



마우스의 복벽에서 결합조직에 대한 금속 이식체의 생체적합성 비교

김국렬¹ · 이민호² · 김병일³ · 민병운⁴ · 김명훈⁵ · 최은상⁶ · 조현욱¹

¹순천대학교 자연대학 생물학과, ²전북대학교 치과대학 재료학교실, ³순천대학교 공과대학 금속재료공학과,
⁴광양보건대학 임상병리학과, ⁵광주보건대학 물리치료과, ⁶부산대학교 생명과학부

Comparative Biocompatibility of Metal Implants in Connective Tissue of Abdominal Wall of the Mouse

Kuk Ryul Kim¹, Min Ho Lee², Byung Il Kim³, Byung Woon Min⁴, Myung Hoon Kim⁵,
Eun Sang Choe⁶ and Hyun Wook Cho¹

¹College of Natural Sciences, Suncheon National University, Suncheon 540-742

²School of Dentistry, Chonbuk National University, Jeonju 561-756

³Department of Materials Science and Metallurgical Engineering, Suncheon National University, Suncheon 540-742

⁴Kwangyang Health College, Kwangyang 545-703

⁵Kwangju Health College, Kwangju 501-759

⁶Division of Biological Sciences, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Received November 25, 2003; Accepted December 18, 2003

ABSTRACT. The purpose of this study is to compare the biocompatibility of commercial purity Ti, Ti-6Al-4V and Ti-6Al-7Nb alloy specimens with and without surface treatment in mouse abdominal connective tissue in vivo. Each metal was implanted into specific abdominal subdermal tissue site of female mouse. After 4 weeks, the implants were removed and abdominal tissues were fixed, dehydrated and embedded in glycol methacrylate resin. And the tissues were histologically prepared for microscopical evaluation. It was characterized by the presence of connective tissue with fibrous capsule surrounding the implant. The fibrous tissue surrounding the implant was studied to determine the biocompatibility of implanted metals. The average thickness of the fibrous capsule formed around the implant was much thinner for the hydrogen peroxide added hydrochloric acid solution-treated specimen than for the others. The results of this evaluation indicate that modification of the surface properties of titanium and titanium alloy implants changes the biological properties in the abdominal connective tissue. In conclusion, these observations suggest that the proper surface treatment performed in the study is effective for the improvement of biocompatibility.

Keywords: Biocompatibility, Abdominal wall, Titanium, Surface treatment.

서 론

현대의학에 있어서 생체내 이식 재료의 중요성이 증가하고 있는 반면에 이식재료의 생체적합성(biocompatibility)을 결정하는 요소에 대하여는 많이 알려져 있지 않다. 이식재료가 화학반응을 일으키지 않고 비독성을 나타낸다

하더라도 생체에 이식되면 염증, 섬유형성(fibrosis), 응고 작용 및 감염 등을 유발시키는 것으로 되어 있다. 특히, 이식재료의 표면과 일시적으로 결합하는 생체내의 단백질이 급성 염증반응을 결정하는 중요한 요소이며 약간의 경우에는 이식재료에 의해 촉매된 염증반응이, 즉 이식재료와 관련된 염증세포가 방출한 산화물에 의해, 재료자체의 분해를 유발할 수도 있는 것으로 보고되어 있다(Tang and Eaton, 1995). 그 외에도 이식체 표면의 화학 성분이 사이토카인이나 콜라겐과 같은 섬유의 분비를 촉진하고 따라서 섬유성 막의 발달을 자극하는 것으로 밝혀져

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

있다(Thomsen and Gretzer, 2001). Mery *et al.*(1996)은 이식체에 대한 결합조직의 반응으로서 풍부한 섬유모세포, 대식세포, 다핵 거대 세포(multinucleated giant cell), 및 이식체를 둘러싸는 결합조직 막의 형성이 특징이라고 하였다. 일반적으로 이식체 표면의 분자구조와 세포사이의 기질 사이에 미세한 환경이 구성되는 것으로 알려져 있다. 즉 세포와 그리고 세포사이의 기질의 성분이 이식체 표면에 부착 지점을 형성하는데 관여하고, 그리고 세포와 조직액의 물질통로를 형성하는데 기여하게 된다. 이식체 주위를 둘러싸는 섬유성 결합조직막은 이식체와 생체 사이의 장벽 역할을 하게되며 이 장벽은 이식체의 생체적합성과 관련이 있다(Thomsen and Gretzer, 2001). 이와 같이 이식된 재료에 대한 생체 조직의 반응을 이해하기 위해서는 적절한 조직학적 평가가 있어야 하는데(Jansen *et al.*, 1994) 이러한 과정의 일환으로 동물의 피하조직에 이식하였을 때 재료주위에 생성되는 결합조직막과 세포가 생체적합성 평가의 좋은 지표가 될 수 있다고 하였다(Schreiber *et al.*, 1990b).

또한 임상 전 단계에 있어서 이식재료의 생체적합성 평가를 위해 동물의 피하조직을 이용하는데 이것은 실험조직이 용이한 점 때문이다(Williams *et al.*, 1997). 그리고 기니아피그, 흰쥐, 사람을 실험재료로 하여 피하 결합조직에 이식체를 삽입하였을 때 이식체에 대한 치유과정 혹은 결합조직의 반응은 근본적으로 유사한 경향(Schreiber *et al.*, 1990a)을 보이기 때문에 동물에서 나타난 이식체 반응 결과를 사람에게 그대로 적용할 수가 있다.

