〈학술논문〉 DOI:10.3795/KSME-B.2008.32.11.856

혈액 세포의 고유자성을 이용한 마이크로 자기영동 세포분리기

정 진 희* · 한 기 호†

(2008년 8월 1일 접수, 2008년 9월 25일 수정, 2008년 10월 1일 심사완료)

Magnetophoretic Microseparators for Separating Blood Cells Based on Their Native Magnetic Properties

Jinhee Jung and Ki-Ho Han

Key Words: Blood Cells(혈액 세포), Cell Separator(세포분리기), High Gradient Magnetic Separation(고구배자장), Magnetophoresis(자기영동), Microfluid(미소유체)

Abstract

This paper presents the characterization of a continuous magnetophoretic microseparator for separating white and red blood cells from peripheral whole blood cells based on their native magnetic properties. The magnetophoretic microseparator separated the blood cells using a high gradient magnetic separation (HGMS) method without the use of additives such as magnetic beads or probing materials. Experimental results show that the paramagnetic capture mode microseparator can continuously separate out 93.5% of red blood cells and 97.4% of white blood cells from diluted whole blood, and the diamagnetic capture mode microseparator can continuously separate out 89.7% of red blood cells and 72.7 % of white blood cells by using applying an external magnetic flux of 0.2 T using a permanent magnet.

1. 서 론

고구배자장(HGMS: high gradient magnetic separation)을 이용하여 바이오 물질을 분리하기 위한 자기영동(magnetophoresis) 분리 기술[1~4]은 간단한 구조와 함께 효율이 높고, 사용이 간편하며, 유전영동(dielectrophoresis)에 비해 가수분해 특성이 없는 장점이 있어 오랫동안 꾸준히 연구되고 있는 분야이다. 자기영동을 이용하여 세포를 분리하는 기술은 크게 자기입자를 이용하는 방법과 세포의 고유자성을 이용하는 방법으로 구분된다.

자기입자를 이용하는 방법은 선택성이 뛰어나 시료 속에 희박하게 존재하는 희귀세포를 손쉽게 분리할 수 있고, 다양한 종류의 세포를 정확히 구분할 수 있다는 장점을 지니고 있다. 반면, 이 방법은 자기입자를 이용하기 때문에 분리 전·후

기호설명

$\vec{F}_{BC}$	: 혈액 세포가 받는 자기력
μ_0	: 공기의 투자율
χ_{BC}	: 혈액 세포의 자화율
χ_B	: 용액의 자화율
V_{BC}	: 혈액 세포의 부피
$\vec{H}$	: 외부자기장 벡터
r, ϕ	: 원통 좌표계에서의 거리와 각도
$\vec{a}_r$, $\vec{a}_\phi$	: 원통 좌표계에서의 단위 벡터

† 책임저자, 회원, 인제대학교 나노공학부
E-mail : mems@inje.ac.kr
TEL : (055)320-3715 FAX : (055)320-3715
* 인제대학교 나노공학부

에 복잡한 시료처리 작업이 요구되며, 또한 불연속적인 분리 특성으로 인해 시료 처리속도가 느린 단점이 있다.

이러한 문제점을 해결하기 위하여 지난 수십 년 동안 세포의 고유자성만을 이용하여 세포를 분리하려는 연구들[5~12]이 수행되어 왔으며, 그 결과 디옥시헤모글로빈(deoxyhemoglobin) 적혈구(RBCs: Red Blood Cells)는 혈액 속에서 약 3.9×10^{-6} (SI)의 자화율(susceptibility)을 가지는 상자성(paramagnetic) 입자이고 백혈구(WBCs: White Blood Cells)는 Takayasu에 의해[11] 반자성(diamagnetic) 입자임이 알려졌다. 세포가 고유자성을 지니고 있음이 알려졌음에도 불구하고 세포의 고유자성이 매우 미약하고, 수 센티미터(cm) 이상의 크기인 기존 자기영동 세포분리기에서 발생하는 구배자장으로는 수 마이크로미터(μm) 크기의 세포에 충분한 자기력을 유도하기 어려운 한계로 인해 세포의 고유자성만을 이용한 분리기술은 여전히 뚜렷한 연구 성과를 보이지 못하고 있다.

Han과 Frazier의 선행 연구[13]에서 기존의 자기영동 세포분리 기술의 한계점을 극복하고 분리속도를 향상시키기 위하여 초소형 정밀기계기술을 이용함으로써 세포의 고유자성만으로 세포를 연속적으로 분리할 수 있는 마이크로 자기영동 세포분리기를 제안하였다.

