

생체 내 티타늄과 지르코니아 표면에서 형성시킨 치면세균막의 비교

임규택¹ · 이지현² · 임일구² · 박소현² · 임현필³ · 김옥수^{2*}

전남대학교 치의학전문대학원 ¹치의학과, ²치주학교실, ³보철학교실

Comparison of biofilm on titanium and zirconia surfaces: *in vivo* study

Kyu-Taek Lim¹, DDS, MSD, Ji-Hyun Lee², DDS, MSD, Il-Gu Lim², DDS, So-Hyun Park², DDS,

Hyun-Phil Lim³, DDS, PhD, Ok-Su Kim^{2*}, DDS, PhD

²Department of Periodontics, ³Department of Prosthodontics, ¹School of Dentistry, Chonnam National University, Gwangju, Korea

Purpose: This study was conducted to compare *in vivo* biofilm formation on titanium surface and zirconia surface. **Materials and methods:** For biofilm formation on titanium and zirconia in oral cavity, after producing oral appliances using acrylic resin and orthodontic wire tailored to 9 subjects, we made titanium and zirconia specimens (6 mm × 6 mm × 2 mm), fixed them on oral appliances and maintained them in oral cavity of test subjects for 24 and 72 hours. Test subjects who have equipped two pairs of specimens maintained oral hygiene not by using toothpaste but only by tooth brushing. After 24 and 72 hours, we removed and observed specimens through scanning electron microscopy (SEM). **Results:** Biofilm formation showed large deviation depending on individuals. For formation comparison between titanium and zirconia for 24 hours, zirconia showed less biofilm formation than titanium. Biofilm formation showed large deviation depending on individuals. As for formation comparison between zirconia and titanium, the degree of biofilm formation in zirconia was less than it was in titanium after a lapse of 24 hours. The result of biofilm formation in 72 hours trial show that zirconia has an inclination to formate less biofilm than it was in titanium. **Conclusion:** Based on the above results, we can conclude that early biofilm formation in oral cavity was influenced by difference of abutment materials. (*J Korean Acad Prosthodont* 2013;51:245-51)

Key words: Titanium surface; Zirconia surface; Biofilm

서론

골유착성 임플란트는 전악 혹은 부분 무치악 환자의 치료방법으로 널리 사용되고 있으며 점차 그 활용 범위가 광범위해지고 있다. 그리고 단일 치아 수복과 부분 무치악 환자에게 대한 임플란트 치료가 증가하면서 보다 심미적인 보철이 요구되어지고 있다.¹

임플란트 보철의 심미적 측면에서의 성공 여부는 임플란트 주위의 치은 점막 형태와 최종 보철물의 재료 및 형태에 의하기 때문에 세라믹 지대주는 기존의 티타늄 지대주에 비해 재료 자체의 높은 생체 적합성뿐만 아니라 심미적으로 많은

장점을 가지고 있다.² 세라믹 재료는 자연치아와 유사한 색상을 제공하여 기존의 금속 지대주로 인해 발생될 수 있는 치은 주위의 변색을 막을 수 있어서 특히 치은이 얇은 환자에게 유리하며, 개인별 특성에 맞게 삭제가 가능하다는 장점이 있다.^{3,4}

최근, 전형적인 치과 보철분야 재료인 금값의 상승과 아말감 재료에 대한 거부감, 환자의 심미적 요구의 증대 등에 대한 환경적 요구의 변화에 따라 지르코니아(zirconia, ZrO₂) 보철물 및 임플란트를 이용한 심미 보철치료가 각광을 받고 있다.^{5,7} 또한 지르코니아는 생체친화성이 매우 우수 하여 체내 매식 시 독성이나 염증반응을 일으키지 않는 생체불활성 소재로 잘 알려져 있을 뿐만 아니라, 기존의 합금과는 달리 부식이나 변색에 대

*Corresponding Author: Ok-Su Kim

Department of Periodontics, School of Dentistry, Chonnam National University,

33 Yongbong-ro, Buk-gu, Gwangju, 500-757, Korea

+82 62 530 5640: e-mail, periodrk@chonnam.ac.kr

Article history: Received July 12, 2013 / Last Revision July 31, 2013 / Accepted September 12, 2013

© 2013 The Korean Academy of Prosthodontics

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*이 논문은 전남대병원 임상연구소에서 연구비를 지원받았음(CRI 11007-1).