한편 본 연구에서 생체적합성을 평가하고자하는 티타늄 및 티타늄 합금은 우수한 생체적합성, 고강도 및 고인성의 기계적 성질 때문에 하중을 받는 부위의 임플란트 재료로 널리 사용되는 중요한 금속재료이다(Van, 1987). 그러나 자연적으로 생성된 티타늄 및 티타늄 합금의 산화피막은 불균일하고 치밀하지 못하며, 공식 등이 발생하기 쉬운 여러 문제점이 있어 이런 어려움을 해결하기 위한 과정으로 상용 티타늄이나 그 합금 표면에 치밀한 부동태 피막을 형성함과 함께 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(Groot, 1991; Kokubo, 1991), 코팅층과 기관과의 결합이 약하고 성분이나 결정의 제어가 어렵다는 단점이 있다. 인공 생체재료가 골과 결합하기 위해서는 임플란트 재료를 체내에 매식했을 때 재료 표면에 골유사 아파타이트 층이 형성되어야 한다(Kokubo, 1991). 따라서 많은 연구

자들이(Groot *et al.*, 1987; Hanawa *et al.*, 1996; Kokubo *et al.*, 1996; Tengvall *et al.*, 1989) 아파타이트를 형성하기 위해 여러 가지 방법을 사용하였다. Tengvall *et al.* (1989)은 과산화수소의 수용액에서 티타늄 표면에 티타니아 겔 층을 형성하였으며, 이 티타니아 겔 층이 유사체액에서 아파타이트 층의 형성에 기인한다고 하였다.

그러나 생체 내에서 이들 표면처리 한 금속 시편에 대한 생체적합성에 관한 연구는 아직 미흡한 실정이다. 그래서 본 연구에서는 기존의 실험을 바탕으로 과산화수소 용액만 혹은 과산화수소와 염산의 혼합한 용액을 만들고 이 용액에 티타늄 혹은 티타늄 합금을 담가 표면 처리하여 각각의 금속 시편에 대한 생체적합성을 파악하고자 하였다. 이런 실험 목적을 가지고 본 연구에서는 현재 인공 임플란트 재료로 널리 사용되고 있는 상용 순 티타늄 및 그 합금의 표면에 생체 내에서 골유사 아파타이트를 형성시켜 생체활성 재료를 만들 목적으로, 여러 가지의 전해질 처리 및 열처리를 실시하였다. 그리고 이들 재료와 또 이들 재료를 표면 처리한 상태에 따른 상대적인 생체적합성을 비교평가하기 위해 실험하기가 어려운 골에 금속을 삽입하는 대신 비교적 쉽게 처리할 수 있는 복부의 피하조직에 시편을 이식하는 방법을 사용하였다. 이들 재료의 상대적인 생체적합성을 비교평가하기 위하여 본 연구에서는 금속 시편 이식체 주위에 형성된 섬유성 결합조직 막을 조직학적인 방법으로 조사하였다.

재료 및 방법

실험동물

생후 10주된 ICR계 마우스 암컷 27마리를 사육상자마다 3마리씩 넣어 사육하였으며 평균무게는 33 g이었다. 실험용 펠렛 사료(제일사료주식회사)를 먹이로 주었으며 멸균한 수돗물을 식이용 물로서 공급하였다. 사육실은 온도 $21 \pm 3^\circ\text{C}$ 와 상대습도 $50 \pm 10\%$ 를 유지하였으며 조명 시간은 12시간을 주기로 하였다.

금속시편 처리

본 연구에 사용한 시편은 Table 1과 같은 조성을 갖는 공업용 순 티타늄 판과 Ti-6Al-4V 합금(Titania Co, ITALY) 및 Ti-6Al-7Nb(T-Alloy Tough, GC, JAPAN)을 $3 \times 3 \times 1$ (가로×세로×두께)mm의 크기로 절단하여 사용하였다. 준비한 시편을 #240~#2000의 emery paper로 연마한 다음 연마과정에서 생성된 미세결함을 제거하기 위해 0.1 μm 알루미나 단계까지 경면으로 연마하였다. 연마 후 모든 시편을 48% HF, 62% HNO₃ 및 증류수 1 : 1.5 : 6 (vol%)으로 혼합한 용액에 상온에서 2분 동안 산세(acid

Table 1. Chemical compositions of pure Ti, Ti-6Al-4V and Ti-6Al-7Nb alloys (Unit: wt%)

Specimen	H	N	O	C	Al	V	Nb	Fe	Ti
Ti	0.001	0.01	0.07	-	-	-	-	0.04	balance
Ti-6Al-4V	0.004	0.003	0.147	0.005	6.23	4.12	-	0.189	balance
Ti-6Al-7Nb	0.003	0.005	0.124	0.004	6.21	-	7.15	0.176	balance

Table 2. Various surface treatments employed in the present study

Specimen	Code	Surface treatment
Pure Ti	T1	No treatment
	T2	Immersion in 8.8 M H ₂ O ₂ + 0.1 M HCl solution at 80°C for 1 h
	T3	Immersion in 30 wt% H ₂ O ₂ solution at 80°C for 1 h
Ti-6Al-4V	A1	No treatment
	A2	Immersion in 8.8 M H ₂ O ₂ + 0.1 M HCl solution at 80°C for 1 h
	A3	Immersion in 30 wt% H ₂ O ₂ solution at 80°C for 1 h
Ti-6Al-7Nb	N1	No treatment
	N2	Immersion in 8.8 M H ₂ O ₂ + 0.1 M HCl solution at 80°C for 1 h
	N3	Immersion in 30 wt% H ₂ O ₂ solution at 80°C for 1 h

etching)한 후, 증류수에서 초음파 세척하였다.

