

# 임의 형상 제작 기법을 이용한 3차원 세포지지체 제작에 관한 연구

최도현\*, 김현철\*\*,#

\*인제대학교 기계자동차공학부, \*\*고안전 차량 핵심기술연구소, 인제대학교 전자IT기계자동차공학부

## A Study on the Fabrication of 3D Scaffolds Using the Solid Freeform Method

Do-Hyun Choi\*, Hyun-Chul Kim\*\*,#

\*Department of Mechanical & Automotive Engineering, Inje University,

\*\*Department of Electronic IT Mechanical & Automotive Engineering, Inje University  
(Received 8 August 2018; received in revised form 13 August 2018; accepted 27 September 2018)

### ABSTRACT

With the goal of tissue regeneration for organs damaged through an accident or a disease, research on tissue engineering has been conducted to produce 3-D scaffolds that can support the cells in the attachment and growth for the cell proliferation and differentiation. A scaffold requires a suitable pore size and porosity to increase the nutrient circulation or oxygen supply for the attachment and growth of cells. The existing production methods such as solvent-casting particulate leaching, phase separation, and fiber bonding have certain disadvantages. With these methods, it is difficult to obtain a free desired shape. In addition, certain pore sizes and interconnectivities among the pores may not be guaranteed.

To solve these problems, this study has fabricated a scaffold with a 3-D shaped nose using Alginate, which is a natural polymer obtained through Fused Deposition Modeling (FDM), one of the CAD/CAM-based Solid Freeform Fabrication (SFF) methods.

**Key Words** : Scaffold(세포지지체), Solid Freeform Fabrication(임의형상제작), Hydrogel(하이드로젤), Tissue Engineering(조직공학)

## 1. 서 론

조직공학(Tissue engineering)은 사고나 질병에 의해 손상된 조직과 장기를 재생하여 삶의 질을 개선하기 위한 생물학, 의학, 공학이 융합된 학문이라고

할 수 있다<sup>1,2)</sup>.

기존의 손상된 조직은 자연 재생 또는 약물 치료, 손상 조직 제거, 이식을 통해 치료하였다. 조직공학에서는 효율적인 치료를 위해 생체 적합성 재료로 원하는 기능과 구조를 가지는 세포지지체(Scaffold)를 구성하여 세포를 배양시켜 인공 장기나 조직을 재생한다. 조직을 재생하기 위한 주된 요소에는 세포, 세포지지체, 세포의 성장조건이며, 세포

# Corresponding Author : mechkhc@inje.ac.kr

Tel: +82-55-320-3988, Fax: +82-55-324-1723

Copyright © The Korean Society of Manufacturing Process Engineers. This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Noncommercial 3.0 License (CC BY-NC 3.0 <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.

가 성장하는 동안 적합한 환경을 제공하는 세포지지체는 매우 중요한 역할을 하므로 이에 대한 많은 연구가 진행되고 있다<sup>3,4)</sup>.

세포 지지체는 세포가 조직으로 성장하는 동안 세포 성장에 적합한 환경을 제공하며, 성장에 필요한 영양분 공급과 배설물 등의 배출을 원활하게 도와주는 큰 기공과, 세포지지체 내부에 보다 넓은 표면적을 만들어 세포들의 부착을 높여줄 작은 기공을 가진 구조로 제작되어야 하며, 목적 조직에 맞는 충분한 기계적 강도를 가지고 있어야 한다<sup>5)</sup>.

기존 세포지지체 제작 방법에는 염 추출법(Solvent-casting particulate leaching), 상분리법(Phase separation), 이산화탄소를 이용한 고압기체 팽창법(High pressure gas saturation), 유화동결 건조법(Emulsion freeze drying), 섬유 압착법(Fiber bonding) 등이 있다<sup>6-9)</sup>. 염 결정의 크기와 생분해성 고분자를 유기용매에 용해시킨 후 승화를 통해 제작하기에 비교적 다양한 공극 크기와 공극률 조절이 가능하다. 그러나 이와 같은 방법은 원하는 자유 형상이나 일정한 공극 크기 및 모양을 얻기가 어렵고, 공극끼리의 내부 연결성이 보장되지 않을 수 있다는 것뿐만 아니라 내부 염 결정 및 유기 용매(Solvent)가 잔류하고 있어 세포의 부착과 성장에 영향을 줄 수 있다는 단점이 있다.

