

압출 적층 조형 기술을 이용한 TCP/HA 의 혼합비율에 따른 바이오 세라믹 인공지지체의 제작 및 특성 연구[§]

사민우* · 김종영*†

* 안동대학교 기계공학과

Characteristic Analysis and Fabrication of Bioceramic Scaffold using Mixing Ratios of TCP/HA by Fused Deposition Modeling

Min-Woo Sa* and Jong Young Kim*†

* Dept. of Mechanical Engineering, Andong Nat'l Univ.

(Received June 23, 2014 ; Revised August 6, 2014 ; Accepted August 7, 2014)

Key Words : Fused Deposition Modeling(압출 적층 조형), Tricalcium Phosphate(삼인산칼슘), Hydroxyapatite(수산화인회석), Scaffold(인공지지체)

초록: 조직공학은 손상된 골 조직 및 장기를 복원, 재생, 그리고 복구할 수 있는 잠재력을 가진 새로운 학문 분야이다. 인산칼슘계 세라믹인 삼인산칼슘과 수산화인회석은 골 조직 재생을 위해 골전도성과 생체적합성의 특성을 가진 우수한 재료로 알려져 있다. 본 연구에서, 혼합 용액 구조물은 적층 및 히터 장치를 기반으로 한 압출 적층 조형 시스템을 이용하여 제작되었다. 바이오 세라믹 인공지지체는 1,300 °C의 고온에서 소결되었고, 또한 형태학적인 특성은 주사전자현미경을 통해 분석되었다. 게다가, TCP/HA 의 혼합비율에 따른 미세구조물과 수축률에 대한 효과는 연구되었다. 인공지지체의 기계적 특성은 1 mm/min 의 크로스헤드 속도로 압축 시험기를 통해 측정되었고, 인공지지체의 세포 증식 평가를 위해 MG-63 세포를 이용하였다. 본 연구의 결과는 혼합된 TCP(75 wt%)/HA(25 wt%) 인공지지체가 골 조직 재생을 위해 적합한 인공지지체라는 것을 제안한다.

Abstract: Tissue engineering is an emerging research field that has the potential to restore, regenerate and repair damaged bone tissue and organs. Tricalcium phosphate and hydroxyapatite biomaterials-based calcium phosphate are excellent materials that have both osteoconduction and biocompatibility for bone tissue regeneration. In this study, solution structures were successfully fabricated using a fused deposition modeling system based on deposition and heating devices. The morphology characteristics of the bioceramic scaffolds sintered at a temperature of 1,300 °C were analyzed by scanning electron microscopy. The effects of various blended TCP/HA ratio on the microstructure and shrinkage were studied. The mechanical properties of the scaffolds were measured using a compression testing machine from stress-strain curves on the crosshead velocity of 1 mm/min. The fabricated scaffolds were evaluated by cell proliferation tests of MG-63 cells. The results of this study suggest that the blended TCP(75 wt%)/HA(25 wt%) scaffold is an appropriate scaffold for bone tissue regeneration.

1. 서론

최근 조직 공학(Tissue engineering) 분야에서는

골 조직 재생을 위한 3 차원 인공지지체(Three-dimensional scaffold)의 제작에 관한 연구를 활발히 수행하고 있다. 인공지지체는 생분해성(Biodegradability), 적절한 기계적 특성(Mechanical property), 내부 연결성(Interconnectivity)이 있는 3 차원 다공성 구조(Porous structure), 골전도성(Osteoconductivity) 그리고 생체적합성(Biocompatibility)

§ 이 논문은 2014년도 대한기계학회 대구·경북지회 춘계 학술대회(2014. 4. 25., 계명대) 발표논문임.

† Corresponding Author, E-mail: jykim@anu.ac.kr

© 2014 The Korean Society of Mechanical Engineers

등을 필요로 한다.^(1,2) 이때 골 조직 재생에 적용할 수 있는 이상적인 재료로서 인산칼슘계 세라믹(Calcium phosphate-based ceramics)인 삼인산칼슘(Tricalcium phosphate, TCP) 및 수산화인회석(Hydroxyapatite, HA)이 주로 이용되고 있다. 이 중 TCP는 높은 생분해성을 가졌고, HA는 생체활성(Bioactivity)이 매우 우수하고 골 대체재로서 자연적인 골 기질과 화학적인 성분이 유사한 것으로 알려져 있다.^(3,4) 다공성 세라믹 인공지지체의 제작 방법에는 염 침출법(Particulate leaching), 사출성형법(Melt molding), 동결건조법(Freeze drying), 가스발포법(Gas foaming), 상 분리법(Phase separation) 등으로 다양한 방식이 있다.⁽⁵⁻⁷⁾ 하지만, 이러한 제작 방법은 임의적이고 복잡한 3차원 형상으로의 인공지지체를 제작하기 어렵고, 또한 혈관신생(Vascularization)을 위해 인공지지체 상에 내부 경로를 만들고 공간 분포와 공극 크기, 형상 맞춤형(Geometry)으로 정밀하게 제어하기 힘들다.⁽⁸⁾ 이를 위한 방안으로 적층 가공(Additive manufacturing) 방식이 이용되고 있으며 제작 공정에 따라 압출 적층 조형법(Fused deposition modeling, FDM), 직접 금속 레이저 소결법(Direct metal laser sintering, DMLS), 선택적 레이저 소결법(Selective laser sintering, SLS), 광조형법(Stereolithography, SLA), 적층 제조 방식법(Laminated object manufacturing, LOM) 등이 있다.⁽⁹⁻¹¹⁾ 하지만 원소재의 세라믹 파우더를 이용하여 3차원 인공지지체를 제작하기 힘들었다. 최근 들어 국내 연구진에 따르면 마이크로 광조형 시스템(Micro-stereolithography, MSTL)과 몰딩 기술(Mold technology)을 이용하여 수산화인회석 혹은 삼인산칼슘 인공지지체가 제작되고 있는 것으로 보고되었다.^(12,13) 하지만, 마이크로 광조형 기술의 경우에는 생체재료로 사용될 수 없는 수지를 이용하고 있어 골 재생을 위한 인공지지체 제작에 단점이 있고, 복잡한 3차원 형상의 제작이 어렵고 제작 후에는 여분의 물질을 씻어 내거나, 표면을 매끄럽게 다듬기 위한 사후공정이 필요할 수도 있다.⁽¹⁴⁾ 몰드를 이용한 인공지지체 제작 방법은 제작 과정의 어려움 때문에 내/외부 연결성이 있는 3차원 인공지지체의 제작에 한계가 있으며 형상에 맞게 몰드를 계속적으로 만드는 것도 쉽지 않다.^(13,15) 유사 연구로서 Schumacher의 연구 논문에서도 RP 장비를 이용하여 몰드를 제작하였고, HA와 β -TCP의 혼합 비율에 따른 재료를 넣어 1,300°C에서 소결을