한 저항성이 매우 높은 것으로 알려져 있다.^{5,7}

생체 외 실험에서 가장 점착도(adherence)가 큰 *S. mutans* 균에 있어서 티타늄에 비해 지르코니아가 치면세균막의 두께가 얇았고, 생체 내 실험에서도 티타늄보다 지르코니아가 월등히 적은 치태 축적을 보여, 생체 내에서 항균효과도 탁월한 것으로 알려져 있어 그 사용이 임플란트 매식체로의 사용에 주목 받고 있다.⁸

임플란트의 실패의 주요 원인 중 하나인 임플란트 주위염은 주로 세균감염이 원인인데 지르코니아 표면에서 세균막의 형성 정도가 임플란트 주위염의 결정적 요인이다. 이번 연구에서는 티타늄과 지르코니아 시편에 생체 내 세균형태의 분포양상에 대하여 알아보고 비교하고자 한다.

연구 재료 및 방법

1. 티타늄, 지르코니아 시편 제작

6 mm 직경의 Grade II 티타늄 봉을 2 mm 간격으로 절단하여 가압증기멸균기로 소독한 시편과, pre-sintering (1040℃)된 지르코니아(이트리아가 함유된 부분안정화 지르코니아)봉을 같은 크기로 기공용 saw를 이용하여 자른 후 sintering (1500도) 과정을 거쳐 poly bag에 진공 보관하였다(Kuwotech Co., Korea). R_a 평균 표면 거칠기는 3D optical profiler를 사용하여 측정하였다(티타늄 = 0.66 μm , 지르코니아 $R_a = 0.46 \mu\text{m}$).

2. 장치 제작

구개 측으로 양측에 7 mm × 28 mm × 2 mm 직사각형의 홈이 2개 파진 장치를 제작하고(Fig. 1) EO 가스 멸균을 시행하였다. 실험을 시작하기 전에, 장치의 구개측 홈에 flowable resin (G-aenial Universal Flo, GC Corporation, Korea)을 이용하여 시편을 부착하였다(티타늄: 18개, 지르코니아: 18개).

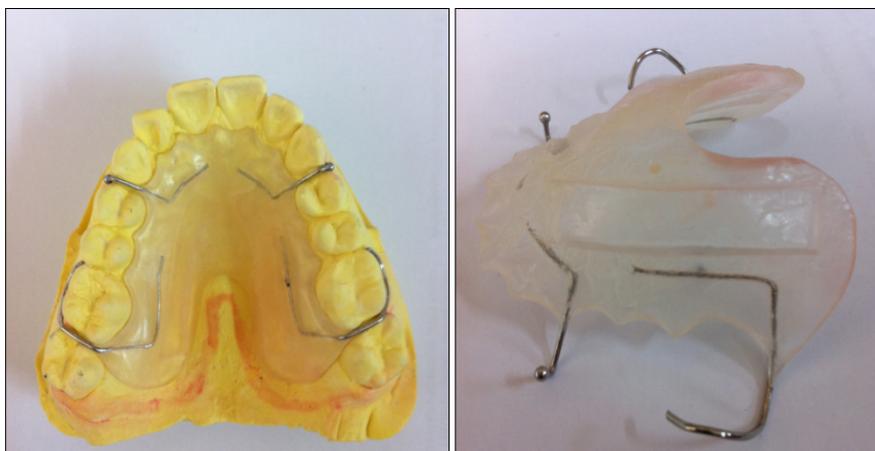


Fig. 1. Experimental appliance model.

3. 실험 대상자 선정 및 구강위생 유지방법

이번 실험에 참가 대상자는 29세에서 33세 사이의 8명의 남성과 1명의 여성으로 구성된 성인으로 모집되었다. 이들은 모두 비흡연자들이었으며, 최근 6개월간 항생제를 투여한 의학 적 병력이 없었다. 또한 전신 질환(당뇨, 고혈압, 간염, 결핵, 알레르기)도 없었다.

72시간동안 식사 시나 물을 제외한 음료를 마실 때는 장치를 빼고 1회용 폴리 글러브에 밀봉하여 보관한 후 다시 장착하였다. 구강위생은 치약을 사용하지 않고 물로만 양치하도록 하였다(이 실험은 전남대학교병원 임상시험윤리위원회(IRB)의 승인을 받았고 동의서를 받았다.(CNUH-2011-047)).

