

바이오-플로팅시스템을 통한 Tailor-Made 3D PCL Scaffold 제작

손준곤 · 김근형[†] · 박수아 · 김완두

자연모사 바이오기계연구팀, 한국기계연구원
(2007년 12월 22일 접수, 2008년 1월 18일 채택)

Fabrication of Tailor-Made 3D PCL Scaffold Using a Bio-Plotting Process

JoonGon Son, GeunHyung Kim[†], Su-A Park, and WanDoo Kim

Nature-Inspired BioMechanical Team, Division of Nano-Machinery,

Korea Institute of Machinery and Materials (KIMM), 171 Jang-Dong, Yuseong-Gu, Daejeon 305-343, Korea

(Received Decemer 22, 2007; Accepted January 18, 2008)

초록 : 생체 친화적이며 생분해성 고분자 소재인 poly(ϵ -caprolactone) (PCL)을 rapid prototyping(RP) 공정의 바이오플로팅 시스템을 통해 세포 재생용 지지체(scaffold)를 제작하였다. 제작된 PCL 지지체는 DMA(dynamic mechanical analyzer)를 통해 동일한 재료로 제작된 기존 염침출법(salt-leaching)에 의한 지지체보다 월등히 향상된 기계적 강도를 갖고 있음을 확인하였고, 이는 기존 전통적인 세포지지체 제작에서 문제점중의 하나인 기계적인 강도적인 측면을 보완하여, 뼈조직 재생에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 예상된다. 지지체 내부의 구조는 세포의 증식과 이동 및 영양분의 공급이 지속될 수 있도록 전체적으로 연결된 통로로 구성되어 있고, 다양한 세포의 증식이 가능하도록 지지체의 공극 크기와 strand의 굵기 등을 조절할 수 있으며, 이를 이용하여 대체하고자 하는 생체 조직의 특성에 맞도록 기계적 강도를 조절할 수 있음을 확인하였다. 제조된 PCL지지체는 연골세포를 통하여 셀 컬처링 되었고, 3차원 세포 지지체로서의 충분한 가능성을 보여주었다.

Abstract : Biomedical scaffold for tissue regeneration was fabricated by one of rapid prototyping processes, bioplotting system, with a biodegradable and biocompatible poly(ϵ -carprolactone) (PCL). Through dynamic mechanical test, it was observed that the PCL scaffold manufactured by the bioplotting process has the superior mechanical properties compared to the conventional scaffold fabricated by a salt-leaching process, and the plotted scaffold could be employed as a potential scaffold to regenerating hard and soft tissue. The plotted scaffold was consisted of porous structures, which were interconnected with each pore to help cells be easily adhered and proliferated in the wall of pore tunnels, and metabolic nutrients can be transported within the matrix. By using the plotting system, we could adjust the pore size, porosity, strand pitch, and, strand diameter of PCL scaffolds, which were important parameters to control mechanical properties of the scaffolds, and consequently we could determine that the mechanically controlled scaffolds could be used as a matching scaffold for any required mechanical properties of the target organ. The fabricated 3D PCL scaffold showed enough possibility as a 3D biomedical scaffold, which was cell-cultured with chondrocytes.

Keywords : PCL, 3D scaffold, bioplotter, rapid prototyping.

서 론

지난 수 십 년간 과학기술의 발달에 따라 인체의 조직을 모사하여 대체하는 기술이 활발히 연구되고 있다. 최근의 세포 재생 공학 분야에서는 인체의 조직들을 대체하기 위한 수단으로 세포들의 배양을 돕는 지지체(scaffold)에 대한 연구가 많이 진행되고 있다. 인체내의 세포는 부유세포와 부착되어 성장하는 부착세포로 구성되어 있는데,

부착세포는 부착할 곳이 없으면 성장되지 못하고 죽는다.¹ 따라서 지지체는 원하는 형상의 외형을 가지고 있으면서, 내부는 세포들이 침투할 수 있도록 다공성의 구조를 가짐으로, 내부 구조물에 세포들이 부착되고 배양될 수 있는 환경을 제공하고 시간이 지남에 따라 세포들의 증식을 돕는 구조물이다.

