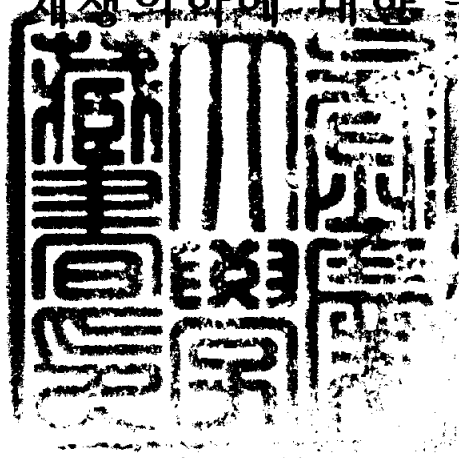


781
6-1-1
A
-2

碩士學位論文

조직공학적 다공성 지지체의 제조
및 재생의학에 대한 응용



2002年 12月 16日

釜慶大學校 大學院

高分子工學科

金 仁 英

조직공학적 다공성 지지체의 제조
및 재생의학에 대한 응용

Preparation of Tissue Engineered
Porous Scaffolds and Application for
Regeneration Medicine

2002年 12月 16日

釜慶大學校 大學院
高分子工學科
金 仁 英

조직공학적 다공성 지지체의 제조
및 재생의학에 대한 응용

指導教授 이 봉

이 論文을 工學碩士學位 論文으로 提出함.

2002年 12月 16日

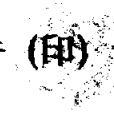
釜慶大學校 大學院
高分子工學科
金 仁 英

金仁英의 碩士 學位 論文을 認准함.

主 審 釜慶大學校 教 授 민 성 기



委 員 釜慶大學校 教 授 박 성 수 (印)



委 員 釜慶大學校 教 授 이 봉



2002年 12月 16日

釜 慶 大 學 校 大 學 院

목 차

List of Tables	vii
List of Figures	ix
Abstract	xiii

=====

제 1 장. 서 론	1
1. 생체조직공학의 정의	1
2. 생체조직공학의 기본 요소	1
2-1. 생체 재료	1
2-2. 세 포	3
2-3. 생체내 환경	3
3. 생체조직공학 및 재생의학으로의 응용	6
3-1. 생체 재료를 이용한 재생의 유도	6
3-2. 세포를 이용한 결손 조직의 대체	6
3-3. 조직 또는 장기를 대신하는 모델 시스템	7
3-4. 유전적으로 개량된 세포의 이식	7
3-5. 인공 물질의 표면 처리	7
 제 2장. 파라핀 분말 추출법을 이용한 새로운 조직공학적 다 공성 지지체의 제조 및 특성	 11
1. 이론적 배경	11

2. 실험	15
2-1. 시약 및 재료	15
2-2. 조직공학적 다공성 지지체의 제조	15
2-2-1. 파라핀 분말 추출법을 이용한 다공성 지지체의 제조	15
2-2-2. 유화동결 건조법에 의한 다공성 지지체의 제조	19
2-2-3. 용매 캐스팅/염 추출법을 이용한 다공성 지지체의 제조	22
2-3. 다공성 지지체의 특성 결정	25
2-3-1. 파라핀 분말 추출법으로 제조된 다공성 지지체의 잔존 파라핀 확인	25
2-3-2. SEM에 의한 다공 크기 및 다공 형태의 분석	25
2-3-3. 수은 다공도계 분석	26
3. 결 과	27
3-1. 조직공학적 다공성 지지체의 제조	27
3-1-1. 파라핀 분말 추출법을 이용한 다공성 지지체의 제조	27
3-1-2. 유화 동결 건조법에 의한 다공성 지지체의 제조 ...	30
3-1-3. 용매 캐스팅/염 추출법을 이용한 다공성 지지체의 제조	33
3-2. 파라핀 분말 추출법으로 제조한 다공성 지지체의 특성 결정	36
3-3-1. 파라핀 분말 추출법으로 제조된 다공성 지지체의 잔존 파라핀 확인	36
3-3-2. SEM에 의한 다공 크기 및 다공 형태의 분석	36