4. SEM (주사전자현미경)처리

24시간과 72시간에 수거한 시편의 치면세균막을 관찰하기 위하여 scanning electron microscopy (SEM: S-4700 HITACH Japan)로 관찰하였다. 시편을 glutaraldehyde 25% solution (product number G5882: Sigma-Aldrich Saint Louis USA)을 멸균증류수로 10배 희석하여 만든 2.5% glutaraldehyde로 실온에서 24시간동안 유지하고 phosphate buffer 용액(pH 7.4)을 사용하여 3번 세척 후 에탄올 용액(20%, 40%, 60%, 80%, 100%)으로 dehydration시킨 후 시편을 진공건조하고 금으로 코팅 후 SEM (주사전자현미경)을 이용해 관찰하였다.

5. 생체 내에서 형성된 치면세균막의 면적

24시간, 72시간에 형성된 치면세균막의 면적을 측정하기 위해 SEM (주사전자현미경)상에서 50배의 비율로 3곳을 대칭적으로 선택하여 촬영하였다. 'Image J' (US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA)프로그램을 이용하여 흑백 보정을 통해 SEM (주사전자현미경)상의 치면세균막을 검은색으로

그 외 티타늄과 지르코니아 시편 표면을 백색으로 분리하여 보정한 후, *Imgarea image area analyzer*를 이용하여 백분율을 얻어 면적 비율을 산출하였다(<http://mkwak.org/imgarea/>). 간균과 구균 비율은 10,000배 확대한 SEM (주사전자현미경)사진에서 구균의 수와 간균의 수를 직접 세어 그 비율을 기록하였다.

6. 통계처리

24시간, 72시간 각각에서 지르코니아, 티타늄 두 그룹에서의 치태세균의 부착 정도(%)의 차이와 간균과 구균의 비율은 정규성 검정 후 정규성을 보이지 않아 *Wilcoxon* 부호순위 검정을 이용하였다. $P < .05$ 를 통계적 유의성 있는 것으로 간주하였다 (SPSS Version 10.0).

결과

1. 실험 시편 종류와 구강 내 장착 시간에 따른 치태부착 정도 분석

1) 티타늄, 지르코니아 시편의 치태 세균 부착 정도의 시간에 따른 평가

Fig. 2는 티타늄과 지르코니아 구강 내 24시간, 72시간 장착한 시편의 주사전자 현미경 사진이다.

실험대상자들의 구강 위생 정도에 따라 치태의 양이 현격한 차이를 보였다. 각각의 실험대상자의 24시간, 72시간 치태세균 부착 정도는 시간에 따라 증가하였다(Table 1).

24시간과 72시간으로 시간이 경과함에 따라 치면세균막은 티타늄과 지르코니아 모두에서 증가하였다. 24시간에서 티타늄에 비해 지르코니아의 치면세균막 형성이 24시간 쯤 관찰에

