



## 조직학과 효소활성 방법을 이용한 순 타이타늄과 타이타늄 합금의 상대적인 생체적합성 평가

염동선<sup>1</sup> · 김병일<sup>1</sup> · 이유미<sup>2</sup> · 이은정<sup>2</sup> · 이성태<sup>2</sup> · 성치남<sup>2</sup> · 서권일<sup>3</sup> · 조현욱<sup>2</sup>

<sup>1</sup>순천대학교 공과대학 금속공학전공, <sup>2</sup>순천대학교 자연대학 생명과학전공, <sup>3</sup>순천대학교 자연대학 식품영양학과

## Relative Evaluation for Biocompatibility of Pure Titanium and Titanium Alloys using Histological and Enzymatic Methods

Dong Sun Yeom<sup>1</sup>, Byung Il Kim<sup>1</sup>, Yu Mi Lee<sup>2</sup>, Eun Jung Lee<sup>2</sup>, Sung Tae Yee<sup>2</sup>,  
Chi Nam Seong<sup>2</sup>, Kwon Il Seo<sup>3</sup> and Hyun Wook Cho<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Material Science and Metallurgical Engineering, Suncheon National University,

<sup>2</sup>Department of Biology, Suncheon National University,

<sup>3</sup>Department of Food Nutrition, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

Received September 4, 2007; Accepted December 17, 2007

Titanium or titanium alloy is a widely used implant material according to its certified biocompatibility, sufficient strength and ready availability. The purpose of this study was to evaluate the relative biocompatibility of titanium and titanium alloy specimens (Ti-29Nb-13Ta, TiNb and Ti-6Al-4V, Ti64) using *in vivo* and *in vitro* methods. For *in vivo* experiment, the specimens were implanted in the abdominal subcutaneous region of female mice for 2 and 4 weeks. The reaction of connective tissue to specimens was evaluated histologically. The specimens were encapsulated by fibrous connective tissue consisting of fibroblast, fibrocyte and other cells including neutrophil, macrophage, giant multinucleated cell and unidentified cells. Some newly formed blood vessels were located in the fibrous capsule surrounding the implant. Cell types and the thickness of fibrous capsules were examined quantitatively. Most of cell types located in the fibrous capsule were fibroblasts and fibrocytes. The average thickness of fibrous capsules for the TiNb specimens was much thinner than that of the titanium alloy, Ti64. The thickness of the fibrous capsule around all titanium specimens decreased at 4 weeks compared to 2 weeks post-implantation. The biocompatibility of titanium and titanium alloy specimens were also investigated in *in vitro* method using alkaline phosphatase from MG-63 cells. Alkaline phosphatase activity of the TiNb specimen showed higher activity than the titanium alloy, Ti64. In conclusion, the TiNb alloy with thin capsule thickness *in vivo* and high alkaline phosphatase activity *in vitro* will be of considerable use in biomedical applications.

**Key words:** Biocompatibility, Titanium alloy, Abdominal connective tissue, MG-63 cell.

### 서 론

사람의 삶의 질이 높아지면서 임플란트(implant)에 대한 수요가 점점 늘고 있다. 이런 임플란트 재료로서 뛰어난 생체적합성, 좋은 기계적 성질, 부식에 대한 높은 저항

성, 저렴한 구입 비용 등의 이유로 타이타늄이나 혹은 타이타늄 합금이 광범위하게 이용되고 있다(Mohammadi *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003). 그런데 시판중인 순수 타이타늄은 생체적합성은 뛰어나지만 전단 강도, 내마모성 같은 기계적 성질이 낮아서 치과와 정형외과의 임플란트로 사용하기에 어려운 면이 있다(Lee *et al.*, 2003). 이런 단점을 해결하기 위해, 뛰어난 강도와 낮은 탄성을 및 부식성이 거의 없는 titanium-6aluminum-4vanadium (Ti-6Al-4V, Ti64)합금이 개발되었지만 생체적합성 면에서

Correspondence to: Hyun Wook Cho, Department of Biology, College of Natural Sciences, Suncheon National University, Suncheon, Chonnam 540-742, Korea  
E-mail: hwcho@suncheon.ac.kr

는 여러 가지 문제가 있는 것으로 알려져 있다(Rogers et al., 1997). 즉, aluminum(Al)이 Alzheimer 병과 관련 있을지도 모른다는 논란(DeVoto and Yokel, 1994), 그리고 골모세포(osteoblast)를 이용한 *in vitro* 실험에서 vanadium(V)이 Al 보다 세포독성이 더 높게 나왔다고 하는 보고(McKay et al., 1996) 등이다. 이와 유사한 내용으로 Al이 Alzheimer 질병과 유의하게 관련 있으며, V는 호흡기 계통에 독성이 있는 것으로 보고되었다(Okazaki and Gotoh, 2005). 또 Ti64 합금에서 방출된 이온이 골수의 기질세포로부터 골모세포로 분화되는 것을 억제하였는데 이것은 결국 정상적인 골 생성을 방해함으로써 임플란트의 실패로 귀결될 수 있다고 하였다(Thompson and Puleo, 1996).

이런 이유로 해서 Ti64합금 대신에 기계적 성질을 가지고 있으면서 더 나은 생체적합성을 가진 합금, 즉 zirconium (Zr), niobium(Nb) 혹은 tantalum(Ta)을 함유하는 새로운 타이타늄 합금을 개발하게 되었다(Ito et al., 1995). 이런 Zr, Nb, Ta 등은 비독성 원소로 알려져 있다(Naganawa et al., 2004). 본 실험에서는 이렇게 해서 개발된 타이타늄 합금(Ti-29Nb-13Ta, TiNb)의 생체적합성을 순수 타이타늄과 기존의 타이타늄 합금인 Ti64와 비교하였다. 생체적합성을 *in vivo* 상태에서 비교하기 위해 순수 타이타늄과 타이타늄 합금 시편을 마우스 복부 결합조직에 이식하고 2주와 4주 동안 생존시킨 뒤에 희생시켜 조직학적인 방법을 사용하여 관찰하였다. 동시에 *in vitro*에서 생체적합성을 알아보기 위해, 실험 금속 시편 위에 MG-63 세포를 배양하여 그 때 생성되는 alkaline phosphatase 활성을 측정하여 조사하였다. alkaline phosphatase 활성은 골모세포 발현의 표지자 역할을 할 수 있고 따라서 실제 임플란트 시에 골기질 형성과 관련 있는 골모세포 분화의 지표로 활용할 수 있어서(Postiglione et al., 2003)이 효소활성 측정을 선택하였다.