통해 몰드를 제거하였다. 그 결과, 재료의 선 폭이 매우 굵었고, 공극과 공극 사이의 내부 연결성이 떨어져 보였다.⁽¹⁶⁾ 또한 골 대체재로서의 사용을 위해 제작이 되었지만 *in-vitro* 평가를 수행하지 않아 어떠한 인공지지체가 장점이 있는지 추가적인 실험이 요구되었다. 이러한 한계와 단점을 극복하기 위해 혼합된 재료를 압출 적층 조형 기술을 이용하여 원하는 크기, 내부 연결성을 가지는 구조물을 빠르게 제작하였고, 고온 소결을 함으로써 원하는 바이오 세라믹 인공지지체를 성공적으로 제작하게 되었다.

본 연구에서는 압출 적층 가공 기술을 이용하여 TCP/HA의 혼합비율에 따른 3차원 TCP, TCP(75 wt%)/HA(25 wt%), TCP(50 wt%)/TCP(50 wt%), TCP(25 wt%)/HA(75 wt%), HA 인공지지체를 제작하였다. 제작된 인공지지체의 수축률을 계산하였고, 기계적 강도 평가와 *in-vitro* 세포 증식 평가를 수행한 후에 얻어진 결과에 대하여 고찰해보았다.

2. 재료 및 방법

2.1 재료

바이오 세라믹 미립자인 TCP와 HA는 Berkeley Advanced Biomaterials(Berkeley, USA)에서 구입되었다. 파우더 입자는 응집되어 있는 형태로 100 nm의 크기를 가지고 있다. 바이오 세라믹 미립자를 분산시켜 안정화시키는 분산제는 폴리메타크릴레이트(Darvan® C, R. T. Vanderbilt, USA), 바이오 세라믹 미립자들 간의 점착성과 점도를 증가시키는 점성제는 하이드록시프로필 메틸셀룰로스(Hydroxypropyl methylcellulose (HPMC), H7509-100G, Sigma-Aldrich, USA), 그리고 바이오 세라믹 미립자들을 응집시키는 응집제는 폴리에틸렌 이민(Polyethylenimine (PI), 408727-100ML, sigma-Aldrich, USA)이 이용되었다. 사용된 재료들의 세부적인 사항은 Table 1에 나타내고 있다.

2.2 압출 적층 가공 시스템

본 연구에서는 3차원 바이오 세라믹 인공지지체의 제작을 위해 기존의 폴리머 적층 시스템(Polymer deposition system)을 기반으로 하여, 2개의 Z 축을 이용한 FDM 시스템을 이용하였다. Fig. 1은 압출 적층 가공 시스템의 전체 사진을 보여주고 있다. 이 시스템은 정밀 모션 제어 시스템을 적용하여 마이크로 선 폭 및 높이로 층

층이(Layer by layer) 적층하여 3 차원 인공지지체를 쉽게 제작할 수 있는 장점을 가지고 있다. Fig. 1(a)는 X-Y-Z 축의 스테이지이며, Fig. 1(b)는 혼합 재료를 분사할 수 있는 적층 축(Z.a)과 적층된 혼합 재료를 경화시킬 수 있는 히터 축(Z.b)을 보여준다. 그리고 시스템에 사용된 온도 및 압력 조절 장치를 Fig. 1(c)에서 보여주고 있다. 이때 공압은 최대 750 kPa 까지 조절 가능한 압력 조절기(Super Σ x-V7, Musashi, Japan)가 사용되었고, 온도는 250 °C까지 조절 가능한 온도 조절기(TCU-02, Musashi, Japan)가 사용되었다.

Table 1 Detail of used materials

Bioceramic powders	Source	Particle size
TCP	Berkeley Advanced Biomaterials, USA	Avg. 100 nm
HA		
Mixing materials	Source	Molecular wt.
Darvan® C	R. T. Vanderbilt, USA	M _w 10,000 to 16,000
HPMC	Sigma-Aldrich, USA	
PI	Sigma-Aldrich, USA	Avg. M _w ~25,000 by LS

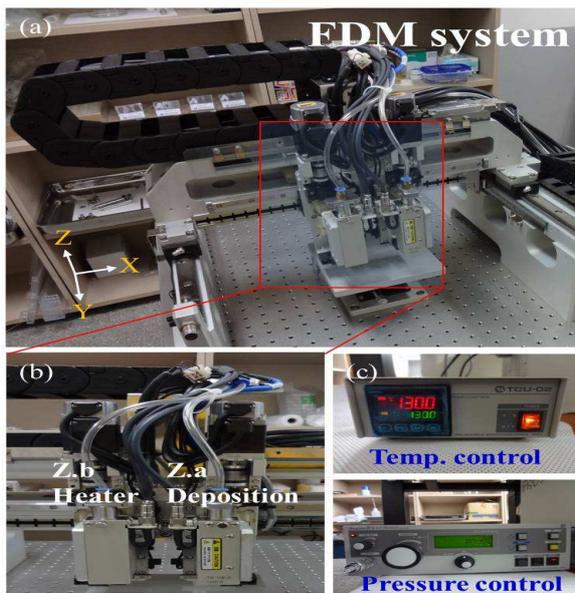


Fig. 1 Actual images of fused deposition modeling system (a: FDM system, b: deposition (Z.a) and Heating (Z.b), and c: temperature and pressure devices)

2.3 3 차원 혼합 구조물의 제작 방법

2.3.1 혼합물 제조

혼합물 재료는 이전 다른 연구자의 논문을 참고하였고, 자체적으로 최적의 혼합 비율을 찾은 후 실험을 수행하였다.⁽¹⁷⁾ 본 실험에서는 1.5 g의 바이오 세라믹 파우더를 기준으로 실험을 수행하였다. 준비된 파우더를 플라스틱 접시(Plastic dish)에 넣고 분산제인 Darvan® C 용액을 2 ml 넣어주었다. 점성제인 0.4 g의 HPMC와 응집제인 0.3 ml의 PI를 넣고 골고루 섞이도록 혼합하였다. 혼합물 제조 후에 오븐(Oven, OF-12, JEIO TECH, Korea)에서 60 °C로 20분 동안 넣어 두었다. 오븐에서의 열처리 과정은 혼합물의 수분을 제거하기 위해 수행되었다.