본 논문에서는 선행 연구결과[13]에 의해 수학적으로 확립된 연속적인 세포분리 방식을 이용하여, 고구배자장과 세포의 고유자성으로부터 발생되는 자기력의 이론식이 유도되며, 시뮬레이션 결과를 통하여 유도된 이론식의 타당성이 검증된다. 나아가 유속에 따른 혈액 세포의 분리효율이 측정되며, 예측결과와 비교·분석된다.

2. 분석 및 설계

2.1 이론

Figure 1과 같이 센자성 와이어(ferromagnetic wire)에 자기장이 인가되면 와이어 주위의 자기장이 굽어지게 되어 강한 고구배자장이 형성된다. 이로 인해 센자성 와이어 주위에 놓여 있는 자기입자들은 고구배자장의 영향으로 자기력을 받게 된다. 센자성 와이어가 혈액 속에 놓여 있을 경우, 혈액 내의 디옥시헤모글로빈 적혈구는 상자성 입자처럼 백혈구는 반자성 입자처럼 행동하기 때문에 센자성 와이어 주위에 놓여있는 적혈구 및 백혈구는 외부자기장에 의한 자기력의 영향을 받게 된다. 구배자장에 의해 혈액 세포가 받는 자기력은 다음식과 같다.

$$\vec{F}_{BC}=\frac{1}{2}\mu_0(\chi_{BC}-\chi_B)V_{BC}\nabla(\vec{H}\circ\vec{H}) \qquad (1)$$

여기서 μ_0는 공기의 투자율, χ_{BC}와 χ_B는 혈액세포와 용액의 자화율, V_{BC}는 반지름이 b인 혈액세포의 부피($=\frac{4}{3}\pi b^3$), $\vec{H}$는 외부자기장 벡터이다.

Han과 Frazier의 선행 연구결과[13]에 의하면, 센자성 와이어의 단면이 Fig. 1과 같은 원형의 모양일 경우, 와이어 주위에 놓인 혈액 세포가 받는 자기력은 다음식과 같다.

$$\vec{F}_{BC}=-C\frac{2k\mu_0\Delta\chi V_{BC}a^2}{r^3}\left[k\frac{a^2}{r^2}+\cos2\phi\right]H_o^2\vec{a}_r - C\frac{2k\mu_0\Delta\chi V_{BC}a^2}{r^3}\sin2\phi H_0^2\vec{a}_\phi \qquad (2)$$

여기서 k는 $(\mu_W-\mu_0)/(\mu_W+\mu_0)$로 표현된다. C는 정사각형과 원형의 단면적 비율인 $\pi/4$이고, μ_W는 센자성 와이어의 투자율, $\Delta\chi(=\chi_{BC}-\chi_B)$는 용액에 대한 혈액 세포의 상대적인 자화율이다. r과 ϕ는 원통 좌표계에서의 거리와 각도이

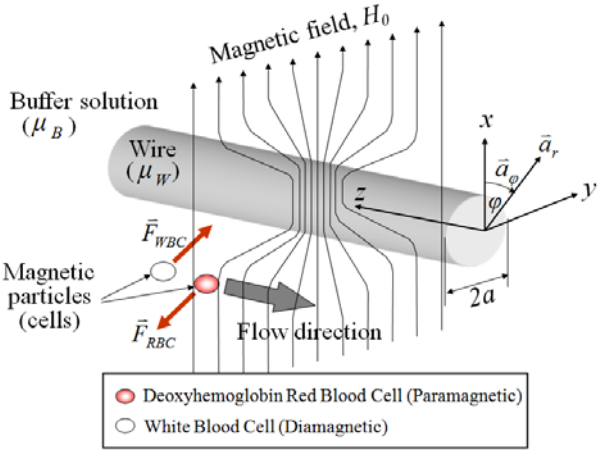

Fig. 1 Working principle of magnetophoretic microseparator using a high gradient magnetic separation

