

*In vivo*와 *in vitro* 에서 양극산화 처리한 타이타늄 시편의 상대적인 생체적합성 평가

이유미 · 이은정 · 염동선¹ · 김도순 · 이성태 · 김병일¹ · 조현욱*

순천대학교 자연과학대학 생명과학전공, ¹순천대학교 공과대학 금속공학전공

Received January 17, 2006 / Accepted March 27, 2006

Relative Biocompatibility Evaluation of Anodized Titanium Specimens *in vivo* and *in vitro*. Yu Mi Lee, Eun Jung Lee, Dong Sun Yeom¹, Do Soon Kim, Sung Tae Yee, Byung Il Kim¹ and Hyun Wook Cho*. *Department of Biology, College of Natural Sciences, Suncheon National University, ¹Department of Materials Science and Metallurgical Engineering, College of Engineering, Suncheon National University* – To evaluate the biocompatibility of untreated and anodized titanium specimens, the specimens were implanted in the subcutaneous tissue of the abdominal region of female mice for two weeks. The reaction of connective tissue to specimens was histologically studied. The implants were encapsulated by fibrous connective tissue consisting of fibroblast, fibrocyte and other cells including neutrophil, macrophage and giant multinucleated cell. Some newly formed blood vessels were located in the fibrous capsule surrounding the implant. Giant multinucleated cells were observed at the fibrous capsule adjacent to the implant. Kind of cell types and the thickness of fibrous capsules were examined quantitatively. Most of cell types located in the fibrous capsule were fibroblast and fibrocyte. The average thickness of fibrous capsules for the anodized specimens was much thinner than that of the untreated titanium specimen. Biocompatibility of titanium specimens were also studied by using cell culture method. The number of MG-63 cells was significantly increased on the anodized titanium specimens *in vitro* experiment. Our observations suggest that anodized titanium specimens are more effective for the improvement of biocompatibility *in vivo* and *in vitro*.

Key words – Biocompatibility, anodized titanium, mouse, MG-63 cell

인체에 사용되는 임플란트(implant)의 재료 성질에 따라 임상적 치료 결과에 중요한 영향이 나타날 수 있다. 이런 재료는 치과 치료, 정형외과 치료, 혈관이나 심장판막과 같은 심혈관 치료에 다양하게 사용되고 있다[11]. 최근에는 좋은 생체적합성, 부식에 대한 높은 저항성, 저렴한 구입 비용 등의 이유로 해서 타이타늄이 생체 내의 이식 재료로 광범위하게 이용되고 있다[15].

한편 타이타늄과 같은 동일한 재료를 임플란트 시편으로 사용하더라도 임플란트의 생체적합성 혹은 안정성은 임플란트 표면의 특징, 예를 들면 표면의 구조, 표면 산화물의 두께와 성장 등에 달려 있다는 것이 밝혀졌다[26]. 임플란트 표면의 특징이 임플란트의 생체 반응에 중요한 역할을 하는 것이 보고 됨에 따라 임플란트의 표면 처리 방법에 관심이 집중되었다[13]. 타이타늄 임플란트 표면을 처리하는 방법으로서 가열산화법, 화학산화법, 플라즈마 산화법 등이 있으며 최근에는 양극산화법을 이용하여 표면 처리하는 방법이 개발되어 주목을 받고 있다[28,32]. 양극산화법은 전기화학적 방법으로 임플란트의 표면에 거칠고 두꺼우며 기공을 가지는 산화물 피막을 형성하는 것이다[25].

이런 임플란트 재료를 사용하여 치과 치료나 정형외과 치

료의 경우처럼 임플란트를 뼈에 이식하여 생체적합성을 평가하기도 한다. 하지만 임상 전 단계에 있어서는 임플란트의 생체적합성 평가를 위해 동물의 피하조직을 이용하기도 하는데 이것은 실험하기가 편리한 점 때문이다[31]. 기니아피그, 흰쥐, 사람을 실험 대상으로 하여 피하 결합조직에 임플란트를 삽입하였을 때 임플란트에 대한 치유과정 혹은 결합조직의 반응은 근본적으로 유사한 경향을 보이기 때문에 동물에서 나타난 임플란트 반응 결과를 임상 기초자료로 활용할 수가 있다[23].

이번 연구에서는 앞의 다양한 표면 처리 방법 중 여러 단계의 전압에서 양극산화법으로 표면을 처리한 타이타늄의 생체적합성을 평가하고자 하였다. *in vivo*에서 생체적합성을 평가하기 위해, 마우스 복벽과 같은 피하 결합조직 내에 시편을 삽입하고 2주 후에 마우스를 희생하여 시편에 대한 조직 반응을 조직학적으로 평가하였다. 일반적으로 생체 내에 임플란트를 삽입했을 때 나타나는 생물학적 반응은 먼저 이식 후에 임플란트 주위를 둘러싸는 섬유성 결합조직 막의 형성이며 이어서 나타나는 심하고 만성적인 염증 변화이다. 그런 섬유성 막의 형성은 임플란트의 이식 실패를 예방하는데 있어서 중요하다[12]. 임플란트의 생체적합성이 좋지 않을 때는 두꺼운 섬유성 결합조직 막의 발생과 더불어 만성 염증이 일어난다[18]. 따라서 본 실험에서는 타이타늄을 이식한 후 나타나는 섬유성 막을 광학현미경으로 관찰하고 분석하여 생체적합성을 평가하고자 하였다. 아울러 타이타늄 시편

*Corresponding author

Tel : +82-61-750-3614, Fax : +82-61-750-3608

E-mail : hwcho@sunchon.ac.kr

위에서 세포를 배양하여 *in vitro* 상태에서 생체적합성을 평가하고 *in vivo*에서 평가한 결과와 비교해 보고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

생후 9주된 ICR계 마우스 암컷 12마리를 사육 상자 마다 3마리씩 넣어 동물 사육실에서 사육하였다. 실험용 펠렛 사료(제일사료주식회사)를 먹이로 주었으며 1차 증류수를 식이용 물로서 공급하였다. 사육실은 온도 21±3℃와 상대습도 50±10%를 유지하였으며 조명시간은 12시간을 주기로 하였다.