2.3.2 혼합 구조물의 제작 방법

바이오 세라믹 인공지지체를 얻기 위해서는 3 차원의 구조물 제작이 잘 이루어져야 한다. 제조된 혼합물을 배럴(Barrel, PS10S, Iwashita, Japan)에 넣고 테이퍼 노즐(Taper nozzle, PNT-22G-32, Iwashita, Japan)을 결합시킨다. 3 차원 구조물 제작을 위해 사전에 준비된 코드 데이터를 컴퓨터를 통해 시스템을 위치시키고 준비를 마친다. 그 다음에는 Fig. 1(Z-a)의 사진을 참고하면 시린지의 노즐에서 분사된 재료가 정반의 작업 공간(Working stage) 위에 적층 되고, Fig. 1(Z.b)의 히터(Heater)에 의해 혼합된 재료를 경화시키게 된다. 모든 제작은 자동화된 코드 데이터에 의해 층층이 반복적으로 쌓여지게 된다. Table 2는 구조물 제작을 위한 공정을 보여주고 있다. Z.b 축에 가해지는 히터의 온도는 100 °C이고, 구동 축의 이송 속도는 200~230 mm/s로 실험을 수행하였다. 혼합 구조물의 선 폭은 600 μ m, 공극은 450 μ m로 설정하였다.

Table 2 Process condition for the structure fabrication

Nozzle (Inner diameter)	410 μ m
Pressure	600 kPa
Temperature (Z.b axis)	100 °C
Feed rate	200~230 mm/s
Line width	600 μ m
Pore size	450 μ m

2.3.3 소결 처리

제작된 구조물은 상온에서 자연 건조를 시킨 후에 알코올(Alcohol)을 이용하여 떼어내고, 물기가 마르면 소결로(Furnace, MF-12, JEIO TECH, Korea)에 넣어 제어된 입력 값에 따라 소결되었다. 온도의 제어 절차는 다음과 같이 수행되었다. 1 단계는 5 °C/min 로 상승하였고, 2 단계에서 600 °C에서 1 시간 유지하였다. 또한, 3 단계에서는 9.17 °C/min 로 상승하였고, 4 단계에서는 1,300 °C에서 2 시간 유지하였다. 끝으로, 실험실의 내부 온도(24.5 °C)까지 온도가 자연적으로 하강하도록 하였다. 이와 같은 단계별 절차는 기존 다른 연구자의 소결 공정 순서를 이용하여 실험을 수행하였다.⁽¹⁸⁾

2.4 기계적 강도 평가

각각의 인공지지체를 비교하기 위해 압축시험기(Compression Testing Machine, JSV-H1000, JISC, Japan)를 사용하였으며, 크로스 헤드 속도를 1 mm/min 으로 일정하게 하였다. 압축 실험은 실내 환경에서 수행되었고, 실험군마다 3 개씩 평가하였다. 평가를 위해 사용된 인공지지체의 크기는 평균 $7.0 \times 7.0 \times 4.5 \text{ mm}^3$ 이다. 이때 하중-변위 곡선을 이용하여 압축 강도를 평가하였고, 평균 값으로 결과를 나타내었다.

2.5 세포 실험

2.5.1 세포 배양

세포 특성 평가를 위해 조골세포와 유사한 MG-63 세포를 이용하였다. 배지는 DMEM(D-minimum essential medium/high glucose, Hyclone, Logan, UT, USA)에 10% 우태혈청(Fetal bovin serum, Gibco, Rockville, MD, USA)과 1% 항생제(Penicillin streptomycin, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 사용하였다. 세포는 37 °C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양되었다. 배지는 pH 를 조절하기 위해 수시로 교체하였다. 바이오 세라믹 인공지지체에 세포를 파종하기 위해 100 μm 의 배양 접시에서 4 일 동안 충분히 배양되어 있는 세포를 0.25% Trypsin-EDTA solution(Gibco, Rockville, MD, USA)을 사용하여 떼어냈다. 세포 수는 0.4% trypan blue stain(Gibco, Rockville, MD, USA)으로 염색한 후에 hemacytometer 를 이용하여 계산되었고, 각각의 바이오 세라믹 인공지지체마다 1×10^5 cells 를 피펫(Pipet)을 이용하여 파종하였다.

2.5.2 세포 특성 평가

세포 증식 특성을 평가하기 위해 샘플마다 4

개씩 인공지지체를 준비하였으며, 이는 평균적인 데이터를 얻기 위함이다. 세포를 파종하기 이전에 제작된 바이오 세라믹 인공지지체는 70% 에탄올에 넣은 후 자외선에서 살균하였다. 또한 PBS 및 배지에서 2 시간 pre-wetting 시켜 세포가 쉽게 세라믹 인공지지체 표면에 증착할 수 있도록 하였다. 세포를 파종한 후 7 일 동안 인큐베이터에서 배양을 시켰다. 배지는 매일 1 회 교체 해주었다. 세포 증식 평가를 위해 Cell Counting Kit-8(CCK-8, Dojindo Molecular technologies, Japan) 용액을 사용하였다. 1, 4, 7 일에 CCK-8 용액을 배지와 1:10 으로 혼합하여 넣고 4 시간 후 450 nm 에서 micro reader(UVM340, Elisa, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였고, 세포의 증착 및 증식을 관찰하였다. 7 일 후에 36% 포르말린(Formalin, Junsei, Japan)을 4% 포르말린으로 DI water 를 이용하여 정제하였다. 그리고 나서 증식된 세포를 고정시켰고, 흡후드(Fume hood)에서 건조시켰다. 이후에 주사전자현미경을 이용하여 세포가 부착된 것을 관찰하였다.

