

쾌속 조형 기술을 이용한 바이오리액터의 개발

Development of Bioreactor by Rapid Prototyping Technology

박정훈¹, 이승재², 이인환^{3,✉}, 조동우⁴, 이종원⁵
Jeong Hun Park¹, Seung-Jae Lee², In Hwan Lee^{3,✉}, Dong-Woo Cho⁴ and Jong-Won Rhie⁵

1 충북대학교 정밀기계공학과 (Department of Precision Mechanical Engineering, Chungbuk National Univ.)

2 충남대학교 BK21 메카트로닉스 사업단 (BK21 Mechatronics groups, Chungnam National Univ.)

3 충북대학교 기계공학부 (School of Mechanical Engineering, Chungbuk National Univ.)

4 포항공과대학교 기계공학과 (Department of Mechanical Engineering, POSTECH)

5 가톨릭의대 성형외과 (Department of Plastic Surgery, College of medicine, Catholic Univ.)

✉ Corresponding author: anxanx@chungbuk.ac.kr, Tel: 043-261-3161

Manuscript received: 2008.9.11 / Revised: 2008.11.17 / Accepted: 2008.12.24

It has been reported that mechanical stimulation takes a role in improving cell growth in skeletal system. Various research groups have been showed their own bioreactors which stimulate cell-seed three-dimensional scaffold. In this study, we hypothesized that the various conditions of mechanical stimulation would affect cell growth and proliferation. To prove our hypothesis, we designed a custom-made bioreactor capable of applying controlled compression to cell-encapsulated scaffolds. This device consisted of a circulation system and a compression system. Each parts of the bioreactor was fabricated using the rapid prototyping technology. By using the rapid prototyping technology, we can modify and improve the bioreactor very rapidly. For dynamic cell culture, cell-encapsulated agarose gel was fabricated in 2% concentration. We performed dynamic cell culture using this agarose gel and developed bioreactor in 3 days.

Key Words: Bioreactor (바이오리액터), Mechanical Stimulation (기계적 자극), Rapid Prototyping Technology (쾌속 조형 기술), Musculoskeletal Cell (근골격계 세포), Agarose Gel (아가로스 젤)

1. 서론

세포의 분화, 증식 및 조직 재생에 있어서 물리적 자극의 영향에 대한 연구는 활발히 진행되고 있으며, 최근에는 다양한 물리적 자극이 세포의 성장 및 분화에 중요한 역할을 한다는 실험적 연구 결과가 보고되고 있다.¹⁻³ 특히 뼈, 연골과 같은 근골격계 세포의 경우, 압축력과 같은 기계적 자극에 큰 영향을 받는 것으로 알려져 있고, 이러한 연구 결과를 바탕으로 다양한 방식의 동적 세포 배양기가 개발되고 있다.

하지만 이와 같은 기존의 연구들은 단순한 형

태의 반복적 자극만을 고려했다는 점에서 문제점이 발견된다. 이에 본 연구에서는 근골격계 세포의 성장 및 분화에 중요한 역할을 하는 기계적 자극 중, 다양한 모드의 압축력이 근골격계 세포의 성장 및 분화, 증식에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 분석적 연구를 위해 동적 배양시스템인 바이오리액터를 개발하였다.

특히, 본 연구에서 개발된 바이오리액터의 각 부품은 쾌속 조형 기술을 이용하여 제작하였다. 3D Printing 방식의 쾌속 조형 장비를 사용하여 바이오리액터의 각 부품에 대해 신속한 제작 및 설계 변경을 수행할 수 있었으며, 그 결과로 매우 빠른

시간 안에 최종적으로 바이오리액터를 제작할 수 있었다. 본 연구에서는 개발된 바이오리액터와 함께 세포가 파종된 2%의 아가로스 젤(agarose gel)을 제조하였으며, 이를 이용하여 세포에 압축력을 가해주는 동적 배양 실험을 수행하였다.

2. 바이오리액터

2.1 순환 시스템

본 연구에서 개발된 바이오리액터는 배양 챔버 내의 아가로스 젤에 다양한 모드의 압축력을 전달해줄 수 있도록 설계하였다. 세포 배양에 있어서 가장 중요하게 고려되어야 할 사항은 이산화탄소(CO₂)의 농도(5%)와 배양 온도(36.5°C), 그리고 외부 환경에 의한 오염 방지이다. 이를 위해 외부 환경과 차단된 독립 배양 챔버(culture chamber)를 구현하였고, 챔버 내 36.5°C 로 유지된 배양액의 순환을 위해 두 개의 펌프(pump)와 실리콘 튜브(silicon tube), 그리고 이 배양액의 온도 유지를 위한 워터베스(waterbath)를 이용하였다.⁴ 본 연구에서 사용된 펌프는 Waston-malow 社의 SCI-Q 401U 이며, 한 개의 채널(channel)로서 120ml/min 까지의 유량 조절 범위를 가진다.