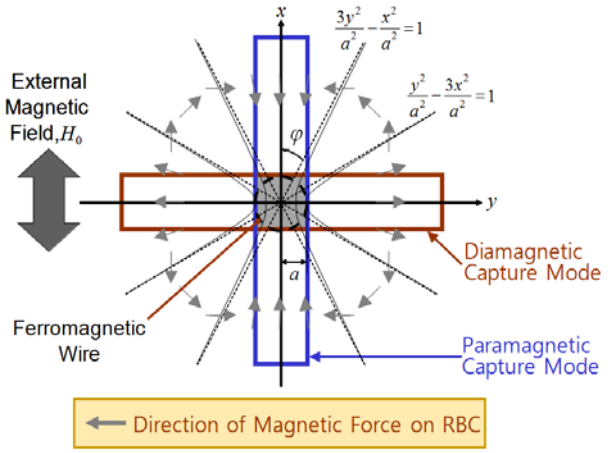

Fig. 2 Direction of the magnetic force on RBC around a circular ferromagnetic wire within a uniform external magnetic flux

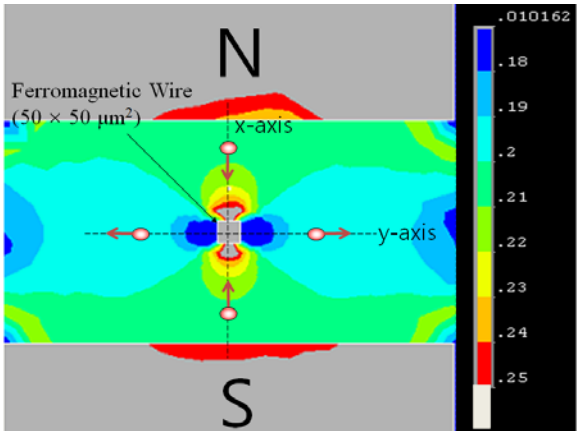

Fig. 3 Simulated distribution of the magnetic flux around a square ferromagnetic wire in a uniform external magnetic flux

며, $\vec{a}_r$과 $\vec{a}_\phi$는 r과 ϕ에 대한 원통 좌표계에서의 단위 벡터이다.

식 (2)에 의하면, Fig. 2의 x축($\phi \approx 0°$) 상에 자기입자가 놓여 있을 경우($\sin 2\phi \approx 0$, $\cos 2\phi \approx 1$) 상자성 입자($\Delta\chi$이 양의 값)는 와이어에 끌리는 자기력을 받게 되고, 반자성 입자($\Delta\chi$이 음의 값)는 와이어에서 멀어지는 방향으로 자기력을 받게 된다. Figure 2의 y축($\phi \approx 90°$) 상에 자기입자가 놓여 있을 경우($\sin 2\phi \approx 0$, $\cos 2\phi \approx -1$) 반자성 입자는 와이어에 끌리는 방향으로, 상자성 입자는 멀어지는 방향으로 자기력을 받는다. 따라서 첫 번째의 경우를 상자성 포획모드(PMC: paramagnetic capture mode), 두 번째의 경우를 반자성 포획모드(DMC: diamagnetic capture mode)라 명명한다.

2.2 시뮬레이션

Figure 3은 센자성 와이어 주위에 형성된 자기장 분포를 유한요소법을 이용하여 해석한 결과이다. 그림의 *x*-축을 따라 센자성 와이어에 가까워지면 자속밀도가 증가함을 알 수 있으며, 따라서 상자성 입자인 적혈구는 와이어에 끌리는 힘을 받게 된다. 반면, *y*-축을 따라 센자성 와이어에 가까워지면 자속밀도가 감소하며, 적혈구는 와이어에서 멀어지는 힘을 받게 된다.

이론과 수치해석을 위해 디옥시헤모글로빈 적혈구는 $\chi_{BC} = -3.8 \times 10^{-6}$ (SI), 용액은 $\chi_B = -7.7 \times 10^{-6}$ (SI) 의 자화율이 사용되었다. 외부자기장($B_0 = \mu_0 H_0$)은 0.2 T의 영구자석을 이용하여 인가되었고, 전기도금을 이용하여 제작된 니켈 센자성 와이어의 포화 자속($B_S = \mu_0 M_S$)은 0.6 T로 측정되었다.

이론에 사용된 센자성 와이어의 단면이 원형이지만, 실제 전기도금으로 제작되는 센자성 와이어의 단면은 사각형이므로 시뮬레이션에서는 사각형이 사용된다. Figure 4(a)와 4(b)는 각각 상자성 포획모드와 반자성 포획모드에서 동작하는 자기영동 세포분리기의 채널 중간높이의 적혈구가 받는 자기력을 그래프로 나타낸 것이다. 상자성 포획모드의 경우 채널 중간높이($y = 0$)에 위치한 적혈구는 센자성 와이어에 끌리는 방향으로 자기력을 받게 되며[Fig. 4(a)], 반자성 포획모드의 경우 채널 중간높이($x = 0$)에 위치한 적혈구는 상자성 포획모드와는 반대로 센자성 와이어에서 멀어지는 힘을 받게 된다[Fig. 4(b)]. 이 두 경우 모두 센자성 와이어에 근접해 있을 때 자기력이 크며 와이어에서 멀어질수록 급격히 감소한다.