2.6 주사전자현미경 분석

제작된 바이오 세라믹 인공지지체의 구조 및 표면을 관찰하기 위해 주사전자현미경(Scanning electron microscope, Tescan, VEGAII LMU, Czech)을 사용하였다. 인공지지체를 관찰하기 위해 Au 스퍼터링 기에서 40 s 동안 코팅하였고, 20 kV 의 가속 전압을 주었다.

3. 결과 및 토론

3.1 바이오 세라믹 인공지지체의 제작 및 평가

본 연구에서는 초기 혼합 구조물의 형상크기를 $8.5 \times 8.5 \times 5.8 \text{ mm}$, 선 폭을 600 μm , 그리고 공극을 450 μm 로 설계하였다. 바이오 세라믹 인공지지체의 내·외부 구조를 상호 연결되도록 하기 위해 격자(Lattice)패턴으로 선정하였고, 다공성을 위해 3 층을 연속적으로 반복하여 적층 하고자 하였다. 하지만 노즐을 통해 분사되는 혼합 재료의 수분이 여전히 남아 있어 연속적인 패턴과 격자 구조로 제작하기 어려웠고, 새로운 제작 공정을 통해 혼합 구조물을 제작하게 되었다.

Fig. 2 는 3 차원 구조물 제작을 위한 이전 연구자들의 제작 공정(Fig. 2(a))과 본 연구를 위한 제작 공정(Fig. 2(b))을 보여주는 개략도이다. 이전 연구자들의 구조물 제작 방법은 로보캐스팅(Robocasting)이라고 불린다. 오일이 담겨 있는

용기에 재료를 토출하여 적층한 후 재료에 남아 있는 오일을 제거하기 위해 1 일 동안 방 온도에서 건조시키는 작업이 요구되었다.⁽¹⁶⁾ 본 연구에서는 공정 개선을 위해 폴리머 적층 기반 시스템에 적용하여 세라믹 구조물도 제작할 수 있도록 공정을 개발하게 되었다. 본 연구에서의 구조물 제작 방법을 보면, 1 층을 제작한 후에 폴리머와 같이 상온에서 바로 경화되는⁽¹⁹⁾ 재료적 성질이 없어서 히터를 이용한 공정을 적용하였고, 2 층, 3 층을 제작하면서 3 차원 형상이 무너져 내리는 문제점을 보완하였다. 이때 형상이 무너져 내리지 않는 것은 재료 표면에 혼합되어 있던 solution 은 히터에 의해 빠르게 제거되었기 때문이고, 이로 인해 표면이 건조하게 됨으로써 형상이 그대로 유지되었다. 이렇게 2 축(Z.a 와 Z.b)을 빠르게 움직임으로써 기존의 3 차원 세라믹 인공지지체의 제작 방식보다 빠르고 간단하게 제작할 수 있게 되었다.

제작된 혼합 구조물을 1,300 °C의 소결로에서 소결하였고, 전체 형상의 크기를 비교해보았다. 소결 후에 TCP 미립자의 혼합비율이 많아질수록 인공지지체의 수축현상이 작았고, HA 미립자의 혼합비율이 많아질수록 인공지지체의 수축현상이 크다는 것을 알 수 있었다. TCP의 녹는점은 1,756 °C이므로 TCP 파우더의 결합이 약하게 작용되었다. 그러나, HA의 녹는점은 1,250 °C로서 1,300 °C의 소결 온도를 넘어서 파우더의 결합이 더 잘 된 것으로 판단되었다.^(20,21) 즉, 바이오 세라믹 파우더의 녹는점에 의해서 수축률이 변화되었다고 판단되며, 인공지지체를 관찰 했을 때 TCP 보다 HA의 표면이 더욱 단단하게 형성된 것을 알 수 있었고, 또한 기계적 강도 평가를 통해서도 위와 같은 결과를 입증할 수 있었다. 이때 수축 현상의 발생은 바이오 세라믹 미립자를 제외한 모든 혼합된 재료가 1,000 °C의 고온에서 제거⁽²²⁾되었기 때문에 나타난 것으로 보이며, 1,300 °C의 소결을 통해 미립자의 결합력이 높아진 것⁽¹²⁾으로 판단되었다.

Fig. 3은 바이오 세라믹 인공지지체의 소결 전과 후의 가로·세로 길이에 대한 수축률 결과를 보여주고 있다. HA의 혼합비율이 증가함으로써 소결에 의한 수축률은 증가된 것을 확인할 수 있었다. 향후 인공지지체를 이용한 동물 실험을 수행할 경우 소결에 의한 수축률을 미리 계산하여 적합한 크기에 맞게 설계되어야 할 것으로 판단되었다. Table 3은 제작된 바이오 세라믹 인

공지지체의 선 폭과 공극 크기는 약 $400 \pm 20 \mu\text{m}$ 이고, 계산된 공극률은 약 45~50 %로 확인되었다. Oh의 논문⁽²³⁾에 따르면 $400 \mu\text{m}$ 의 공극 크기를 가지는 인공지지체는 연골세포와 조골세포의 성장에 좋은 영향을 끼치는 것으로 보고되었다.

Table 3 Sintering result of the fabricated bioceramic scaffolds

	Structures	Scaffolds
Line width	600 μm	400 μm
Pore size	450 μm	400 μm
Porosity	45~50 %	