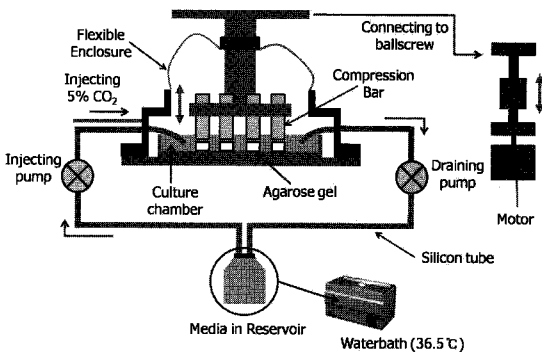


Fig. 1 Schematic drawing of independent culture chamber and Circulation system of Bioreactor

또한 5%의 이산화탄소(CO₂)의 농도를 유지하기 위해 이 챔버 안으로 5%의 농도로 맞춰진 이산화탄소(CO₂) 가스가 일정한 유량으로 유입되도록 레귤레이터(regulator)와 플로어미터(flowmeter)를 이용하였다. 레귤레이터는 가스통에서 나오는 5%의 이산화탄소(CO₂) 가스압의 조절을 담당하고 이 레귤레이터에서 입력되는 가스의 압력에 따라 플로어미터에서 배양 챔버로 유입되는 가스의 유량

을 조절하게 된다. Fig. 1 은 본 연구에서 개발된 바이오리액터의 독립 배양 챔버 및 순환 시스템을 나타낸다.

2.2 압축 시스템

독립된 배양 챔버 내 아가로스 젤에 다양한 모드의 압축력을 가해주기 위해 모터의 회전 운동에 따라 이송부(moving part)가 볼스크류(ballscrew)의 축 방향으로 상하 직선 운동을 하게 된다. 이에 따라 이송부에 고정된 압축 바(compression bar)가 그 하부에 위치한 아가로스 젤에 압축을 가하는 구조이다. Fig. 2 는 본 연구에서 개발된 바이오리액터의 3D CAD 모델이다.

세포가 파종된 아가로스 젤에 효과적으로 압축력을 가해주기 위해서 아가로스 젤의 미소한 높이 차이에 맞춰 압축 바의 초기 위치를 조절할 수 있도록 설계하였다. 특히, 압축 바 위치 조정의 편의성을 위하여 Fig. 3 과 같이 두 개의 스프링을 이용하였다.

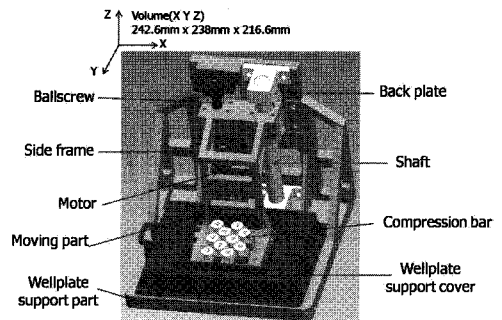


Fig. 2 CAD model of bioreactor

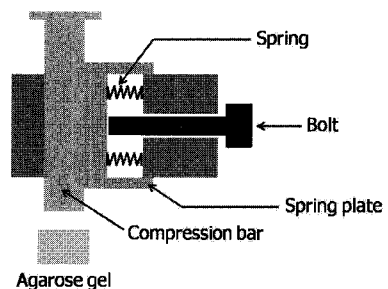


Fig. 3 Schematic drawing of compression bar fixing plate

초기 상태에서 압축 바는 스프링 플레이트(spring plate)와 압축 바 고정판(fixing plate) 사이에 연결된 스프링의 압축력에 의해 구속된 상태이다. 스프링 플레이트를 볼트 쪽으로 밀면 압축 바는

자유로운 움직임이 가능하게 되고, 이 때 압축 바의 밑면이 자연스럽게 아가로스 젤의 윗 표면과 평행하게 접촉하게 된다. 이렇게 아가로스 젤의 높이에 맞게 압축 바의 위치를 조절하고 고정시킨 후, 스프링 플레이트를 다시 압축 바 쪽으로 이동시키고 볼트를 조이게 되면 압축 바의 위치 고정이 완벽히 이루어진다.