마이크로 자기영동 세포분리기는 미소유체채널 내의 센자성 와이어와 유리 기판 사이의 접착력을 높이기 위해 폭을 120 μm로 제작하였다. 상자성 포획모드의 경우 정사각형(50×50 μm^2)에 비해 직사각형(120×50 μm^2) 센자성 와이어로부터 더욱 강한 자기력이 발생(Fig. 4(a))함을 알 수 있

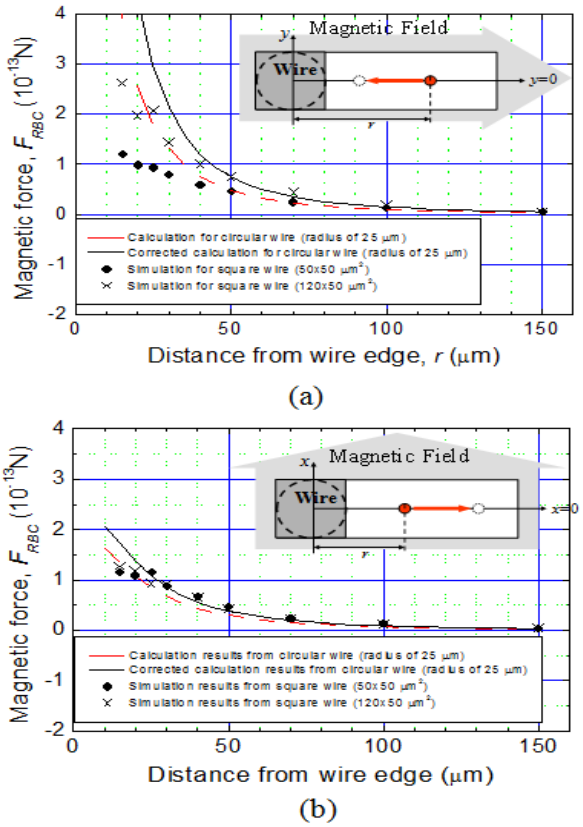

Fig. 4 Calculation and simulation results of magnetic force on RBC placed in the center of the microchannel for (a) PMC and (b) DMC

다. 반면, 반자성 포획모드의 경우 정사각형 (50×50 μm^2)과 직사각형(120×50 μm^2) 센자성 와이어에서 발생하는 자기력은 비슷한 크기[Fig. 4(b)]임을 수치해석 결과로부터 알 수 있다.

2.3 설계

제안된 마이크로 자기영동 세포분리기는 한 개의 입력채널과 세 개의 출력채널로 구성되며, 채널 중앙을 따라 센자성 와이어가 놓인다. Figure 5(a)와 같이 상자성 포획모드를 형성하기 위하여 외부자기장을 채널 폭의 수평방향으로 인가한다. 이 경우 미소유체채널을 따라 흐르는 적혈구는 상자성 입자이므로 와이어에 끌리게 되며, 백혈구는 적혈구와는 반대되는 성질을 가진 반자성 입자이므로 와이어에서 멀어지게 된다. 결과적으로 적혈구는 중앙 출력채널로 분리되며, 백혈구는 두 바깥 출력채널로 분리된다. 반면, Figure