타이타늄 시편 제작 및 처리

본 연구에 사용한 시편은 공업용 순 타이타늄 판을 4×6×1(가로×세로×두께) mm의 크기로 절단하여 사용하였다. 준비한 시편을 #800~#1500의 emery paper로 연마하였고, 표면의 유기물질 제거를 위해 20% NaOH 용액으로 60℃에서 30분간 초음파 세척을 하였다. 모든 시편을 63% HNO₃ 용액 15 ml와 55% HF 3 ml에 증류수 82 ml를 첨가하여 총 100 ml의 혼합 산용액을 만든 다음 상온에서 5분 동안 산세(acid etching)한 후, 증류수에서 초음파 세척하였다.

초음파 세척 후, 금속 시편의 표면처리에 따른 상대적인 생체적합성을 평가하기 위해 세척한 순 타이타늄을 양극 산화 처리하였다. 양극 산화처리는 시편을 20 mA에서 각각 260 V, 280 V, 310 V 전압을 걸어 각각 hold time 10분 동안 표면처리를 하였다. 전해액으로는 glycerol 2-phosphate disodium salt hydrate 0.03 mol 과 calcium acetate 0.2 mol 을 사용하였다. 표면처리 후 시편을 증류수에서 세척하고 60℃에서 24시간 건조하여 사용할 시편을 완성하였다. 대조군의 경우, 산화처리를 하지 않은 시편을 사용하였다(Table 1).

주사전자현미경 관찰

대조군과 양극 산화 처리한 타이타늄 시편의 표면을 25 kV 상태에서 주사전자현미경(Hitachi S-3500N)으로 관찰하였다.

타이타늄 시편 이식

세균의 감염을 방지하기 위해 대조군 시편과 표면 처리한

타이타늄 시편을 멸균기에 넣어 가압 멸균하였다. 이어서 마우스 복부에 시편을 삽입할 수 있도록 수술 준비를 하였다. 마우스 한 마리마다 sodium pentobarbital을 50mg/kg 농도로 복강에 주입하여 마취시켰다. 완전히 마취된 쥐를 눕힌 다음 제모제(니크린, 일동제약)를 사용하여 복부의 털을 제거하고 털이 제거된 피부부위를 알코올로 소독하였다. 소독용 가위로 피부 1군데를 금속시편이 들어 갈 수 있는 3 mm 크기로 절개하고 피부와 복부근육 사이의 결합조직 부위에 멸균된 시편 1개를 넣었다. 그리고 봉합사로 절개부위를 봉합하였다. 대조군 및 양극 산화 처리한 시편 각각의 군별로 3마리의 마우스를 배당하였다. 그리고 복부 내에 타이타늄 시편을 이식해 두는 기간은 2주로 하였다.

생체조직 처리

타이타늄 시편 삽입 후 2주가 되었을 때 sodium pentobarbital로 마취시킨 후 제모 크림을 복부에 발라 다시 자라난 털을 제거하였다. 시편이 들어 있는 부위를 중심으로 복부 피부와 근육을 동시에 잘라내어 4% glutaraldehyde 용액에 최소 48시간 고정하였다. 이어서 핀셋으로 결합조직에 있는 금속시편을 조심스럽게 빼낸 다음, 포매 하기 전까지 잘라낸 복부 조직을 동일한 고정 용액인 4% glutaraldehyde에 보관하였다. 4℃에서 0.01 M phosphate buffer (pH 7.4)로 조직 샘플을 24시간 동안 수세하고 에틸알코올 탈수과정을 거친 다음 glycol methacrylate resin에 포매 하였다. 마이크로 톰으로 2.5 μm 두께의 절편을 만들어 슬라이드에 올렸다. 조직 염색방법인 hematoxylin-eosin을 사용하여 염색하고 광학 현미경으로 관찰하였다.

염상 처리 및 섬유성 결합조직 막 두께 측정

염색한 복부 조직 절편을 광학현미경(Olympus, BX50)으로 관찰하고 현미경에 부착된 SPOT 디지털 카메라(Diagnostic Instruments사의 Model No. 11.2 Color Mosaic)로 촬영하여 컴퓨터에 저장하였다. 생체적합성을 평가하기 위하여 현미경 상에 나타난 시편 임플란트를 둘러싸는 섬유성 결합조직 막의 두께를 측정하였다. 섬유성 막의 두께 측정은 Diagnostic Instruments사의 SPOT INSIGHT™ Software (Version 4.0)를 이용하였다. 섬유성 막 두께 측정은 1 마리의 마우스 복부조직 절편에서 10군데 씩, 군별로는 총 30회를 측정하고 그 평균값과 표준편차를 구하였다. 대조군 타이타늄 시편에 대한 표면처리를 한 각 시편 종류간의 유의한 차이는 t-test를 이용하였으며 p<0.05 일 때 유의한 차이가 있는 것으로 하였다.

섬유성 결합조직 막에 있는 섬유모세포(섬유세포 포함) 수에 대한 기타 세포 수의 상대적인 비율 측정

40배율로 현미경 관찰 시에 시편을 둘러싸는 섬유성 결합조직 막 63,800 μm²에 있는 섬유모세포와 섬유세포를 합한

Table 1. Various surface treatments employed in the present study

Material	Specimen Code	Surface treatment
Titanium	T1	No treatment (control)
	T2	Anodizing in 20 mA at 260V for hold time 10 min
	T3	Anodizing in 20 mA at 280V for hold time 10 min
	T4	Anodizing in 20 mA at 310V for hold time 10 min

세포 수에 대한 기타 세포(중성호성백혈구, 대식세포, 거대다핵세포 및 미확인 세포) 수의 상대적인 비율을 조사하였다. 세포 수의 측정은 1 마리의 마우스 복부조직 절편에서 얻은 섬유성 막에서 임의로 5 부위를 정하여 각각의 막 63,800 μm^2 에 있는 세포 수를 계산하고 그 평균값과 표준편차를 구하였다. 군별로는 총 15회를 측정하였다. 대조군 타이타늄 시편에 대한 표면처리를 한 각 시편 종류간의 유의한 차이는 t-test를 이용하였으며 $p < 0.05$ 일 때 유의한 차이가 있는 것으로 하였다.