3-3-3. 수은 다공도계 분석	37
4. 결 론	41
5. 참 고 문 헌	43

제 3장. 플라즈마 방전 처리에 따른 고분자 지지체의 친수성

증대	44
1. 이론적 배경	44
2. 실험	46
2-1. 시약 및 재료	46
2-2. 용매 캐스팅/염 추출법을 이용한 다공성 지지체의 제조	46
2-3. 다공성 지지체의 멸균	47
2-3-1. ethylene oxide gas (EOG)에 의한 지지체의 멸균 ..	47
2-3-2. 방사선 조사에 의한 지지체의 멸균	47
2-3-3. 플라즈마 방전 처리에 의한 지지체의 멸균	47
2-3-4. 플라즈마 방전 처리된 다공성 지지체의 수분 흡수 시험	48
2-4. 멸균 처리된 지지체의 특성 결정	50
2-4-1. 분자량 측정	50
2-4-2. SEM에 의한 다공 크기 및 다공 형태의 분석	50
3. 결 과	51
3-1. 다공성 지지체의 제조	51
3-2. 다공성 지지체의 멸균	51
3-2-1. ethylene oxide gas (EOG)에 의한 지지체의 멸균 ..	51

3-2-2. 방사선 조사에 의한 지지체의 멸균	55
3-2-3. 플라즈마 방전 처리에 의한 지지체의 멸균	58
3-2-4. 플라즈마 방전 처리된 다공성 지지체의 수분 흡수 시험	58
4. 결 론	63
5. 참 고 문 헌	65
제 4장, 골분과 생분해성 고분자를 이용한 재생의학적 인공 골 재생	66
1. 이론적 배경	66
2. 실 험	68
2-1. 시약 및 재료	68
2-2. 세포의 배양	70
2-3. 뼈 세포로의 분화 (Osteogenesis)	70
2-4. 천연/합성 고분자 지지체의 제조	71
2-5. 천연/합성 고분자 지지체의 평가	71
2-6. <i>in vivo</i> 에서의 골 형성	72
3. 결 과	75
3-1. 간엽줄기세포의 뼈 세포로의 분화	75
3-2. 천연/합성 고분자 지지체의 특성 결정	77
3-3. <i>in vivo</i> 에서의 골 형성	81
4. 결 론	84
5. 참 고 문 헌	85

List of Tables

Table 1-1. Absorbable biomedical materials used for tissue engineering

Table 1-2. Application of tissue engineering and regenerative medicine

Table 2-1. Processing Variables for Fabrication and Results of Average Porosities, and Median Pore Size of PLGA Scaffolds using Novel Paraffin Particles Leaching Method

Table 2-2. Processing Variables for Fabrication and Results of Average Porosities, and Median Pore Size of PLGA Scaffolds using Emulsion Freeze Drying Method

Table 2-3. Processing Variables for Fabrication and Results of Average Porosities, and Median Pore Size of PLGA Scaffolds using Solvent Casting / Salt Leaching Method

Table 2-4. Amounts of Residual Paraffin with Mass Loss before and after Paraffin Particles Leaching Processing

Table 3-1. Measurement of Wetting Property of Plasma Treated Scaffolds

Table 4-1. Amounts of Residual Salt with Mass Loss before and after Salt Leaching Processing

Table 5-1. Processing Variables and Properties of IP/PLGA

Scaffolds by means of Solvent Casting/Salt Leaching Method

List of Figures

- Figure 1-1.** Tissue engineering approach to develop organ replacements using cultured cells.
- Figure 2-1.** The chemical structures of synthetic biodegradable polymers.
- Figure 2-2.** Schematic representation of novel paraffin particles leaching method to fabricate PLGA scaffolds.
- Figure 2-3.** Schematic representation of emulsion freeze drying method to fabricate PLGA scaffolds.
- Figure 2-4.** Schematic representation of solvent casting salt leaching method to fabricate PLGA scaffolds.
- Figure 2-5.** Photographs of PLGA scaffolds by novel paraffin particles leaching method.
- Figure 2-6.** Porosities and Pore size distribution of PLGA scaffolds by emulsion freeze drying method.
- Figure 2-7.** SEM micrographs of PLGA scaffolds by emulsion freeze drying method (cross section $\times 200$). ; (a) sample No. 2-c (b) sample No. 2-d
- Figure 2-8.** Porosities and Pore size distribution of PLGA scaffolds by solvent casting / salt leaching method.
- Figure 2-9.** SEM micrographs of PLGA scaffolds by solvent casting / salt leaching method (cross section $\times 50$).

Figure 2-10. SEM micrographs of PLGA scaffolds by novel paraffin particles leaching method (cross section $\times 50$).

Figure 2-11. Porosities and Pore size distribution of PLGA scaffolds by novel paraffin particles leaching method.

Figure 3-1. Photographs of EOG sterilizer.

Figure 3-2. Change of scaffolds shape before and after E.O gas processing.

Figure 3-3. SEM micrographs of PLGA scaffolds After E.O gas treatment ($\times 50$).

Figure 3-4. Variation of scaffolds weight / volume after E.O gas treatment.