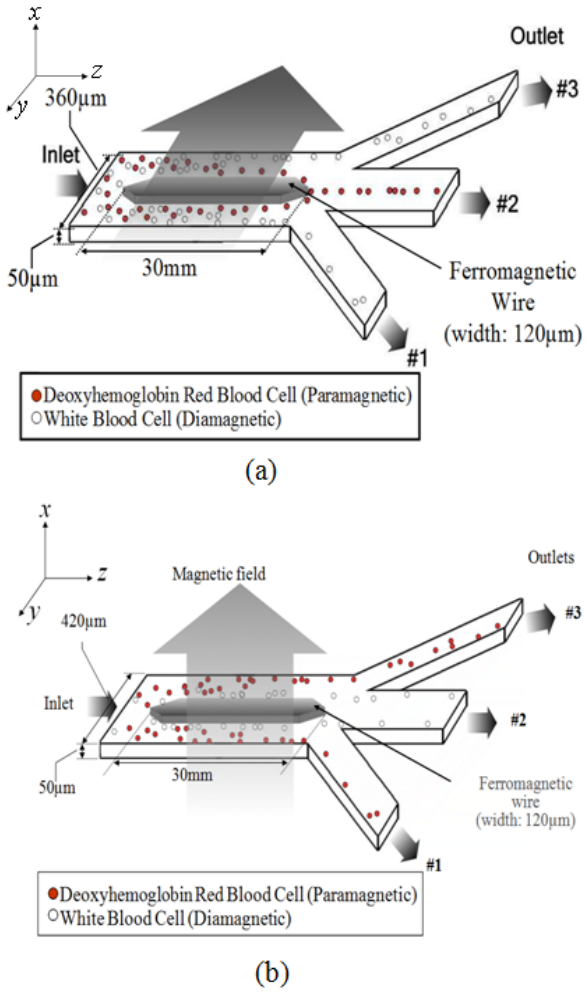

Fig. 5 Design of the magnetophoretic micro-separator having one inlet and three outlets of (a) PMC and (b) DMC

5(b)의 반자성 포획모드를 형성하기 위하여 외부자기장을 채널 폭의 수직방향으로 인가한다. 이 경우 상자성 포획모드와는 반대로 적혈구는 센자성 와이어에서 멀어져 두 바깥 출력채널로 분리되고, 백혈구는 센자성 와이어로 끌리게 되어 중앙 출력채널로 분리된다.

3. 제 작

미소유체채널을 형성하기 위하여 0.7 mm 두께의 바닥 유리기판(Borofloat™, Howard Glass Co., Worchester, MA)을 25% 불산을 이용하여 50 μm의 깊이로 식각한다. 식각된 기판에 Ti/Cu/Cr

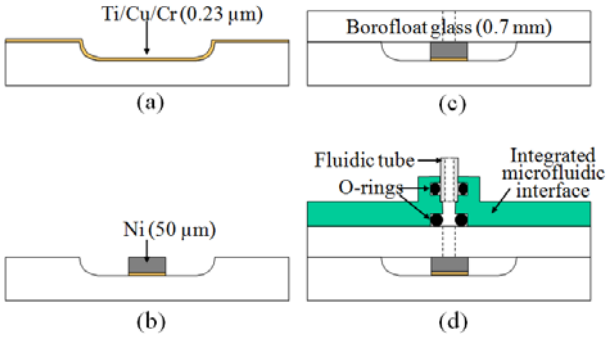

Fig. 6 Microfabrication of the magnetophoretic microseparator

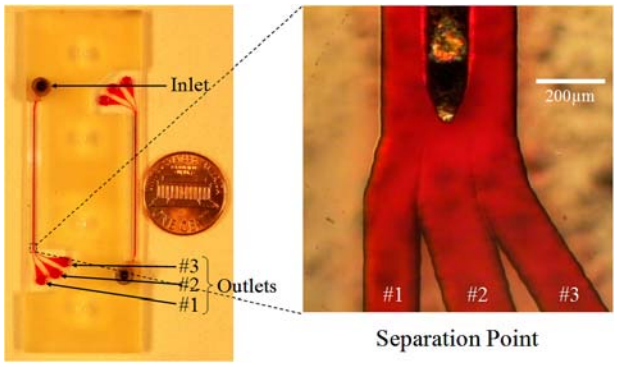

Fig. 7 Fabricated magnetophoretic microseparator

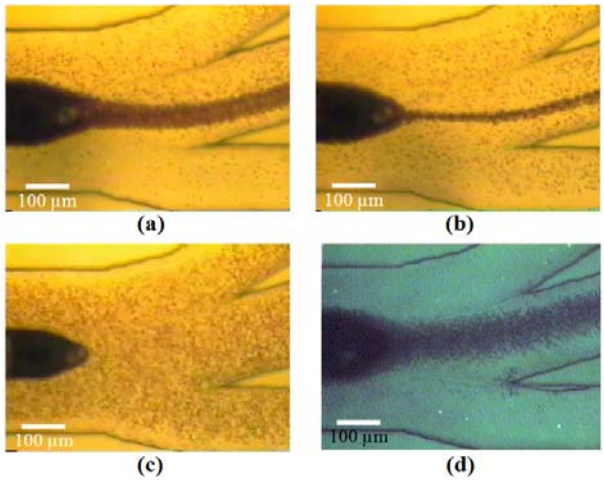

Fig. 8 RBCs and WBCs passing through the microchannel of the PMC microseparator for various average flow velocities at (a) 0.1 mm/sec with magnetic field, (b) 0.2 mm/sec with magnetic field, (c) 0.2 mm/sec without magnetic field, and (d) 0.05 mm/sec with magnetic field