## 재료 및 방법

**실험동물.** 생후 10주된 ICR계 마우스 암컷 36마리를 사육 상자 마다 6마리씩 넣어 동물 사육실에서 사육하였다. 사육실은 온도  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 와 상대습도  $50 \pm 10\%$ 를 유지하였으며 조명시간은 12시간을 주기로 하였다.

**금속 시편 제작 및 처리.** 본 연구에 사용한 시편은 대조군으로서 판매되고 있는 순수한 타이타늄(Ti)과 이 대조군과 비교하고자 하는 타이타늄 합금(TiNb), 그리고 또 다른 타이타늄 합금(Ti64) 등 총 3종류의 금속을 사용하였다. 마우스의 복부에 이식할 수 있도록 하기 위해 금속판을 4

mm×6 mm×1 mm(가로×세로×두께) 크기로 절단하여 시편을 만들었다. 절단된 시편 표면의 유기물질을 제거하기 위해 20% NaOH 용액으로 60°C에서 30분간 초음파 세척을 하였다. 이어서 혼합 산용액(63% HNO<sub>3</sub> 용액 15 ml와 55% hydrofluoric acid 3 ml, 그리고 증류수 82 ml를 첨가하여 총 100 ml)에 시편을 담가 상온에서 5분 동안 산세(acid etching)한 후, 증류수에서 초음파 세척하였다.

**주사전자현미경과 주사탐침 현미경 분석.** 대조군 순수 타이타늄 및 2종류 타이타늄 합금의 표면을 금으로 코팅한 후 25 kv 상태에서 주사전자현미경(Hitachi S-3500N)으로 관찰하였다. 또한 Thermo Microscope회사의 주사탐침현미경(Model: Autoprobe CP Research)을 이용하여 관찰하고 프로그램 Proscan 1.7로 분석하여 표면 거칠기(surface roughness)를 구하였다.

**마우스 복부 결합조직 내 금속 시편 이식.** 세균의 감염을 방지하기 위해 Ti 시편과, TiNb 및 Ti64 합금 시편을 멸균기에 넣어 가압 멸균(autoclaving)하였다. 이어서 마우스 복부에 시편을 삽입할 수 있도록 준비를 하였다. 마우스 한 마리마다 sodium pentobarbital을 50 mg/kg 농도로 복강에 주입하여 마취시켰다. 완전히 마취된 쥐를 놓은 다음 제모제(Niclean cream, Ildong Pharmaceutical)를 사용하여 복부의 털을 제거하고 털이 제거된 피부부위를 알코올로 소독하였다. 멸균된 가위로 피부 한군데를 금속 시편이 들어 갈 수 있는 3 mm 크기로 절개하고 피부와 복부근육 사이의 결합조직 부위에 멸균된 시편 한 개를 넣었다. 그리고 봉합사로 절개부위를 봉합하였다. 순수 Ti 시편과 합금 시편(TiNb 및 Ti64)으로 된 각 군에 6마리의 마우스를 배당하였으며 복부 내에 시편을 이식해 두는 기간은 2주와 4주로 하였다. 3종류의 시편 군 각각에 6마리씩 배당하였고 따라서 이식 2주와 4주 후에 각 18마리씩 총 36마리의 마우스를 희생하였다.

**생체조직 처리 및 조직 절편 염색.** 타이타늄 합금 시편 삽입 후 2주와 4주가 되었을 때 sodium pentobarbital로 마취시킨 후, 제모 크림을 복부에 발라 다시 자라난 털을 제거하였다. 현미경 관찰을 하기 위해, 시편이 들어 있는 부위를 중심으로 복부 피부와 근육을 동시에 잘라내어 4% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4) 용액에 최소 48시간 고정하였다. 이어서 핀셋으로 결합조직에 있는 금속시편을 조심스럽게 빼낸 다음, 포매하기 전까지 잘라낸 복부 조직을 동일한 고정 용액인 4% glutaraldehyde에 보관하였다. 4°C에서 0.01 M phosphate

buffer(pH 7.4)로 조직 샘플을 24시간 동안 수세하고 에틸알코올 탈수과정을 거친 다음 glycol methacrylate resin에 포매 하였다. 마이크로톰으로 2.5  $\mu\text{m}$  두께의 절편을 만들어 슬라이드에 올렸다. 조직 염색방법인 hematoxylin-eosin을 사용하여 염색하고 광학현미경으로 관찰 하였다.

#### 영상 처리, 섬유성 결합조직 막 두께 및 세포 종류 측정

염색한 복부 조직 절편을 광학현미경(Olympus, BX50)으로 관찰하고 현미경에 부착된 SPOT 디지털 카메라(Diagnostic Instruments, Model No. 11.2 Color Mosaic)로 촬영하여 컴퓨터에 저장하였다. 생체적합성을 평가하기 위하여 현미경 상에 나타난 시편을 둘러싸는 섬유성 결합조직 막의 두께를 측정하였다. 섬유성 막의 두께 측정은 SPOT INSIGHT™ Software(Version 4.0, Diagnostic Instruments)를 이용하였다. 섬유성 막 두께 측정은 1마리의 마우스 복부조직 절편에서 10군데 씩, 측정하고 평균값을 구하였으며, 그 다음에 군별로 배당된 6마리에서 다시 평균값과 표준편차를 구하였다.

섬유성 막에 존재하고 있는 섬유세포와 섬유모세포 수에 대한 기타 세포 수의 상대적인 비율을 측정하였다. 즉, 400배율로 현미경 관찰 시에 시편을 둘러싸는 섬유성 결합조직 막 63,800  $\mu\text{m}^2$ 에 있는 섬유세포 수에 대한 기타 세포(중성호성백혈구, 대식세포, 거대다핵세포 및 미확인 세포) 수의 상대적인 비율을 정량적으로 조사하였다. 세포 수의 측정은 1마리의 마우스 복부조직 절편에서 얻은 섬유성 막에서 임의로 5 부위를 정하여 각각의 막 63,800  $\mu\text{m}^2$ 에 있는 세포 수를 계산하고 그 평균값을 구하였다. 이어서 군별로 배당된 6마리에서 얻은 평균값으로 나타내었다. 세포 종류에 의한 생체적합성을 쉽게 확인하기 위해 이 평균값을 이용하여 섬유세포(섬유모세포 포함) 수에 대한 기타 세포 수의 비율을 상대적으로 나타내었으며, 결과를 백분율로 표시하였다.