세포배양에 사용한 시약

세포 배양에 필요한 배지 Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM)과 배지에 첨가하는 항생제(antibiotic-antimycotic) 및 FBS (fetal bovine serum)는 Gibco BRL (USA) 제품을 사용하였고, 2-ME (2-mercaptoethanol)와 sodium bicarbonate (NaHCO_3)는 Sigma (USA) 제품을 사용하였다. 또한 세포 분리에 필요한 Trypsin-EDTA는 Gibco BRL(USA) 제품을 사용하였고, 세포 증식을 측정하는데 사용한 Cell titer 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay는 Promega (USA) 제품을 사용하였다.

MG-63 세포배양 및 세포증식 측정

Human osteosarcoma에서 분리한 cell-line인 MG-63 (ATCC CRL-1427, USA)은 Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM)에 sodium bicarbonate (NaHCO_3 , 3.7g/l), 항생제(10,000 units/ml penicillin G sodium, 10,000 units/ml streptomycin sulfate, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ amphotericin B), 2-ME (2-mercaptoethanol, 50 μM), 10% FBS를 첨가한 배지를 이용하여 37°C, 5% CO_2 배양기에서 배양하였으며, 3일에 한번씩 배지를 갈아 주었다. 또한 세포증식과 세포 수 측정에 사용한 세포는 0.05% Trypsin-EDTA로 처리한 후, 회수하여 사용하였다.

세포증식 측정에는 배양한 MG-63을 37°C에서 0.05% Trypsin-EDTA로 2분간 처리한 후, 10% FBS/DMEM을 첨가하여 회수한 세포를 사용하였다. 각 금속시편에서 자란 세포의 증식 정도를 측정하기 위해 회수한 세포를 금속시편이 들어 있는 48 well micro-plate에 $2 \times 10^4/\text{well}$ 이 되도록 분주하고 3일 동안 37°C, 5% CO_2 배양기에서 배양한 뒤, 시편을 배양한 well에서 분리하였다. 분리된 시편에 Cell titer 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay를 첨가하고, 2~8시간 동안 배양한 다음, Microplate reader (Titertek Multiscan Plus, Finland)로 490 nm에서 O.D.값을 측정하여 증식 정도를 측정하였다. 각 금속시편은 triplicate로 실험을 진행하였고, 평균값을 구해 결과에 나타내었다. 대조군 시편과 표면처리를 한 각 타이타늄 시편 종류간의 유의한 차이는 t-test를 이용하였으며, $p < 0.05$ 일 때 유의한 차이가 있는 것으로 하였다.

MG-63 세포 수 측정

세포 수 측정에는 배양한 MG-63에 0.05% Trypsin-EDTA를 37°C에서 2분간 처리한 후, 10% FBS/DMEM을 첨가하여 회수한 세포를 사용하였다. 회수한 세포를 금속시편이 들어 있는 48 well micro-plate에 $2 \times 10^4/\text{well}$ 이 되도록 분주하고 3일 동안 37°C, 5% CO_2 배양기에서 배양한 뒤, 각 금속시편에 자란 세포를 counting하기 위해 시편과 함께 배양한 well에서 분리하여 0.05% Trypsin-EDTA를 처리한 후, 세포를 수거하여 counting하였다. 각 금속시편은 triplicate로 실험을 진행하였고, 평균값을 구해 결과에 나타내었다. 대조군 시편과 표면처리를 한 각 타이타늄 시편 종류간의 유의한 차이는 t-test를 이용하였으며, $p < 0.05$ 일 때 유의한 차이가 있는 것으로 하였다.

결 과

타이타늄 시편 표면에 대한 주사전자현미경 관찰

타이타늄 시편의 표면 구조를 주사전자현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 1에 잘 나타나 있다. 아무런 산화 처리를 하지 않은 대조군 시편 T1의 경우, 표면에 다공성 구조가 관찰되지 않았다(Fig. 1A). 260 V에서 산화 처리한 시편 T2에서는 분화구 형태의 다공성 구조가 잘 나타났으며(Fig. 1B), 280 V에서 산화 처리한 시편 T3 (Fig. 1C), 그리고 310 V에서 산화 처리한 시편 T4 (Fig. 1D)에서 볼 수 있는 것처럼 전압이 높아질수록 다공성 구조의 구멍 직경이 증가하였다.

복부 결합조직의 광학 현미경 관찰

복부의 결합조직(connective tissue)에 금속 시편이 들어가 있던 자리는 빈 공간으로 남아 있어서 쉽게 구별되었다(Fig. 2). 기존의 결합조직은 섬유와 세포들이 성글게 배열되어 있

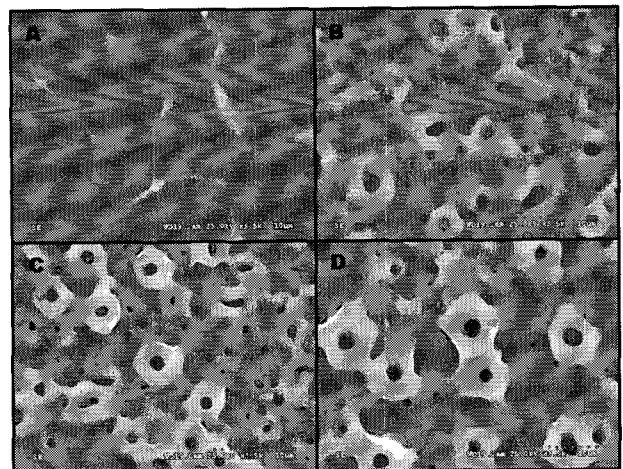


Fig. 1. Scanning electron micrographs of untreated titanium surface(A), and anodized titanium surfaces at 260V(B), 280V(C) and 310V(D). (original magnification $\times 3500$)