2.3 제어 시스템

배양 챔버 내의 아가로스 젤에 가해지는 압축력을 제어하기 위해서는 이송부를 제어할 수 있는 별도의 제어 장치 및 제어 소프트웨어가 필요하다. 이송부의 제어를 위해 PC 에 내장된 모션 컨트롤러(PCI-7334, NI) 및 모터 드라이브(MID-7604, NI)를 이용하여 스텝 모터(PK23-01A, Oriental Motor)를 제어하도록 하였다. 또한 NI(National Instrument)社의 LabVIEW 프로그램을 이용하여 제어 프로그램을 개발하였다. 이를 이용하면 Fig. 4 와 같은 두 가지 모드 of 기계적 자극을 제어할 수 있다.

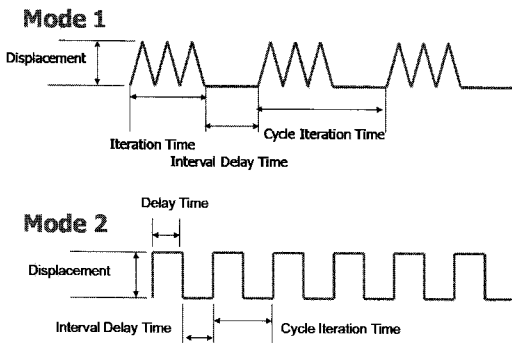


Fig. 4 Two mode of mechanical stimulation

첫 번째 모드의 자극은 일정 횟수의 반복 자극과 그 다음의 반복 자극 사이에 일정한 지연 시간을 두는 방식으로서 이송부의 이송 속도와 가속도, 그리고 자극의 세기(아가로스 젤 높이에 대한 압축)와 자극의 반복 횟수, 반복 자극 사이의 지연 시간, 그리고 반복 자극 후 지연 시간을 가지는 한 사이클의 총 반복 횟수를 입력 파라미터(parameter)로 하였다. 또한 반복 자극 사이의 지연 시간을 0sec 로 하면 지속적인 사인파형의 자극 형태도 가능하다. 한편, 두 번째 모드의 자극은 한번의 자극을 준 상태에서의 지연 시간과 제 위치에서의 반복 지연 시간을 두는 방식으로서 이를 반복하게 된다. 입력 파라미터는 이송 속도와 가속

도, 자극의 세기와 압축 상태에서의 지연 시간, 제 위치에서의 지연 시간, 한 사이클에 대한 총 반복 횟수이다. Fig. 5 는 본 연구에서 개발된 LabVIEW 프로그램의 스크린 이미지이다.

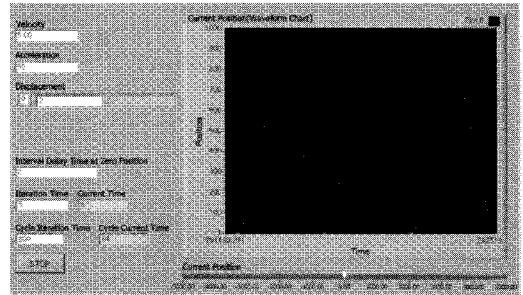


Fig. 5 Screen image of control program

3. 쾌속 조형 기술을 이용한 제작

3.1 쾌속 조형 장치

쾌속 조형(rapid prototyping)이란 설계 단계에 있는 복잡한 3D CAD 형상을 간단한 데이터 변환 작업에 의해 미세한 두께의 단면 형상을 얻어내고 해당되는 미세 두께를 연속적으로 적층한 후, 궁극적으로 3D CAD 형상과 동일한 형상의 시제품을 신속하게 제작하는 기술이다. 이러한 기술을 이용하면 제품의 설계 확인 및 개발 기간의 단축 등의 면에서 매우 큰 이점을 가지게 된다. 본 연구에서도 이 기술을 이용하여 바이오리액터를 제작하였다. Fig. 6 은 이러한 기술을 이용한 여러 가지 상용화된 장치 중, 본 연구의 바이오리액터 제작에 이용된 Object Geometries Ltd.社의 Eden 250 을 보여주고 있다.