초음파 세척한 후, 이렇게 만들어진 금속 시편의 표면처리에 따른 상대적인 생체적합성을 평가하기 위해, 순 티타늄, Ti-6Al-4V 합금 및 Ti-6Al-7Nb에 대해 Table 2와 같은 전해질로 표면처리를 실시하였다. 표면처리 후 시편을 증류수에서 세척한 후 60°C에서 24시간 건조하여, 승온속도를 5°C/min으로 400°C에서 1시간 동안 열처리하였다. 열처리를 마지막 과정으로 하여 표면처리를 끝냄으로써 복부결합조직에 삽입할 금속 시편을 완성하였다. 따라서 완성된 금속 시편 종류는 Table 2에 있는 것처럼 1) 순수한 티타늄으로서 표면 처리하지 않은 것, 2) 80°C에서 순수한 티타늄을 8.8 M H₂O₂와 0.1 M HCl 혼합 용액에 1시간 동안 담가두어 표면 처리한 것, 3) 80°C에서 순수한 티타늄을 30 wt% H₂O₂ 용액에 1시간 동안 담가두어 표면 처리한 것, 4) Ti-6Al-4V 티타늄 합금을 표면 처리하지 않은 것, 5) 80°C에서 Ti-6Al-4V 티타늄 합금을 8.8 M H₂O₂와 0.1 M HCl 혼합 용액에 1시간 동안 담가두어 표면 처리한 것, 6) 80°C에서 Ti-6Al-4V 티타늄 합금을 30 wt% H₂O₂ 용액에 1시간 동안 담가두어 표면 처리한 것, 7) Ti-6Al-7Nb 티타늄 합금을 표면 처리하지 않은 것, 8) 80°C에서 Ti-6Al-7Nb 티타늄 합금을 8.8 M H₂O₂와 0.1 M HCl 혼합 용액에 1시간 동안 담가두어 표면 처리한 것, 9) 80°C에서 Ti-6Al-7Nb 티타늄 합금을 30 wt% H₂O₂ 용액에 1시간 동안 담가두어 표면 처리한 것 등 9 종류이었다.

금속시편 이식

세균의 감염을 방지하기 위해 표면 처리한 9 종류의 금속시편을 멸균기에 넣어 가압 멸균(autoclaving)하였다.

이어서 마우스 복부에 금속 시편을 삽입할 수 있도록 수술 준비를 하였다. 마우스 한 마리마다 sodium pentobarbital을 50 mg/kg 농도로 복강에 주입하여 마취시켰다. 완전히 마취된 쥐를 눕힌 다음 전기 제모기를 사용하여 복부의 털을 제거하고 털이 제거된 피부부위를 알코올로 소독하였다. 소독용 가위로 피부 1군데를 금속시편이 들어갈 수 있는 3 mm 크기로 절개하고 피부와 복부근육의 결합 조직 부위에 멸균된 시편 1개를 넣었다. 그리고 봉합사로 절개부위를 봉합하고 염증을 방지하기 위하여 항생제 doxycycline (tetracycline계열)을 20 mg/kg 농도로 3일간 복강에 주사하였다. 금속 1 종류마다 3개의 시편을 만들었고 마우스 1마리에 시편 1개를 삽입하였기 때문에 금속 1 종류에는 마우스 3마리가 배당된 셈이었다. 따라서 사용된 마우스는 합계 27마리였다. 복부 내에 금속 시편을 이식해 두는 기간은 기존의 문헌을 참고하여 4주로 하였다.

생체조직 처리

금속시편 삽입 후 4주가 되었을 때 에테르로 마취시켜 마우스를 희생하였다. 희생된 쥐를 눕혀서 고정하고 전기 제모기를 이용하여 다시 자라난 복부의 털을 제거한 다음 시편이 들어 있는 부위를 중심으로 복부 피부와 근육을 동시에 잘라내어 4% glutaraldehyde 용액에 최소 48시간 고정하였다. 핀셋으로 결합조직에 있는 금속시편을 조심스럽게 빼낸 다음 잘라낸 복부 조직을 동일한 고정 용액인 4% glutaraldehyde 에 포매하기 전까지 보관하였다. 증류수로 복부 조직 샘플을 수세하고 알코올 탈수과정을 거친 다음 glycol methacrylate resin에 포매하였다. 마이크로톰으로 3.0 µm 두께의 절편을 만들어 슬라이드

에 올렸다. 조직 염색방법인 hematoxylin-eosin을 사용하여 염색하고 현미경으로 관찰하였다.

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 나

타난 금속시편 이식재료를 둘러싸는 섬유성 결합조직 막의 두께를 측정하였다. 섬유성 막의 두께 측정은 IMT Software(Size Analysis Program)를 이용하였다. 금속시편을 마우스 1마리마다 1개씩 삽입하였고 금속 1종류마다 마우스 3마리를 배당하였었다. 따라서 섬유성 막 두께 측정은 1마리의 마우스 복부조직 절편에서 10군데 씩 측정하여 도합 30군데의 섬유성 결합조직 막의 두께를 측정하고 그 평균값을 구하였다.