Figure 3-5. SEM micrographs of PLGA scaffolds after γ -irradiation ($\times 50$).

Figure 3-6. Comparison of changes Mw as γ -irradiation dosage.

Figure 3-7. SEM micrographs of PLGA scaffolds as plasma treatment ($\times 50$).

Figure 3-8. Comparison of changes Mw as plasma treatment.

Figure 3-9. Effect of different plasma treatment time on water absorption.

Figure 4-1. SEM microphotographs before and after pulverized DBP (original magnification ; $\times 100$).

Figure 4-2. Implantation athymic nude mouse for 4 weeks of the DBP impregnated PLGA/PLA scaffolds.

Figure 4-3. Osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells with alkaline phosphatase activity.

Figure 4-4. SEM microphotographs of DBP/PLA scaffolds by means of the solvent casting/salt leaching method (original magnification, $\times 50$). ; (a) PLA, (b) 20% DBP, (c) 40% DBP, and (d) 80% DBP

Figure 4-5. Effect of different DBP content on pore size distribution of IP/PLGA scaffolds by solvent casting/salt leaching method.

Figure 4-6. Photomicrographs of H&E histological sections of implanted (a) PLA scaffold only, (b) PLA scaffold + cell, (c) DBP-PLA scaffold, (d) DBP-PLA scaffold + cell,

Figure 4-7. Photomicrographs of von Kossa histological sections of implanted (a) PLA scaffold only, (b) PLA scaffold + cell, (c) DBP-PLA scaffold, (d) DBP-PLA scaffold + cell,

Figure 5-1. The chemical structures of ipriflavone.

Figure 5-2. Ipriflavone microphotographs of (a) SEM, (b) optical microscopy,

Figure 5-3. Effect of different IP content on pore size distribution of IP/PLGA scaffolds by solvent

casting/salt leaching method.

Figure 5-4. SEM microphotographs of IP/PLGA scaffolds by solvent casting/salt leaching method. (cross section, original magnifications $\times 50$)

Figure 5-5. X-ray diffractions of patterns (a) IP and PLGA, (b) 10% IP-PLGA, 30% IP-PLGA and 50% IP-PLGA.

Figure 5-6. After 8 weeks, Photographs of implanted IP/PLGA scaffolds,

Figure 5-7. Photomicrographs of H&E histological sections of implanted. (a) PLGA scaffold only ($\times 100$), (b) IP-PLGA scaffold ($\times 100$), (c) PLGA scaffold only ($\times 400$), (d) IP-PLGA scaffold ($\times 400$)

Figure 5-8. Photomicrographs of osteocalcin histological sections of implanted. (a) IP-PLGA scaffold ($\times 40$), (b) IP-PLGA scaffold ($\times 200$)

Abstract

Preparation of Tissue Engineered Porous Scaffold and Application for Regeneration Medicine

In Young Kim

Dept. of Polymer Sci. & Tech.,

Graduate School

Pukyong National University

Tissue engineering strategies have often focused on the use of natural or synthetic, degradable materials as scaffolds for cell transplantation or as a means to guide regeneration. The degree of success of these tissue engineering methods is highly dependent on the properties of the scaffold. Basic scaffold design requirements include degradability, biocompatibility, high surface area/volume ratio, and mechanical integrity.

The degradability, biocompatibility, and large surface area/volume ratio of scaffolds can be accomplished by the appropriate choice of synthetic or natural material and processing approach. Poly(lactic acid) (PLLA), poly(glycolic acid) (PGA), and their copolymers (PLGA) have been widely used in tissue

engineering applications because they undergo controllable hydrolytic degradation into natural metabolites, and can be processed into highly porous scaffolds by a variety of methods.

In chapter 2 of this study, A novel paraffin particles leaching method for fabrication of porous, biodegradable PLGA scaffold has been proposed for the application to tissue engineering. PLGA scaffolds using novel paraffin particles leaching method with porosity range of 45 to 98 %, median pore size range of 20 to 94 μm with larger pore diameters greater than 200 μm , and specific pore area in the range of 40 to 278 (m^2/g) were manufacture by varying processing parameters as ratio of PLGA/paraffin (1/1, 1/4, 1/7) and paraffin size (355~425, 425~600, 600~710). These results suggest that mass loss of paraffin particles leaching processing can confirm residual paraffin.

Result of comparing to emulsion freeze drying method and solvent casting salt leaching method, it is possible to impregnate with water soluble factors as like cytokine and to has excellent properties. We suggest that novel paraffin particles leaching method may be effect about tissue engineered organ regeneration.