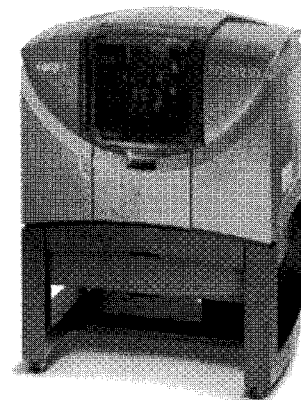


Fig. 6 Eden 250 RP machine

Eden 250 은 Polyjet 방식의 3D 프린터로서, 3D CAD 파일을 STL 파일로 변환 후, 바로 실제 모델 형상을 제작하는 장치이다. 이 장치의 제작 소재는 포토폴리머(photopolymer) 재료로서 모델 재료(model material)와 서포트 재료(support material)로 나뉜다. Fig. 7 과 같이 모델 재료는 설계된 3D CAD 모델의 형상을 적층시키는 데 이용되고, 서포트 재료는 모델 형상의 적층 시, 빈 공간을 채우거나 성형되는 모델의 지지를 위해 쓰이게 된다. 이 서포트 재료는 성형 모델의 적층 작업이 모두 끝난 뒤, 워터젯 장치(waterjet machine)에서 고 압력의 물 분사를 이용하여 제거될 수 있다. 또한 물 분사로 잘 제거되지 않은 곳의 서포트 재료는 5% 수산화나트륨 수용액에 1 시간 정도 담금으로써 제거될 수 있다. 수산화나트륨 수용액의 온도는 초기 물과 수산화나트륨을 혼합할 때 고온으로 상승하여 1 시간 반 정도 지난 후 상온이 되기 때문에, 수산화나트륨의 혼합 후 1 시간 반 이후에 성형물을 담근 후, 서포트 재료를 제거해야 한다.

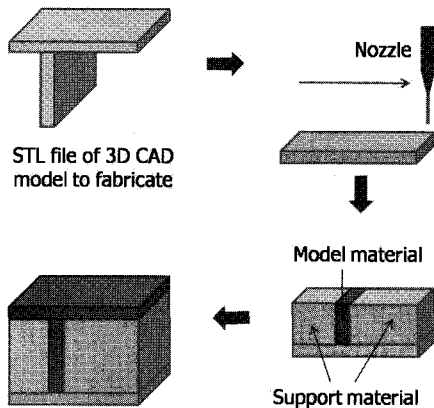


Fig. 7 The process of 3D printing

Table 1 는 쾌속 조형 장치 Eden250 에 쓰이는 모델 재료에 대한 물성치를 나타낸다. 본 연구에서는 모델 재료로서 Fullcure 720 과 Verowhite 를 사용하였고, 서포트 재료로 Fullcure 705 를 사용하였다.

3.2 결합 공차 실험

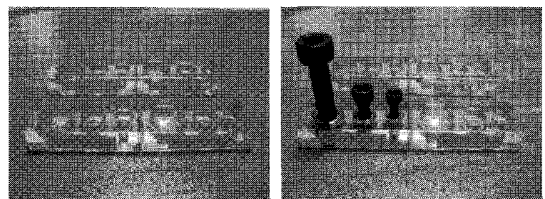
상용화 된 RP 장비를 이용한 각 부품의 제작에 앞서 제작 공차에 대한 실험을 수행하였다. 제작 공차 실험은 각 부품별 고정을 위한 너트(Nut)와 제작 부품 내부의 너트 삽입부에 대한 결합 공

Table 1 The mechanical property of model materials

Character	Fullcure 720	Verowhite
Tensile strength(Mpa)	60.3	49.8
Elongation at break(%)	15~25	15~25
Modulus of elasticity(Mpa)	2,870.00	2,495.00
Flexural strength	75.8	74.6
Flexural modulus	1718	2137
Izod notched impact(J/m)	39.6	37.5
Compression strength(Mpa)	84.3	N/A
SHORE	83	83
Rockwell	81	81
Heat distortion temperature	48.4	47.6
Ash content(%)	<0.01	<0.4

차 실험, 그리고 RP 장비로 제작된 부품 별 결합 공차 실험으로 나누어 수행하였다.