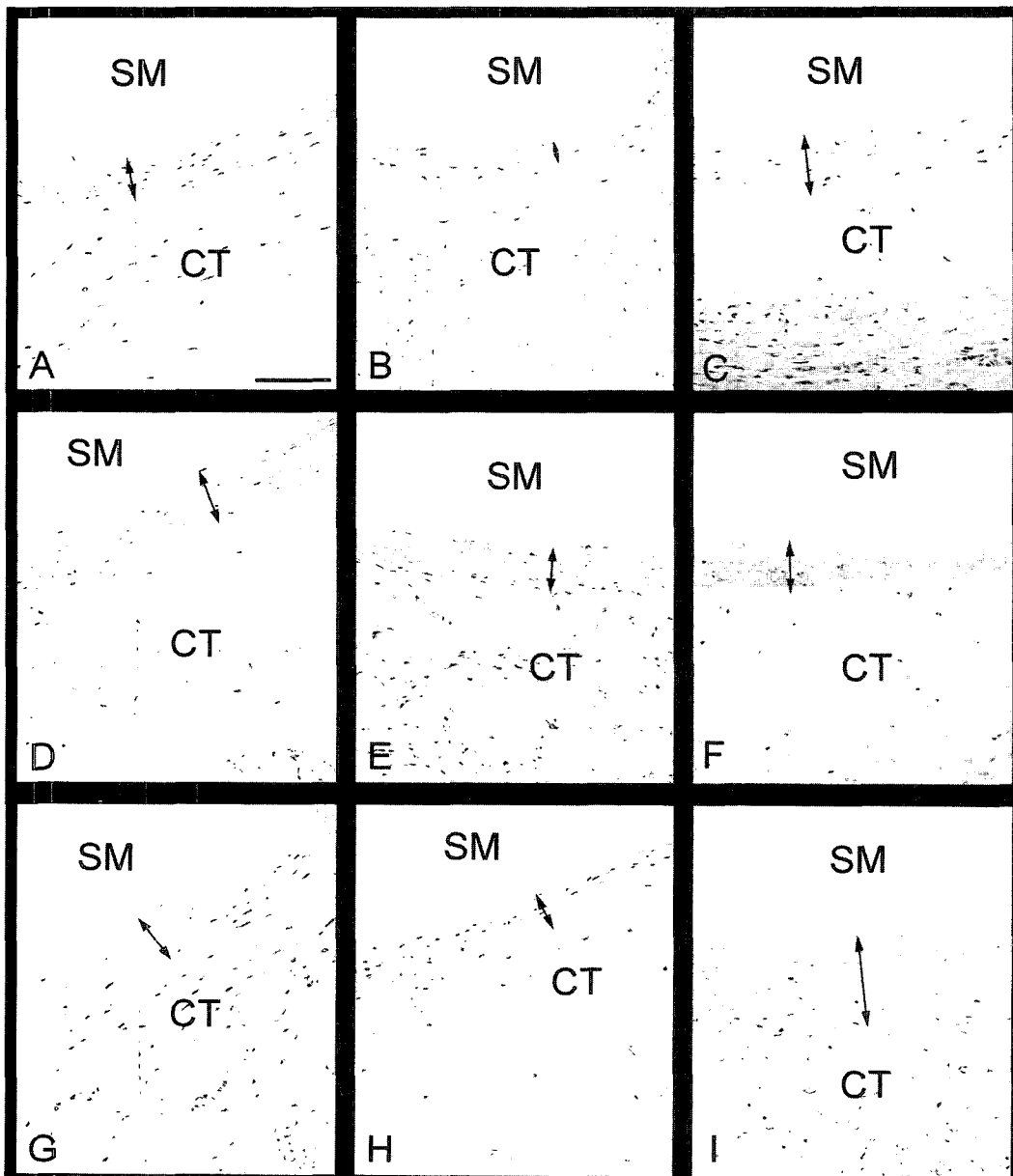


Fig. 1. Photomicrographs of glycol methacrylate resin sections obtained from abdominal tissue of the mouse implanted with Code T, A and N series metals. Double arrow indicates the thickness of fibrous capsule surrounding the implanted metal. Scale bar is 100 μ m. A, code T1 metal implanted. B, code T2 metal implanted. C, code T3 metal implanted. D, code A1 metal implanted. E, code A2 metal implanted. F, code A3 metal implanted. G, code N1 metal implanted. H, code N2 metal implanted. I, code N3 metal implanted. Abbreviations used: CT, connective tissue; SM, site of implanted metal.

통계처리

Excel 프로그램을 이용하여 섬유성 복부결합 조직 막 30군데를 측정된 두께의 평균값과 표준편차 값을 동시에 구하였다. 표면처리를 한 각 금속 종류간의 유의한 차이는 one-way ANOVA 방법을 이용하였으며 t-test에서 $p < 0.05$ 일 때 유의한 차이가 있는 것으로 하였다.

결 과

마우스의 복부 부위에서는 피부와 결합조직으로 구성된 피하조직이 hematoxylin과 eosin에 이중 염색되어 잘 관찰되었다. 전체적으로 삽입된 금속 시편을 둘러싸는 새로이 형성된 결합조직 막은 시편 삽입 전의 기존의 결합조직과는 뚜렷하게 구분되었다(Fig. 1). 새로이 형성된 결합조직 막에는 섬유사이사이에 비교적 규칙적으로 섬유모세포 혹은 섬유세포가 배열되어 있었으며 대식세포도 관찰되었다. 섬유성 막 아래에 있는 기존의 결합조직은 섬유와 세포들이 성글게 배열되어 있는 것이 특징이었다. 따라서 시편 이식체가 들어 있던 빈 공간과 그 이식체를 둘러싸는 섬유성 막이 현미경상으로 확실하게 구분되었다. 막의 두께는 일정한 경우도 있었지만 금속 시편에 따라 두께의 차이가 있는 것도 관찰되었다.