In chapter 3 of this study, Biodegradable polymers are necessary to sterilize all medical implants after fabrication and prior to their surgical placement to reduce the risk of infections

and associated complications. But, sterilization techniques can significantly affect the mechanical and physical properties of polymer scaffold. In addition, they can leave harmful residues on these materials, causing them to fail *in vivo*.

Polymeric scaffolds for tissue engineering must be either manufactured aseptically or sterilized after processing. For sterilization processing, the general requirement of polymeric scaffolds are non-toxicity, tissue compatibility, and preservation of its properties. The goal of study was to determine the optimal sterilization technique without causing damage slightly to successful tissue engineering. The plasma sterilization method was compared to three well-established techniques; 70 % ethanol, ethylene oxide, and γ -irradiation. We evaluated molecular weight and change of pore structure by various sterilization methods. The former was evaluated by gel permeation chromatography (GPC) and the latter by scanning electron microscopy (SEM), respectively. Before and after sterilization, change of volume and mass weight were measured.

We observed increasing wettability of plasma treated scaffold according to 0.01 w/v % brilliant blue dye dropping method and water absorption. Our results show that plasma treatment is the most suitable method for sterilizing polymeric scaffolds for tissue engineering applications.

In chapter 4 of this study, we developed the novel

demineralized bone particle (DBP) impregnated polylactic acid (PLA) scaffolds for the tissue engineered bone. Scaffolds were prepared by solvent casting/salt leaching methods with mixtures as PLA as biodegradable matrix, Ammonium bicarbonate as porogen (size: 180 ~ 250 μm , 250~355 μm), and DBP. Characterizations of Scaffolds prepared by the these methods were analysed by SEM, mercury intrusion porosimeter and so on.

In result, Twenty w/v% of PLA concentration and 90 w/w% of PLA to ammonium bicarbonate were fixed and then DBP content were varied 20, 40 and 80 w/w% to PLA by means of solvent casting/salt leaching method. All of surface, cross section, and side of DBP/PLA scaffolds were highly porous with good interconnections between pores in which can support the surface of cell growth, proliferation and differentiation. Particularly, a uniform distribution of well interconnected pores from the surface to core region. It can be observed that the pore size was almost same, however, in the order of 81 μm (PLA control) $\geq$ 76 μm (20% of DBP) $\geq$ 74 μm (40% of DBP) $\geq$ 69 μm (80% of DBP). Porosities as well as specific pore areas also were almost same from 97.8 % of PLA control to 94.4 % of 80% DBP and 68.3 m^2/g of PLA control to 62.75 m^2/g of 80% DBP, respectively, even though the amount of DBP increased.

For macrostructure of DBP/PLA scaffolds, the solvent casting/salt leaching methods might be more recommended due to relatively large surface area per volume, higher porosity,

almost same interconnective structure between pore, more uniform the pore size and pore size distribution, no change pore size and distribution varied with DBP contents, and less processing variables compared with the emulsion freeze drying. From the base of these results, we decided that the animal experiments are carrying out using the series of DBP/PLA scaffold prepared by the solvent casting/salt leaching methods.

Implantation of DBP/PLA Scaffolds. Scaffolds of PLA alone, DBP/PLA of 40, and DBP powder without MSC cells were implanted on the back of athymic nude mouse to observe the effect of DBP on the induction of cells proliferation for 4 weeks.

We can observe the evidence of calcification, osteoblast, osteoid from the undifferentiated stem cells in the subcutaneous sites and other soft connective tissue sites having a preponderance of stem cells. In summary, it seems that DBP plays an important role for bone induction in DBP/PLA scaffolds. It might be suggested that bone morphogenetic protein in the DBP stimulate osteogenesis

Also, the similar trends were observed with MSC cell. In summary, it seems that DBP plays an important role for bone induction in DBP/PLA scaffolds.

In chapter 5 of this study, we developed the novel IP loading PLGA (IP/PLGA) scaffolds for the possibility of the application of the tissue engineered bone. IP/PLGA scaffolds

were prepared by solvent casting/salt leaching method. IP/PLGA scaffolds were characterized by porosimeter, SEM, determination of residual salt amount, and X-ray diffraction. IP/PLGA scaffold were implanted into the back of athymic nude mouse, to observe the effect of IP on the osteoinduction compared with control PLGA scaffolds. The implants were removed after 3, 6, and 9 weeks and fixed in 10% buffered formalin. Thin sections were cut from paraffin embedded tissue and histological sections were stained H&E, von Kossa, and immunohistochemical staining for type I collagen and osteocalcin.

