄 합금이나 대조군인 스테인레스 강 주위에 형성된 막의 두께가 더 두꺼운 경향을 보여 적합성이 떨어지는 것으로 되어 있다. 이런 결과로 볼 때 본 실험에서 적용한 화학적 표면처리의 티타늄의 생체적합성이 더 우수한 것으로 생각된다.

또한, 매식체 표면의 micron 수준의 거친 면이 세포배양 시에 세포의 반응을 조절하고 생체 내에서는 생체적합성과 조직 부착을 조절하는데, 조직과 부착이 잘 되는, 즉 가장 높은 생체적합성을 나타내는 매식체의 표면은 1-3 μm 의 일정한 표면조도를 나타낸 것이라고 하였다.¹⁹⁾ 본 실험에서도 세포 부착실험을 실시하지는 않았지만, 화학적 표면처리를 실시한 시편의 표면 평균조도가 2.251 μm 로 나타나 세포반응을 조절하고 조직부착이 잘 될 것으로 생각된다. 또한, 생체적합성을 높이기 위해서는 매식한 금속의 표면에 아파타이트 층이 형성되는 것이 중요한데,⁹⁾ Li 등²⁰⁾은 졸겔 방법에 의해 형성된 수화티타니아 층이 유사체액에서 아파타이트를 형성한다고 보고하였으며, 이는 Ti-OH 군이 체내에서 아파타이트 형성에 중요한 역할을 한다고 하였다. 또한, 티타늄 임플란트 표면에 골 조직 내 체액 중의 Ca과 P 등의 무기이온이 흡착되어 인산칼슘의 석출이 일어나고, 이것이 결정화되어 아파타이트 상을 이루면 골조직과의 결합이 가능하지만, 골조직과 임플란트 사이에 골유착(osseointegration)이 일어나기까지는 수개월의 시간이 소요되므로 아파타이트의 생성을 촉진하기 위해 티타늄 표면에 아파타이트나 생체 내에서 높은 활성을 보이는 세라믹 재료를 코팅하는 방법,¹⁰⁾ 칼슘이온을 주입하는 방법,¹¹⁾ 알칼리금속 이온을 포함하는 전해질 수용액에 처리하는 방법,²¹⁾ H_2O_2 에 처리하는 방법¹²⁾ 등이 검토되어 왔다.

Wu 등²²⁾은 상용 순 티타늄 시편을 15 wt% H_2O_2 의 수용액에서 80°C로 1시간 동안 침적한 후 300°C에

V. 결 론

서 1시간 동안 열처리를 실시한 결과, 티타늄 표면에 미세균열을 가진 다공질 구조의 anatase 층이 형성되어 아파타이트 생성에 기여한다고 하였다. 또한, Lee¹³⁾는 H₂O₂와 TaCl₅의 금속염화물이 혼합된 수용액에서 티타늄 및 티타늄 합금에 대하여 화학적인 표면처리를 실시하여, 그 표면에 티타니아 겔층을 형성하였으며, 400℃에서 1시간 동안 열처리 시 비정질의 티타니아 겔층이 결정질로 변하며, 이렇게 표면처리 한 시편을 유사체액에 침적시 표면에 구형의 아파타이트 층이 형성되어 생체활성을 띤다고 하였다. 본 실험에서도 97% H₂SO₄와 30% H₂O₂의 1:1(vol %) 혼합수용액에서 40℃로 1시간 동안 화학적으로 표면처리와 열처리를 수행한 시편에서 결정립 내에 표면의 조도가 증가된 조직이 관찰되며, HBSS에 15일 동안 침적한 시편에서 구형의 아파타이트가 표면 전체에 형성되었고, EDX 및 XPS 분석 결과 기지의 Ti와 Ca 및 P의 이온이 검출된 것으로 보아 화학적 표면처리가 생체활성도에 영향을 미친다고 판단할 수 있다. 또한, Wang 등²³⁾은 열처리 온도가 400℃에서부터 rutile의 피크가 생성되기 시작하여 온도가 증가될수록 anatase 피크의 회절강도가 감소하는 반면 rutile의 상대적 강도는 증가한다고 하였다. 따라서 이들의 연구결과들을 비교해 볼 때, 상용 순 Ti를 97% H₂SO₄와 30% H₂O₂의 1:1(vol %) 혼합수용액에서 40℃로 1시간 동안 화학적으로 표면처리를 한 후, 400℃에서 1시간 동안 열처리 공정을 적용한, 본 실험의 경우, 2θ가 25° 및 48° 부근에서 titania의 비정질층의 형성은 화학적 표면처리에 의해 생성된 것이며, 이러한 비정질층이 400℃에서 1시간 동안의 열처리에 의해 anatase의 결정상으로 성장한 것으로 판단된다.