이를 해결하기 위해 CAD/CAM 기반의 임의 형상 제작 기법(Solid Freeform Fabrication)을 적용한 3차원 형상의 세포지지체 제작에 관한 연구가 진행되고 있다<sup>5,9)</sup>. 이 제작 기법은 CAD 형상을 한 층씩 적층 또는 경화하는 방법으로 3차원 형상을 제작하는 방법이며, 대표적으로 SLS(Selective Laser Sintering), SLA(Stereolithography Apparatus) 그리고 FDM(Fused Deposition Modeling)의 3가지 방식이 있다.

SLS 방식은 분말 형태의 고분자에 레이저를 순간적으로 주사하여 용융 소결(Sintering) 하는 방법으로 한 층씩 제작하는 기술이며, SLA 방식은 액상의 광경화성 소재 표면에 레이저(UV)를 주사하여 주사된 부분만 경화시켜 3차원 형상을 만드는 방법이다.

FDM 방식은 필라멘트 형태의 열가소성 고분자를 노즐에서 가열 후 분사하는 방식으로 한 층씩 적층

하여 형상을 제작한다. 이를 적용한 세포지지체 제작에는 일반적으로 생분해성 고분자인 PCL(Polycaprolactone)을 사용하여, 디스펜서(Dispenser)를 통해 고온으로 녹인 후 분사하여 3차원 형상을 제작한다. 이렇게 제작된 지지체는 비교적 강한 기계적 강도를 가지고 있어 골 조직 재생을 위한 3차원 세포지지체 제작에 주로 사용되고 있다.

인체 특성상 뼈와 같이 단단한 조직 외에도 피부, 연골 등 기계적 강도가 낮은 부위도 있지만, 이러한 세포의 재생에 필요한 세포지지체 제작에 대한 연구<sup>10-15)</sup>는 상대적으로 많은 연구가 수행되고 있지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 CAD/CAM 기반의 임의 형상 제작 기법을 사용하여, 연한 조직에 적합한 천연고분자인 알지네이트(Alginate)를 사용한 세포지지체 제작에 관한 연구를 수행하였다.

## 2. 세포지지체 제작 방법

### 2.1 제작 방법

인체의 유연한 기관에 적합한 세포지지체를 만들기 위해서 본 연구에서는 해초로부터 분리되어 추출된 천연고분자인 알지네이트를 사용하였다.

알지네이트 하이드로겔과 CaCl<sub>2</sub> solution의 경화 반응을 통해 알지네이트 세포지지체를 제작하였으며, 액상의 용액을 경화 하기 위해 FDM방식의 3D 프린팅을 이용해서 원하는 형상의 지지체가 경화될 수 있는 몰드를 제작하여 사용하였다. 제작된 외부 형상의 몰드에 알지네이트 하이드로겔을 채운 후 내부 기공이 될 몰드를 넣고 밀봉시킨 상태로 CaCl<sub>2</sub> solution과 경화반응을 시킨다. 완전히 경화가 된 이후 외부 몰드에서 알지네이트를 분리한 이후, 내부 몰드를 제거하여 기공을 만드는 것으로 인체 형상의 알지네이트 세포지지체를 제작하였다.

알지네이트 하이드로겔 제작에는 제약 또는 화장품에 사용되는 재료인 Duck Algine NSPH2-NY(Sodium Alginate, kikkoman)을 사용하였다. 알지네이트의 경화를 통한 제작 특성을 알아보기 위해 Table 1 에서와 같이 농도 1% w/v에서 4% w/v까지 제작하였으며, 핫플레이트에서 표면 온도 95°C 로

**Table 1 Experimental conditions for Alginate Hydrogel**

Concentration	Distilled water(ml)	Sodium Alginate(g)
1% w/v	200	2
2% w/v		4
3% w/v		6
4% w/v		8

가열 유지하면서 1000rpm 의 회전속도로 Sodium Alginate가 완전히 녹을 때 까지 교반기를 사용하여 제작하였다. 농도가 높아질수록 점도가 높아져 교 반기를 통한 제조에는 어려움이 있어 4% w/v 농도 까지 이번 실험에서 제조하였다.