In result, all samples by means of solvent casting salt leaching method were highly porous with good interconnections between pores in which can support the surface of cell growth, proliferation and differentiation. Particularly, a uniform distribution of well interconnected pores from the surface to core region. It can be observed that the pore size was above 100.5 μm and porosities were above 91.7 %. Scaffolds of PLGA alone, IP/PLGA of 50% were implanted on the back of athymic nude mouse to observe the effect of IP on the induction of cells proliferation for 9 weeks. We can observe the evidence of calcification, osteoblast, osteoid from the undifferentiated stem cells in the subcutaneous sites and other soft connective tissue sites having a preponderance of stem cells. In summary, it seems that IP plays an important role for bone induction in IP/PLGA scaffolds.

제 1장. 서 론

1. 생체조직공학의 정의

조직공학 (Tissue Engineering)은 손상된 조직이나 장기를 복원, 재건, 또는 대체하여 정상적인 기능을 하게 되는데 그 목적이 있다. 이러한 조직공학은 과학의 발달과 함께 등장한 새로운 분야의 하나이며 생명과학과 공학의 기본 개념과 기술을 통합 응용하여 생체 조직의 구조와 기능 사이의 상관관계를 이해하는 학문이다. 나아가서 생체 조직의 대용품을 만들어 이식함으로써 우리 몸의 기능을 유지, 향상 또는 복원하는 것을 목적으로 하는 응용 학문이다.

2. 생체조직공학의 기본 요소

2-1. 생체 재료

생체 재료는 생체조직공학에 없어서는 안될 중요한 요소이다. 생체 재료는 콜라겐과 같이 인체 내에 존재하는 천연 재료가 있고 각종 폴리머로 대표되는 인공 재료가 있다. 어떤 종류의 재료를 사용하던지 사용되는 재료는 기본적으로 요구되는 몇 가지 요건을 갖추어야 한다.

첫째로 재료는 세포가 붙어서 충분히 3차원적 구조를 가진 조직을 형성할 수 있도록 틀의 역할을 하여야 한다. 이것은 인공 생조직 (bioartificial tissue)을 만드는데 가장 기본적인 요소로써 재료

의 성질과 구조에 따라 매우 다른 결과가 얻어질 수 있다. 나아가서 단순한 틀로써만이 아니라 세포의 기능을 유지 또는 향상시키는 역할을 하는 경우도 많다.

둘째로는 이식된 세포와 숙주 세포 사이에 위치하는 중간 장벽(interface)으로써의 역할을 하여야 한다는 것이다. 이것은 사용하는 목적에 따라 여러 가지 형태로 나타난다. 즉 가장 흔히 요구되는 기능으로 이식 후에 염증 반응이나 이물 반응을 일으키지 않아야 한다는 소위 면역학적으로 불활성 (inert)해야 한다는 점이 요구되는가 하면 어떤 경우에는 적극적으로 주위 조직과 반응하여 주위에 존재하는 세포가 자라 들어올수 있도록 유도하는 일이 필요할 수도 있다. 때로는 이식 세포와 숙주 세포간에 선택적인 장막으로 존재하여 산소나 영양소는 장막 안으로 잘 공급되고 항체나 면역 세포는 들어가지 못하도록 차단하는 소위 면역 보호 기능이 필요할 때도 있다.

셋째로는 세포 전달 매개체로 또는 중간 막으로써 기능을 다한 뒤 즉 이식된 세포가 충분히 조직으로써의 제기능과 역할을 하게 된 다음에는 필요에 따라 생체 내에서 분해되어 없어질수 있는 생분해성 또한 일부 생체 재료가 갖추어야 될 조건일 것이다.

현재의 기술은 재료의 구성 성분의 비율을 조정함으로써 인체 내에서 분해되는 속도를 조절할 수도 있고 3차원 프린팅 기법이라는 새로운 기술로 재료의 내부 구조까지 다양한 형태로 만들 수 있을 뿐 아니라 한 재료 안에서도 재료 표면의 성질을 다르게 배열함으로써 세포의 흡착 정도를 조절하여 원하는 형태의 조직을 만들기도 하고 있다.

2-2. 세 포

생체조직공학에 사용되는 세포는 건강하고 세포 고유의 기능 잘 해야 할뿐 아니라 다음과 같은 요소도 갖추고 있어야 한다.

첫째 세포외기질을 분비할 수 있어야 하고 다른 세포나 또는 생체 재료와 반응하여 3차원적인 조직을 형성할 수 있어야 하며 특별한 자극에 대하여 필요한 단백질을 생산할 수 있어야 한다. 또한 이러한 기능들은 단시간에 끝나서는 안되고 충분한 기간 지속되어야만 한다.