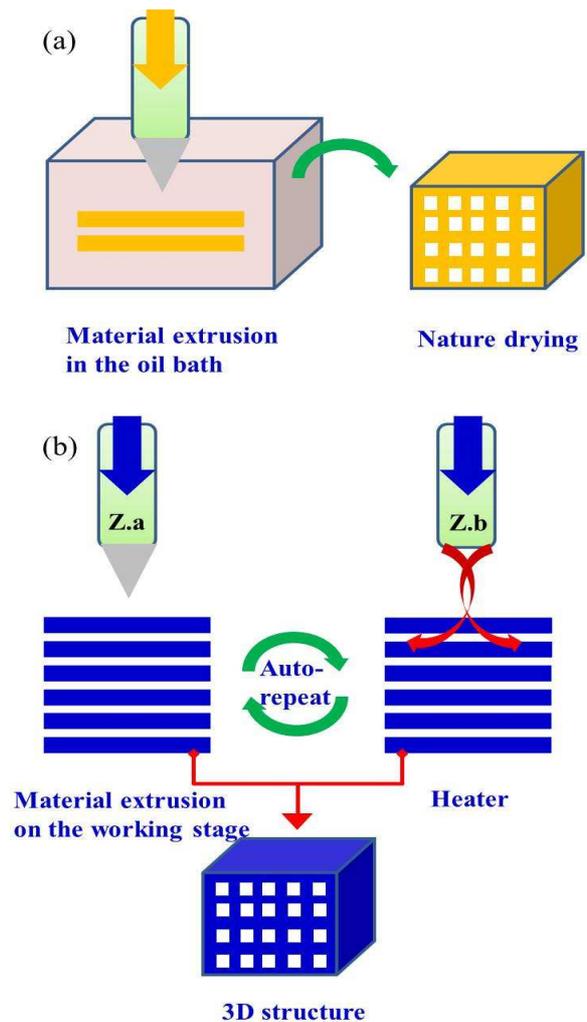


Fig. 2 Schematic diagram of the fabrication of 3D structure (a: previous structure fabrication method and b: our new method)

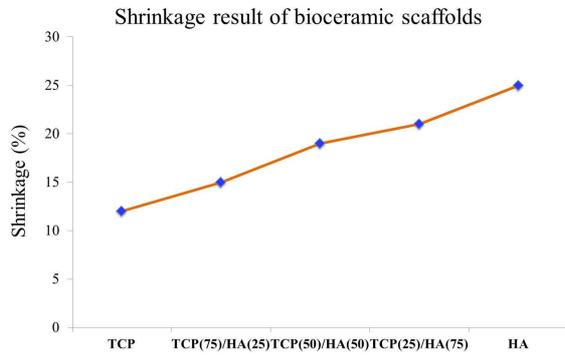


Fig. 3 Shrinkage result of the bioceramic scaffolds (standard error: within $\pm 1\%$)

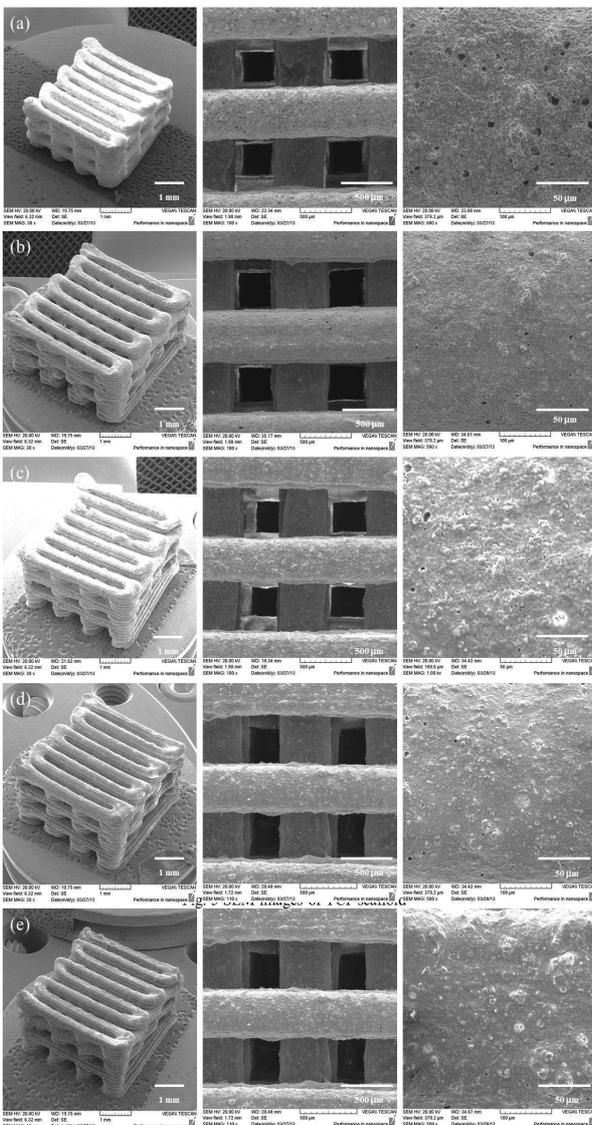


Fig. 4 SEM images of the fabricated (a) TCP, (b) TCP(75)/HA(25), (c) TCP(50)/HA(50), (d) TCP(25)/HA(75), (e) HA scaffolds (left: 3D view, center: pore view, right: surface view)

Fig. 4 은 제작된 TCP, TCP(75)/HA(25), TCP(50)/HA(50), TCP(25)/HA(75), HA 인공지지체들의 SEM 사진을 보여준다. Fig. 4(a)는 TCP 인공지지체의 SEM 사진이며, 표면에 미세기공이 형성되어 있는 것으로 확인되었다. 그 지름의 크기는 평균 $20\ \mu\text{m}$ 정도로 확인되었다. 미세기공의 형성은 고온에서 소결되면서 발생한 것으로 판단되며, 이와 같은 표면은 세포의 성장을 방해하는 요인이 될 수도 있을 것으로 보였다. 실험에 사용된 세포의 크기가 대략 $10\ \mu\text{m}$ 이기 때문에 미세기공에 들어가게 되면 영양분 공급이 원활하지 않고 증식의 어려움이 있을 것으로 사료되었다. Fig. 4(b-d)는 TCP(75)/HA(25), TCP(50)/HA(50), TCP(25)/HA(75) 인공지지체들의 SEM 사진이다. TCP 인공지지체보다 미세기공이 줄어들었고 세포가 부착하기에 유리한 거친 표면을 가졌다.⁽¹²⁾ 두 재료의 혼합비율에 따라 인공지지체의 표면에 영향을 끼치는 것을 알 수 있었고, 이 결과는 HA 미립자의 혼합에 의해 만들어진 것으로 판단된다. 기존 연구 논문을 보면, 인산칼슘계 세라믹스 중 TCP와 HA의 두 상을 혼합한 이상인 산칼슘(Biphasic calcium phosphate, BCP)은 우수한 생체친화성과 골전도성, 그리고 생분해성을 가지고 있어 현재까지 광범위하게 연구 및 보고되고 있다.⁽²⁴⁾ TCP는 생체적합성이 좋아서 체내로 흡수가 잘 되는 특성이 있고, HA는 뛰어난 기계적 강도와 골전도성을 지니고 있어 각각의 장점이 상호작용을 한 것으로 판단되었다.⁽²⁰⁾ 그래서 혼합된 TCP/HA 인공지지체의 표면 특성 또한 세포 증착 및 증식에 유리하게 작용할 것으로 보여진다. Fig. 4(e)는 HA 인공지지체의 SEM 사진이다. 다른 인공지지체뿐만 아니라 HA 인공지지체 또한 성공적으로 제작되었고, 인공지지체의 표면을 보면 거칠고 울퉁불퉁한 것을 확인할 수 있었다.