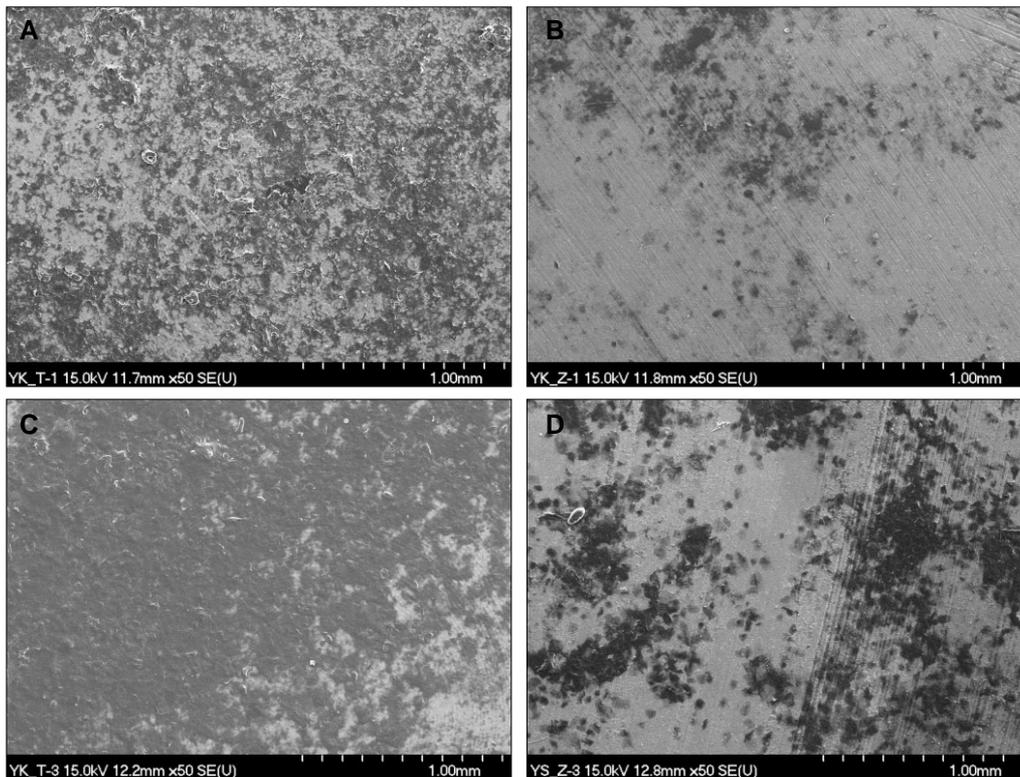


Fig. 2. Bacterial adhesion on titanium and zirconia Surfaces (magnification $\times 50$). A: 24 hrs titanium surface, B: 24 hrs zirconia surface, C: 72 hrs titanium surface, D: 72 hrs zirconia surface.

Table 1. Ratio of plaque amount attached to titanium and zirconia surface

Titanium surface		Zirconia surface	
24 hrs	72 hrs	24 hrs	72 hrs
40.64 \pm 29.05 (%)*	58.99 \pm 31.90 (%)	21.76 \pm 15.08 (%)*	45.63 \pm 27.85 (%)

mean \pm SD

* Statistically significant difference by Wilcoxon signal rank test ($P < .05$)

서는 통계적으로 유의하게 적었다. 72시간 췌 관찰에서는 티타늄에 형성된 치면세균막의 비율이 지르코니아에서보다 더 컸으나 두 표면간에 유의한 차이는 없었다(Table 1).

2) 실험 시편 종류와 구강 내 장착 시간에 따른 간균의 비율

Fig. 3은 티타늄과 지르코니아의 표면에 부착된 구균(A, B, C, D)과 간균(A, B)의 모습을 10,000배로 확대하여 보여주는 SEM (주사전자현미경)사진이다. 실험대상자 들에 따라 간균의 비율은 높은 차이를 보였다.

Table 2는 간균 비율의 평균과 표준편차이다. 24시간, 72시간에서 각각의 티타늄과 지르코니아의 간균비율과, 티타늄과 지르코니아 시편 종류 별 24시간, 72시간에서 간균비율의 통계적 유의성은 없었다(Wilcoxon 부호순위 검정 $P > .05$).

고찰

임플란트의 사용이 증가하면서 임플란트 지대주의 소재에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다. 티타늄이 현재 가장 널리 이용되는 이유는 생체 친화적이고, 뼈와 비슷한 탄성계수를 갖기 때문이다. 한편으로는 티타늄 소재 이외의 지대주로 지르코니아를 새로운 소재로 사용하려는 시도가 있어, 이러한 현재의 관심에 티타늄과 지르코니아의 생체내에서 형성시킨 치면세균막의 형성정도에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 기존의 연구는 24시간동안 구강 내 형성시킨 치면세균막의 정도를 비교하는 실험이었다.⁹ 이에 시간이 더 경과함에 따른 24시간과 72시간에 걸쳐 치면세균막의 형성정도 및 그 추이를 분석하는 것은 보다 인체에 오래 존재해야 할 임플란트 지대주의 생체 내 역할에 더 부합하는 연구일 것임에 이 실험의 의