너트와 부품 내부의 너트 공간에 대한 결합 공차 실험은 3M, 4M, 6M 의 너트 규격에 대하여 수행하였고, 각 규격에 대해 RP 장비로 제작된 부품 내부의 너트 결합 공간 공차를 0.1mm, 0.2mm, 0.3mm, 0.4mm 로 하여 너트와의 결합성을 실험하였다. 실험 결과 0.2mm 의 공차가 가장 알맞게 너트와의 결합이 이루어지는 것을 확인하였다. Fig. 8 은 너트와 부품 내부의 너트 삽입부에 대한 공차 실험 결과를 보여주고 있다.

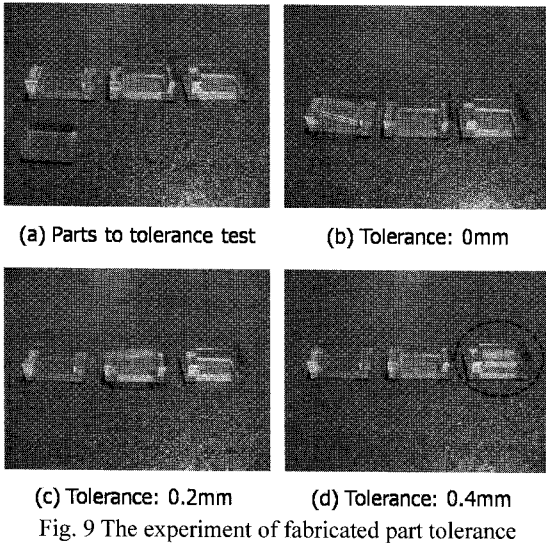


Tolerance: 0.1mm / 0.2mm / 0.3mm / 0.4mm

Fig. 8 The experiment of nut tolerance

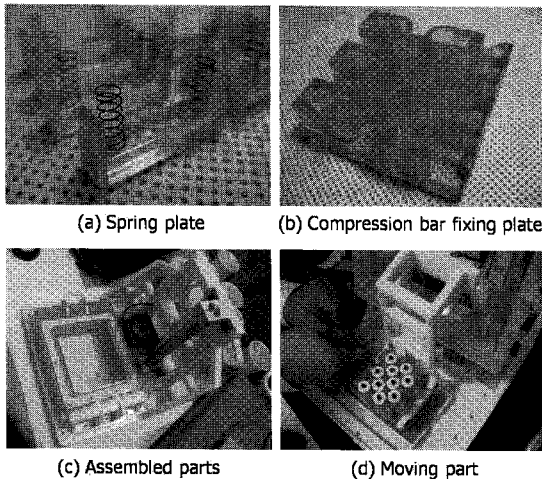
RP 장비로 제작된 부품별 결합 공차에 대한 실험은 직육면체 형상의 부품과 이 직육면체가 삽입될 수 있는 삽입 부품 내부의 공간에 대한 결합 공차에 대한 실험이다. 직육면체에 대해 삽입부에

대한 공차를 0mm, 0.2mm, 0.4mm 로 하여 직육면체와의 결합성을 실험하였고, 결과로서 0.4mm 의 공차를 주었을 때 가장 알맞은 결합을 이루는 것으로 확인되었다. Fig. 9 는 RP 제작 부품별 결합 공차에 대한 실험 결과를 보여준다.



3.3 RP 장비를 이용한 제작

3D 설계 프로그램에서 바이오리액터에 대한 각 부품별 모델링을 수행한 후, 각 부품의 파일을 STL 파일로 변환한다. 그리고 쾌속 조형 장치에 연결된 Object studio 에서 이 파일을 불러들인 후, 여러 성형 옵션을 설정한 뒤 각 부품 별 제작을 실행하였다. 본 연구에서는 Eden 250 의 성형 조건



중 high speed mode, gloosy 로 설정 후 제작하였다. High speed mode 에서의 적층 두께는 0.42µm 이며, gloosy 는 적층되는 모델 주위의 서포트 재료 적층을 무시하는 옵션이다. Fig. 10 은 본 연구에서 쾌속 조형 장치로 제작한 각 부품 및 전체 조립된 모습을 보여주고 있다.