3.2 기계적 강도 평가

제작된 바이오 세라믹 인공지지체의 기계적 특성을 평가하기 위해 압축시험기를 이용하였다. 하중-변위 곡선을 통해 각각의 인공지지체에 대한 압축 강도를 확인하였다. Fig. 5는 인공지지체의 압축 강도에 대한 결과를 보여주고 있다. TCP 인공지지체($0.66\ \text{MPa}$)는 TCP(75)/HA(25) 인공지지체($0.82\ \text{MPa}$)와 비교했을 때, $0.16\ \text{MPa}$ 정도 TCP(75)/HA(25) 인공지지체가 높았다. TCP(50)/HA(50) 인공지지체의 압축 강도는 $1.22\ \text{MPa}$ 이고, TCP(25)/HA(75) 인공지지체는 1.56

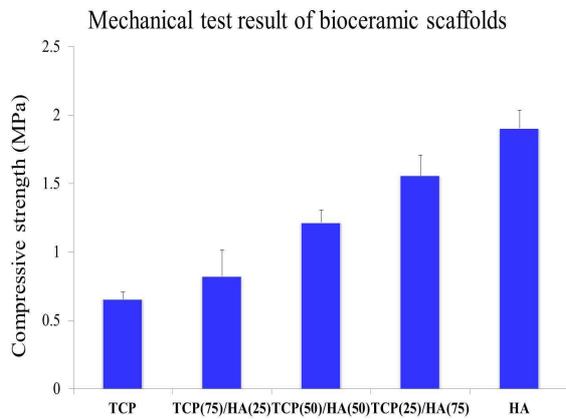


Fig. 5 Compressive strength result

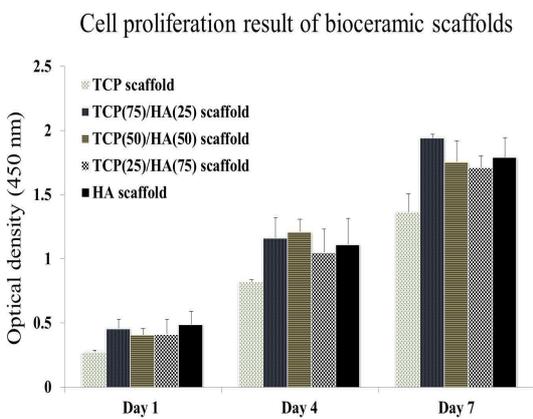


Fig. 6 Cell proliferation result of the bioceramic scaffolds using CCK-8 assay

MPa, 그리고 HA 인공지지체는 1.9 MPa 로 평가 되었다. 이 결과는 HA 의 혼합비율이 증가되면 인공지지체의 압축 강도는 높아진다는 것을 알 수 있었다. 평가된 인공지지체의 압축 강도와 실제 인간의 골 형상에서 해면골(Sponge bone 혹은 Cancellous bone)의 압축 강도와 비교해 보았다. 다른 연구자들의 논문(Tripathi, G. and Vorndran, E.)^(25,26)을 인용하면, 해면골의 압축 강도는 2~12 MPa 의 범위 안에 드는 것으로 보고 되었다. 본 연구에서 제작된 HA 인공지지체의 압축 강도가 실제 해면골의 압축 강도 범위에 유사하게 접근한 것으로 보여진다. 하지만 아직까지 충분한 압축 강도의 범위에 있진 않아 보였고, 소결 온도 및 재료의 특성, 공극률을 조절한다면 압축 강도를 향상시킬 수 있을 것으로 판단되었다.

3.3 세포 증식 평가

Fig. 6 은 7 일 동안 3 차원 바이오 세라믹 인공

지지체에서 MG-63 세포의 증식 결과를 보여준다. CCK-8 을 이용하여 세포 증식 및 생존능력을 측정하고 평가하였다. Microreader 기를 통해 흡광도를 측정하였고, 살아있는 세포 수와의 상관관계를 확인하고자 하였다. 그 결과, 각각의 TCP, TCP(75)/HA(25), TCP(50)/HA(50), TCP(25)/HA(75), HA 인공지지체는 초기 세포 부착이 비슷하게 나타났다. 4 일 차와 7 일차에서는 TCP(75)/HA(25), TCP(50)/HA(50), TCP(25)/HA(75), HA 인공지지체가 TCP 인공지지체보다 높은 증식을 나타내었다. 특히, TCP(75)/HA(25) 인공지지체가 평균 값으로 확인해 보았을 때 가장 높은 세포 증식을 보였다. TCP(50)/HA(50), TCP(25)/HA(75), HA 인공지지체도 세포 증식이 지속적으로 이루어진 것으로 보여진다. 반면에, TCP 인공지지체는 4 일에서 7 일로 진행되는 과정에 있어 높은 증식은 보이지 않은 것으로 나타났지만, 세포 증식은 꾸준히 되고 있는 것으로 확인되었다. 결과적으로, HA 가 포함된 인공지지체일수록 세포 증식에 영향을 끼치는 것으로 보여지며, HA 와 TCP 의 적절한 혼합비율은 세포 증식을 향상시키는 것으로 판단되었다.

이러한 결과는 Seol 외 연구자들의⁽¹²⁾ 연구 결과와 유사하게 나타난 것으로 확인되었다. 그 논문에서 보면, HA 인공지지체가 TCP 와 HA/TCP 인공지지체보다 세포 증식이 높게 나타났다고 하였으며, 그 중에서도 TCP 인공지지체가 가장 낮은 세포 증식을 보였다고 하였다. 하지만, HA 인공지지체에서의 골 분화가 다른 TCP, HA/TCP 인공지지체에서의 골 분화보다 낮은 수준으로 일어난다고 하였고, 14 일 동안 세포 배양액 환경과 골 조직 분화 배양액 환경에서 real time PCR 을 수행하여 그 결과를 입증하였다. 결론적으로 모든 측면을 고려할 때 혼합된 HA/TCP 인공지지체가 생체 내 골 조직 재생에 더욱 효과적일 것이라고 예상하였고, 본 연구 결과에서는 세포 증식 측면으로 볼 때 혼합된 TCP/HA 인공지지체 중에서도 TCP(75)/HA(25) 인공지지체가 골 조직 재생에 더욱 적합할 것으로 기대한다. 인공지지체에 증식된 세포의 부착 위치 및 형태를 관찰하기 위해 세포를 포르말린에 고정된 후 인공지지체의 단면을 잘랐다.