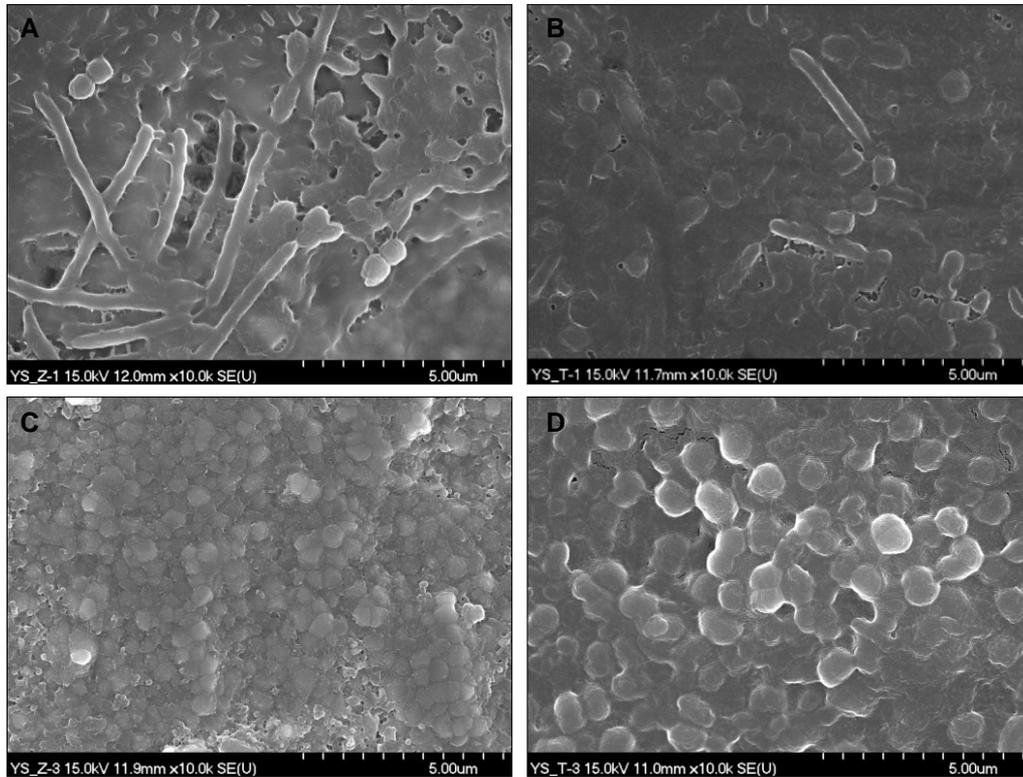


Fig. 3. Plaque composition (Rod %) attachment to titanium and zirconia surfaces after 24 hrs and 72 hrs (magnification $\times 10,000$, $12 \times 10 \mu\text{m}$ size specimen). A: 24 hrs zirconia, B: 24 hrs titanium, C: 72 hrs zirconia, D: 72 hrs titanium.

Table 2. Percentage of rods on biofilm attachment

		Percentage of rods on biofilm attachment (%)			
		Titanium surface		Zirconia surface	
		24 hrs	72 hrs	24 hrs	72 hrs
		9.56 \pm 12.66 (%)	18.62 \pm 24.50 (%)	11.34 \pm 16.64 (%)	5.50 \pm 10.65 (%)

* mean \pm SD

의가 있다.

24시간에서 티타늄과 지르코니아의 치면세균막 부착의 유의성 있는 차이는 치면세균막 형성과정에서 그 원인을 찾을 수 있을 것이다. 치면세균막 형성의 첫 번째 과정은 획득피막(acquired pellicle)의 형성이다.¹⁰ 이 획득 피막은 대부분 타액 단백질과 bacterial cell-free enzymes으로 구성되어지고, 치면세균막을 형성하는 동안 세균이 부착 될 표면으로 작용한다.¹⁰ 초기 부착은 일정 거리에서 세균 표면의 상호작용으로 시작되는데: 이는 반데르발스 인력과 electrostatic repulsive forces에 의한 것이다.¹¹ 초기 세균 부착에 영향을 줄 수 있는 또 다른 요소는 표면으로부터 세균까지의 거리이다, 액체 배지를 둘러싸는 ionic strength와, 세균의 표면자유에너지(surface free energy) 그리고 구강표면, 그리고 표면거칠기가 그러한 요소들이다.¹²

Rimondini 등⁸이 yttrium 표면으로 안정화시킨 정방정계의(tetragonal) 지르코니아가 티타늄에 비해 주목할 만큼 치면세균막이 적게 축적된다는 것을 발견하였다. 이 저자들은 티타늄 표면이 구조화된 치면세균막에 의해 보다 일정한 방식으로 부착되어지는 반면, 지르코니아는 세균 cluster를 형성하며 집락화된다는 것 또한 발견하였다.⁸

이러한 획득피막형성 후의 초기 치면세균막 형성기전의 차이가 24시간에서의 지르코니아에서 티타늄보다 적게 치면세균막 형성된 결과를 뒷받침 할 것이다.