둘째 충분한 양의 세포를 확보할 수 있어야 한다. 생체조직공학의 궁극적 목적이 임상에의 응용에 있는 만큼 처음 실험 단계부터 실제 임상에 응용 될 때를 예상하고 조직을 체외에서 형성할 만큼의 충분한 양의 세포가 준비되어야 한다.

셋째로는 이 세포가 이식되었을 때 인체 내에서 거부 반응을 일으키지 말아야 할 것이다 (Figure 1-1).

2-3. 생체내 환경 (*in vivo* environment)

생체내 환경은 또 다른 하나의 중요한 요소로서 작용한다. 일단 세포와 생체 재료가 생체 내로 이식되면 이들은 체외와는 전혀 다른 생화학적 및 물리화적인 환경에 놓이게 된다. 생화학적 및 물리적인 환경에 놓이게 된다. 생화학적 환경을 결정짓는 요소는 이식물이 위치하는 장소와 생체 재료의 투과성과 물질 수송력에 의하여 결정된다. 다음으로는 생체 재료의 투과성이 문제가 되는데 이식된 인공 생체조직 내에서 가장 안쪽에 위치하는 세포는 주위의 산

소나 영양분이 공급에서 가장 멀리 위치하게 되어 자연히 불리한 상태가 된다. 그러므로 주위 조직의 산소 분압과 영양분의 농도를 알고 이식된 세포의 요구량을 알 수 있다면 그 사이를 막고 있는 생체 재료의 투과성을 조절할 수 있게 되고 거꾸로 생체 재료의 투과성에 따라 이식하는 위치를 달리하든지 하는 방법으로 주위환경을 바꾸어 줄 수 있을 것이다.

두 번째로 간과하기 쉬운 것이 물리적인 환경이다. 생체 내의 모든 세포는 주위 조직으로부터 각각 일정한 물리적 영향을 받고 있으며 이 물리적 영향 또한 세포의 기능에 영향을 미치게 된다.

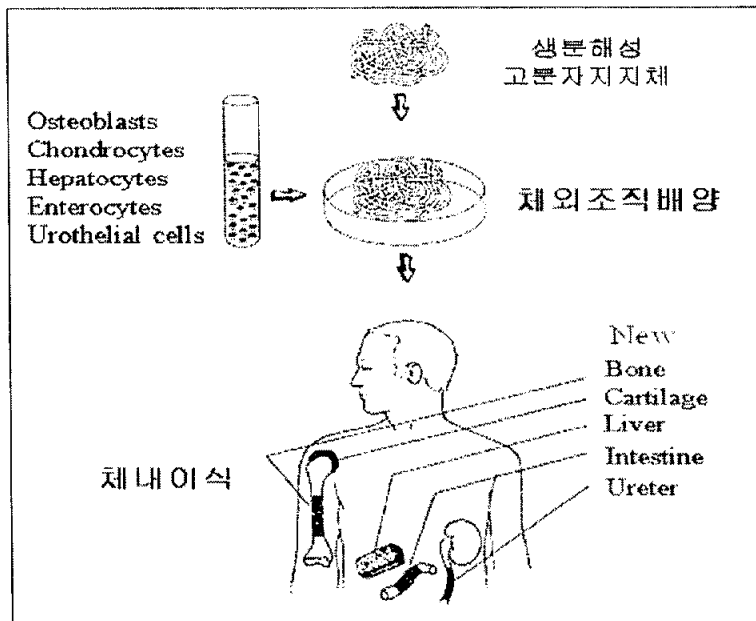


Figure 1-1. Tissue engineering approach to develop organ replacements using cultured cells.

3. 생체조직공학 및 재생의학으로의 응용.

3-1. 생체 재료를 이용한 재생의 유도.

특정 종류의 생체 재료는 자체에 세포를 포함하고 있지 않더라도 생체 내에 이식되었을 때 주위 조직으로부터 재생을 유도하는 능력이 있다. 대표적인 것이 본 논문에서 제시한 방법인 탈무기 질화된 (demineralized)된 뼈로서 그 속에 세포는 없지만 주위 조직으로부터 재생을 유도 할 수 있다. 이 방법의 장점은 이식물에 세포가 포함되어 있지 않기 때문에 면역학적인 문제를 일으킬 우려가 적고 처리가 쉽다는 점이다. 또한 본 논문에서 제시한 골다공증 치료제를 이용한 조직 재생 유도도 골다공증 치료 약물 자체에 세포가 없고 오랜 세월간 사람들이 직접 복용한 약물로써 다른 어떠한 생체 재료보다도 우수한 장점이 있을것으로 사료된다. 최근 들어 동물에서 소장 점막하 조직 (small intestinal submucosa, SIS)을 생체 재료로 이용하는 연구가 활발한데 이종간의 이식이 가능하고 쉽게 얻을 수 있다는 장점 때문에 널리 쓰일 것으로 예측된다. 또한 이런 물질들을 인공으로 합성해서 생분해되는 시기까지도 조절 가능한 재료가 사용되고 있다 (Table 1-1).