경화반응을 위해 사용되는 CaCl<sub>2</sub>(DAEJUNG) solution은 수용액 상태에서 이온화가 잘 되어 Alginate hydrogel solution과 빠르게 접촉함과 동시에 경화반응이 시작되며, 실험에 사용된 CaCl<sub>2</sub> solution은 0.1M 농도 단위로 제작하였으며, 흡습성이 있어 분자식 로 분자량 147.01로 계산하였다.

몰드 제작에는 FDM 방식의 3D 프린팅이 가능한 (주)로킷의 '3DISON' 장비를 사용하였으며, 노즐 직경은 0.4mm, 출력 조건으로는 레이어 높이 0.25mm,

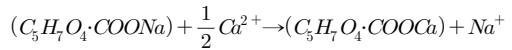
출력 속도와 여유 시간 속도는 기본 값으로 80mm/s 로 설정하였으며, 출력 형상에 따라 적절히 변경하였다.

외부 형상에 대한 몰드 제작에는 PLA 필라멘트를 사용하였으며, 내부 몰드 제작에는 Supporter로 사용되는 PVA, HIPS(High Impact Polystyrene) 필라멘트를 사용하였다.

PVA 필라멘트의 경우 물에 녹는 소재이며, HIPS 필라멘트는 Limonene oil에 녹는 특징을 가지고 있으며, Limonene oil은 오렌지에서 추출한 것으로 향료, 화장품, 식품첨가제 등으로 사용된다. 전체적인 3차원 형상의 알지네이트 세포지지체 제작 과정은 Fig. 1에 나타내었다.

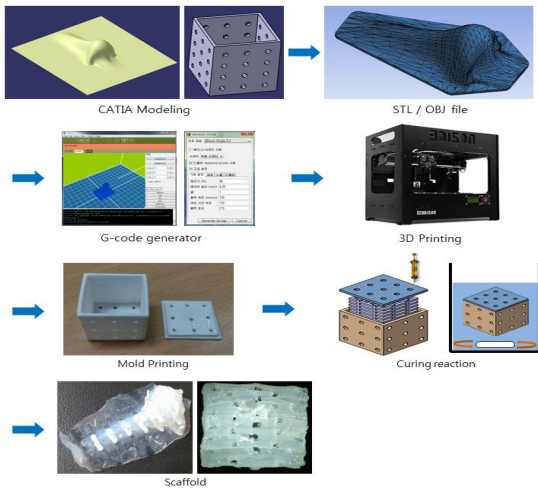
## 2.2 제작 기초 실험

알지네이트 세포지지체를 제작하기 위해서는 알지네이트 하이드로겔 solution에 Ca<sup>2+</sup> 을 첨가하여 Ca<sup>2+</sup> 를 중심으로 알지네이트가 망상을 형성하는 반응을 일으켜야 하며, 알지네이트의 경화 반응식은 다음과 같다.



알지네이트 하이드로겔과 CaCl<sub>2</sub> solution의 경화 반응을 통한 형상 정도를 알아보기 위해 사각형 몰드에 Table 1의 조건에서 CaCl<sub>2</sub> solution 의 농도를 조절하며 이에 따른 경화 후 형상 정도를 분석하였다. 각각의 농도에 따라 경화 반응은 30분 동안 진행했으며, 3% w/v 과 4% w/v 의 알지네이트와 0.3M 의 CaCl<sub>2</sub> solution 과의 반응에서 수축 없이 형상 정도가 우수하였음을 확인하였다.

세포지지체의 형상을 유지하면서 내부 기공 형성을 위해 외부 몰드와 내부 기공을 형성할 몰드를 3D 프린팅 방법을 이용해 제작한 후 내부 몰드를 물리적으로 제거하는 방법을 사용하여 세포지지체를 제작하였다. 3차원 형상을 가지는 구조에 대해 제작은 하였으나, 기공 간 낮은 연결성을 가지며 몰드를 제거하는 도중 막의 손상으로 내부 기공 형상 유지에 문제가 있을 뿐 아니라, 형상이 변형되



**Fig. 1 Scaffold fabrication process**

어 적절치 않은 것으로 판단되었다. 이를 해결하고자 본 연구에서는 물리적인 방법을 배제한 화학적으로 몰드를 제거하는 방법을 고안하였고, 특정 용매에 녹는 PVA, HIPS 필라멘트를 이용하여 내부 몰드를 제작하고 화학적으로 제거하는 방법을 통해 세포지지체를 제작하였다.