4. 세포 배양 실험

4.1 세포가 파종된 아가로스 젤의 제조

세포에 기계적 자극을 주기 위해 아가로스 젤 안에 세포를 파종시키는 실험을 수행하였다. 아가로스는 열적으로 가변성이기 때문에 젤의 제조에 아주 유용하다. 또한 배양하고자 하는 세포의 점착과 증식/분화를 효과적으로 유도하고 대사산물의 전달이 용이해야하는 생체 조직공학적 지지체로서 좋은 장점을 가지고 있다.⁵⁻⁸

4%의 아가로스 수용액을 만들기 위해 100ml 의 DW(deionized water)에 아가로스 파우더(Bacto™ Agar, BD) 4g 을 용해시키고 이를 오토클레이브(Autoclave)로 고온 멸균시킨다. 이 아가로스 수용액과 세포가 부유된 배양액 10ml(chondrocyte, 5x10⁵/ml, n=7, DMEM+10% FBS)을 10ml 씩 혼합해 (1:1 비율) 2%의 아가로스 농도를 맞춘다. 마지막으로 이 혼합물을 디스크 형태의 아가로스 젤 제작용 몰드(mold)에 주입하고, 상온에서 경화시킨 다음, 몰드로부터 분리하여 젤 제조를 완성한다. 제작된 아가로스젤의 크기는 지름 10mm, 높이 5mm 의 디스크 모양이다. Fig. 11 은 세포가 파종된 아가로스 젤과 이 아가로스 젤이 배양 챔버 내에 놓여진 모습을 보여준다.

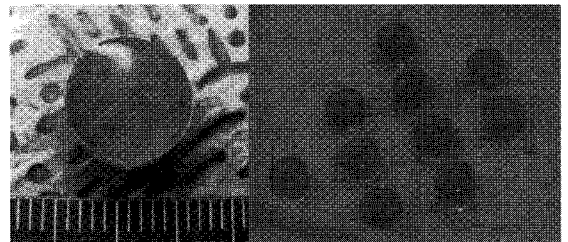


Fig. 11 Fabricated cell-encapsulated agarose gel

4.2 연골 세포 배양 실험

세포가 파종된 아가로스 젤을 바이오리액터의 배양 챔버 내에 위치시키고, 압축 바를 이용하여 압축력을 가해주며 동적 배양 실험을 수행하였다.

본 연구에서는 10mm 의 압축 변위(아가로스 젤 높이의 20%)로 일일 8 시간씩 1Hz 의 주기로 사인파형의 압축을 아가로스 젤에 가해주며 총 3 일 동안 동적 세포 배양 실험을 수행하였다. 자극을 준 후부터 1 일째와 3 일째에 세포의 증식에 대한 평가 실험을 위해 cell count 를 실시하였고, 아가로스 젤 안에 파종되어 증식된 세포의 형상을 현미경 (LEICA, DC 300)을 이용하여 관찰하였다. 세포 형상 관찰을 위해 5mm 높이 아가로스 젤의 밑면에 서부터 세포의 형상이 잘 나타난 단면들을 선택하여 이미지 촬영을 실시하였다. Fig. 12 는 1 일째와 3 일째에 관찰된 아가로스 젤의 현미경 이미지를 보여주고 있다.

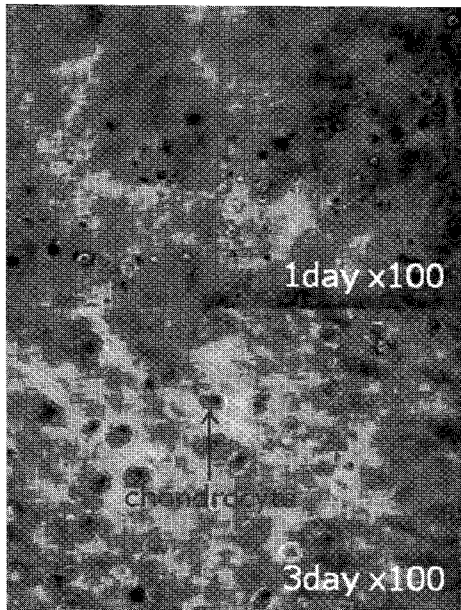


Fig. 12 Inverted micrograph images of agarose gel

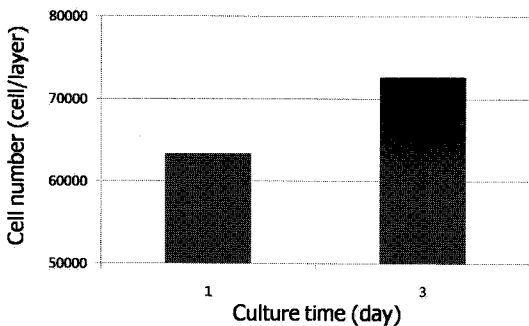


Fig. 13 Number of chondrocytes in dynamic culture

Fig. 13 은 아가로스 젤 안에 파종된 연골 세포의 동적 배양을 실시한 후, 1 일째와 3 일째의 세포 개수를 비교한 것이다. 현미경을 통해 촬영된 이미지 상의 연골 세포 개수를 세고, 이 이미지의 넓이를 계산한 후, 실제 아가로스 젤의 단면적과 비교하여 아가로스 젤의 한 단면에 존재하는 세포 개수를 결정하였다.