따라서 이러한 X-선회절 및 조직사진 결과로 미루어 볼 때, 상용 금속시편에 아무런 처리를 하지 않고 유사체액인 HBSS에 침적할 경우, 인체 내의 골 및 조직과의 용이한 결합을 촉진하는 아파타이트 상의 형성을 기대하기 어려운 반면, 본 실험에서 적용한 표면처리를 실시할 경우, 시편표면에 생체활성을 부여하여 아파타이트 상의 유도가 용이하며 생체적합성도 우수한 것으로 판단된다.

본 연구는 임플란트 재료로 널리 사용되고 있는 상용 순 티타늄 표면에 골 유사 아파타이트 층을 형성하여 생체활성을 부여할 목적으로 시행되었다. 준비한 시편을 48% HF, 62% HNO₃ 및 증류수의 혼합액으로 상온에서 2분 동안 산세 처리한 다음 97% H₂SO₄와 30% H₂O₂의 혼합 수용액에서 40℃로 1시간 동안 화학적으로 처리하고 400℃에서 1시간 동안 열처리하였다. 시편의 표면활성을 조사하기 위해 유사체액에 침적 처리하였고, 표면층의 변화를 조사하기 위해 TF-XRD, SEM, EDX 및 XPS로 분석하였다. 또한 본 실험에서 적용한 화학적인 표면처리 및 열처리를 실시한 시편의 생체적합성을 조사하기 위해 알루미늄과 스테인레스 강 316L을 대조군으로 하여 실험동물인 마우스의 복부 결합조직에 4주 동안 매식하였으며, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 상용 순티타늄의 화학적 표면처리로 생체 내에서 아파타이트 석출에 기여할 수 있는 비정질의 titania hydrogel 층이 형성되었으며, 평균 표면 거칠기는 2.175 μm로 증가된 양상을 보였다
2. 400℃에서 1시간 열처리시 비정질의 titania hydrogel 층이 성장한 anatase 상으로 변화되었으며, HBSS에 침적 시 시편 표면에 Ca과 P의 성분을 가진 구형의 균일한 아파타이트가 석출되었다.
3. 마우스의 복부결합조직 내 매식된 금속시편들을 둘러싼 섬유성 막의 평균 두께는 화학적 표면처리를 실시한 티타늄에서 46.98 μm로 무처리 상용 시편인 티타늄, 알루미늄 및 스테인레스 스틸 316L에서 각각 52.20 μm, 168.65 μm 및 100.95 μm 보다 막의 평균두께가 감소함으로써 생체적합성이 우수하였다.

참고문헌

1. Tang L, Eaton JW. Inflammatory response to biomaterials. Am J Clin Pathol 1995;103:466-471.
2. Thomsen P, Gretzer C. Macrophage interactions with modified material sur-

- faces. *Current Opinion Solid State and Materials Sci* 2001;5:163-176.
3. Jansen JA, Dhert WJ, van der Waerden JP, von Recum AF. Semi-quantitative qualitative histologic analysis method for the evaluation of implant biocompatibility. *J Invest Surg* 1994;7:123-134.
 4. Schreiber H, Kinzl HP, Thieme J. Computerized microscopic image analysis method in tissue-biomaterials interaction. *Biomater Artif Cells Artif Organs* 1990b;18:637-641.
 5. Williams SK, Berman SS, Kleinert LB. Differential healing and neovascularization of ePTFE implants in subcutaneous versus adipose tissue. *J Biomed Mater Res* 1997;35:473-481.
 6. Schreiber H, Keller F, Kinzl HP, Hunger H, Knofler W, Rubling U, Merten W. The question of the transmissibility of the result of subcutaneous tests of biomaterials from animals to humans. *Z Exp Chir Transplant Kunstliche Organe* 1990a;23:23-25.
 7. Van NR. Titanium: The implant material of today. *J Mater Sci* 1987;22:3801-3811.
 8. Groot KD. Medical applications of calciumphosphate bioceramics. *J Ceram Soc Japan* 1991;99:943-953.
 9. Kokubo T. Recent progress in glass-based materials for biomedical application. *J Ceram Soc Japan* 1991;99:965-973.
 10. Groot KD, Geesink RGT, Klein CPAT, Serekian P. Plasma-sprayed coating of hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res* 1987;21:1357-1387.
 11. Hanawa T, Asami K, Asaoka K. Micro-dissolution of calcium ions from calcium-ion-implanted titanium. *Corros Sci* 1996;38:1579-1594.
 12. Tengvall P, Elwing H, Lundstrom I. Titanium gel made from metallic titanium and hydrogen peroxide. *J Colloid Interface Sci* 1989;130:405-413.
 13. Lee MH. Effect of surface modification of titanium implant on the calcium phosphate formation. *J Kor Res Soc Dent Mater* 2003;30:63-68.
 14. Morehead JM, Holt GR. Soft-tissue response to synthetic biomaterials. *Otolaryngol Clin North Am* 1994;27:195-201.
 15. Johnson R, Harrison D, Tucci M, Tsao A, Lemos M, Puckett A, Hughes JL, Benghuzzi H. Fibrous capsule formation in response to ultra high molecular weight polyethylene treated with peptides that influence adhesion. *Biomed Sci Instrum* 1997;34:47-52.
 16. Salthouse TN. Some aspects of macrophage behavior at the implant interface. *J Biomed Mater Res* 1984;18:395-401.
 17. Lee MH. Biocompatibility of a modified metallic surface of Ti and Ti-6Al-4V alloy with the connective tissue of mouse. *Metals and Materials Int* 2000;6:373-379.
 18. Lee MH, Yoon DJ, Won DH, Bae TS, Watari F. Biocompatibility of surface treated pure titanium and titanium alloy by *in vivo* and *in vitro* test. *Metals and Materials Int* 2003;8:35-42.
 19. von Recum, AF, van Kooten TG. The influence of micro-topography on cellular response and the implications for silicone implants. *J Biomater Sci Polymer Ed* 1995;7:181-198.
 20. Li P, Ohtsuki C, Kokubo T, Nakanishi K, Soga N, Groot KD. The role of hydrated silica, titania and alumina in inducing apatite on implants. *J Biomed Mater Res* 1994;28:7-15.
 21. Kokubo T, Mijaji F, Kim HM, Nakamura T. Spontaneous apatite formation on