seed layer를 증착하고[Fig. 6(a)], 전기도금을 이용하여 니켈 와이어를 형성한다[Fig. 6(b)]. Seed layer를 제거하고 고온 열 공정(685℃, 3.5 h)으로 바닥과 덮개 유리기판을 접합한다[Fig. 6(c)]. 유리기반의 마이크로 자기영동 세포분리기는 쾌속조형기술(stereolithography)로 제작된 일체형 유체 인터페이스와 UV 접착제(1187-M, DYMAX Co., Torrington, CT)로 접착되어 Fig. 6(d)와 같이 최종 완성된다. 세포가 유체채널 표면에 붙는 현상을 줄이기 위하여Pluronic-F108 계면활성제(BASF Corporation, Florham Park, NJ)를 미소유체채널 표면에 코팅한다. Figure 7은 완성된 마이크로 자기영동 세포분리기의 모습이다.

4. 실험 및 결과

4.1 상자성 포획모드

측정을 위한 장치는 0.2 T의 외부자기장을 인

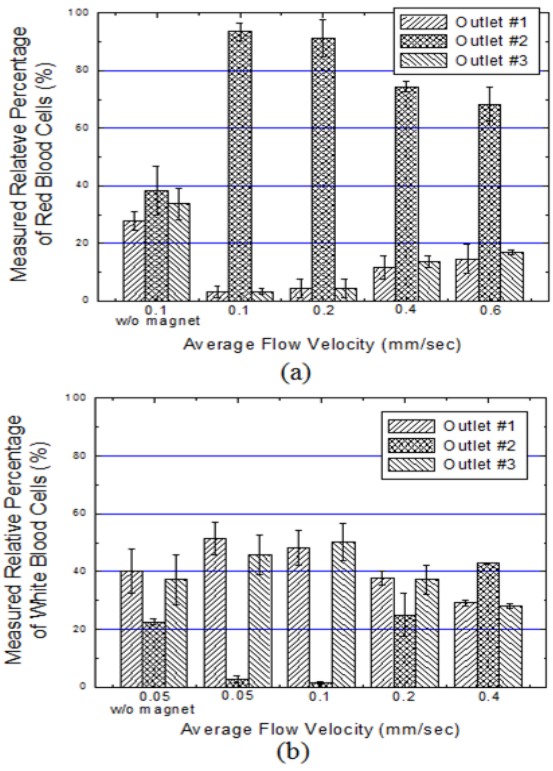

Fig. 9 Measured relative separation percentage of (a) RBCs and (b) WBCs at each outlet of the PMC microseparator for various average flow velocities

가하기 위한 영구자석이 이용되었으며, 미소유체 채널을 따라 흐르는 유체의 유량을 제어하기 위한 주사기 펌프(PHD 2000, Harvard apparatus, Holliston, MC)가 사용되었다. 유속의 변화를 줄이기 위하여 유리 주사기(81227, Hamilton Inc., Reno, NV)가 사용되었다. 내부 직경이 0.25 mm인 튜브를 통하여 혈액 세포를 미소유체채널 내에 주입하였다. 측정에 사용된 시료는 혈액을 3 mM isotonic sodium hydrosulfite solution에 1:10 비율로 희석하여 준비되었다.

Figure 8은 상자성 포획모드의 미소유체채널을 따라 흐르는 혈액 세포의 모습이다. Figure 8(a)-(b)와 같이 외부자기장이 인가된 경우 적혈구는 센자성 와이어에 가까워지며, 중앙 출력채널로 흘러가게 된다. 반면, 자기장이 인가되지 않은 경우 적혈구는 두 바깥 출력채널과 중앙 출력채널로 고루 퍼져 흘러가게 된다[Fig. 8(c)]. 또한 Fig. 9(a)에서 보이는 바와 같이 유속이 감소할수록 분리효율이 증가함을 알 수 있으며, 이는 유속이 감소할수록 혈액 세포가 자기력을 받는 시간이 길어지기 때문이다. 결과적으로 0.1 mm/sec의 유속에서 93.5%의 적혈구가 분리되었다. Figure 8(d)는 0.05 mm/sec의 속도로 채널을 지나