이를 위해서 대체하고자 하는 신체 부위와 동등한 정도의 기계적 강도를 갖고 있어야 하고, 원하는 모양으로 만들 수 있어야 한다. 또, 높은 공극률(porosity)과 넓은 표면적을 가지고 있으면서, 각각의 공극(pore)들이 균일하게 잘 연결되어 세포들의 증식 통로로 이용될 수

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: gkim@kimm.re.kr

있어야 한다.

물론, 인체 혹은 체내에 사용되는 물질이므로, 거부반응 없이 생체 친화적(biocompatible)이어야 하며, 세포가 증식됨에 따라 구조물이 세포로 대체되도록 생분해(biodegradable)가 가능해야 한다. 그리고, 분해된 성분들이 체내에 흡수(bioabsorbable)되어도 문제가 없어야 한다.

이러한 지지체를 만들기 위한 여러 생체 고분자 재료들이 개발되어 활용되고 있는데, PCL은 낮은 용융점을 가지며 기계적 성형이 용이하며 일정 수준 이상의 적당한 기계적 강도를 형성할 수 있고, 생체친화적인 재료로 체내에서 가수분해와 효소 활동 등의 방법으로 분해되어 이산화탄소와 물의 형태로 배출되며, 독성이 없어 많이 이용되고 있다.

PCL을 이용하여 화학적인 방법인 염침출법(salt-leaching process)으로 만든 지지체는 Figure 1과 같이 어느 정도의 공극 분포를 가지며 높은 공극률을 가지고 있다. 그러나 sponge 구조를 갖기 때문에 기계적 강도가 약하고 가장 큰 단점은 공극들이 서로 interconnected한 구조를 이루고 있지 못하고 있다.

이러한 구조는 다음과 같은 이유로 세포의 증식에 문제점을 가지고 있다. 세포들이 표면에 seeding되어 어느 정도 자라고 침투가 진행이 되면 세포 사이의 공간이 새로 증식된 세포들로 채워지게 된다. 이때 산소나 영양분들이 차단되는 penetration depth를 형성하며 더 이상 새로운 세포들이 증식되지 못하게 된다.²

따라서 지속적인 세포의 증식을 위해서는 영양소와 세포의 이동 통로로 이용될 수 있는 interconnected한 구조의 지지체가 필요하다.

많은 공학적 기술들 또한 세포 배양용 지지체를 만드는 데에 응용되고 있는데, 이러한 구조를 만들 수 있는 제조기법으로 다음의 몇 가

지 방법 중에 RP 테크닉이 있다.

3D 프린팅법의 경우 powder mixture 등의 재료로 롤러를 이용하여 한 층씩 쌓아나가는 방법이고 바이오플로팅(bioplotting)법은 어느 정도의 점도를 가진 재료를 미세한 노즐을 통한 압출 방식으로 그려내는 방법이다.

두 가지 방법 다 공극들의 연결이 잘 되어 있고, 외관상 차이는 없어 보인다. 그러나, 기계적 강도를 살펴보면 3D 프린팅법에 의한 지지체는 flexural strength, Young's modulus, strain 등 여러 부분에서 바이오플로팅 방식에 비해 낮은 값을 나타낸다. 이러한 차이는 결국 세포의 증식에서도 바이오플로팅 방법이 우월한 결과를 보여준다.³

바이오플로팅시스템에 의한 지지체의 제작은 고분자 재료의 민감한 특성인 온도와 바이오 플로터의 지지체 제조 조건에 의해 좌우되는데, 온도 변화에 따른 노즐에서의 swelling 현상이나, plotting 속도에 따른 strand의 diameter 변화와 이들이 layer thickness 변화에 미치는 영향 등을 고려하여 제작하여야 한다. Figure 2는 모든 조건은 동일한 상태에서 PCL의 용융 온도 변화가 3차원 지지체의 제작에 미치는 영향을 비교한 사진이다. (b) 사진은 전체적으로 설계된 형태로 형상이 구현된 모습인 반면, (a) 사진은 layer가 쌓여가면서 구조가 무너진 형태를 나타내고 있다.