있고 hematoxylin-eosin에 약하게 염색되었다. 그러나 시편 주위에 새로이 형성된 섬유성 결합조직 막은 치밀하게 나타났으며 또한 hematoxylin-eosin에 진하게 염색되어 기존의 결합조직과 뚜렷하게 구별되었다. 이 결합조직 막에는 주로 섬유모세포와 섬유세포가 혼재하고 있었으며 막에 혈관이 존재하기도 하였다(Fig. 3). 이 혈관이 비어 있는 경우도 있었지만(Fig. 3A), 적혈구가 들어차 있는 것도 관찰되었다(Fig. 3B). 막의 두께가 일정한 경우도 있었지만 시편에 따라 두께의 차이가 있는 것도 관찰되었다. 시편의 표면과 바로 접촉했던 막 쪽에는 거대다핵세포(giant multinucleated cell)가 나타나기도 하였다(Fig. 3A). 피부조직 아래의 털주머니(hair

follicle)가 여러 개 나타났으며 털주머니의 바깥뿌리집(external root sheath)을 쉽게 관찰 할 수 있었다(Fig. 2). 시편이 삽입된 결합조직 부위에 괴사(necrosis), 육아종(granuloma), 이영양성 석회화(dystrophic calcification)와 같은 현상은 나타나지 않았다.

시편 주위에 새로이 형성된 섬유성 결합조직 막의 두께를 측정하였다. 순수한 타이타늄 중에서 표면을 처리하지 않은 대조군 시편 T1의 경우, 결합조직 막의 두께는 45.92 μm 로 나타났다(Table 2). 260 V에서 산화 처리한 T2의 경우, 막의 두께는 36.53 μm 로 나타나 대조군 T1 시편과는 유의한 차이를 보였다. 280 V에서 산화 처리한 T3의 경우, 막의 두께는 37.78 μm 로 나타났고 310 V에서 산화 처리한 T4의 경우 막의 두께는 40.19 μm 로 나타나 역시 대조군 시편과 유의한 차이를 보였다.

그리고 이 섬유성 결합조직 막에 있는 섬유모세포와 섬유세포 외에 기타 세포로서 중성호성백혈구, 대식세포, 거대다핵세포(giant multinucleated cell) 및 미확인 세포들도 존재하였다(Fig. 3). 이 섬유성 막 63,800 μm^2 면적에 존재하는 기타 세포 수에 대한 섬유모세포와 섬유세포를 합한 세포 수의 상대적인 비율은 84.8%~90.6%로 나타났다(Table 3). 염증 반응과 관련 있는 중성호성백혈구 및 대식세포와 같은 기타 세포의 비율이 가장 적게 나타난 시편은 280 V에서 산화 처리한 T3 시편으로서 그 상대적 비율은 9.4%이었다. 상대적으로 염증 관련 세포가 많이 나타난 경우는 15.2%로 확인된 대조군 T1 시편이었다.

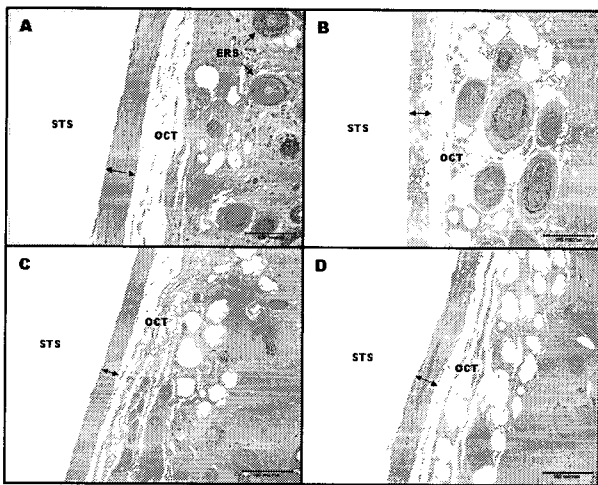


Fig. 2. Photomicrographs of abdominal connective tissue from untreated(A), anodized at 260V (B), 280V (C) and 310V (D) titanium specimens. Double arrows indicate the thickness of fibrous capsule surrounding the titanium specimen. Abbreviations used: ERS, external root sheath; OCT, old connective tissue; STS, space formerly occupied by titanium specimen. Bars size= 100 μm .

Table 2. Thickness measurements of the fibrous capsule surrounding the titanium specimens after 2 weeks of implantation in connective tissue of abdomen

Specimen code	Thickness (μm)
T1	45.92±8.53
T2	36.53±4.70*
T3	37.78±8.64*
T4	40.19±9.55*

Values represent mean±SD.

*p < 0.05

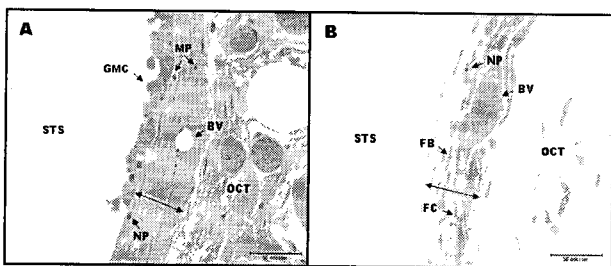


Fig. 3. Photomicrographs of several cell types and newly formed blood vessels from untreated(A) and anodized at 310V(B) titanium specimens. Double arrows indicate the thickness of fibrous capsule surrounding the titanium specimen. Abbreviations used: BV, blood vessel; FB, fibroblast; FC, fibrocyte; GMC, giant multinucleated cell; MP, macrophage; NP, neutrophil; OCT, old connective tissue; STS, space formerly occupied by titanium specimen. Bars size= 50 μm .

Table 3. The relative ratio between fibroblast and fibrocyte, and other cells in the fibrous capsule 63,800 μm^2 surrounding the titanium specimens after 2 weeks of implantation in connective tissue of abdomen

Specimen code	Relative number of fibroblast and fibrocyte (%)	Relative number of other cells§ (%)
T1	84.8	15.2
T2	89.9	10.1*
T3	90.6	9.4*
T4	85.7	14.3

§ Other cells include neutrophil, macrophage, giant multinucleated cell and unidentified cells.

*p < 0.05

Table 4. Cell proliferation and number of MG-63 cultured on various titanium specimens

Specimen code	Cell proliferation (O.D value at 490nm)	Cell number ($\times 10^4$)
T1	0.0392 \pm 0.0042	0.078 \pm 0.025
T2	0.0401 \pm 0.0012	0.099 \pm 0.015*
T3	0.0424 \pm 0.0016	0.121 \pm 0.022*
T4	0.0351 \pm 0.0074	0.105 \pm 0.019*

Values represent mean \pm SD.