**Alkaline phosphatase(ALP) activity 측정.** Human osteosarcoma에서 분리한 cell-line인 MG-63(ATCC CRL-1427, USA)은 Dulbecco's modified Eagles medium(DMEM)에 sodium bicarbonate( $\text{NaHCO}_3$ , 3.7 g/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  $\mu\text{M}$ ), 10% FBS를 첨가한 배지를 이용하여 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 배양하였으며, 3일에 한번 씩 배지를 갈아 주었다.

골모세포 분화의 지표가 되는 ALP 활성을 측정하기 위해, 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 7일 동안 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 배양한 뒤, 각 금속 시편 위에서만 자란 세포를 회수하여 ALP를 측정하였다. 즉, 7일간 배양한 금속시편을 배양한 well에서 분리하여 0.05% Trypsin-EDTA를 처리한 후, 회수한 세포를 인산 완충용액으로 washing하였고 0.1% Triton X-100을 이용하여 세포를 파괴하였다. 그 다음 14,000 rpm에서 20분 동안 원심분리하여 상층액을 얻은 후, Bio-Rad DC Protein Assay Reagent를 이용하여 상층액에 포함된 단백질을 정량한 다음, 정량된 동량의 단백질과 적정 농도로 희석한 standard를 96 well micro-plate에 100  $\mu\text{l}/\text{well}$  로 분주하였다. 그 다음 각 well 에 기질인 yellow substrate를 50  $\mu\text{l}$ 씩 분주하여 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 반응을 시키면서 5분 간격으로 Microplate reader (Titertek Multiscan Plus, Finland)를 이용해 405 nm에서 optical density 값을 측정하였으며, standard의 기울기가 최대일 때 2 N NaOH 50  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 반응을 종료시킨 후, 측정된 O.D. 값을 이용하여 ALP의 농도를  $\mu\text{M}/\text{hour}/\text{mg}$  protein/ $\text{mm}^2$  단위로 계산하였다. 이 때 ALP 활성의 측정 한계치는 3.125  $\mu\text{M}$ 이었다. 각 금속시편은 triplicate로 실험을 진행하였고, 평균값을 구해 결과에 나타내었다.

**통계 분석.** 마우스의 복부에서 시편을 둘러싸는 섬유성 결합조직 막의 두께 및 ALP 활성에 대한 통계분석은 one-way ANOVA 방법을 이용하였다. ANOVA 검정 후 유의한 차이가 인정되면 post-hoc analysis 로서 Tukey 방법을 사용하였다. 분석결과는  $p < 0.05$  일 때 유의한 차이가 있는 것으로 하였다.

## 결 과

#### 시편 표면에 대한 주사전자현미경 및 주사탐침현미경

**분석.** 사용된 3종류의 타이타늄 금속 시편의 표면 구조를 주사전자현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 1에 나타나 있다. 순수 타이타늄 시편의 표면은 다른 타이타늄 합금의 표면에 비하여 비교적 매끄러운 구조를 하고 있었다. 그러나 순수 타이타늄이나 혹은 타이타늄 합금 모두 표면에 미세한 다공성 구조는 나타나지 않았다. 따라서 이들에 대한 시편 표면의 구조 또는 거칠기를 주사탐침 현미경으로 관찰하였다. 그리고 Proscan 1.7 프로그램으로 이들 시편 표면의 거칠기를 구하였으며 그 값은 다음과 같다. 대조군에 해당하는 순수 Ti 시편의 표면 거칠기는

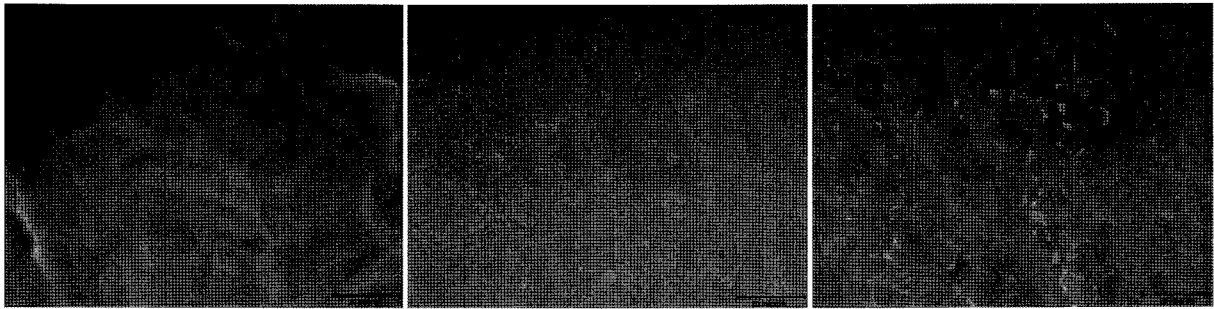


Fig. 1. Scanning electron micrographs of pure Ti (A), TiNb (B) and Ti64 (C) surfaces. Bar size = 20  $\mu\text{m}$ .

0.049  $\mu\text{m}$ 이었으며 TiNb의 거칠기는 0.060  $\mu\text{m}$ , 그리고 Ti64 합금의 거칠기는 0.053  $\mu\text{m}$ 로 각각 나타났다.

**복부 결합조직의 광학 현미경 관찰.** 조직학적인 분석을 하기 위해 2주와 4주 동안 금속 시편이 들어가 있던 마우스의 복부 결합조직을 절편으로 만들고 염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다. 복부의 결합조직에 금속 시편이 들어가 있던 자리는 빈 공간으로 남아 있어서 쉽게 구별되었다(Fig. 2). 시편이 들어 있던 빈 공간 주위 마우스의 피부조직도 잘 관찰되었으며, 세부적으로는 피부조직의 털 주위에 있는 바깥뿌리상피집(external root

sheath) 조직도 동시에 관찰되었다. 기존의 결합조직은 섬유와 세포들이 싱글게 배열되어 있었고 hematoxylin-eosin에 약하게 염색되었다. 그러나 시편 주위에 새로이 형성된 섬유성 결합조직 막은 치밀하게 나타났으며 또한 hematoxylin-eosin에 진하게 염색되어 기존의 결합조직과 뚜렷하게 구별되었다(Fig. 3). 이 결합조직 막에는 주로 섬유모세포와 섬유세포가 혼재하고 있었으며 막에 혈관이 존재하기도 하였다(Fig. 4). 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. 그리고