세포들의 증식은 세포들의 배양시 지지체에 부착되는 초기 부착률에 따라 비례하게 된다. 많은 수의 세포가 세포 배양용 지지체의 표면에 부착하는데 성공하면 높은 증식률을 나타내고, 지지체의 표면 형

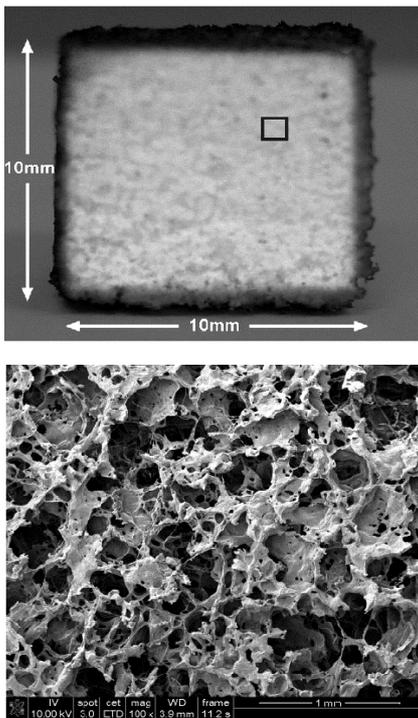
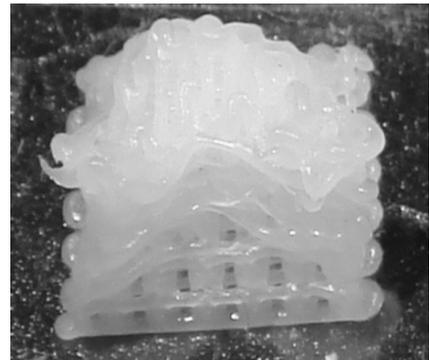
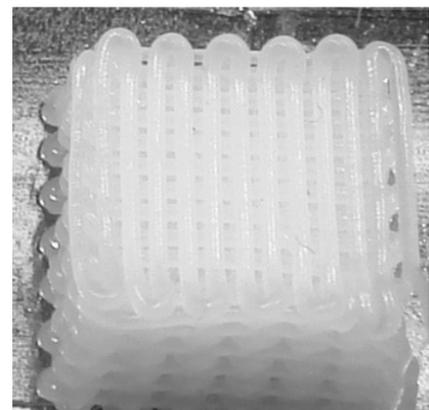


Figure 1. The upper surface of PCL scaffold fabricated by a salt-leaching process and SEM image of magnified surface.



(a)



(b)

Figure 2. Effect of the melting temperature for PCL under same manufacturing conditions (a) at 120 °C and (b) at 100 °C.

상과 공극의 크기는 세포의 초기 부착물에 영향을 미친다. 이러한 이유로 근육 세포의 경우 평평한 바닥에서 보다 마이크로 크기의 고분자 물질이 깔린 바닥에서 잘 증식했고, 마이크로 이하 크기의 구조물을 가진 바닥에서는 더 높은 증식률을 나타냈다.⁴ 뼈 세포의 경우 지지체가 100~350 μm 크기의 공극을 가질 때 재생이 잘 되었다.⁵

따라서 본 연구에서는 공극간의 연결성에 제한이 있는 염침출법(salt-leaching process)의 한계를 극복하고, 기계적 강도가 향상된 세포의 증식에 적합한 다양한 공극의 크기를 가진 interconnected 구조의 tailor-made 지지체를 제작하고자 PCL을 원료로 바이오 플로팅 방법을 이용하여 3차원 구조의 지지체를 만들었고, 이에 세포를 배양하여 초기 부착 상태를 확인하여 보았다.

실 험

재료. 바이오플로터를 통한 세포 재생용 지지체 제작시 사용된 재료는 PCL (poly-ε-caprolactone, Mn ca. 80000 g · mol⁻¹, mp. = 60 °C)로 미국 Aldrich chemical사의 제품이 사용되었다.