3-2. 세포를 이용한 결손 조직의 대체

신체 조직의 일부가 결손되거나 기능을 못할 때 체외에서 세포와 생체 재료를 이용하여 조직을 만들어 결손 부위에 공급하는

방법이다. 대표적인 것이 피부 대용품으로 사용되는 Living Skin Equivalent (LSE) 등이다. LSE는 collagen과 섬유모세포를 이용하여 만든 인공 피부로써 생체 조직에 의하여 개발되어 가장 먼저 임상
에 이용된 첫 예로 현재는 상품화 되어 Advance Tissue Science와 Organogenesis라는 두 개의 회사에서 제품을 판매하고 있는 실정이다. 이외에도 간, 혈관, 뼈, 연골조직 등 신체의 각종 장기를 만들어 이식하려는 시도가 광범위하게 연구되고 있으며 속속 임상
에 이용될 전망이다 (Table 1-2).

3-3. 조직 또는 장기를 대신하는 모델 시스템

생체 재료와 세포를 이용하여 체외에서 인공 생체 조직 또는 장기를 만들어서 각종 약물의 효과 판정 또는 독성 실험에 사용할 수도 있고 인위적으로 질병 상태를 만들어서 질병에 대한 기초 연구에도 이용할 수가 있다.

3-4. 유전적으로 개량된 세포의 이식

유전적으로 개량된 세포 (genetically engineered cell)를 만들고 이를 적절한 지지체 (scaffold)에 심거나 캡슐화하여 생체 내에 이식하는 방법이다.

3-5. 인공 물질의 표면 처리

인공 재료의 표면을 살아있는 세포나 또는 세포의 이동을 유도할 수 있는 생체 재료로 덮음으로써 이물 반응을 최소화하고 감염으로부터 보호하면서 기존의 조직과 잘 융화시키는 역할을 하고 있다.

Table 1-1. Absorbable biomedical materials used for tissue engineering

Material	Example
Natural polymer	Fibrin, collagen, gelatin, hyaluronate Matrigel
Synthetic polymer	Polyglycolide (PGA) glycolide-lactide copolymers (PLGA) polylactides (PLA; PLLA and PDLLA), ethylene oxide block copolymers with PLA or propylene oxide chains
Inorganic material	Tricalcium phosphate, calcium carbonate, non-sintered hydroxyapatite

Table 1-2. Application of tissue engineering and regenerative medicine

장 기	병변 또는 질환	생체조직공학적 접근법
신경계	파킨슨씨병, 헌팅톤씨병, 통증	뇌세포, 부신수질 크로마핀세포 이식
	중추 신경 손상	슈반씨 세포 이식, 신경영양인자 투여
	말초 신경 손상	신경유도관, 슈반씨세포 이식, 신경영양인자
심혈관계	동맥 경화, 혈관 손상	인공 생체 혈관
	심장 판막 질환	인공 생체 판막
	심근결색증	골격근 모세포 이식
혈액	재생 불량성 빈혈	골수 조혈 모세포 이식
간	간 경화증, 대사성 간 질환	인공 생체 간
감각기관	각막 손상	인공 생체 각막
	망막 변성증	망막세포, 망막 상피세포 이식
	소음성 난청	청각 세포 이식
비뇨생식기	신부전증	인공 생체 신장
	방광, 요로 결손	인공 생체 방광 및 요로
	남성불임, 선천성 고환 결핍증	정자 모세포, 고환 세포 이식
	방광 요관 역류	내시경적 세포 충전재 요법
소화기	짧은 창자 증후군	인공 생체 장
근골계	두 개골, 뇌막 결손	인공 생체 두개골, 뇌막
	관절 및 인대 손상	인공 생체 연골, 인대
	수지 절단	인공 생체 수지
	기관지 손상 및 결핍증	인공 생체 기관지
내분비계	당뇨병	췌도이식
	뇌하수체 부전증	뇌하수체 세포 이식
	부갑상선 기능 저하증	부갑상선 세포 이식
피부	광범위 화상, 당뇨성	인공 생체 피부
	피부궤양	
	미용 성형	
치아	치아 결손, 치주 조직 결손	인공 생체 치아 및 치주 조직

제 2장. 파라핀 분말 추출법을 이용한 새로운

조직공학적 다공성 지지체의 제조 및 그 특성

1. 이론적 배경

최근 산업화와 공업화로 고도로 발달된 현대사회에서 여러 가지 사고 및 질병에 노출되어 있다. 이러한 사고와 질병은 여러 가지 원인에 의해 신체에 상해를 주어 부분적 혹은 전체적 장기의 손상과 손실을 가져오게 되었다. 첨단 의학 기술로도 완치가 불가능한 경우도 허다하고 더불어 장기 공여자에 의한 새로운 장기 이식은 공여자수의 절대 부족으로 장기 기증을 기다리는 수많은 사람에게 희망을 주지 못하고 있다 [1].