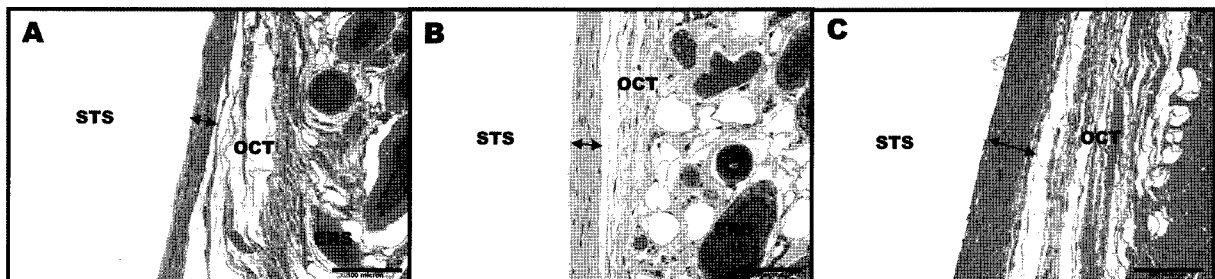


Fig. 2. Photomicrographs of abdominal connective tissue from pure Ti (A), TiNb (B) and Ti64 (C) specimens after 2 weeks of implantation. Double arrows indicate the thickness of fibrous capsule around the specimen. Abbreviations used: ERS, external root sheath; OCT, old connective tissue; STS, space formerly occupied by the specimen. Bars size = 100  $\mu\text{m}$ .

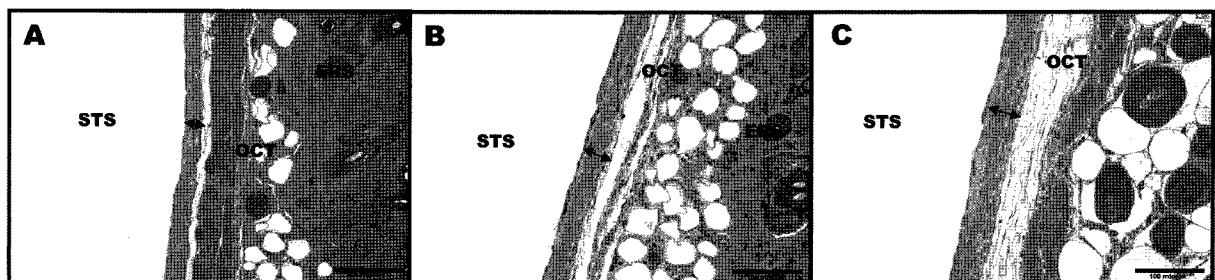
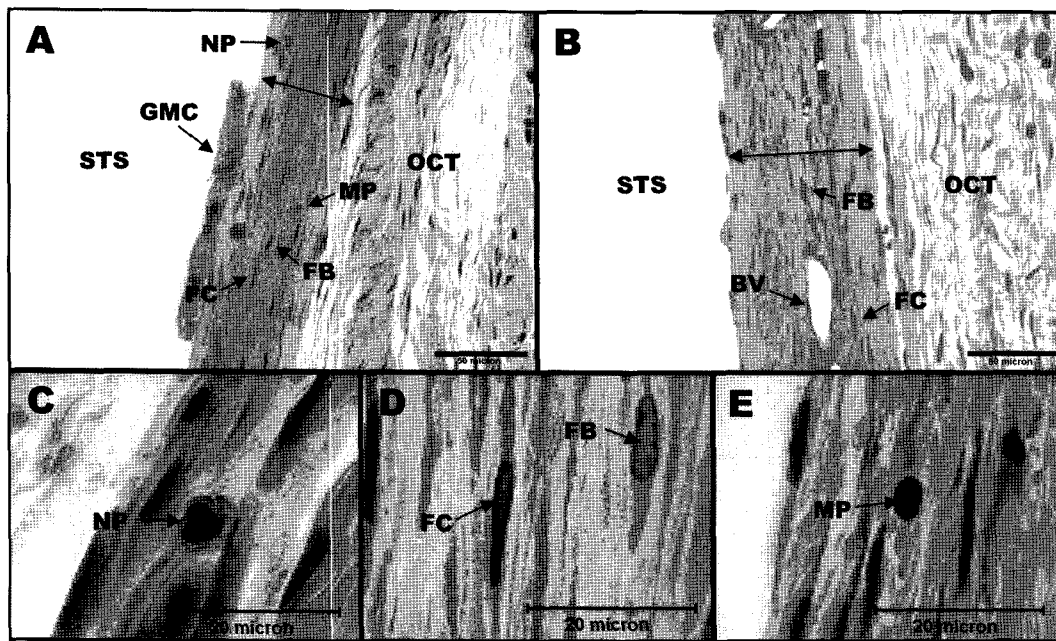


Fig. 3. Photomicrographs of abdominal connective tissue from pure Ti (A), TiNb (B) and Ti64 (C) specimens after 4 weeks of implantation. Double arrows indicate the thickness of fibrous capsule around the specimen. Abbreviations used: ERS, external root sheath; OCT, old connective tissue; STS, space formerly occupied by the specimen. Bars size = 100  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 4.** Photomicrographs of several cell types (A) and newly formed blood vessel (B) from Ti64 specimen after 2 weeks of implantation. (C), (D) and (E) are higher magnification of neutrophil, fibroblast (or fibrocyte) and macrophage, respectively. Double arrows indicate the thickness of fibrous capsule around the Ti64 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 the specimen. Bars size = 50  $\mu\text{m}$  (A and B) and 20  $\mu\text{m}$  (C, D and E).

**Table 1.** The relative ratio between fibrocytes (including fibroblasts) and other cells in the fibrous capsule 63,800  $\mu\text{m}^2$  surrounding the pure titanium (Ti) and titanium alloy (TiNb and Ti64) specimens after 2 and 4 weeks of implantation in connective tissue of abdomen

Specimen type	Week post implantation	Relative number ratio of fibrocytes (%)	Relative number ratio of other cells <sup>§</sup> (%)
Ti	2	86.2	13.8
	4	87.5	12.5
TiNb	2	85.9	14.1
	4	87.9	12.1
Ti64	2	90.6	9.4
	4	91.9	8.1

<sup>§</sup>Other cells include neutrophil, macrophage, giant multinucleated cell and unidentified cells.