3D PCL 지지체의 제작. 3차원 구조의 지지체는 PCL을 재료로 노즐의 내부 직경에 맞춰 100도~120도로 용융하여 제작된 바이오 플로터를 이용하여 압출하여 만들었다. PCL 용융시 열분해(degradation)를 고려하여 모든 지지체 제작은 PCL 주입 후 약 30분 후 제작되었다.

실험에 사용된 바이오 플로팅 시스템은 Figure 3과 같은 구조의 PED(precision extruding deposition) 방식으로 알갱이 상태의 PCL을 가열 챔버 안에 넣어 화학적 용해 없이 고온으로 용융시켜 정밀한 나사의 회전에 따른 압력으로 밀어내어 미세한 바늘을 통해 XYZ 스테이지로 이동하며 target plate에 그려낸다.

노즐의 크기는 27G(200 μm), 25G(250 μm), 23G(330 μm)을 이용하였고, 각각의 노즐로 300~700 μm의 주기를 갖는 strand를 90도 직각으로 교차시키며 층으로 쌓아 전체적으로 연결되는 Figure 4와 같은 모습의 다공성 형태로 샘플들을 제작하였다. 3차원 구조의 PCL 지지체 샘플들은 가로, 세로, 높이가 각각 10×10×5 mm의 크기를 가지며 공극의 크기는 150~400 μm까지 갖도록 strand간의 간격을 조정하여 제작하였다. 일반적으로 제작시간은 지

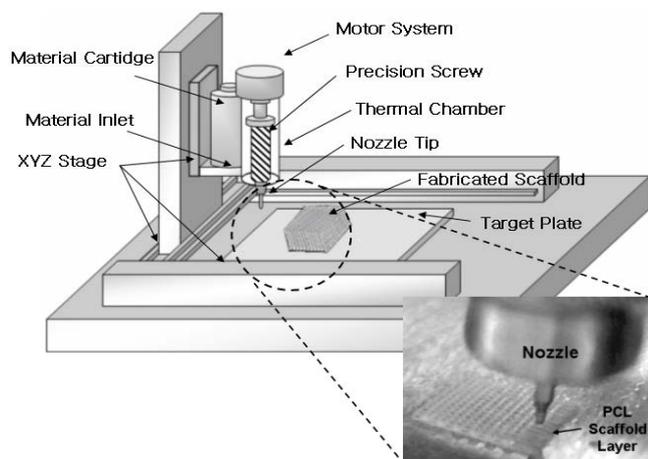


Figure 3. Schematic of bioplotting system.

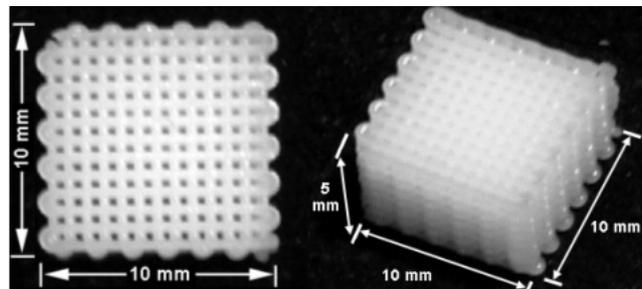


Figure 4. Fabricated 3D PCL scaffolds by bioplotting system.

지체의 크기와 노즐의 이동속도에 따라 다르며 10×10×5 mm의 크기 제작시 약 15~20분 정도가 필요하게 된다.

3D PCL 지지체의 외형적 특성 분석. 바이오플로터의 노즐의 크기가 작으면 용융된 재료의 원활한 압출을 위해 온도를 올려주어 viscosity를 낮춰줘야 하나, 온도가 높아질수록 냉각 시간이 길어지면서 형성된 구조물의 형상 변화가 생기게 된다. 또 온도가 변함에 따라 swelling 현상에 의해 strand의 diameter가 변하게 되는데, tailor-made 지지체를 만들기 위해 변형을 줄이도록 이러한 조건들을 조정하며 제작하였다. 여러 diameter의 strand로 주기와 공극의 크기를 변화시켜가며 현미경을 이용하여 공극률, 공극의 크기와 정밀도를 확인하였다.