### 2.2.1 내부 몰드 화학적 제거를 통한 세포지지체 제작

세포지지체 내부의 영양분과 산소공급, 그리고 배설물 배출을 위한 기공이 되는 부분을 화학적으로 제거가 가능한 PVA, HIPS 필라멘트 소재를 이용하여 3D 프린팅을 이용해 제작하였다. 외부 몰드는 PLA를 이용해 제작하고 알지네이트 하이드로겔을 채운 후 제작된 PVA/HIPS 몰드를 한 층씩 쌓고 완전 뚜껑을 씌워 밀봉 하였다. 기초 실험을 통해 얻은 경화 농도인 0.3M solution에 완전히 잠기게 한 후 경화 속도를 높이기 위해 교반기에서 magnetic stirrer bar를 사용하여 400rpm의 회전속도에서 경화 되도록 설정하였다. 내부까지 완전히 경화 되도록 24시간 이후에 몰드에서 알지네이트 세포지지체를 분리하였으며, 경화 이후 내부 기공 형성을 위해 제작한 PVA/HIPS 소재를 이용한 내부 몰드를 화학적 방법을 통해 제거하였다. PVA의 경

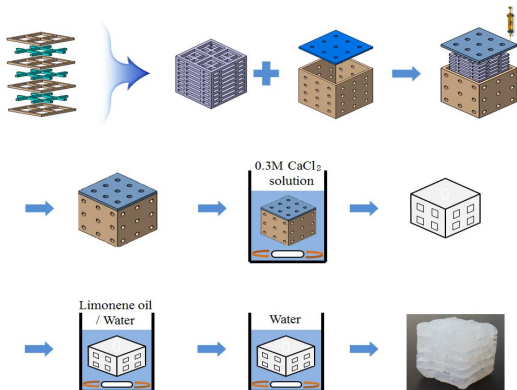


Fig. 2 Scaffold fabrication process with chemical removal for internal pores

우에는 물에 녹여 제거하였으며, HIPS 몰드는 Limonene oil에 완전히 잠기게 한 이후 교반기에서 magnetic stirrer bar를 사용해 제거하였다. 사각 형태의 내부 몰드를 가진 세포지지체 제작 과정을 Fig. 2에 나타내었다.

### 3. 실험결과 및 고찰

PVA 필라멘트와 HIPS 필라멘트로 30(mm) x 30(mm)내부 몰드를 제작한 후 화학적인 방법으로 제거한 세포지지체가 Fig.3과 Fig.4에 보여진다. Fig.3은 PVA 몰드를 이용한 것이며 Fig.4는 HIPS 몰드를 이용하여 세포지지체를 제작한 결과물이다.

PVA 몰드를 이용하여 세포지지체를 제작한 결과를 보면, 기공의 크기와 모양이 일정한 형태를 유지하지 못하는 것을 볼 수 있다. 이는 알지네이트 하이드로겔과 CaCl<sub>2</sub> solution이 반응하는 과정과 동시에 PVA 몰드가 녹으면서 형태를 유지하지 못한 것으로 판단된다.

반면 HIPS 몰드를 사용하여 제작한 알지네이트 세포지지체는 기공의 크기와 모양이 일정하게 유지되고 있는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 일정한 모양과 형상을 가지는 세포지지체 제작에는 HIPS 필라멘트를 사용하는 것이 더 적합하다는 것을 알 수 있다.

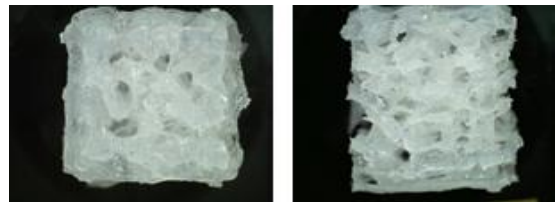


Fig. 3 Scaffold using PVA

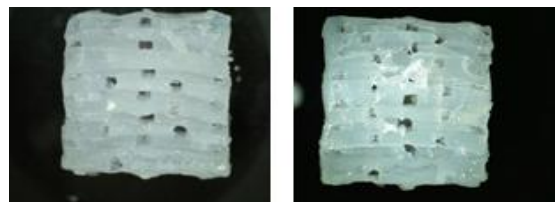


Fig. 4 Scaffold using HIPS



Fig. 5 Internal mold shapes for pores

원하는 기공의 폭을 결정하기 위해서는 내부 몰드 선폭에 따른 경화 후 기공 선폭의 관계를 확인할 필요가 있다. 이를 위해 HIPS 필라멘트의 제작 선폭에 따른 내부 기공 선폭 관계를 알아보기 위한 실험을 수행하였다.