순수한 티타늄 중에서 표면 처리하지 않은 시편 T1을 마우스의 복부에 삽입한 경우, T1 시편 주위에 형성된 결합조직 막의 두께는 $52.20 \mu\text{m}$ 로 나타났다(Table 3) (Fig. 1A). 80°C 에서 1시간 동안 8.8 M H_2O_2 와 0.1 M HCl에 담가두어 표면 처리한 T2 시편의 경우, 표면 처리하지 않은 T1보다 더 얇은 $38.57 \mu\text{m}$ 로 나타나 유의한 차이를 보였다(Fig. 1B). 80°C 에서 1시간 동안 30 wt% H_2O_2 에 담가두어 표면 처리한 T3 시편의 경우, 표면 처리하지 않은 T1보다 오히려 두께가 증가한 $84.88 \mu\text{m}$ 로 나타나 역시 유의한 차이를 보였다(Fig. 1C). 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.

티타늄 합금인 Ti-6Al-4V 종류의 시편을 삽입한 경우, 표면 처리하지 않은 A1 시편 주위에 형성된 섬유성 막의 두께가 $75.62 \mu\text{m}$ 로 나타났다(Fig. 1D). H_2O_2 와 HCl에 담가두어 표면 처리한 A2 시편의 경우 $62.27 \mu\text{m}$ 의 두께를 나타내었는데 이는 A1과의 유의한 차이를 보였다(Fig. 1E). H_2O_2 로만 표면 처리한 A3 시편의 경우, 표면 처리하지 않은 A1 보다 두께가 더 증가된 $77.77 \mu\text{m}$ 를 나타내었으며 이는 A1과의 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 1F).

비교적 섬유성 막의 두께가 얇게 형성된 시편 A1과 A2의 조직을 보면 막의 두께가 얇은 것은 물론 막 자체의 결합 조직도 두꺼운 막이 형성된 A3에 비해서 섬유 조직이 성글고 또 섬유 사이에 있는 섬유모세포나 혹은 섬유세포의 수량도 적게 나타났다.

또 다른 티타늄 합금인 Ti-6Al-7Nb 종류의 시편을 삽입한 실험에서, 표면 처리하지 않은 N1 시편의 경우, 형성된 결합조직 막의 두께는 $66.56 \mu\text{m}$ 로 나타났다(Fig. 1G). 표면 처리한 N2 시편의 경우에는 N1에 비해 감소된 $45.64 \mu\text{m}$ 두께로 나타나 N1과의 유의한 차이를 보였다(Fig. 1H). 다르게 표면 처리한 N3 시편의 경우에는 시편 주위에 형성된 결합조직 막의 두께가 표면 처리하지 않은 시편 N1보다 더 증가된 $86.89 \mu\text{m}$ 두께를 나타내었는데 역시 N1 시편 주위에 형성된 막 두께인 $66.56 \mu\text{m}$ 에 비해 유의한 차이를 보여 주었다(Fig. 1I).

고 찰

뼈처럼 단단하지 않은 연한 조직에 이식체를 삽입할 경우 그 이식체를 둘러싸는 섬유성 결합조직 막이 형성된다는 사실은 잘 알려져 있으며 이 막의 두께를 측정하여 생체적합성을 평가할 수 있다는 것도 또한 잘 확립되어 있다(Morehead and Holt, 1994). 따라서 이식체가 오랫동안 체내에 위치하고 그 기능을 유지하는지를 연구하기 위해서는 둘러싸는 섬유성 막이나 혹은 막의 형성과정을 이해하는 것이 중요하다(Johnson *et al.*, 1997). 막의 형성 과정을 보면, 이식체를 삽입했을 때 대식세포가 먼저 이식체의 표면으로 접근하고 이 대식세포의 자극에 의해 섬유모세포와 결합조직이 증식하여 결국 이식체 주위를 둘러싸는 섬유성 결합조직 막을 형성하게 된다(Salthouse, 1984). 티타늄과 같은 금속 이식체에 대한 피하 결합조직의 조직학적 반응은 생체적합성 평가에 중요한 부분

Table 3. Mean thickness of fibrous capsule surrounding the metal implants in connective tissue of abdomen (unit: μm)

Kind of metals		Thickness
Specimen	Code	
Pure Ti	T1	52.20 ± 13.39
	T2	38.57 ± 18.12
	T3	84.88 ± 23.20
Ti-6Al-4V	A1	75.62 ± 26.11
	A2	62.27 ± 23.73
	A3	77.77 ± 14.60
Ti-6Al-7Nb	N1	66.56 ± 36.45
	N2	45.64 ± 30.50
	N3	86.89 ± 45.10

(Schreiber *et al.*, 1990a)이며 또한 결합조직 막에 있는 세포가 생체적합성 평가의 좋은 지표(Schreiber *et al.*, 1990b)가 될 수 있다고 알려져 있다. 이처럼 이식체를 둘러싸는 섬유성 막은 적합성 평가에 잘 이용될 수 있다.