3D PCL 지지체의 기계적 특성 분석. 10×10×5 mm 크기의 3차원 구조의 PCL 지지체의 공극률 변화에 따른 기계적 강도를 측정하기 위해 DMA(dynamic mechanical analyzer, TA Instrument)를 이용하여 1~10 Hz의 frequency sweep으로 compressive modulus를 측정하였다. 기존 염침출법으로 동일한 모양의 3차원 구조의 PCL 지지체를 제작하여 측정한 값과 바이오플로터를 이용한 3차원 구조의 PCL 지지체의 값도 함께 비교하였다.

세포 배양 실험. 본 연구에서 제작된 3차원 세포지지체의 내부 공극 사이의 세포 성장을 알아보기 위해 세포 배양 실험을 수행하였다. 10×10×5 mm 크기의 지지체를 70% 알코올에 담근 후, 자외선에서 멸균 처리하였다. 실험에 사용된 세포는 돼지로부터 콜라게네이즈 효소처리를 하여 분리한 연골 세포를 사용하였다. 분리된 연골 세포는 충분한 세포 수를 확보하기 위해 3대 계대배양한 세포를 사용하였으며, 시판된 5×10⁵ cells을 접종하였다. 배양액은 1% 항생제가 포함된 DMEM-HG를 사용하였으며, 37 °C 하에서 5% CO₂ 인큐베이터에서 일주일간 배양하였다. 연골 세포가 배양된 지지체 샘플은 4% 포르말데히드(formaldehyde)를 이용하여 고정하였고, 탈수과정을 거친 후, 전자주사현미경(SEM)을 이용하여 관찰하였다.

결과 및 토론

3D PCL 지지체의 정밀도와 공극률. Figure 5는 3가지 크기의 노즐(nozzle diameter=200, 250, 330 μm)을 가지고 strand의 주기를 150~400 μm로 바꿔가면서 3D PCL 지지체 샘플을 제작한 뒤 현미경을 이용하여 실측한 값과 비교한 그래프이다.

x축이 설계된 strand의 주기 값이고 y축이 현미경을 이용하여 실제 측정된 값이다. 실측된 strand의 위치가 설계된 주기와 일치할

수축 데이터의 분포는 그래프의 대각점선 쪽으로 접근하게 된다. Figure 5(a)를 보면 nozzle diameter(ND)가 330 μm 의 경우 strand period(SP)가 150, 250, 350 μm 로 설정하여 제작하였고, ND=250 μm 의 경우 SP=200, 300, 400 μm 로, ND=200 μm 의 경우 SP=140, 240, 340 μm 를 갖도록 하였다. 실제 측정된 strand 주기의 분포는 설계된 값에 잘 따라가고 있으나, 전체적으로 감소한 값을 가지고 있는데, 이는 압출된 strand의 diameter가 수직적 압력이나 die-swelling 현상 등에 의해 완전한 원형에서 변형되어 수평적 방향으로 증가되어 strand의 간격의 감소로 나타나게 된 것이다. 낮은 용융온도는 빠른 응고로 인해 지지체의 형상의 변화가 적지만 strand간의 접착력이 약해서 기계적 인장강도가 감소하고, 높은 온도는 PCL의 viscosity를 낮춰주어 다양한 모양의 가공이 쉽지만 응고시간 동안 이러한 형상의 변화를 유발한다. Figure 5(b)는 설계된 공극률과 실제 측정된 공극률의 비교 그래프이다. ND=200, 250, 330 μm 의 경우에 대해 45~75%의 공극률을 갖도록 interconnected한 지지체가 제작되었고, 실제 측정된