세포들은 인공지지체의 선과 선이 겹쳐지는 부분이나 엇갈리는 부분 등에 자라는 것을 알 수 있으며, 실제 현미경을 통해 관찰해 본 결과, 인공지지체의 윗부분에서는 부착된 세포가 잘

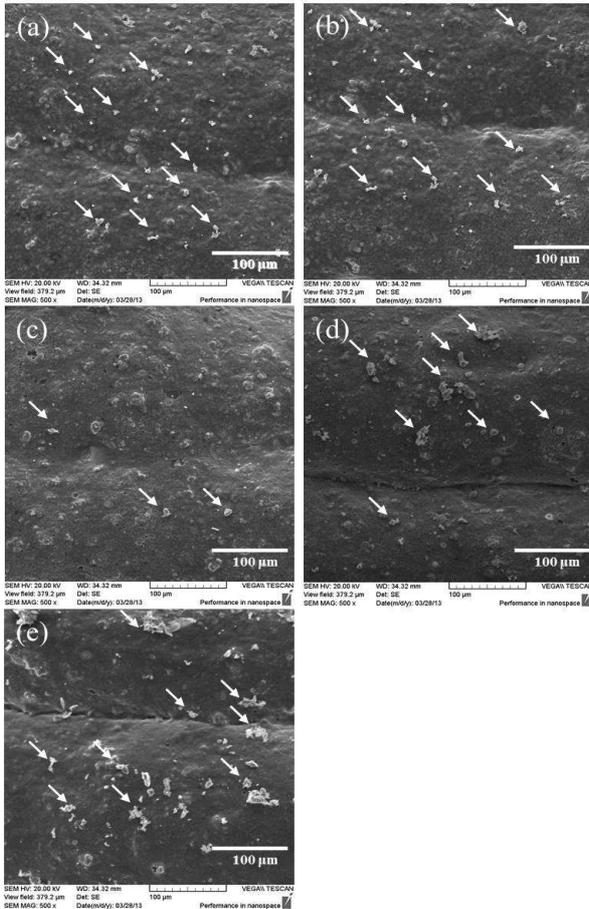


Fig. 7 SEM images of the cross-sectioned scaffolds after cell proliferation for 7 days ((a) TCP, (b) TCP(75)/HA(25), (c) TCP(50)/HA(50), (d) TCP(25)/HA(75), (e) HA scaffolds)

보이지 않았다. 하지만, 자른 단면의 옆 부분에는 세포가 붙어서 증식했다는 것을 알 수 있었다. Fig. 7 은 인공지지체 내부에 부착된 세포의 SEM 사진을 보여준다.

4. 결론

본 연구에서는 압축 적층 조형 시스템을 이용하여 다양한 혼합비율에 따른 TCP/HA 바이오 세라믹 인공지지체를 제작하였다. 시스템의 분사 및 히팅 공정을 이용하여 혼합 구조물의 제작을 위한 공정을 최적화하였다. 혼합된 구조물은 소결 공정의 단계에 의해 1,300 °C, 2 시간 동안 소결되었다. 모든 인공지지체는 수축현상이 발생하였고, 선 폭은 200 µm, 공극은 50 µm 씩 감소하였다. 소결 후 인공지지체의 공극률은 대략 45~50%로 계산되었다. SEM 사진을 통해 HA 미립자가 많이 혼합된 인공지지체일수록 표면이

거친 것을 알 수 있었고, 세포 증착 및 증식에 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다. 기계적 압축 강도 평가를 수행하였고, HA 인공지지체(1.9 MPa)가 다른 인공지지체보다 높은 압축 강도 결과를 얻었다. 하지만 실제 인간의 해면골의 압축 강도에는 다소 부족한 결과였지만, 추가적인 요인을 고려한다면 향상된 값을 얻을 수 있을 것으로 판단되었다. MG-63 세포를 이용한 세포 증식 평가에서는 TCP(75)/HA(25), TCP(50)/HA(50), TCP(25)/HA(75) 인공지지체가 TCP 인공지지체보다 세포 증식이 높았고 그 중에서도 TCP(75)/HA(25) 인공지지체가 다른 인공지지체보다 증식 효과가 있는 것으로 판단되었다. 결론적으로, TCP의 생분해성 특성과 HA의 골전도성 특성을 혼합한 인공지지체가 골 조직 재생에 더욱 효과적일 것으로 예상하였다. 향후 바이오 세라믹 인공지지체를 이용한 동물실험을 통해 골 조직 재생 능력을 평가할 계획이다.

후 기

이 논문은 2013 년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업지원을 받아 수행된 것임(No. 2013R1A4A01010936).

참고문헌 (References)

- (1) Yang, S., Leong, F., Du, Z. and Chua, C. K., 2001, "The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors," *Tissue Eng.*, Vol. 7, No. 6, pp. 679~689.
- (2) Yoshikawa, H. and Myoui, A., 2005, "Bone Tissue Engineering with Porous Hydroxyapatite Ceramics," *J. Artif. Organs.*, Vol. 8, No. 3, pp. 131~136.
- (3) Kim, K. L., Ok, K. M., Kim, D. H., Park, H. C. and Yoon, S. Y., 2013, "Fabrication and Characterization of Biphasic Calcium Phosphate Scaffolds with an Unidirectional Macropore Structure Using Tertiary Butyl Alcohol Based Freeze Gel Casting Method," *J. Korean Ceram. Soc.*, Vol. 50, No. 4, pp. 263~268.
- (4) Kim, Y. H., Jyoti, A., Byun, I. S., Min, Y. K., Yang, H. M., Lee, B. T. and Song, H. Y., 2008, "Effects of Macrophage on Biodegradation of β -Tricalcium Phosphate Bone Graft Substitute," *J. Korean Ceram. Soc.*, Vol. 45, No. 10, pp. 618~624.
- (5) Hutmacher, D. W., 2000, "Scaffolds in Tissue Engineering Bone and Cartilage," *Biomaterials*, Vol. 21, Issue 24, pp. 2529~2543.
- (6) Sachlos, E. and Czernuszka, J. T., 2003, "Making