72시간에서 다시 그 차이가 큰 의미가 없어진 이유 역시, 초기 치면세균막의 형성이 완성되면서 cluster 형태의 지르코니아 초기 집락화가 서로 합쳐지면서 티타늄과 같은 형태의 치면세균막의 일정한 구조화(uniformed structure)를 이루면서 그 차이가 크게 좁혀진 것으로 판단된다.

구강 내에 위치시킨 티타늄과 지르코니아를 실험대상자 개인별로 24시간 72시간 유지시키기 위해 티타늄과 지르코니아 2쌍을 구강 내 장치를 이용하여 구개측에 위치시키고 치약 등의 구강세정제를 사용하지 않는 잇솔질만으로 구강위생을 유지 시켜, 티타늄, 지르코니아 시편을 주사전자현미경으로 관찰한 본 실험의 결과는 초기 24시간 동안의 치면세균막의 형성 정도는 티타늄에 비해 지르코니아가 유의성 있게 치면세균막의 부착이 적었다. 개인적인 특성에 따라 치면세균막의 형성 정도가 큰 편차를 보였는데 이는 구강위생이나 구강 내 세균 조성 등의 차이 때문이라 생각된다.

72시간 쯤 관찰시 티타늄에서의 치면세균막의 부착정도가 지르코니아에서 보다 부착정도가 더 큰 경향을 보였다. 이러한 결과는, 한 번 부착된 치면세균막에 추가적인 치면세균막의 형성 속도는 매우 가속화 되어 이로 인해 어느 정도 티타늄과 지르코니아의 차이를 좁힌 것으로 판단된다. 즉, 일정 시간 이후에는 티타늄과 지르코니아의 차이가 크게 없다는 결과를 짐작하게 하는 실험 결과로 해석된다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 치면세균막의 초기형성은 소재(티타늄, 지르코니아 등)의 차이에 영향을 받으며 개인의 철저한 구강위생 습관을 시행 시 혹은 전문가에 의한 철저한 치태

관리 시 지르코니아 소재가 티타늄 소재보다 더 우수하다고 생각된다. 그러나 이번 실험은 개인의 구강위생 능력이나 구강 내 세균 조성 등의 차이에 의해 많은 편차를 보여 향후 지속적인 연구 시 실험대상군의 편차를 줄이려는 노력이 필요하다.

결론

본 연구는 생체 내에서 티타늄과 지르코니아 표면에 형성시킨 치면세균막을 24시간과 72시간에 걸쳐 비교 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 티타늄과 지르코니아 모두 시간이 지남에 따라 치면세균막의 증가를 보였으며 그 정도는 개인에 따른 큰 편차를 보였다.
2. 24시간 동안 구강 내에서 형성시킨 치면세균막의 정도는 티타늄에 비해 지르코니아가 유의성 있게 적었다($P<.05$).
3. 72시간 동안 구강 내에서 형성시킨 치면세균막의 정도는 티타늄과 지르코니아에서 유의성 있는 차이를 확인할 수 없었다.

이상의 결과 구강 내에서 치면세균막의 초기 형성은 지대주 소재의 차이에 의해 영향을 받을 것으로 생각된다.