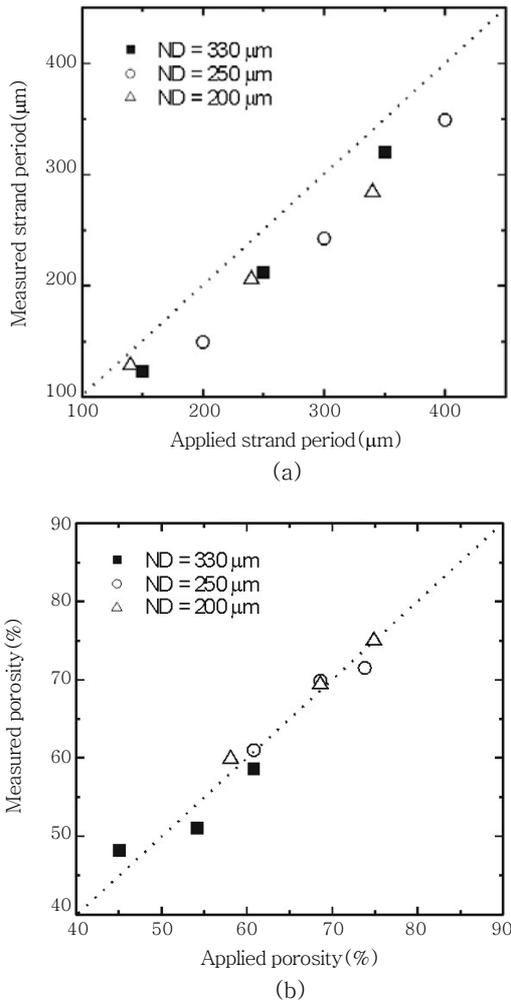


Figure 5. Comparisons of (a) applied strand period vs. measured strand period and (b) measured porosity vs. applied porosity for various NDs (needle diameters).

공극률도 3% 이내의 오차를 가지며 그래프의 점선에 잘 따르고 있음을 확인할 수 있다.

이는 압출된 strand의 diameter가 증가된 변화에 의해 수평적으로 공극의 크기(pore size)는 감소했지만 수직적인 두께(layer thickness)의 감소로 인해 전체적인 부피대 질량비인 공극률의 차이는 변화가 없었음을 알 수 있다.

3D PCL 지지체의 기계적 특성. 다양한 부분의 인체 조직을 대체 하려면 그에 대응하는 기계적 강도를 형성할 수 있어야 한다. 이에 따라 3D PCL 지지체의 공극률을 변화시켜 가면서 기계적 강도를 측정하여 보았다.

Figure 6(a)는 공극의 크기 변화에 따른 compressive modulus 값을 나타낸 그래프이다. 3가지 종류의 노즐(200, 250, 330 μm)로 제작된 다양한 공극 크기의 지지체 샘플들 중에서 가장 대조적인 공극 크기를 갖는 샘플을 3가지 선택하여 테스트를 진행하였다. 각각의 경우 샘플의 공극 크기는 130, 240, 320 μm 로 공극의 크기가 작을수록 압축강도가 정비례하여 증가하고 있다.

이와 같은 경우의 공극률이 압축 강도에 미치는 영향 또한 Figure 6(b)에서 비례함을 확인할 수 있다. 두 그래프의 값을 비교해 보면, 지지체의 strand 간격을 조정하여 공극의 크기를 설정할 수 있고, 이