* $p < 0.05$

in vitro에서 MG-63 세포의 증식 및 세포 수 측정

세포의 증식이 많을수록 O.D. 값이 높는데 가장 높은 경우는 0.0424로 나타난 시편 T3이었다(Table 4). 그렇지만 표면을 처리하지 않은 대조군 시편 T1과는 유의한 차이를 보이지 않았다. 그리고 시편 위에서 세포를 배양했을 때 가장 많은 세포 수를 나타낸 시편은 0.121 $\times 10^4$ 개수를 나타낸 T3이었고 대조군 시편 T1과 유의한 차이를 보였다(Table 4). 반대로 가장 적은 세포 수를 보인 시편은 표면을 처리하지 않은 대조군 시편 T1 으로서 0.078 $\times 10^4$ 를 나타내었다.

고 찰

본 실험의 경우와 같이 뼈처럼 단단하지 않은 연한 조직에 임플란트를 삽입할 경우, 다양한 생체 반응이 일어난다. 보통 시편을 삽입하기 위해 동물에 대한 의과적 처치를 하면서 심한 염증, 만성 염증, 섬유형성 및 시편을 둘러싸는 막의 형성과 같은 일련의 과정이 일어난다[29]. 즉, 그 임플란트를 둘러싸는 섬유성 결합조직 막이 새롭게 형성되며 이 막의 두께를 측정함으로써 생체적합성을 평가할 수 있다는 것이다[9,16,20]. 임플란트를 둘러싸는 결합 조직 막의 두께가 얇을수록 생체적합성이 좋은 것으로 판단한다[5,29]. 섬유성 막이 형성되는 데는 여러 요소가 관여하는데, 즉 임플란트의 크기, 임플란트의 모양, 표면구조, 임플란트가 삽입되는 위치, 임플란트 표면의 화학적 성질, 임플란트 표면의 다공성 크기 등이다[12]. 따라서 임플란트가 오랫동안 체내에 위치하고 그 기능을 유지하는지를 연구하기 위해서는 둘러싸는 섬유성 막이나 혹은 막의 형성과정을 이해하는 것이 중요하다[6]. 막의 형성과정을 보면, 임플란트를 삽입했을 때 대식세포가 먼저 임플란트의 표면으로 접근하고 이 대식세포의 자극에 의해 섬유모세포와 결합조직이 증식하여 결국 임플란트 주위를 둘러싸는 섬유성 결합조직 막을 형성하게 된다[22]. 이 막은 섬유모세포, 염증 세포와 콜라겐 섬유로 이루어져 있으며[11] 또한 이 막에 새로운 혈관이 생성되기도 한다[30]. 본 실험의 Fig. 3에서 볼 수 있는 것처럼 대조군 T1 시편 및 310 V로 양극 산화 처리한 T4 시편의 경우, 시편을 둘러싸는 결합조직 막에 새로이 형성된 혈관과 그 혈관 속에

들어 있는 적혈구가 잘 관찰되었다. 얇은 결합조직 막에 비해 두꺼운 결합조직 막에 더 많은 혈관, 대식세포, 섬유모세포, 콜라겐 섬유가 분포한다는 보고도 있다[2].

현재 상업적으로 이용되고 있는 순수 타이타늄과 타이타늄 합금은 정형외과(orthopedics)나 혹은 치아보철(dental prosthesis)에 이상적인 임플란트 재료로 확립되어 있다[11]. 타이타늄과 같은 금속 임플란트에 대한 피하 결합조직의 조직학적 반응은 생체적합성 평가에 중요한 부분이며[23] 또한 결합조직 막에 있는 세포가 생체적합성 평가의 좋은 지표가 될 수 있다고 알려져 있다[24]. 이처럼 임플란트를 둘러싸는 섬유성 막은 생체 적합성 평가에 잘 이용될 수 있다[1]. 본 실험에서는 표면을 처리하지 않은 타이타늄과 표면을 산화 처리한 타이타늄과의 생체적합성을 상호 비교하였다. 일반적으로 타이타늄을 양극산화 처리하면 타이타늄 표면에 존재하는 산화막(oxide layer)이 보다 균일하게 되면서 두껍고 치밀하게 되는데, 높은 전압을 가했을 경우 분화구 형태의 미세다공성 구조(microporous structure)가 형성된다[19,25]. 전압이 높을수록 표면의 다공성 구조의 구멍크기가 커지며 또한 산화 처리에 의해 생긴 타이타늄 표면 산화피막(oxide film)도 두꺼워진다[4]. 이런 산화처리에 의해 형성된 구조, 즉 산화 막의 두께, 다공성 구조 및 분포 등에 의해 생체 조직의 반응이 다르게 나타나는 것으로 알려져 있다[27,28]. 골에 타이타늄 시편을 이식한 실험에서도 3-200 nm의 산화피막 두께를 가진 시편에 비해 600-1000 nm 피막 두께를 가진 시편에서 골 조직 반응이 더 크게 일어났다고 하는 보고에서 볼 수 있는 것처럼 시편의 피막 두께가 생체에 영향을 미친다는 사실을 알 수 있다[27].