0.9mm, 1.2mm 선폭을 갖는 다양한 형상을 설계하고 HIPS 필라멘트를 이용해 Fig. 5와 같이 내부 기공 형상을 만들어 세포지지체를 제작 하였다.

Fig. 6 및 Fig. 7은 내부 기공 형상에 따른 세포지지체의 단면을 촬영한 이미지이며, Fig. 8과 Fig. 9는 세포지지체의 단면에 대해 임의의 지점에서의 선폭을 측정된 값을 그래프로 나타낸 것이다.



Fig. 6 0.9mm, 1.2mm rectangular pattern shapes

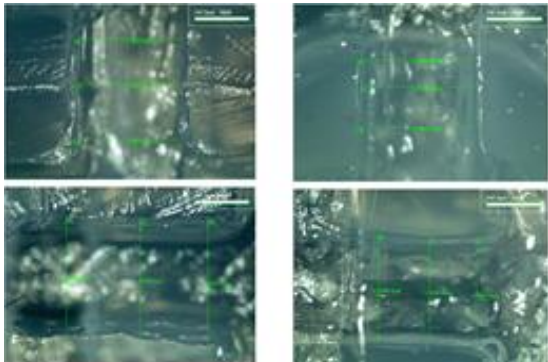


Fig. 7 0.9mm, 1.2mm circular pattern shapes

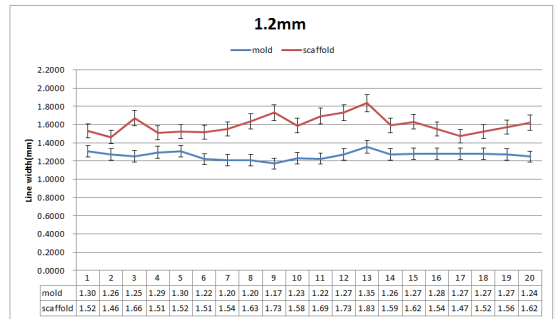
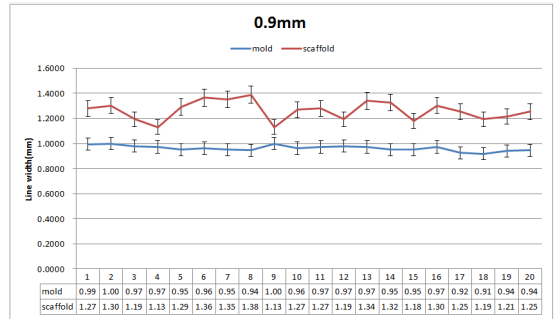


Fig. 8 Line width measurement for rectangular pattern shapes

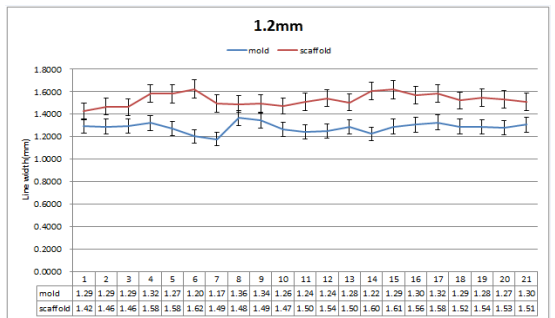
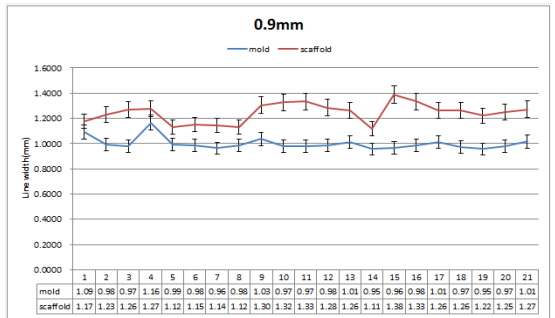


Fig. 9 Line width measurement for circular pattern shapes

우선 몰드의 선폭을 보면 모델링 기준 길이에 비해 0.06mm 정도 크게 측정이 되는데 이는 3D Printer에서 고온에 의해 출력 시 팽창 이후 수축으로 인해 발생하는 현상으로 볼 수 있으며, 제작된 세포지지체의 선폭은 모델링 기준 길이에 비해 약 0.36 ~ 0.39mm 정도 크게 형성되는 것으로 나타났다. 이는 알지네이트 경화 시 수축과 시간이 지남에 따라 수분이 빠져나가는 현상이 발생한 결과로 보여진다.