본 실험에서는 표면 처리하지 않은 순수한 티타늄 시편을 삽입한 경우, 형성된 막의 두께는 $52.20\ \mu\text{m}$ 이며 표면 처리하지 않은 티타늄 합금인 Ti-6Al-4V는 $75.62\ \mu\text{m}$ 로 나타나 유의한 두께 차이를 보였으며 또 다른 티타늄 합금인 Ti-6Al-7Nb인 경우 $66.56\ \mu\text{m}$ 로 나타나 순수한 티타늄과 유의한 차이를 보이지 않았다. 본 실험에 사용된 2종류의 티타늄 합금이 순수한 티타늄 보다 생체적합성이 좋지 않은 경향을 나타낸다고 볼 수 있다. 본 실험을 하기 전에는 순수한 티타늄보다 티타늄 합금이 더 좋은 생체적합성을 나타낼 것으로 예상하였으나 실제 실험결과상으로는 예상과는 다르게 나왔다. 이런 결과는 Kim *et al.*(2001)이 보고한 내용에서도 볼 수 있는데 순수한 티타늄보다 티타늄 합금 주위에 형성된 막의 두께가 더 두꺼운 경향을 보여 티타늄 합금의 적합성이 떨어지는 것으로 되어 있다. 이 결과의 생리적 해석에 대하여는 더 연구를 해봐야 되겠지만 본 실험상에서는 순수한 티타늄이 여타의 티타늄 합금보다 생체적합성이 더 나은 것으로 사료되며 추후에 여러 종류의 합금을 만들어서 실험해 보면 생체적합성이 나은 티타늄 합금이 개발될 수 있을 것으로 보인다.

한편 이식체 주위에 형성되는 막을 관찰하여 생체적합성을 평가할 수 있다는 내용에 대하여 여러 연구자들이 보고하였다. Wolfaardt *et al.*(1992)은 영장류의 단단한 조직인 골 조직과 골막하 조직, 그리고 연한 조직인 점막하 조직 및 근육 조직내에 코스메실(Cosmesil), 아크릴 레진, 구타페르카(gutta-percha) 등을 이식하고 12주간 생존시킨 후에 희생시켜 이식체 주위에 형성된 결합조직 막과 염증반응을 조직학적으로 관찰하여 생체적합성 평가를 할 수 있다고 하였다. 즉, 구타페르카 이식체 주위에 두꺼운 막이 형성되고 심한 염증이 유발되는 것으로 보아 다른 이식 재료에 비하여 가장 생체적합성이 낮은 것으로 보고하였다. 즉 생체적합성이 좋다는 것은 얇은 섬유성 막이 형성되고 염증이 약하게 나타난다는 것을 의미한다 (Morehead and Holt, 1994).

세라믹과 같은 재료를 피하에 이식하였을 때도 세라믹 종류에 따라 막의 두께가 다른 것으로 보고되었다(Butler *et al.*, 1997). 이식체의 종류에 따라 막의 두께가 다르지만 그 이외에도 섬유성 결합조직 막의 두께가 동물체내 이식한 위치(피하 부위, 복강 부위 혹은 근육)와 이식체의 coating 상태에 따라 다른 것으로 알려졌다(Butler *et al.*, 1997, 2001c). 같은 이식체라도 복강에 이식한 경우는 피하에 이식한 경우보다 둘러싸는 섬유성 막의 두께가 더

두껍다고 보고되어 있다(Benghuzzi, 1996; Johnson *et al.*, 1997). Sprague-Dawley 흰쥐를 대상으로 이식체를 피하에 삽입하였을 때 형성된 섬유성 막의 두께는 $100\ \mu\text{m}$ 이하이었으며 따라서 연구자들은 생체적합성이 좋은 것으로 보고하였다(Turner *et al.*, 1991).

Gotman(1997)은 이식체를 둘러싸는 섬유성 조직의 두께는 이식체의 독성과 그리고 이식체와 그 이식체가 접하는 조직 사이의 운동에 비례한다고 하였으며 그 예로서 비교적 독성이 약한 순수한 티타늄을 인체에 삽입했을 때는 두께가 얇은 반면 독성이 있는 스테인리스 금속을 삽입하였을 때는 막의 두께가 2 mm에 이른다고 하였다. 당연히 둘러싸는 막의 두께가 두꺼우면 두꺼울수록 그 막에 있는 대식세포, 섬유모세포의 수가 많으며 콜라겐의 양도 많아진다고 하였다(Butler *et al.*, 2001a, 2001b).

일반적으로 이식체 주위를 감싸는 결합조직 섬유의 성분은 콜라겐으로 알려져 있다(van Mullem *et al.*, 1990; von Recum *et al.*, 1993). 즉, 콜라겐은 상처 치유와 이식체를 둘러싸는 결합조직 막에서 중요한 역할을 하며 특히, 이식 초기에는 콜라겐 type III에 대한 콜라겐 type I의 비율이 상대적으로 낮으나 시간이 지나는 동안 이식 상처가 계속적으로 치유되면서 콜라겐 type I 비율이 증가하고 콜라겐 type III은 감소하는 것으로 보고되었다(Shannon *et al.*, 1997). 따라서 두 콜라겐 type I과 type III 간의 양적인 관계는 이식체를 둘러싸는 막의 안정성을 나타내며 동시에 생체적합성 정도를 나타낸다고 할 수 있다(von Recum *et al.*, 1993). 특별히 이식체 주위의 결합조직 섬유 막의 성분을 분석하지 않았지만 다른 연구자들의 결과를 볼 때, 본 실험에서도 콜라겐이 막을 구성하는 주된 섬유 성분일 것으로 사료된다.