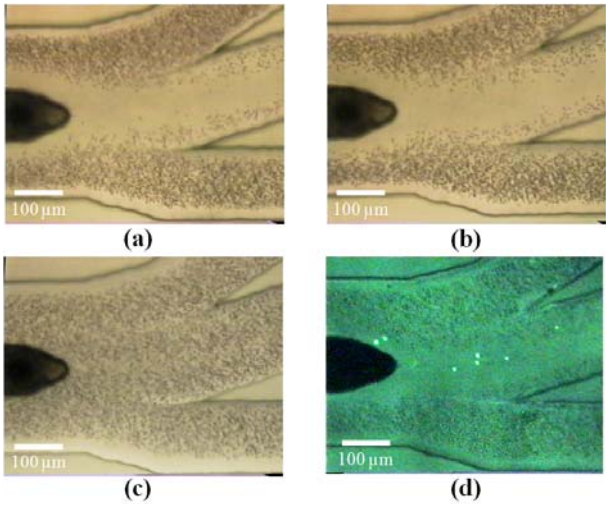

Fig. 10 RBCs and WBCs passing through the microchannel of the DMC microseparator for various average flow velocities at (a) 0.1 mm/sec with magnetic field, (b) 0.2 mm/sec with magnetic field, (c) 0.2 mm/sec without magnetic field, and (d) 0.05 mm/sec with magnetic field.

가는 적혈구와 형광 염색된 백혈구의 모습이다. 이로부터 97.4%의 백혈구가 두 바깥 출력채널로 분리되는 결과[Fig. 9(b)]를 얻었다.

4.2 반자성 포획모드

Figure 10은 반자성 포획모드의 미소유체채널을 따라 흐르는 혈액 세포의 모습이다. Figure 10(a)-(b)와 같이 외부자기장이 인가된 경우 적혈구는 상자성 포획모드와는 반대로 센자성 와이어에서 멀어져 두 바깥 출력 채널로 흘러가게 된다. 반면, 외부자기장이 인가되지 않은 경우 적혈구는 두 바깥 출력채널과 중앙 출력채널로 고루 퍼져 흘러가게 된다[Fig. 10(c)]. 상자성 포획모드와 마찬가지로 유속이 감소할수록 분리효율이 증가하였다[Fig. 11(a)]. 결과적으로 0.1 mm/sec의 유속에서 89.7%의 적혈구가 분리되었다. Figure 10(d)는 0.05 mm/sec로 흘러가는 적혈구와

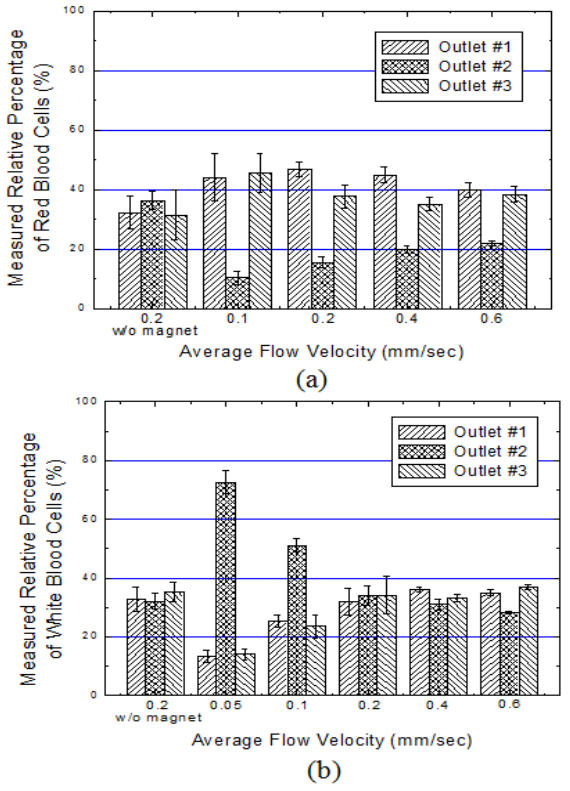

Fig. 11 Measured relative separation percentage of (a) RBCs and (b) WBCs at each outlet of the DMC microseparator for various average flow velocities.

형광 염색된 백혈구의 모습이다. 이로부터 72.7%의 백혈구가 중앙 출력채널로 분리되는 결과[Fig. 11(b)]를 얻었다.