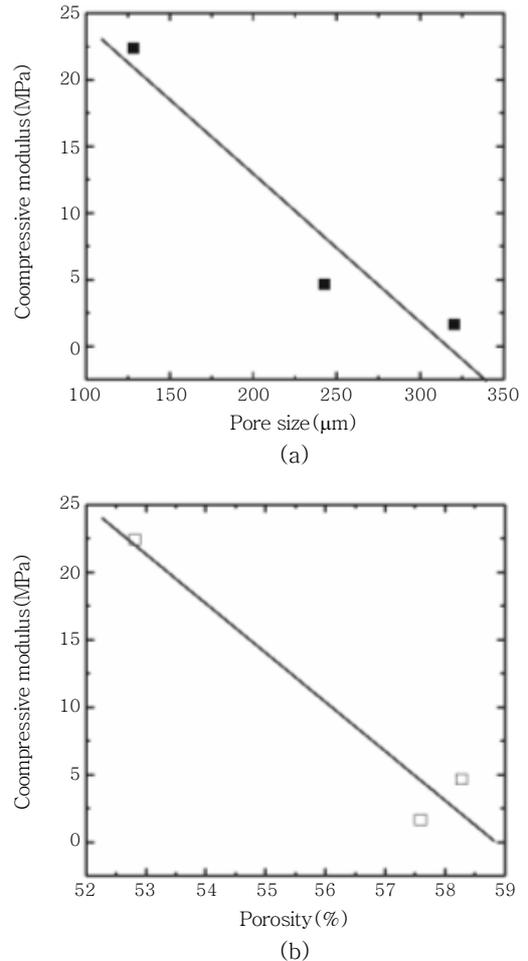


Figure 6. Compressive modulus curve of 3D PCL scaffold as a function of (a) pore size and (b) porosity.

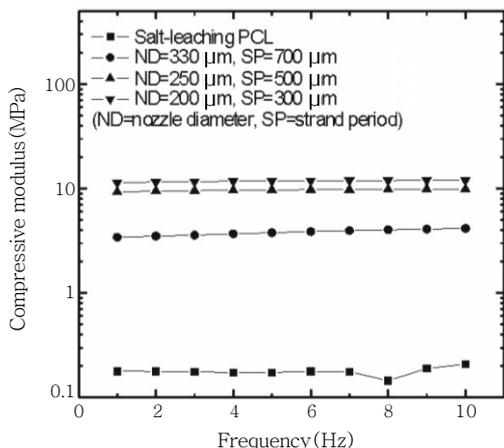


Figure 7. Comparison of compressive modulus for 3D PCL scaffold fabricated by bioplotting process and salt-leaching process. ND and SP mean a needle diameter and a strand period, respectively.

를 이용하여 3차원 지지체의 공극률을 조절할 수 있음을 알 수 있다. 이로써, 지지체의 기계적 압축 강도는 이러한 공극률에 비례하여 변화함을 확인할 수 있었고, 이를 이용하여 원하는 기계적 강도를 갖도록 하여 다양한 신체조직을 대체할 수 있는 지지체의 개발도 가능함을 알 수 있다.

염침출법에 의한 3D PCL 지지체와의 비교. 기존 염침출법에 의한 3D PCL 지지체는 스폰지구조를 가지고 있으며, 이로 인하여 외부 응력이 가해졌을 때 응력을 지지해줄 기계적 강도가 약하다는 단점이 있는 반면, 바이오플로팅을 통하여 얻어진 지지체는 외부 응력의 집중화를 분산시킬 수 있는 구조물로 제작될 수 있기 때문에 기계적인 강도를 변화시킬 수 있는 장점을 가지고 있다.

Figure 7에서는 바이오플로팅 시스템에 의한 3D PCL 지지체의 경우 다양한 strand 두께 및 strand간의 간격을 변화시킴으로써, 압축강도가 바뀌는 확인할 수 있다. 바이오 플로터를 이용하여 ND = 200 μm, SP=300 μm를 갖는 샘플과 ND=250 μm, SP=500 μm, 그리고 ND=330 μm, SP=700 μm를 갖는 3D PCL 지지체를 제작하여 compressive modulus를 측정한 값은 각각 11.37, 4.28, 3.43 MPa로 동일한 고분자 재료를 사용하였음에도 염침출법에 의한 PCL 지지체의 0.18 MPa 보다 월등히 향상되었음을 알 수 있다.

이는 염침출법으로 제조된 지지체의 약한 기계적 강도로는 대체하기 힘든 골(bone) 조직에 대해서도 유용하게 접근할 수 있는 가능성을 보여준다.

세포 배양 실험. Figure 8은 제작된 지지체의 공극 사이에 연결 세포가 부착된 모습을 보여주고 있다. Figure 8(a)는 수많은 연결 세포들이 strand 표면에 골고루 잘 퍼져 부착되어 있는 모습을 나타내고 있다. Figure 8(b)에서는 지지체의 strand 사이 단위 공간에서 세포들이 strand를 타고 연결되어 뻗어 있는 모습을 볼 수 있고 Figure 8(c)에서는 strand를 타고 건너편으로 연결되며 증식된 형태이나 지지체 내의 단위 공극 사이에서 완전히 정착되지 않은 모습을 보여주고 있다.