이 섬유성 결합조직 막에는 여러 종류의 세포들이 나타났다. 즉, 막을 구성하는 대부분의 세포는 85.9~91.9%를 차지한 섬유모세포와 섬유세포이었다(Table 1). 나머지 8.1~14.1%를 차지하는 세포 종류는 중성호성백혈구(neutrophil), 대식세포(macrophage), 거대다핵세포 및 미확인세포 등이었다(Fig. 4).

생체적합성을 비교 평가하기 위해 2주와 4주 동안 삽입해 두었던 시편 주위에 새로이 형성된 섬유성 결합조직 막의 두께를 측정하였다(Table 2). 먼저 순수 타이타늄 시

**Table 2.** Thickness measurements of the fibrous capsule surrounding the pure titanium (Ti) and titanium alloy (TiNb and Ti64) specimens after 2 and 4 weeks of implantation in connective tissue of abdomen

Specimen type	Thickness ( $\beta_1$ )	
	2 weeks	4 weeks
Ti	46.12 $\pm$ 8.50	33.70 $\pm$ 6.90
TiNb	53.17 $\pm$ 11.20*	40.19 $\pm$ 15.22*
Ti64	58.26 $\pm$ 13.32*	43.45 $\pm$ 13.68*

Values represent mean  $\pm$  SD.

\* $p < 0.05$ , compared with pure Ti(control) specimen.

편을 2주 동안 이식해 둔 경우, 시편 주위에 새로이 형성된 결합조직 막의 두께는 46.12  $\mu\text{m}$ 로 나타났다. TiNb 합금의 경우 막의 두께는 53.17  $\mu\text{m}$ , 그리고 Ti64 합금의 경우, 막의 두께는 58.26  $\mu\text{m}$ 로 나타나 순수 타이타늄 시편 주위의 결합조직 막의 두께가 가장 얇아서 결과적으로 다른 합금에 비해 생체적합성이 좋은 것으로 나타났다. 두 종류의 타이타늄 합금 시편 주위의 결합조직 막 두께는 순수 타이타늄의 주위 막 두께와 유의한 차이를 나타내었다. 그러나 타이타늄 합금 즉, TiNb와 Ti64 합금간의 막 두께는 유의한 차이를 나타내지 않았다. 결과적으로 시편 주위를 둘러싸는 결합조직 막의 두께를 이용하여 생체적합성을 좋은 순서대로 나열하면 Ti, TiNb, Ti64 순이

**Table 3.** Alkaline phosphatase activity of MG-63 cells cultured on pure titanium (Ti) and titanium alloy (TiNb and Ti64) specimens

Specimen type	Alkaline phosphatase activity ( $\mu\text{M}/\text{hour}/\text{mg protein}/\text{mm}^2$ )
Ti	$0.030 \pm 0.009$
TiNb	$0.028 \pm 0.008$
Ti64	$0.025 \pm 0.006^*$

Values represent mean  $\pm$  SD.

\* $p < 0.05$ , compared with pure Ti (control) specimen.

었다.

4주 동안 시편을 이식해 둔 경우에도 순수 타이타늄 시편 주위의 조직 막 두께가  $33.37 \mu\text{m}$ 로 나타나 다른 합금 시편에 비해 가장 얇은 것으로 관찰되었다. 2주의 결과와 마찬가지로 순수 Ti 주위의 막에 비해, TiNb와 Ti64 합금의 경우 모두 막 두께가 더 두꺼운 것으로 측정되었다. 그리고 동일한 시편인 경우에는 2주 동안 이식해둔 시편에 비해 4주 동안 삽입 해 둔 시편 주위의 결합조직 막 두께가 감소되어 나타났다.

**Alkaline phosphatase(ALP) 활성 측정.** ALP 활성의 경우, 대조군에 해당하는 순수 Ti 시편에서 가장 높은 활성이 나타났으며 이어서 TiNb 합금 순으로 ALP의 활성이 나타났다(Table 3). Ti64 합금에서 가장 낮은 ALP의 활성을 보여주었고 순수 Ti의 ALP 활성과 유의한 차이를 나타내었다. 이런 ALP 활성을 이용하여 생체적합성을 평가하면, 가장 좋은 시편이 Ti이었으며 그 다음이 TiNb, 이어서 마지막으로 Ti64 순으로 나타났다.

## 고 찰

현재 상업적으로 이용되고 있는 순수 타이타늄과 타이타늄 합금은 정형외과나 혹은 치아보철에 이상적인 임플란트 재료로 확립되어 있다(Lehle *et al.*, 2004). 따라서 이런 타이타늄 합금의 상대적인 생체적합성에 대하여 많은 연구가 이루어졌다. 먼저 *in vivo* 관련 실험을 보면, 타이타늄 합금을 비롯한 여러 종류의 금속을 흰쥐의 경골(tibia)에 이식하고 48주간 생존시켰을 때 경골조직에 남아 있는 금속의 농도를 이용하여 생체적합성을 조사하였다(Okazaki *et al.*, 2004). 타이타늄 합금 중에서 Ti-15Zr-4Nb-4Ta에서 방출된 타이타늄 농도가 Ti64 합금에서 나온 타이타늄 농도보다 더 낮게 경골조직에서 검출되었으며 동시에 Zr, Nb, Ta 농도도 매우 낮게 나타났다고 하였다. 따라서 이들은 *in vivo* 상태에서 Ti-15Zr-4Nb-4Ta 합금의 경우, 금속이 생체 내로 적게 방출되므로 장기간의 이식에 유리할 것(생체적합성이 좋을 것)이라고 보고하였

다. 일반적으로 Zr이 첨가된 타이타늄 합금은 강도가 더 강화되는 것으로 알려져 있다.