본 실험에서는 여러 단계의 전압에서 표면을 산화처리 하여 만든 시편을 복부 결합조직에 삽입하였다. Table 2에서 볼 수 있는 것처럼 모든 전압 단계에서 처리한 시편을 둘러싸는 마우스 섬유성 결합조직 막의 두께가 감소하여 생체적합성이 증가하는 것으로 나타났다. 아울러 산화 처리한 시편을 상호 비교해 보았을 때, 260 V나 280 V에서 산화 처리한 시편에 비해 높은 전압인 310 V에서 산화 처리한 시편의 경우는 섬유성 막의 두께가 더 두껍게 나타났다. 따라서 310 V에서 처리한 시편은 260 V와 280 V에서 처리한 시편보다 오히려 생체적합성이 감소하는 것으로 나타났다. 이처럼 임플란트의 표면에 따라 생체적합성이 다르게 나타나는 경우를 다음과 같은 이론으로 설명하기도 한다. 즉, 임플란트의 표면이 매끄러울 때는 임플란트를 둘러싸는 결합조직 막의 두께가 두꺼운데 그 이유는 임플란트와 접하는 결합 조직이 임플란트의 표면에 부착되지 못하고 미끄러져 계속적으로 기계적 자극을 유발하며 이로 인해 육아종 반응(granulation response)이 일어나서 막이 두꺼워 진다는 것이다. 이에 반해 표면이 다공성 구조일 때는 막 조직이 임플란트의 다공성 표면에 단단히 고정되어 기계적 자극이 일어나지 않으며 따라

서 막의 두께가 얇아진다는 것이다[5]. 본 실험의 경우, 시편 표면의 다공성 구조의 구멍이 비교적 균일하고 구멍의 직경이 작은 260 V와 280 V의 시편에서는 캡슐 막의 두께가 얇아서 증가한 생체적합성을 보였으며 상대적으로 시편 표면의 다공성 구멍의 직경이 큰 310 V에서 처리한 시편의 경우에는 생체적합성이 감소되었다. 보고에 의하면 시편 표면의 거칠기(surface roughness)가 어떤 임계값(critical value) 이상으로 높으면 대식세포 반응이 일어나며 이로 인해 파골세포의 골 흡수를 활성화하고 결과적으로 골 분해를 유발하여 생체적합성을 감소시키는 것으로 알려져 있다[8]. 따라서 260 V와 280 V에서 처리한 시편보다 310 V에서 처리한 시편에서 상대적으로 낮은 생체적합성을 보인 이유를 표면의 어떤 임계값과 연관 지어 설명할 수 있지 않을까 생각된다.

복부 피하에 시편을 넣었을 경우, 시편을 둘러싸는 새로이 형성된 결합조직 막에 대식세포나 혹은 중성호성백혈구 같은 염증 세포가 존재하게 된다[3]. 본 실험에서는 염증 반응에 관여하는 대식세포나 혹은 중성호성백혈구 같은 염증 세포가 상대적으로 많이 나타난 경우는 15.2%의 비율을 보인 대조군 T1 시편이었다. 이 시편의 경우에는 둘러싸는 결합조직 막의 두께도 가장 두껍게 나타나 염증관련 세포가 많은 경우와 일치하였다. 다른 보고에 의하면 암컷과 수컷에 따라 염증 반응이 다르게 나타났는데 암컷의 경우 시편 삽입 후 14일까지는 염증 반응이 심해졌다가 42일 후에는 약해지면서 일정하게 염증 반응이 나타나는 것으로 밝혀졌다. 이에 비해 수컷의 경우 70일 까지 서서히 염증 반응이 약해지는 것으로 나타나는 등 동일한 시편에 대하여 암컷과 수컷의 염증 반응이 다르게 나타나는 것으로 보고되었다. 본 실험의 경우에는 암컷만 사용하였기 때문에 동일한 시편에 대하여 암컷과 수컷에 따라 다르게 염증 반응이 나타나는지는 추후 실험을 통하여 확인할 수 있을 것으로 생각된다.

시편과 시편을 둘러싸는 결합조직 막이 접하는 막의 경계면에 거대다핵세포가 나타나는데 생체적합성이 좋을수록 그 세포의 수가 적으며[20] 또한 이 때 막의 두께도 감소되어 나타나는 것으로 보고되어 있다[29]. 거대다핵세포는 활성화된 대식세포가 융합하여 생성되는 것으로 보이지만[17] 생성과정에 대하여는 완전히 밝혀져 있지 않다[33]. 거대다핵세포 형성에는 여러 요소, 즉 임플란트 주위의 pH, 여러 세포에서 방출되는 cytokine, 그리고 임플란트의 화학적 성분과 물리적 성질에 의해 영향을 받는다[7,14]. 본 실험에서도 결합조직 막의 두께가 두껍게 나타나 생체적합성이 감소한 T1 시편의 경우, 시편과 접하는 결합조직 막에 거대다핵세포가 관찰되었다. 막의 두께가 얇은 T2와 T3 시편에서는 거대다핵세포가 잘 관찰되지 않았다.

Hur 등[4]은 골모세포를 이용한 *in vitro* 실험에서 200 V, 250 V, 300 V로 각각 산화 처리한 타이타늄이 처리하지 않은 순수 타이타늄에 비해 골모세포의 증식이 많은 것으로 보아

양극 산화법이 임플란트 표면 처리에 효과적인 방법이라고 하였다. 이들은 전압을 높일수록 표면 거칠기가 증가하고 산화피막의 두께도 증가함과 동시에 표면의 다공성 구조의 구멍 직경도 증가한다고 하였다. Ti6Al4V 타이타늄 합금을 열산화처리(thermal oxidation treatment)한 경우에도 표면 거칠기가 증가하고 *in vitro*에서 수행한 골모세포 반응에서도 생체적합성이 증가한 것으로 보고되었다[21]. 본 실험에서도 산화 처리를 하지 않은 대조군 타이타늄 시편에서는 다공성 구조가 관찰되지 않았으나 산화 처리를 한 타이타늄 표면에서는 다공성 구조가 관찰되었다. 또한 산화 처리 시에 260 V, 280 V, 310 V로 전압을 높이면 각각의 타이타늄 시편에서 표면 다공성 구조의 구멍 직경이 증가하는 것이 주사전자현미경에서 뚜렷이 관찰되었다. 산화 처리 방법 외에도 시편을 코팅 하여 표면을 변화 시켜도 생체적합성의 변화를 볼 수 있다. 즉, 다양한 종류의 폴리머를 그대로 시편으로 사용하거나 혹은 이들 폴리머에 titaniumcarboxonitride를 코팅한 다음 시편으로 이용하여 세포 증식, interleukin 방출, *in vitro*에서 생체적합성을 평가했을 경우 코팅한 시편에서 생체적합성이 증가하는 것으로 알려져 있다[10].