Cell count 를 실시한 결과, Fig. 13 에서 알 수 있듯이, 바이오리액터로 사인파형의 기계적 자극을 받은 세포들은 1 일째와 비교하여 3 일째에 아가로스 젤 안에서 증식이 더 잘 일어난 것으로 판단된다.

5. 결론

본 연구를 통해 다양한 모드의 기계적 자극을 세포에 가해줄 수 있는 바이오리액터를 개발하였다. 아가로스 젤의 미소한 높이 차에 맞추어 압축 바의 위치를 조정하고 고정할 수 있도록 하였고, 이 압축 바 위치 고정의 편의성을 위해 두 개의 스프링을 이용하였다. 또한 오염 방지를 위해 독립된 배양 챔버 시스템을 구축하였고, 이에 대한 바이오리액터의 제작은 쾌속 조형 장치를 이용하였다. 이로 인해 바이오리액터의 개발 기간 단축에 대한 큰 효과를 얻을 수 있었다. 이렇게 개발된 바이오리액터를 이용하여 동적 세포 배양 실험을 수행한 결과, 본 연구에서 개발된 바이오리액터의 성능을 검증할 수 있었다. 향후, 성능 향상을 위해 장비 개선이 필요할 때에도 RP 기술을 이용하면 쉽고 빠르게 설계 변경 및 제작이 가능할 것으로 판단된다.

후 기

이 논문은 2007 년도 충북대학교 학술연구 지원사업의 연구비 지원으로 수행되었습니다

참고문헌

1. Mauck, R. L., Soltz, M. A., Wang, C. C., Wong, D. D., Chao, P. H., Valhmu, W. B., Hung, C. T. and Ateshian, G. A., "Functional Tissue Engineering of Articular Cartilage Through Dynamic Loading of Chondrocyte-Seeded Agarose Gels," *Journal of Biochemical Engineering*, Vol. 122, Issue 3, pp. 252-

260, 2000.

2. Kisiday, J. D., Jin, M., DiMicco, M. A., Kurz, B. and Grodzinsky, A. J., "Effects of dynamic compressive loading on chondrocyte biosynthesis in self-assembling peptide scaffolds," *Journal of Biomechanics*, Vol. 37, Issue 5, pp. 594 -604, 2004.
3. Meyer, U., Buchter, A., Nazer, N. and Wiesmann, H. P., "Design and performance of a bioreactor system for mechanically promoted three-dimensional tissue engineering," *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, Vol. 44, No. 2, pp. 134-140, 2006.
4. Nugent-Derfus, G. E., Takara, T., O'Neill, J. K., Cahill, S. B., Gortz, S., Pong, T., Inoue, H., Aneloski, N. M., Wang, W. W., Vega, K. I., Klein, T. J., Hsieh-Bonassera, N. D., Bae, W. C., Burke, J. D., Bugbee, W. D. and Sah, R. L., "Continuous passive motion applied to whole joints stimulates chondrocyte biosynthesis of PRG4¹," *OsteoArthritis and Cartilage*, Vol. 15, Issue 5, pp. 566-574, 2007.
5. Lee, S. J. and Cho, D. W., "Solid Freeform Fabrication Technique in Tissue Engineering," *Journal of the Korean Society for Precision Engineering*, Vol. 23, No. 12, pp. 7-15, 2006
6. Khang, G., Kim, M. S., Min, B. H., Lee, I., Rhee, J. M. and Lee, H. B., "Scaffold for Tissue Engineering," *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Vol. 3, No. 4, pp. 376-395, 2006.
7. Knight, M. M., Ghorri, S. A., Lee, D. A. and Bader, D. L., "Measurement of the deformation of isolated chondrocytes in agarose subjected to cyclic compression," *Medical Engineering & Physics*, Vol. 20, No. 9, pp. 684-688, 1998.
8. Awad, H. A., Wickkham, M. Q., Leddy, H. A., Gimble, J. M. and Guilak, F., "Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds," *Biomaterials*, Vol. 25, Issue 16, pp. 3211-3222, 2004.