다른 *in vitro* 연구에 의하면, Niinomi(2003)는 순수한 타이타늄, 그리고 2종류의 타이타늄 합금(Ti64 및 Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr)을 *in vitro*에서 cyto-toxicity를 측정하여 어느 금속이 생체재료로 사용하는 것이 좋은지를 보고하였다. 보고에 의하면, Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr 합금이 순수한 타이타늄과 유사한 세포활성을 나타낸 반면에 Ti64 합금은 순수한 타이타늄에 비하여 세포활성이 낮게 나타나 결과적으로 Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr 합금이 생체재료로 더 적합한 것으로 제안하였다. 또 다른 *in vitro* 실험을 보면, 금속 표면을 연마하고 산세 처리하여 표면의 유의한 차이가 없도록 만든 3종류의 타이타늄 금속(순수한 타이타늄, Ti64 합금 및 Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr 합금) 위에서 MG-63 세포를 48시간 배양 후 생체적합성을 평가하였는데, 자란 세포 수를 비교한 결과 순수한 타이타늄 보다도 오히려 Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr 합금 위에서 배양했을 때 가장 높게 증식되었다고 보고하면서 Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr 합금을 임플란트 재료로 추천하였다(Naganawa *et al.*, 2004). 사람의 잇몸 섬유모세포(gingival fibroblast)를 이용한 실험을 통해, Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr 합금과 순수한 타이타늄 위에서 자란 세포들은 유사하게 증식하였다고 하면서 Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr 합금이 순수한 타이타늄 정도의 생체적합성을 가지고 있다고 하였다(Shimojo *et al.*, 2007).

앞의 기존 연구에서처럼, 대체적으로 Nb와 Ta가 함유된 타이타늄 합금의 생체적합성이 먼저 개발된 Al과 V가 함유된 Ti64 합금 보다 더 좋은 것으로 보고되었는데 이것은 본 실험의 복부 결합조직(abdominal connective tissue)을 이용한 결과와도 같은 양상을 보였다. 그런데 금속에 대한 생체의 조직반응이 어떤 작용을 통해 타이타늄이나 혹은 타이타늄 합금에 대하여 생체에 적합하게 되는지 광범위한 연구가 이루어졌지만, 아직까지는 잘 알려져 있지 않다(Kim *et al.*, 2006). 그러나 결합조직과 금속 시편과의 반응을 통해 새로이 막이 형성되는 과정에 대하여는 알려져 있는 편이다. 즉, 임플란트가 오랫동안 체내에 위치하고 그 기능을 유지하는지를 연구하기 위해서는 둘러싸는 섬유성 막이나 혹은 막의 형성과정을 이해하는 것이 중요하다(Johnson *et al.*, 1997)고 볼 수 있다. 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(Salthouse, 1984). 이 막은 섬유모세포, 염증 세포와 콜라겐 섬유로 이루어져 있으며 또한 이 막에 새로운 혈관이 생성되기도 한다(Walboomers *et al.*, 1998). 본 실험

에서도 시편 주위 결합조직 막을 주로 형성하는 섬유모세포와 섬유세포가 막 세포 종류의 대부분을 차지하고 있었다. 그리고 이 막에 소수의 세포로서 혈액세포 기원인 대식세포, 중성호성백혈구, 거대다핵세포 및 미확인 세포 등도 관찰되었다. 이런 미확인 세포로 인해 결합조직 막에 있는 세포의 종류와 막 두께의 연관성을 짓기에는 무리가 있었다.

한편으로, 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(Li *et al.*, 1999). 본 실험의 경우, 3종류 시편 표면의 거칠기가 유사하게 나타나 표면 구조에 의해서 시편 주위 막의 형성이 크게 영향을 받지 않았을 것으로 예상되며 사용된 시편 자체의 금속 성분이 막 형성에 영향을 주었을 것으로 사료된다. 타이타늄과 같은 금속 이식체에 대한 피라 결합조직의 조직학적 반응은 생체적합성 평가에 중요한 부분(Schreiber *et al.*, 1990)이 되며, 따라서 임플란트를 둘러싸는 섬유성 막은 생체 적합성 평가에 잘 이용될 수 있다(Batniji *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2006). 임플란트를 둘러싸는 결합조직 막의 두께가 얇을수록 생체적합성이 좋은 것으로 판단한다(Jacob *et al.*, 1998; Udipi *et al.*, 2000). 본 실험에서는 순수한 Ti 시편 주위의 결합조직 막이 다른 타이타늄 합금 시편에 비해 가장 얇게 나타나(2주 삽입한 시편의 경우 46.12  $\mu\text{m}$ , 4주 삽입한 시편의 경우 33.70  $\mu\text{m}$ ) 생체적합성이 가장 좋은 것으로 나타났지만 기계적인 약점 때문에 Ti64 혹은 TiNb 합금을 더 사용하고 있는 실정이다. 결과적으로 보면, 순수 Ti 보다 기계적 성질이 더 우수한 TiNb 합금 시편 주위의 막 두께(2주 삽입한 시편의 경우 58.26  $\mu\text{m}$ , 4주 삽입한 시편의 경우 43.45  $\mu\text{m}$ )가 순수 Ti 보다 두껍게 나타났지만 Ti64 보다도 더 얇게 나타나 Ti64 보다 상대적으로 생체적합성이 더 나은 것으로 나타났다. 본 실험의 Fig. 4에서 볼 수 있는 것처럼 TiNb 시편의 경우, 시편을 둘러싸는 결합조직 막에 새로이 형성된 혈관이 잘 관찰되었다. 얇은 결합조직 막에 비해 두꺼운 결합조직 막에 더 많은 혈관, 대식세포, 섬유모세포, 콜라겐 섬유가 분포한다는 보고도 있다(Butler *et al.*, 2001).

본 실험의 Fig. 4에서처럼, 시편과 시편을 둘러싸는 결합조직 막이 접하는 막의 경계면에 거대다핵세포가 나타나는데 생체적합성이 좋을수록 그 세포의 수가 적으며(Ryhnen *et al.*, 1998) 또한 이 때 막의 두께도 감소되어 나타나는 것으로 보고되어 있다(Udipi *et al.*, 2000). 거대다핵세포는 활성화된 대식세포가 융합하여 생성되는 것으로 보이지만(Murch *et al.*, 1982) 생성과정에 대하여는

완전히 밝혀져 있지 않다(Ye *et al.*, 2001). 거대다핵세포 형성에는 여러 요소, 즉 임플란트 주위의 pH, 여러 세포에서 방출되는 cytokine, 그리고 임플란트의 화학적 성분과 물리적 성질에 의해 영향을 받는다(McInnes *et al.*, 1988; Kao *et al.*, 1994). 본 실험에서도 결합조직 막의 두께가 비교적 두껍게 나타나 생체적합성이 상대적으로 좋지 않은 Ti64 시편의 경우, 시편과 접하는 결합조직 막에 거대다핵세포가 관찰되기도 하였지만, 막의 두께가 얇은 순수 Ti 시편에서는 거대다핵세포가 잘 관찰되지 않았다. 따라서 거대다핵 세포의 출현빈도가 낮아 정량적으로 분석하는 데는 한계가 있었다. Rat의 복부나 등쪽 조직에 타이타늄, hafnium 혹은 Ti64를 삽입하고 2주와 4주 후에 희생시킨 다음, 시편 주위에 형성된 섬유성 결합조직 막 두께를 측정해 보면 2주에 비해 4주 후에 희생시킨 시편에서 막의 두께가 더 얇아진다고 하였다(Ryhnen *et al.*, 1998; Matsuno *et al.*, 2001). 본 실험에서도 2주에 비해 4주 후에 희생시킨 시편에서 둘러싸는 막의 두께가 감소하여 기존의 보고와 일치하는 결과를 나타내었다.