본 세포 증식 실험의 Table 3에서 볼 수 있는 것처럼 260 V, 280 V, 310 V에서 산화 처리한 T2, T3, T4의 시편이 처리하지 않은 순수한 대조군 타이타늄 T1보다 더 높은 O.D. 값을 보이는 경향을 나타내었다. 즉 대조군 시편에 비해 유의한 차이는 없었지만 산화 처리한 시편은 모두 세포 증식이 높은 경향을 보여 앞의 보고와 일치하는 결과를 나타내었다. 세포 수 측정 실험에서도 대조군 시편 T1의 0.078×10^4 세포 수에 비해 산화 처리한 T2, T3, T4 시편에서 모두 더 높은 세포 수를 보였으며 또한 유의한 차이를 나타내었다. 이 결과는 마우스의 복부 결합조직 막의 두께 측정 실험에서 대조군에 비해 증가한 생체적합성을 보였던 T2, T3, T4시편과 일치하는 결과를 보여주었다.

위의 *in vivo*와 *in vitro* 결과를 종합해 보면 여러 단계의 전압에서 양극산화 처리한 타이타늄을 마우스의 복부 결합조직에 삽입했을 때 대조군에 비해 처리한 모든 시편에서 시편을 둘러싸는 섬유성 결합조직 막이 얇게 나타나 생체적합성이 증가되었다. 세포 배양을 한 *in vitro* 실험의 경우, *in vivo*의 경우와 마찬가지로 산화 처리한 모든 시편에서 대조군 보다 높은 세포 수의 증가가 관찰되어 결과적으로 생체적합성이 향상되었다. 따라서 *in vivo*와 *in vitro*에서 평가한 생체적합성이 비교적 일치하는 결과를 나타내었다. 한편 가장 높은 310V에서 산화 처리한 시편의 경우에는 260 V와 280 V에서 산화 처리한 시편 보다 오히려 상대적으로 생체적합성이 감소되었다. 이 결과는 시편 표면의 거칠기가 어떤 임계값 이상으로 높으면 오히려 생체적합성이 감소한다는 사실과 관련 있는 것인지 혹은 다른 원인에 의한 것인지는 추후 논의가 필요할 것으로 사료된다.

요 약

처리하지 않은 타이타늄과 양극 산화 처리한 타이타늄 시편의 생체적합성을 평가하기 위해, 시편을 마우스의 복부 피하 조직에 이식하고 2주 동안 생존시켰다. 그 시편에 대한 복부 피하 결합조직의 반응을 조직학적으로 조사하였다. 시편 주위를 둘러싸는 섬유성 결합조직 막이 관찰되었으며 이 막은 섬유모세포, 섬유세포 및 기타 세포로서 중성호성백혈구, 대식세포, 거대다핵세포 등으로 이루어져 있었다. 시편을 둘러싸는 이 막에 새로이 형성된 혈관이 존재하기도 하였다. 임플란트와 접하는 섬유성 막에 거대다핵세포가 관찰되었다. 섬유성 막에 있는 세포 종류와 막의 두께를 조사하였다. 막에 있는 대부분의 세포는 섬유모세포와 섬유세포이었다. 양극 산화 처리를 하지 않은 타이타늄 시편에 비해 산화 처리를 한 시편을 둘러싸는 섬유성 막의 평균 두께가 더 얇았다. 또한 타이타늄 시편의 생체적합성을 세포 배양법으로 조사하였다. 산화 처리를 한 시편 위에서 배양한 MG-63 세포의 수가 유의하게 증가되었다. 이런 결과들은 *in vivo* 와 *in vitro* 실험에서 산화 처리를 한 타이타늄 시편이 생체적합성을 증가시키는데 효과적이라는 것을 말해준다.

감사의 글

본 논문은 한국과학재단 기초연구지원사업 특정기초(과제번호R01-2004-000-10238-0)의 연구비 지원으로 수행된 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Batniji, R. K., J. L. Hutchison, R. Dahiya, S. L. Lam and E. F. 3rd. Williams. 2002. Tissue response to expanded polytetrafluoroethylene and silicone implants in a rabbit model. *Arch. Facial Plast. Surg.* **4**, 111-113.
- Butler, K. R., H. A. Benghuzzi and A. Puckett. 2001. Morphometric evaluation tissue-implant reaction associated with ALCAP and TCP bioceramics *in vivo*. *J. Invest. Surg.* **14**, 139-152.
- Dalu, A., B. S. Blaydes, L. G. Lomax and K. B. Delclos. 2000. A comparison of the inflammatory response to a polydimethylsiloxane implant in male and female balb/c mice. *Biomaterials* **21**, 1947-1957.
- Hur, Y. S., J. B. Park, Y. H. Kwon, Y. Herr, H. S. Kim, B. W. Cho and W. I. Cho. 2003. The effect of implant surface treated by anodizing on proliferation of the rat osteoblast. *J. Kor. Acad. Periodont.* **33**, 499-518.
- Jacob, J. T., C. F. Burgoyne, S. J. McKinnon, T. M. Tanji, P. K. LaFleur and E. Duzman. 1998. Biocompatibility response to modified Baerveldt glaucoma drains. *J. Biomed. Mater. Res.* **43**, 99-107.
- Johnson, R., D. Harrison, M. Tucci, A. Tsao, M. Lemos, A. Puckett, J. L. Hughes and H. Benghuzzi. 1997. Fibrous capsule formation in response to ultra high molecular weight polyethylene treated with peptides that influence adhesion. *Biomed. Sci. Instrum.* **34**, 47-52.
- Kao, W. J., Q. H. Zhao, A. Hiltner and J. M. Anderson. 1994. Theoretical analysis of *in vivo* macrophage adhesion and foreign body giant cell formation on polydimethylsiloxane low density polyethylene and polyetherurethanes. *J. Biomed. Mater. Res.* **28**, 73-79.
- Kim, H. K., J. W. Jang and C. H. Lee. 2004. Surface modification of implant materials and its effect on attachment and proliferation of bone cells. *J. Mat. Sci.: Mater. Med.* **15**, 825-830.
- Kim, K. R., M. H. Lee, B. I. Kim, B. W. Min, M. H. Kim, E. S. Choe and H. W. Cho. 2004. Comparative biocompatibility of metal implants in connective tissue of abdominal wall of the mouse. *J. Toxicol. Pub. Health* **20**, 13-20.
- Lehle, K., J. Buttstaedt and D. E. Birnbaum. 2003. Expression of adhesion molecules and cytokines in vitro by endothelial cells seeded on various polymer surfaces coated with titaniumcarboxonitride. *J. Biomed. Mater. Res.* **65A**, 393-401.
- Lehle, K., S. Lohn, G. Reinerth, T. Schubert, J. G. Preuner and D. E. Birnbaum. 2004. Cytological evaluation of the tissue-implant reaction associated with subcutaneous implantation of polymers coated with titaniumcarboxonitride *in vivo*. *Biomaterials* **25**, 5457-5466.
- Li, D. J., K. Ohsaki, P. C. Cui, Q. Ye, K. Baba, Q. C. Wang, S. Tenshin and T. Takano-Yamamoto. 1999. Thickness of fibrous capsule after implantation of hydroxyapatite in subcutaneous tissue in rats. *J. Biomed. Mater. Res.* **45**, 322-326.
- Lim, S., S. J. Heo, C. H. Han, T. I. Kim, Y. J. Seol, Y. Ku, K. U. Chung, C. P. Chung, S. B. Han and I. C. Rhyu. 2005. Histological response of anodized titanium implant. *J. Kor. Acad. Periodont.* **35**, 525-536.
- McInnes, A. and D. M. Rennick. 1988. Interleukin 4 induces cultured monocytes/macrophages to form giant multinucleated cells. *J. Exp. Med.* **167**, 598-611.
- Mohammadi, S., M. Esposito, M. Cucu, L. E. Ericson and P. Thomsen. 2001. Tissue response to hafnium. *J. Mat. Sci.: Mater. Med.* **12**, 603-611.
- Morehead, J. M. and G. R. Holt. 1994. Soft-tissue response to synthetic biomaterials. *Otolaryngol. Clin. North Am.*, **27**, 195-201.
- Murch, A. R., M. D. Grounds, C. A. Marshall and J. M. Papadimitriou. 1982. Direct evidence that inflammatory multinucleate giant cells form by fusion. *J. Pathol.* **137**, 177-180.
- Parker, J. A. T. C., X. F. Walboomers, J. W. Von den Hoff, J. C. Maltha and J. A. Jansen. 2001. Soft tissue response to silicone and poly-L-lactic acid implants with a periodic or random surface micropattern. *J. Biomed. Mater. Res.* **61**, 91-98.
- Rodriguez, R., K. Kim and J. L. Ong. 2003. *In vitro* osteo-