References

1. Jemt T, Laney WR, Harris D, Henry PJ, Krogh PHJ, Pollizi, Zarb GA, Hermann I. Osseointegrated implants for single tooth replacement: a 1-year report from a multi-center prospective study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1991;6:29-36.
2. Heydecke G, Sierraalta M, Razzong ME. Evolution and use of aluminum oxide single tooth implant abutment: A short review and presentation of two cases. *Int J Prosthodont* 2002;15:448-93.
3. Rasperini G, Magnolione M, Cocconcelli P, Simion M. In vivo early plaque formation on pure titanium and ceramic abutments: a comparative microbiological and SEM analysis. *Clin Oral Implants Res* 1998;9:357-64.
4. Johnson RH, Persson GR. A 3-year prospective study of a single-tooth implant-Prosthodontic complication. *Int J Prosthodont* 2001;14:183-9.
5. Miyazaki T, Hotta Y, Kunii J, Kuriyama S, Tamaki Y. A Review of Dental CAD/CAM: Current Status and Future Perspectives from 20 Years of Experience. *Dent Mater J* 2009;28:44-56.
6. Nakamura K, Kanno T, Milleding P, Ortengren U. Zirconia as a dental implant abutment material: a systematic review. *Int J Prosthodont* 2010;23:299-309.
7. Gomes AL, Montero J. Zirconia implant abutments: a review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011;16:50-5.
8. Rimondini L, Cerroni L, Carrassi A, Torricelli P. Bacterial colonization of zirconia ceramic surfaces: an in vitro and in vivo study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002;17:793-8.
9. Scarano A, Piattelli M, Caputi S, Favero GA, Piattelli A. Bacterial adhesion on commercially pure titanium and zirconium oxide disks: an in vivo human study. *J Periodontol* 2004;75:292-6.

10. Steinberg D, Sela MN, Klinger A, Kohavi D. Adhesion of periodontal bacteria to titanium, and titanium alloy powders. *Clin Oral Implants Res* 1998;9:67-72.
11. Quirynen M, Bollen CM, Papaioannou W, Van Eldere J, van Steenberghe D. The influence of titanium abutment surface roughness on plaque accumulation and gingivitis: short-term observations. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996;11:169-78.
12. Bollen CM, Papaioanno W, van Eldere J, Schepers E, Quirynen M, van Steenberghe D. The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis. *Clin Oral Implants Res* 1996;7:201-11.

생체 내 티타늄과 지르코니아 표면에서 형성시킨 치면세균막의 비교

임규택¹ · 이지현² · 임일구² · 박소현² · 임현필³ · 김옥수^{2*}

전남대학교 치의학전문대학원 ¹치의학과, ²치주학교실, ³보철학교실

연구 목적: 본 연구는 생체 내 티타늄과 지르코니아 표면에 치면세균막의 형성 정도를 비교하기 위함이다.

연구 재료 및 방법: 티타늄과 지르코니아의 구강 내 치면세균막의 형성을 위해 구강 내 장치를 아크릴릭 레진과 교정용 와이어를 이용하여 9명의 실험대상자에 맞추어 제작한 후 티타늄과 지르코니아 봉을 일정 크기의 시편 (6mm × 6mm × 2mm)으로 만들어 장치에 고정하여 실험 대상자 구강 내에 24시간, 72시간 유지시켰다. 2쌍으로만 들어 장치한 시편을 실험 대상자는 치약 등의 구강세정제를 사용하지 않고 잇솔질만으로 구강위생을 유지하였다. 24시간, 72시간 경과 후 시편을 제거하여 SEM(주사전자현미경)으로 치면세균막을 관찰하였다.

결과: 주사전자현미경의 결과 치면세균막의 형성 정도는 개인의 특성에 따라 큰 편차를 보였고, 24시간 후 치면세균막의 비교했을 때 지르코니아 표면에서 치면세균막의 형성 정도가 티타늄의 표면에 비해 적었다. 72시간 후 치면세균막의 형성 정도는 티타늄 표면보다 지르코니아 표면에서 적은 경향을 보였다.

결론: 구강 내에서 치면세균막의 초기 형성은 지대주 소재의 차이에 의해 영향을 받을 것으로 생각된다. (*대한치과보철학회지* 2013;51:245-51)

주요단어: 티타늄 표면; 지르코니아 표면; 치면세균막

* 교신저자: 김옥수

500-757 광주광역시 북구 용봉로 33번지 전남대학교 치과병원 치주학교실

062-530-5640: e-mail, periodrk@chomam.ac.kr

원고접수일: 2013년 7월 12일 / 원고최종수정일: 2013년 7월 31일 / 원고채택일: 2013년 9월 12일

© 2013 대한치과보철학회

이 글은 크리에이티브 커먼즈 코리아 저작자표시-비영리 3.0 대한민국 라이선스에 따라 이용하실 수 있습니다.

*이 논문은 전남대병원 임상연구소에서 연구비를 지원받았음(CRI 11007-1).