0.9mm 몰드를 사용한 것에 비해 1.2mm의 몰드를 사용한 경우 알지네이트 세포지지체의 선폭이 비교적 균일한 것으로 나타난다. 이러한 결과는 내부 몰드를 완전히 제거하는데 소요되는 시간이 0.9mm의 몰드를 사용한 경우 1.2mm 몰드를 사용한 경우에 비해 오래 걸리는데, 이에 따라 알지네이트 세포지지체의 수분이 빠져나가는 것과 관련 되는 것으로 판단 할 수 있다.

또한, 작은 선폭 제작시는 몰드의 선폭이 크므로 동일한 시간에 몰드를 완전히 제거하는데 한계가 있어 약간의 필라멘트가 잔류하는 것을 확인하였다. 24시간을 기준으로 몰드를 완전히 제거하기 위해서는 1.2mm 의 몰드를 사용하는 것이 적합한 것으로 확인하였다.

#### 4. 세포지지체 제작

앞선 실험을 통해 분석한 제작 특성 결과를 바탕으로, 인체의 일부인 코를 제작해 보기 위해 Fig. 10과 같이 간단하게 모델링하고 3D 프린터를 이용해 외부 및 내부 형상을 위한 몰드를 Fig. 11과 같이 출력한 후, 마지막으로 Fig 12와 같이 세포지지체를 제작하였다.

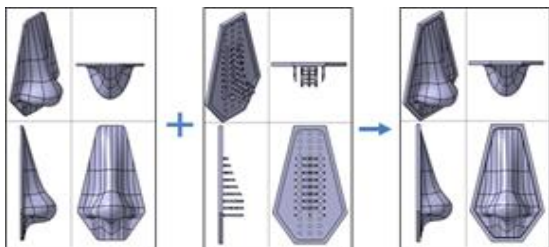


Fig. 10 3D modeling for nose shape

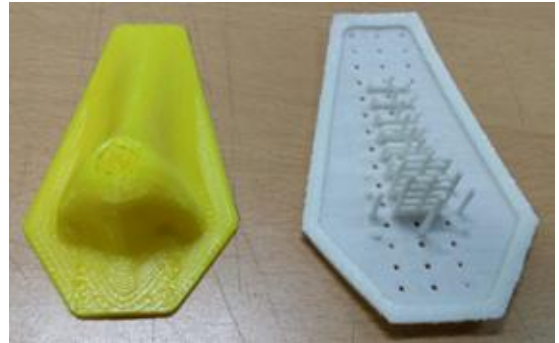


Fig. 11 3D printing for molds



Fig. 12 Nose shape scaffold

코 형태를 가지는 몰드 제작에는 HIPS로 출력을 하게 되면 수축으로 인한 열 변형이 심하게 발생하여 형상을 유지하지 못하는 것을 보완하기 위해 외부 몰드는 PLA 필라멘트를 사용하였으며, 내부 몰드에 대해서만 HIPS 필라멘트를 사용하여 제작하였다.

#### 5. 결론

본 연구에서는 생체 재료로 사용 가능 한 천연 고분자 중 하나인 알지네이트를 이용하여 입의 형상 제작 기법을 통해 세포가 성장하고 자랄 수 있는 환경을 제공해 주는 세포지지체 제작에 관한 연구를 진행하였다. 기초 실험을 수행하고 결과를 분석하여, 알지네이트 세포지지체 제작 과정을 정립하였다.

알지네이트 세포지지체를 제작하기에 앞서 경화 반응에 대한 사전 실험 결과 몰드의 제작 없이는

액상 용액의 반응으로 임의의 형상을 가지는 3차원 구조물 제작이 어렵다고 판단하여 임의의 형상 제작 기법 중 하나인 3D 프린팅 기법을 적용하여 물드를 제작하였다.