- blast response to anodized titanium and anodized titanium followed by hydrothermal treatment. *J. Biomed. Mater. Res.* **65A**, 352-358.
20. Ryhänen, J., M. Kallioinen, J. Tuukkanen, J. Junila, E. Niemelä, P. Sandvik and W. Serlo. 1998. *In vivo* biocompatibility evaluation of nickel-titanium shape memory metal alloy: muscle and perineural tissue responses and capsule membrane thickness. *J. Biomed. Mater. Res.* **41**, 481-488.
 21. Saldaña, L., N. Vilaboa, G. Vallés, J. González-Cabrero and L. Munuera. 2004. Osteoblast response to thermally oxidized Ti6Al4V alloy. *J. Biomed. Mater. Res.* **73A**, 97-107.
 22. Salthouse, T. N. 1984. Some aspects of macrophage behavior at the implant interface. *J. Biomed. Mater. Res.* **18**, 395-401.
 23. Schreiber, H., F. Keller, H. P. Kinzl, H. Hunger, W. Knofler, U. Rubling and W. Merten. 1990. The question of the transmissibility of the results of subcutaneous tests of biomaterials from animals to humans. *Z. Exp. Chir. Transplant Kunstliche Organe* **23**, 23-25.
 24. Schreiber, H., H. P. Kinzl and J. Thieme. 1990. Computerized microscopic image analysis method in tissue-biomaterials interaction. *Biomater. Artif. Cells Organs* **18**, 637-641.
 25. Son, W. W., X. Zhu, H. I. Shin, J. L. Ong and K. H. Kim. 2003. *In vivo* histological response to anodized and anodized/hydrothermally treated titanium implants. *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* **66B**, 520-525.
 26. Sul, Y. T., C. Johansson, E. Byon and T. Albrektsson. 2005. The bone response of oxidized bioactive and non-bioactive titanium implants. *Biomaterials* **26**, 6720-6730.
 27. Sul, Y. T., C. B. Johansson, Y. Jeong, K. Röser, A. Wennerberg and T. Albrektsson. 2001. Oxidized implants and their influence on the bone response. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **12**, 1025-1031.
 28. Sul, Y. T., C. B. Johansson, K. Röser and T. Albrektsson. 2002. Qualitative and quantitative observations of bone tissue reactions to anodised implants. *Biomaterials* **23**, 1809-1817.
 29. Udipi, K., R. L. Ornberg, K. B. Thurmond II, S. L. Settle, D. Forster and D. Riley. 2000. Modification of inflammatory response to implanted biomedical materials *in vivo* by surface bound superoxide dismutase mimics. *J. Biomed. Mater. Res.* **51**, 549-560.
 30. Walboomers, X. F., H. J. E. Croes, L. A. Ginsel and J. A. Jansen. 1998. Microgrooved subcutaneous implants in the goat. *J. Biomed. Mater. Res.* **42**, 634-641.
 31. Williams, S. K., S. S. Berman and L. B. Kleinert. 1997. Differential healing and neovascularization of ePTFE implants in subcutaneous versus adipose tissue. *J. Biomed. Mater. Res.* **35**, 473-481.
 32. Won, D. H., D. H. Kim, Y. S. Lee and T. S. Bae. 2003. Characterization of titanium, niobium and tantalum oxide films by anodic spark discharge technique. *Biomater. Res.* **7**, 163-167.
 33. Ye, Q., K. Ohsaki, K. Li, D-J. Li, C-S. Zhu, T. Ogawa, S. Tenshin and T. Takano-Yamamoto. 2001. Histological reaction to hydroxyapatite in the middle ear of rats. *Auris Nasus Larynx* **28**, 131-136.