막 형성 외에 이식체의 표면에 조직이 붙는 것도 생체 내에서 이식 재료의 성능을 결정하는데 중요한 한 요소인데 실리콘의 표면이나 혹은 기타 합성재료의 표면에 왜 결합조직이 부착하지 않는지에 대하여는 아직까지 잘 알려져 있지 않다(von Recum and van Kooten, 1995). 피하에서 조직과 이식체 간의 성질에 관한 전자현미경 연구에서도 결합조직과 이식체 간에 어떤 접합도 볼 수 없었고 빼낸 이식체를 분석하였지만 이식체에 붙어있는 조직을 관찰할 수 없었다고 하였다(Holgers *et al.*, 1995). 본 실험에서도 금속과 접한 결합조직 면이 현미경 관찰에서 깨끗한 상태를 나타내었는데 이것은 마우스를 희생시켜 금속을 빼낼 때에 이식된 금속과 결합조직 막 사이에 완전한 부착이 일어나지 않아서 금속과 접한 면의 조직이 손상되지 않았음을 의미한다. 위의 연구자들에(von Recum and van Kooten, 1995) 의하면, 이식체 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 이식체의 표면은 1~3 micron의 일정한 거친 면을 나타낼 때라고 하였다. 생체적합성을 높이기 위해서는 이식한 금속의 표면에 아파타이트 층이 형성되는 것이 중요한데(Kokubo, 1991), Li *et al.*(1994)은 줄겔 방법에 의해 형성된 수화티타니아 층이 유사체액에서 아파타이트가 형성된다고 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(Groot *et al.*, 1987), 칼슘이온을 주입하는 방법(Hanawa *et al.*, 1996), 알칼리금속 이온을 포함하는 전해질 수용액에 처리(Kokubo *et al.*, 1996)하는 방법, H₂O₂에 처리하는 방법(Tengvall *et al.*, 1989) 등이 검토되어 왔다. 본 실험에서는 순수한 티타늄을 이식했을 경우 형성된 결합조직 막의 두께는 52.20 µm이었으며 이 티타늄을 과산화수소와 염산 혼합 용액에 담가서 표면 처리한 시편을 삽입한 경우에 형성된 막의 두께는 38.57 µm로 나타나 동일한 금속이라도 표면 처리를 한 경우에는 유의한 차이로 생체적합성이 더 좋은 것으로 나타났다. 그러나 과산화수소 용액에만 담가서 표면 처리를 한 시편을 삽입했을 경우에는 막의 두께가 84.88 µm로 나타나 오히려 적합성이 좋지 않은 것으로 나타났다. 따라서 동일한 금속을 어떤 종류의 전해질을 이용하여 표면 처리를 했느냐에 따라 생체적합성이 좋을 수도 있고 아니면 반대로 나타날 수도 있음을 말해 주고 있다. 이런 결과는 본 실험에서 사용한 티타늄 합금 Ti-6Al-4V에서 표면 처리하지 않은 경우 형성된 막 두께 75.62 µm와 위의 경우처럼 과산화수소와 염산의 혼합 용액에 표면 처리한 경우 62.27 µm, 그리고 과산화수소에만 담가 표면 처리한 경우에 나타난 77.77 µm의 두께 결과를 서로 비교해 보면 앞의 결과와 동일한 경향을 나타내고 있다는 것을 잘 알 수 있다. 또 다른 티타늄 합금인 Ti-6Al-7Nb를 사용한 실험에서도 같은 결과를 나타내었다. 이런 결과에 대한 화학적, 생리적인 해석은 추후 연구를 통해 규명될 수 있을 것이며 또한 이 결과는 실제로 티타늄 금속을 생체에 이식할 때 고려할 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

마우스를 동물재료로 하여 9종류의 금속을 피하에 이식

하고 이 때 형성되는 결합조직 막의 두께를 현미경 방법으로 분석한 본 실험의 결과를 통해 순수한 티타늄이든 혹은 티타늄 합금이든 적절한 표면 처리를 하면 원재료를 이식했을 때보다 더 생체적합성을 높일 수 있다는 것을 알 수 있었다. 따라서 생체적합성이 좋은 새로운 합금의 개발도 필요하지만 아울러 더욱 더 뛰어난 생체적합성을 얻기 위해 적절한 표면 처리 방법을 찾아내는 것도 중요하다는 것을 제시해 주고 있다. 동물체내에서 이식물질에 대한 고유한 치유과정은 사람, 기니아 피그 혹은 흰쥐에 있어서 유사한 경향을 보인다고 하였다(Schreiber *et al.*, 1990a). 본 연구의 결과도 사람을 대상으로 실험을 수행하였을 때 유사한 결과를 얻을 것으로 예상되며 따라서 인체에 삽입하는 금속 종류의 생체적합성을 연구하는 데에 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- Benghuzzi, H. (1996): Cytological evaluation of capsular tissue surrounding TCPL implant in adult rats. *Biomed. Sci. Instrum.*, **32**, 81-86.
- Butler, K., Benghuzzi, H. and Puckett, A. (2001a): Cytological evaluation of the tissue-implant reaction associated with S/C and I/P implantation of ALCAP and HA bioceramics *in vivo*. *Pathol. Res. Pract.*, **197**, 29-39.
- Butler, K., Benghuzzi, H. and Puckett, A. (2001b): Morphometric evaluation of tissue-implant reaction associated with ALCAP and TCP bioceramics *in vivo*. *J. Invest. Surg.*, **14**, 139-152.
- Butler, K., Benghuzzi, H. and Tucci, S. (2001c): Tissue-implant response following soft tissue implantation of poly-L-lysine coated UHMW-polyethylene into adult male rats. *Biomed. Sci. Instrum.*, **37**, 19-24.
- Butler, K., Benghuzzi, H., Tucci, M. and Cason, Z. (1997): A comparison of fibrous tissue formation surrounding intraperitoneal and subcutaneous implantation of ALCAP, HA, and TCP ceramic devices. *Biomed. Sci. Instrum.*, **34**, 18-23.
- Gotman, I. (1997): Characteristics of metals used in implants. *J. Endourol.*, **11**, 383-389.
- Groot, K.D. (1991): Medical applications of calciumphosphate bioceramics. *J. Ceram. Soc. Japan*, **99**, 943-953.
- Groot, K.D., Geesink, R.G.T., Klein, C.P.A.T. and Serekian, P. (1987): Plasma-sprayed coating of hydroxyapatite. *J. Biomed. Mater. Res.*, **21**, 1357-1387.
- Hanawa, T., Asami, K. and Asaoka, K. (1996): Microdissolution of calcium ions from calcium-ion-implanted titanium. *Corros. Sci.*, **38**, 1579-1594.
- Holgers, K.M., Thomsen, P., Tjellstrom, A. and Ericson, L.E. (1995): Electron microscopic observation on the soft tissue around clinical long-term percutaneous titanium implants. *Biomaterials*, **16**, 83-90.
- Jansen, J.A., Dhert, W.J., van der Waerden, J.P. and von Recum, A.F. (1994): Semi-quantitative qualitative histologic analysis method for the evaluation of implant bio-