5. 결 론

본 논문에서는 혈액 세포의 고유자성을 이용하여 혈액 세포를 분리할 수 있는 고성능 마이크로 자기영동 세포분리기를 제안, 제작, 시험 평가하였다. MEMS 공정을 이용하여 제작된 마이크로 자기영동 세포분리기로부터 고구배자장이 형성될 수 있었으며, 미소유체채널 내의 혈액 세포가 받는 자기력을 이론적으로 계산하였다. 또한, 이는 시뮬레이션 결과와 비교하여 그 타당성이 검증되었다. 실험결과에서 0.2 T의 외부자기장이 인가된 상자성 포획모드 자기영동 세포분리기의 중앙 출력채널로부터 0.1 mm/sec의 유속에서 93.5%의 적혈구가 분리되었고, 두 바깥 출력채널로부터 0.05 mm/sec의 유속에서 97.4%의 백혈구가 분리되었다. 반자성 포획모드의 경우 0.1 mm/sec의 유속에서 89.7%의 적혈구가 두 바깥 출력채널로부터 분리되었고, 0.05 mm/sec의 유속에서 72.7%의 백혈구가 중앙 출력채널로부터 분리되었다. 결론적으로, 본 연구에서는 제안된 마이크로 자기영동 세포분리기를 이용하여 혈액에 아무런 생화학적 처리과정이 없이 혈액 세포의 고유자성만으로 적혈구와 백혈구를 높은 효율로 분리할 수 있음을 실험적으로 보였다.

참고문헌

(1) Watson, J. H. P., 1973, "Magnetic Filtration," *J. Appl. Phys.*, Vol. 44, pp. 4209~4213.

(2) Birss, R. R., Gerber, R., and Parker, M. R. 1976, "Theory and Design of Axially Ordered Filters for High Intensity Magnetic Separation," *IEEE Trans. Magn.*, Vol. MAG-12, pp. 892~894.

(3) Uchiyama, S. Kondo, S. and Takayasu, M. 1976, "Performance of Parallel Stream Type Magnetic Filter for HGMS," *IEEE Trans. Magn.* Vol. MAG-12, pp. 895~897.

(4) Uchiyama, S., Kurinobu, S., Kumazawa, M., and Takayasu, M., 1977, "Magnetic Particle Buildup Process in Parallel Stream Type HGMS Filter," *IEEE Trans. Magn.*, Vol. MAG-13, pp. 1490~1492.

(5) Taylor, D. S., and Coryell, C. D., 1938, "The Magnetic Susceptibility of the Iron in Ferrohemoglobin," *J. Amer. Chem.*, Vol. 60, pp. 1177~1181.

(6) Melville, D., Paul, F. and Roath, S., 1975, "Direct Magnetic Separation of Red Cells from Whole Blood," *Nature*, Vol. 255, pp. 706.

(7) Melville, D., Paul, F. and Roath S., 1975, "High Gradient Magnetic Separation of Red Cells from Whole Blood," *IEEE Trans. Magn.*, Vol. MAG-11, pp. 1701~1704.

(8) Melville, D., Paul, F. and Roath, S., 1982, "Fractionation of Blood Components Using High Gradient Magnetic Separation," *IEEE. Trans. Magn.*, Vol. MAG-18, pp. 1680~1685.

(9) Graham, M. D., 1981, "Efficiency Comparison of Two Preparative Mechanisms for Magnetic Separation of Erythrocytes from Whole Blood," *J. Appl. Phys.*, Vol. 52, pp. 2578~2580.

(10) Bahaj, A. S., Watson, J. H. P. and Ellwood, D. C., 1989, "Determination of Magnetic Susceptibility of Loaded Micro-Organisms in Biomagnetic Separation," *IEEE Trans. Magn.*, Vol. 25, pp. 3809~3811.

(11) Takayasu, M., Duske, N., Ash, S. R. and Friedlaender, F. J., 1982, "HGMS Studies of Blood Cell Behavior in Plasma," *IEEE Trans. Magn.*, Vol. MAG-18, pp. 1520~1522.

(12) Takayasu, M., Kelland, D. R. and Minervini, J. V., 2000, "Continuous Magnetic Separation of Blood Components from Whole Blood," *IEEE Trans. Appl. Superconduct.*, Vol. 10, pp. 927~930.

(13) Han, K.-H. and Frazier, A. B., 2004, "Continuous Magnetophoretic Separation of Blood Cells in Microdevice Format," *J. Appl. Phys.*, Vol. 96. pp. 5797~5802.