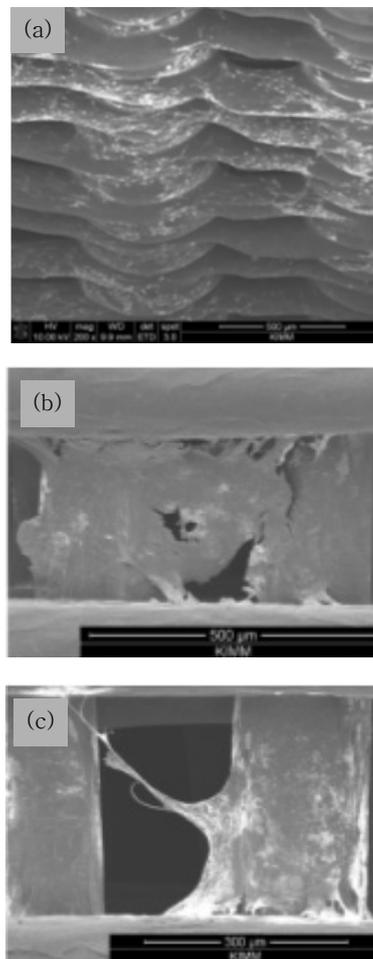


Figure 8. SEM images of proliferated chondrocytes between the strands fabricated by bioplotter system. (a) side view, (b) and (c) top view.

일반적으로 염침출법으로 제작된 3차원 구조의 지지체는 내부에 세포가 침투해 들어가지 못하는 단점이 있으나, 본 연구에서 제작된 지지체는 균일한 공극을 가지고 있으며, 공극사이에 침투된 세포들이 지지체의 strand들에 부착되어 interconnected한 공극의 연결 구조를 이용하여 이동되면서 증식되고 있음을 확인하였고, 이러한 구조는 균일한 조직 재생을 유도하는데 유리함을 알 수 있다.

결론

본 연구에서는 바이오플로팅 방법을 이용하여 생체친화적이면서 생분해성인 고분자 물질인 PCL을 사용하여 화학적 용해과정 없이 고온으로 용융시켜 target plate에 직접 압출시켜 3차원 구조의 세포 재생 지지체를 제작하였다. 같은 재료가 이용된 기존의 염침출법에 의한 지지체보다 기계적 강도가 월등히 향상되었음을 확인할 수 있었고, 원하는 형상의 외형에 전체적인 내부는 interconnected pore 구조를 갖는 tailor-made 지지체를 제작할 수 있음을 확인하였고 세포 배양을 통해 이러한 구조가 세포의 재생에 유용하게 이용되고 있음을 알 수 있었다.

제작된 지지체의 strand diameter, 주기를 변화시키면서 다양한 세포에 적합하도록 공극의 크기를 조정할 수 있었고, 이를 이용하여 porosity의 변화와 넓은 범위의 기계적 강도를 갖도록 조정할 수 있음을 확인하였다. 이는 생체 재생 공학에서 다양한 부위의 신체 조직 대체를 가능케 하며, 기존의 동일한 고분자 물질을 가지고도 다양한 기계적 강도와 특성을 갖는 세포 재생용 지지체의 개발이 가능함을 보여주었다.

감사의 글 : 본 연구는 한국기계연구원 전문연구사업에 의해서 지원되었기에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. G. S. Khang, M. S. Kim, B. H. Min, I. W. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **3**, 376 (2006).
2. E. Sachlos and J. T. Czernuszka, *European Cells and Materials*, **5**, 29 (2003).
3. A. Pfister, R. Landers, A. Laib, U. Hubner, R. Schmelzeisen, and R. Mulhaupt, *J. Polym. Sci.; Part A : Polym. Chem.*, **42**, 624 (2004).
4. A. Thapa, D. C. Miller, T. J. Webster, and K. M. Haberstroh, *Biomaterials*, **24**, 2915 (2003).
5. C. M. Agrawal and R. B. Ray, *J. Biomed. Mater. Res.*, **55**, 141 (2001).