- chemically surface treated Ti. *J Am Ceram Soc* 1996;79:1127-1129.
22. Wu JM, Hayakawa S, Tsuru K, Osaka A. Porous titania films prepared from interactions of titanium with hydrogen peroxide solution. *Scripta Materialia* 2002; 46:101-106.
23. Wang XX, Hayakawa S, Tsuru K, Osaka A. Improvement of bioactivity of H₂O₂/TaCl₅-treated titanium after subsequent heat treatment. *J Biomed Mater Res* 2000; 52:171-176.

Reprint request to:

Min-Ho Lee, Ph.D.

Department of dental biomaterials, School of Dentistry, Chonbuk National University
664-14 Deokjin-Dong, Jeonju, Jeonbuk, 561-756, Korea
LMH@chonbuk.ac.kr

ABSTRACT

EFFECT OF CHEMICAL TREATMENT ON THE BIOACTIVITY OF TITANIUM

Kwan-Sik Min, D.D.S., M.S.D., Min-Ho Lee, Ph.D.*, Seung-Geun Ahn, D.D.S., Ph.D.,
Charn-Woon Park, D.D.S., Ph.D.

*Department of Prosthodontics and *Dental Biomaterials, School of Dentistry, Chonbuk National University*

Statement of problem: Titanium is widely used as an implant material for artificial teeth. Also, studies on surface treatment to form a fine passive film on the surface of commercial titanium or its alloys and improving bioactivity with bone have been carried out. However, there is insufficient data about the biocompatibility of the implant materials in the body.

Purpose: The purpose of this study was to examine whether the precipitation of apatite on titanium metal is affected by surface modification.

Materials and methods: Specimens chemically washed for 2 minute in a 1:1:1.5 (in vol%) mixture of 48% HF, 60% HNO₃ and distilled water. Specimens were then chemically treated with a solution containing 97% H₂SO₄ and 30% H₂O₂ at 40°C for 1 hour, and subsequently heat-treated at 400°C for 1 hour. All specimens were immersed in the HBSS with pH 7.4 at 36.5°C for 15 days, and the surface were examined with TF-XRD, SEM, EDX and XPS. Also, commercial purity Ti specimens with and without surface treatment were implanted in the abdominal connective tissue of mice for 4 weeks. Conventional aluminium and stainless steel 316L were also implanted for comparison.

Results and conclusions: The results obtained were summarized as follows.

1. An amorphous titania gel layer was formed on the titanium surface after the titanium specimen was treated with a H₂SO₄ and H₂O₂ solution. The average roughness was 2.175 μm after chemical surface treatment.
2. The amorphous titania was subsequently transformed into anatase by heat treatment at 400 °C for 1 hour.
3. The average thickness of the fibrous capsule surrounding the specimens implanted in the connective tissue was 46.98 μm in chemically-treated Ti, and 52.20, 168.65 and 100.95 μm , respectively in commercial pure Ti, aluminum and stainless steel 316L without any treatment.

Key words : Chemical surface treatment, Bioactivity, Biocompatibility, Apatite, Fibrous capsule thickness