본 실험에서 측정된 ALP의 경우, 골모세포 분화의 지표가 되는 효소 활성이며 따라서 활성이 높을수록 생체적합성이 좋은 것으로 볼 수 있다. 기존의 연구에 의하면, 동일한 타이타늄 시편에 coating을 함에 따라 세포 증식과 ALP 활성이 다르게 나타났다고 하면서 금속의 표면 성질이 치아 이식체와 주위 골 조직 반응과 같은 *in vivo*에서 중요한 요소로 작용할 것으로 보고하였다(Postiglione *et al.*, 2003). 이와 유사한 연구로서, 타이타늄을 양극산화 처리를 한다든지, 양극산화 처리 후에 이어서 열수처리(hydrothermal treatment)를 한다든지 혹은 sandblasting 한다든지 하여 타이타늄의 표면을 변화시킨 후에 이런 처리과정을 거친 타이타늄이 얼마만큼 생체적합성이 변화되었는지(혹은 배양한 세포 생성물의 변화를 확인하기 위한 방법으로 ALP 활성을 측정하기도 하였다(Rodriguez *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2006). 타이타늄의 표면 거칠기를 0.6에서 1.0, 1.4, 2.1, 3.2  $\mu\text{m}$ 로 각각 증가시킬 경우 ALP의 활성도 거칠기에 비례하여 증가하는 것으로 보고하였다(Kim *et al.*, 2006). 본 실험에서는 유사한 거칠기를 가진 3종류의 금속을 사용하였으므로 거칠기와 같은 시편 표면의 구조에 의한 ALP 활성의 차이보다는 금속 자체의 성질에 의해서 ALP 활성의 차이가 나타난 것으로 생각된다. 본 *in vivo* 실험과 마찬가지로 *in vitro* 실험에서도 ALP 활성이 순수 Ti(0.030), TiNb(0.028) 및 Ti64(0.025) 순으로 높았으며, 그에 따라 상대적으로 생체적합성이 좋은 순서도 앞의 결과와 같았다.

순수한 Ti가 *in vivo*와 *in vitro* 실험에서 가장 생체적합성이 뛰어난 것으로 본 실험에서 나타났지만 여러 가지

기계적 결합 때문에 현실적으로 사용하지 못하고 있는 실정을 감안한다면 그 다음으로 생체적합성이 좋은 것으로 조사된 TiNb 합금을 생체 내 임플란트 재료로 추천할 수 있을 것으로 사료된다.

## 결론

순수 타이타늄과 타이타늄 합금 2종류인 TiNb 와 Ti64 의 상대적인 생체적합성을 평가하기 위해 먼저 *in vivo* 실험으로서, 마우스 복부의 피하결합조직에 시편을 삽입하고 2주와 4주 동안 생존시켰다. 결합조직과 시편과의 반응을 조직학적으로 조사하였다. 시편 주위를 둘러싸는 섬유성 결합조직 막이 관찰되었으며 이 막은 섬유모세포, 섬유세포, 중성호성백혈구, 대식세포, 거대다핵세포 및 미확인 세포 등으로 구성되어 있었으며, 막에 있는 주된 세포는 섬유모세포와 섬유세포이었다. 이 막에는 혈관도 존재하였다. TiNb 시편 주위의 결합조직 막의 평균 두께는 Ti64 주위 막 두께보다도 더 얇게 나타났으며, 결과적으로 Ti64에 비해 TiNb의 생체적합성이 더 좋은 것으로 나타났다. 4주 동안 삽입해 두었던 모든 타이타늄 시편 주위의 막 두께는 2주 동안 삽입해 두었던 시편 주위의 막 두께에 비해 감소되었다. 다음 *in vitro* 실험으로서, Ti-29Nb-13Ta 시편 위에서 배양한 세포에서 생성된 alkaline phosphatase 활성을 측정하였으며 그 결과, Ti64 시편에서 생성된 효소 활성보다 더 높았다. TiNb 시편 주위에 얇은 결합조직 막의 두께가 만들어졌고 또 이 시편 위에서 더 높은 alkaline phosphatase 활성이 측정된 결과를 볼 때, Ti64 합금에 비해 TiNb타이타늄 합금이 생체재료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 글