내부 기공 형성을 위해 물리적인 제거 없이 용매에 녹여 제거 가능하면서 3D 프린터를 이용해 출력력이 가능한 PVA / HIPS 필라멘트를 선택하였으며, 인체에 무해하고 각각 물과 Limonene oil에 녹는 특성을 가지고 있어 세포지지체 제작에 적합하다.

PVA 필라멘트를 물드로 사용하여 제작한 결과, CaCl<sub>2</sub> solution과 알지네이트 하이드로겔이 경화 반응을 일으키는 동안, PVA 물드가 물과 반응하여 세포지지체 형상이 만들어지기 전에 녹아 없어져 최종적으로 일정한 공극 크기 제작과 형상 유지에 적합하지 않아, HIPS 필라멘트를 물드로 제작하였다.

마지막으로 인체의 일부인 코 형태의 세포지지체를 제작하여 인체의 유연한 조직에 적합한 세포지지체 제작 가능성을 확인하였다.

## 후 기

“이 논문은 2017년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임 (No. 2017R1D1A1B03029074).”

## REFERENCES

1. Stock, U. A. and Vacanti, J. P., “Tissue Engineering: Current State and Prospects,” Annual Review of Medicine, Vol. 52, pp. 443-451, 2001.
2. Fuchs, J. R., Nasser, B. A. and Vacanti, J. P., “Tissue engineering: A 21st century solution,” Annals of Thoracic Surgery, Vol. 72, No. 2, pp. 577-591, 2001.
3. Catherine, K. K. and Peter, X. M., “Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part I. Structure, gelation rate and mechanical properties,” Biomaterials, Vol. 22, pp. 511-512, 2001.
4. Cho, E. C., Kim, J. W. and Alberto, F., “Highly Responsive Hydrogel Scaffolds Formed by Three-Dimensional Organization of Microgel Nanoparticles,” NANO LETTERS, Vol. 8, No. 1, pp. 168-172, 2008.
5. Jessica, M., Williams, Adebisi, A. and Rachel, M. S., et al., “Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering,” Biomaterials, Vol. 26, pp. 4817-4827, 2005.
6. Salerno, A., et al., “Design of porous polymeric scaffolds by gas foaming of heterogeneous blends,” Journal of Materials Science: Materials in Medicine, Vol. 20, No. 10, pp. 2043-2051, 2009.
7. Salerno, A., Iannace, S. and Netti, P. A., “Open-pore biodegradable foams prepared via gas foaming and microparticulate templating,” Macromolecular Bioscience, Vol. 8, No. 7, pp. 655-664, 2008.
8. Lee, S. H., Jo, A. R., Choi, G. P., et al., “Fabrication of 3D Alginate Scaffold with Interconnected Pores using Wire-Network Molding Technique,” Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Vol. 10, No. 2, pp. 53-59, 2013.
9. Cartmell, S., “Controlled Release Scaffolds for Bone Tissue Engineering,” Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 98, No. 2, pp. 430-441, 2009.
10. Jeanie, L. D. and David, J. M., “Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications,” Biomaterials, Vol. 24, pp. 4337-4351, 2003.
11. Choi, S. W., Moon, S. K., Chu, J. Y., et al., “Alginate Hydrogel Embedding Poly(D,L-lactided-co-glycolide) Porous Scaffold Disks for Cartilage Tissue Engineering,” Macromolecular Research, Vol. 20, No. 5, pp. 447-452, 2012.
12. Cao, N., “Fabrication of alginate hydrogel scaffolds and cell viability in calcium-crosslinked alginate hydrogel,” University of Saskatchewan,

pp. 6-12, 2011.

13. Ramay, H. R. R. and Zhang, M., "Biphasic calcium phosphate nanocomposite porous scaffolds for load-bearing bone tissue engineering," *Biomaterials*, Vol. 25, No. 21, pp. 5171-5180, 2004.
14. Cardea, S., Pisanti, P. and Reverchon, E., "Generation of chitosan nanoporous structures for tissue engineering applications using a supercritical fluid assisted process," *Journal of Supercritical Fluids*, Vol. 54, No. 3, pp. 290-295, 2010.
15. Goto, E., et al., "A rolled sheet of collagen gel with cultured Schwann cells: Model of nerve conduit to enhance neurite growth," *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 109, No. 5, pp. 512-518, 2010.