- compatibility. *J. Invest. Surg.*, **7**, 123-134.
- 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.
- Kim, B.I., Lee, M.H., Chon, W.Y., Yoon, D.J., Bae, T.S., Park, H.H. and Cho, H.W. (2001): Biocompatibility of surface-treated pure titanium and Ti-6Al-4V alloy. *Materials Transactions*, **42**, 2590-2596.
- Kokubo, T. (1991): Recent progress in glass-based materials for biomedical application. *J. Ceram. Soc. Japan*, **99**, 965-973.
- Kokubo, T., Mijaji, F., Kim, H.M. and Nakamura, T. (1996): Spontaneous apatite formation on chemically surface treated Ti. *J. Am. Ceram. Soc.*, **79**, 1127-1129.
- Li, P., Ohtsuki, C., Kokubo, T., Nakanishi, K., Soga, N. and Groot, K.D. (1994): The role of hydrated silica, titania and alumina in inducing apatite on implants. *J. Biomed. Mater. Res.*, **28**, 7-15.
- Mery, C.C., Grunert, G., Plaza, J.C. and Pizzi, T. (1996): Ultrasound characteristics of connective tissue around porous hydroxyapatite implants in rats. *Biol. Res.*, **29**, 361-367.
- Morehead, J.M. and Holt, G.R. (1994): Soft-tissue response to synthetic biomaterials. *Otolaryngol. Clin. North. Am.*, **27**, 195-201.
- 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. (1990a): The question of the transmissibility of the result of subcutaneous tests of biomaterials from animals to humans. *Z. Exp. Chir. Transplant Kunstliche Organe*, **23**, 23-25.
- Schreiber, H., Kinzl, H.P. and Thieme, J. (1990b): Computerized microscopic image analysis method in tissue-biomaterials interaction. *Biomater. Artif. Cells Artif. Organs*, **18**, 637-641.
- Shannon, C., Thull, R. and von Recum, A. (1997): Types I and III collagen in the tissue capsules of titanium and stainless-steel implants. *J. Biomed. Mater. Res.*, **34**, 401-408.
- Tang, L. and Eaton, J.W. (1995): Inflammatory response to biomaterials. *Am. J. Clin. Pathol.*, **103**, 466-471.
- Tengvall, P., Elwing, H. and Lundstrom, I. (1989): Titanium gel made from metallic titanium and hydrogen peroxide. *J. Colloid. Interface Sci.*, **130**, 405-413.
- Thomsen, P. and Gretzer, C. (2001): Macrophage interactions with modified material surfaces. *Current Opinion Solid State and Materials Sci.*, **5**, 163-176.
- Turner, R.F., Harrison, D.J. and Rajotte, R.V. (1991): Preliminary *in vivo* biocompatibility studies on perfluorosulphonic acid polymer membranes for biosensors applications. *Biomaterials*, **12**, 361-368.
- van Mullem, P.J., Vaandrager, J.M., Nicolai, J.P. and de Wijn, J.R. (1990): Implantation of porous acrylic cement in soft tissues: an animal and human biopsy histological study. *Biomaterials*, **11**, 299-304.
- Van, N.R. (1987): Titanium: the implant material of today. *J. Mater. Sci.*, **22**, 3801-3811.
- von Recum, A.F. and van Kooten, T.G. (1995): The influence of micro-topography on cellular response and the implications for silicone implants. *J. Biomater. Sci. Polymer Ed.*, **7**, 181-198.
- von Recum, A.F., Opitz, H. and Wu, E. (1993): Collagen type I and III at the implant/tissue interface. *J. Biomed. Mater. Res.*, **27**, 757-761.
- Williams, S.K., Berman, S.S. and Kleinert, L.B. (1997): Differential healing and neovascularization of ePTFE implants in subcutaneous versus adipose tissue. *J. Biomed. Mater. Res.*, **35**, 473-481.
- Wolfaardt, J.F., Cleaton-Jones, P., Lownie, J. and Ackermann, G. (1992): Biocompatibility testing of a silicone maxillofacial prosthetic elastomer: soft tissue study in primates. *J. Prosthet. Dent.*, **68**, 331-338.