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

## 참고문헌

- Batniji, R.K., Hutchison, J.L., Dahiya, R., Lam, S.L. and Williams, E.F. 3rd. (2002). Tissue response to expanded polytetrafluoroethylene and silicone implants in a rabbit model. *Arch. Facial Plast. Surg.*, **4**, 111-113.
- Butler, K.R., Benghuzzi, H.A. and Puckett, A. (2001). Morphometric evaluation tissue-implant reaction associated with ALCAP and TCP bioceramics *in vivo*. *J. Invest. Surg.*, **14**, 139-152.
- DeVoto, E. and Yokel, R.A. (1994). The biological speciation and toxicokinetics of aluminum. *Environ. Health Perspect.*, **102**, 940-951.
- Ito, A., Okazaki, Y., Tateishi, T. and Ito, Y. (1995). *In vitro* biocompatibility, mechanical properties, and corrosion resistance of Ti-Zr-Nb-Ta-Pd and Ti-Sn-Nb-Ta-Pd alloys. *J. Biomed. Mater. Res.*, **29**, 893-899.
- Jacob, J.T., Burgoyne, C.F., McKinnon, S.J., Tanji, T.M., LaFleur, P.K. and Duzman, E. (1998). Biocompatibility response to modified Baerveldt glaucoma drains. *J. Biomed. Mater. Res.*, **43**, 99-107.
- Johnson, R., Harrison, D., Tucci, M., Tsao, A., Lemos, M., Puckett, A., Hughes, J.L. and Benghuzzi, H. (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., Zhao, Q.H., Hiltner, A. and Anderson, J.M. (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, M.-J., Kim, C.-W., Lim, Y.-J. and Heo, S.-J. (2006). Microrough titanium surface affects biologic response in MG63 osteoblast-like cells. *J. Biomed. Mater. Res.*, **79A**, 1023-1032.
- Lee, B.-H., Kim, Y.D. and Lee, K.H. (2003). XPS study of bioactive graded layer in Ti-In-Nb-Ta alloy prepared by alkali and heat treatments. *Biomaterials*, **24**, 2257-2266.
- Lee, Y.M., Lee, E.J., Yeom, D.S., Kim, D.S., Yee, S.T., Kim, B.I. and Cho, H.W. (2006). Relative biocompatibility evaluation of anodized titanium specimens *in vivo* and *in vitro*. *J. Life Sci.*, **16**, 302-309.
- Lehle, K., Lohn, S., Reinert, G., Schubert, T., Preuner, J.G. and Birnbaum, D.E. (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., Ohsaki, K., Cui, P.C., Ye, Q., Baba, K., Wang, Q.C., Tenshin, S. and Takano-Yamamoto, T. (1999). Thickness of fibrous capsule after implantation of hydroxyapatite in subcutaneous tissue in rats. *J. Biomed. Mater. Res.*, **45**, 322-326.
- Matsuno, H., Yokoyama, A., Watari, F., Uo, M. and Kawasaki, T. (2001). Biocompatibility and osteogenesis of refractory metal implants, titanium, hafnium, niobium, tantalum and rhenium. *Biomaterials*, **22**, 1253-1262.
- McInnes, A. and Rennick, D.M. (1988). Interleukin 4 induces cultured monocytes/macrophages to form giant multinucleated cells. *J. Exp. Med.*, **167**, 598-611.
- McKay, G.C., Macnair, R., MacDonald, C. and Grant, M.H. (1996). Interactions of orthopaedic metals with an immortalized rat osteoblast cell line. *Biomaterials*, **17**, 1339-1344.
- Mohammadi, S., Esposito, M., Cucu, M., Ericson, L.E. and Thomsen, P. (2001). Tissue response to hafnium. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **12**, 603-611.
- Murch, A.R., Grounds, M.D., Marshall, C.A. and Papadimitriou, J.M. (1982). Direct evidence that inflammatory multinucleate giant cells form by fusion. *J. Pathol.*, **137**, 177-180.



- Naganawa, T., Ishihara, Y., Iwata, T., Koide, M., Ohguchi, M., Ohguchi, Y., Murase, Y., Kamei, H., Sato, N., Mizuno, M. and Noguchi, T. (2004). *In vitro* biocompatibility of a new titanium-29niobium-13tantalum-4.6zirconium alloy with osteoblast-like MG63 cells. *J. Periodontol.*, **75**, 1701-1707.
- Niinomi, M. (2003). Fatigue performance and cyto-toxicity of low rigidity titanium alloy, Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr. *Biomaterials*, **24**, 2673-2683.
- Okazaki, Y. and Gotoh, E. (2005). Comparison of metal release from various metallic biomaterials *in vitro*. *Biomaterials*, **26**, 11-21.
- Okazaki, Y., Gotoh, E., Manabe, T. and Kobayashi, K. (2004). Comparison of metal concentrations in rat tibia tissues with various metallic implants. *Biomaterials*, **25**, 5913-5920.
- Postiglione, L., Di Domenico, G., Ramaglia, L., Montagnani, S., Salzano, S., Di Meglio, F., Sbordon, L., Vitale, M. and Rossi, G. (2003). Behavior of SaOS-2 cells cultured on different titanium surfaces. *J. Dent. Res.*, **82**, 692-696.
- Rodriguez, R., Kim, K. and Ong, J.L. (2003). *In vitro* osteoblast response to anodized titanium and anodized titanium followed by hydrothermal treatment. *J. Biomed. Mater. Res.*, **65A**, 352-358.
- Rogers, S.D., Howie, D.W., Graves, S.E., Pearcy, M.J. and Haynes, D.R. (1997). *In vitro* human monocyte response to wear particles of titanium alloy containing vanadium or niobium. *J. Bone Joint Surg. Br.*, **79**, 311-315.
- Ryhnen, J., Kallioinen, M., Tuukkanen, J., Junila, J., Niemel, E., Sandvik, P. and Serlo, W. (1998). *In vivo* biocompatibility evaluation of nickel-titanium shape memory metal alloy: muscle and perineural tissue responses and encapsule membrane thickness. *J. Biomed. Mater. Res.*, **41**, 481-488.
- Salthouse, T.N. (1984). Some aspects of macrophage behavior at the implant interface. *J. Biomed. Mater. Res.*, **18**, 395-401.
- Schreiber, H., Keller, F., Kinzl, H.P., Hunger, H., Knofler, W., Rubling, U. and Merten, W. (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.
- Shimojo, N., Kondo, C., Yamashita, K., Hoshino, T. and Hayakawa, T. (2007). Cytotoxicity analysis of a novel titanium alloy *in vitro*: adhesion, spreading, and proliferation of human gingival fibroblasts. *Biomed. Mater. Eng.*, **17**, 127-135.
- Thompson, G.J. and Puleo, D.A. (1996). Ti-6Al-4V ion solution inhibition of osteogenic cell phenotype as a function of differentiation time course *in vitro*. *Biomaterials*, **17**, 1949-1954.
- Udipi, K., Ormberg, R.L., Thurmond II, K.B., Settle, S.L., Forster, D. and Riley, D. (2000). Modification of inflammatory response to implanted biomedical materials *in vivo* by surface bound superoxide dismutase mimics. *J. Biomed. Mater. Res.*, **51**, 549-560.
- Walboomers, X.F., Croes, H.J.E., Ginsel, L.A. and Jansen, J.A. (1998). Microgrooved subcutaneous implants in the goat. *J. Biomed. Mater. Res.*, **42**, 634-641.
- Ye, Q., Ohsaki, K., Li, K., Li, D.-J., Zhu, C.-S., Ogawa, T., Tenshin, S. and Takano-Yamamoto, T. (2001). Histological reaction to hydroxyapatite in the middle ear of rats. *Auris Nasus Larynx*, **28**, 131-136.