- Tissue Engineering Scaffolds Work. Review on the Application of Solid Freeform Fabrication Technology to the Production of Tissue Engineering Scaffolds," *Eur. Cell. Mater.*, Vol. 5, pp. 29~40.
- (7) Zhang, X., Cao, C., Ma, X. and Li, Y., 2012, "Optimization of Macroporous 3-D Silk Fibrin Scaffolds by Salt-Leaching Procedure in Organic Solvent-Free Conditions," *J. Mater. Sci: Mater. Med.*, Vol. 23, pp. 315~324.
- (8) Hutmacher, D. W., Sittinger, M. and Risbud, M. V., 2004, "Scaffold-Based Tissue Engineering: Rationale for Computer-Aided Design and Solid Free-Form Fabrication Systems," *Trends Biomechnol.*, Vol. 22, Issue 7, pp. 354~362.
- (9) Bartolo, P. J. S., Almeida, H. and Laoui, T., 2009, "Rapid Prototyping and Manufacturing for Tissue Engineering Scaffolds," *Int. J. Comput. Appl. Tech.*, Vol. 36, Issue 1, pp. 1~9.
- (10) Lee, S. J., Kang, T. Y., Park, J. K., Rhie, J. W., Hahn, S. K. and Cho, D. W., 2007, "Development of Three-Dimensional Scaffold for Cartilage Regeneration Using Microstereolithography," *Proceeding of KSME*, Vol. 5, pp. 188~193.
- (11) Wikipedia, "3D Printing," http://ko.wikipedia.org/wiki/3D_printing
- (12) Seol, Y. J., Park, J. Y. and Cho, D. W., 2011, "Fabrication of Calcium Phosphate Scaffolds Using Projection-Based Microstereolithography and Their Effects on Osteogenesis," *Trans. Korean Soc. Mech. Eng. B*, Vol. 35, No. 11, pp. 1237~1242.
- (13) Soon, Y. M., Shin, K. H., Koh, Y. H., Lee, J. H., Choi, W. Y. and Kim H. E., 2011, "Fabrication and Compressive Strength Hydroxyapatite Scaffolds with a Functionally Graded Core/Shell Structure," *J. Eur. Ceram. Soc.*, Vol. 31, Issues 1~2, pp. 13~18.
- (14) Korea Communications Agency, 2013, "3D Printing Technology and Applications," Vol. 6, pp. 1~6.
- (15) Seol, Y. J., Kim, J. Y., Lee, S. J., Park, E. K., Kim, S. Y. and Cho, D. W., 2008, "Fabrication of Hydroxyapatite Scaffold Using Micro-Stereolithography and Mold Technology," *Proceeding of KSME(08BE044)*, pp. 102~103.
- (16) Schumacher, M., Deisinger, U., Detsch, R. and Ziegler, G., 2010 "Indirect Rapid Prototyping of Biphasic Calcium Phosphate Scaffolds as Bone Substitutes: Influence of Phase Composition, Macroporosity and Pore Geometry on Mechanical Properties," *J. Mater. Sci: Mater. Med.*, Vol. 21, No. 12, pp. 3119-3127.
- (17) Miranda, P., Saiz, E., Gryn, K. and Tomsia, A. P., 2006, "Sintering and Robocasting of Beta-Tricalcium Phosphate Scaffolds for Orthopaedic Applications," *Acta Biomater.*, Vol. 2, No. 4, pp. 457~466.
- (18) Vivanco, J., Aiyanger, A., Araneda, A. and Ploeg, H. L., 2012, "Mechanical Characterization of Injection-Molded Macro Porous Bioceramic Bone Scaffolds," *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, Vol. 9, pp. 137~152.
- (19) Sa, M. W. and Kim, J. Y., 2013, "Effect of Various Blending Ratios on the Cell Characteristics of PCL and PLGA Scaffolds Fabricated by Polymer Deposition System," *Int. J. Precis. Eng. Manuf.*, Vol. 14, No. 4, pp. 649~655.
- (20) Mirhadi, B., Mehdikhani, B. and Askari, N., 2011, "Synthesis of Nano-Sized β -Tricalcium Phosphate via Wet Precipitation," *Process. Appl. Ceram.*, Vol. 5, No. 4, pp. 193~198.
- (21) <http://hydroxyapatite.wikispaces.com/>
- (22) Kim, H., J., Park, I., K., Kim, J. H., Cho, C. S. and Kim, M., S., 2012, "Gas Foaming Fabrication of Porous Biphasic Calcium Phosphate for Bone Regeneration," *Tissue Eng. Regen. Med.*, Vol. 9, No. 2, pp. 63~68.
- (23) Oh, S. H., Park, I. K., Kim, J. M. and Lee, J. H., 2007, "In Vitro and in Vivo Characteristics of PCL Scaffolds with Pore Size Gradient Fabricated by a Centrifugation Method," *Biomaterials*, Vol. 28, pp. 1664~1671.
- (24) Park, K. B., Park, J. W., Ahn, H. U., Yang, D. J., Choi, S. K., Jang, I. S., Yeo, S. I. and Seo, J. Y., 2006, "Comparative Study on the Physicochemical Properties and Cytocompatibility of Microporous Biphasic Calcium Phosphate Ceramics as a Bone Graft Substitute," *J. Korean Acad. Periodontol.*, Vol. 36, pp. 797~808.
- (25) Tripathi, G. and Basu, B., 2012, "A Porous Hydroxyapatite Scaffold for Bone Tissue Engineering Physic-Mechanical and Biological Evaluations," *Ceram. Inter.*, Vol. 38, pp. 341~349.
- (26) Vorndran, E., Klamer, M., Klammert, U., Grover, L. M., Patel, S., Barralet, J. E. and Gbureck, U., 2008, "3D Powder Printing of β -Tricalcium Phosphate Ceramics Using Different Strategies," *Adv. Eng. Mater.*, Vol. 10, pp. 67~71.