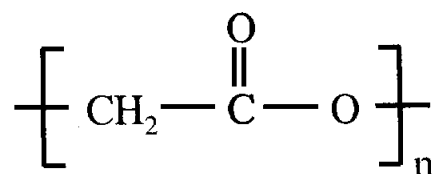
조직공학적 인공장기의 재생의 필수적 세 요소는 장기의 형태를 갖는 지지체와 신경세포, 골세포, 연골세포와 같은 다양한 세포, 이에 수반되는 성장인자들이나 morphogen, adhesions과 같은 생체활성 물질이다. 이 세 가지 요소들이 조화되어 이식 후 일정 시간이 지나 새로운 조직이나 기관으로 재생된 것을 조직공학적 인공 장기라 한다. 최근 생분해성 고분자는 체내 또는 체외에서 세포와 조직배양을 위한 여러 형태의 기질로 널리 사용되고 있는데 이들의 기능은 대부분 세포의 특징인 기질에 달라붙어서 성장하는 세포 (anchorage-dependent cell)의 부착, 이동 및 성장할 수 있는 장소를 제공한다.

고분자 재료가 조직공학에 응용되기 위해서는 인체 내에서의 생체적합성(biocompatibility)이 매우 중요하게 된다. 생분해성 다공성 지지체를 사용하여 제조된 삼차원의 인공 조직을 체내에 이식

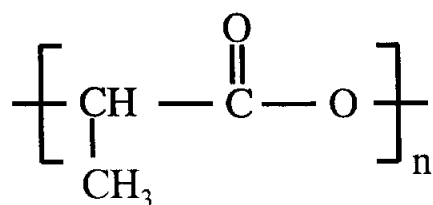
할 시 예상되는 장점은 체내 이식 초기에는 이식된 조직 세포들이 신체 내에서 사멸하지 않고 본래의 기능을 유지하는 기반을 제공하는 것이다. 그리고 시간이 경과함에 따라서 생분해성 고분자는 점차 분해하고 신체 내부에 충분히 적응한 이식 세포만으로 구성된 자연 조직과 동일한 형태와 기능을 지닌 인공 조직을 형성할 수 있게 된다 [2]. 현재 가장 많이 사용되고 있는 생분해성 고분자 중의 하나인 폴리 (α -하이드록시산)계열은 폴리락타이드 (PLA), 폴리글리콜라이드 (PGA), 및 이들의 공중합체인 PLGA 이며 이는 생체내 분해기간의 조절이 용이하며, 생체적합성이 우수하다. 또한 미국의 식품의약 안전국에서 허가된 유일한 생분해성 고분자이기도 하다 [3]. 조직공학에 필수 불가결한 요소인 다공성 지지체는 용매 캐스팅/염 추출법 (solvent casting/salt leaching method), [4] 유화 동결 건조법 (emulsion freeze drying method), [5] 상 분리법 (phase separation method), 폴리글리콜라이드 부직포 (PGA mesh) [6] 등의 방법으로 제조되고 있다. 일반적으로 용매 캐스팅/염 추출법이 제조 공정이 가장 간단하고, 원하는 다공도 및 다공크기를 비교적 용이하게 조절할 수 있는 장점이 있지만, 단점으로 수용성 약물, 단백질 및 성장인자 등을 함유한 다공성 지지체의 경우에는 염의 추출 과정에서 이와 같은 활성인자의 손실이 일어날 수 있다. 또한 유화 동결 건조법은 수용성 인자를 함유하기는 용이하지만, 다공도 및 다공크기를 조절하기가 힘들며 표면에 막이 생기는 단점이 있다 [7].

본 연구에서는 이러한 기존 방법을 보완하고자 파라핀 분말과 생분해성 고분자를 상온에서 압축성형법을 이용하여 다공성 지지체를 제조하였으며, 이를 지지체 제조방법으로 널리 쓰이는 용매 캐스팅 염 추출법과 유화 동결 건조법으로 제조된 담체와 여러 가지

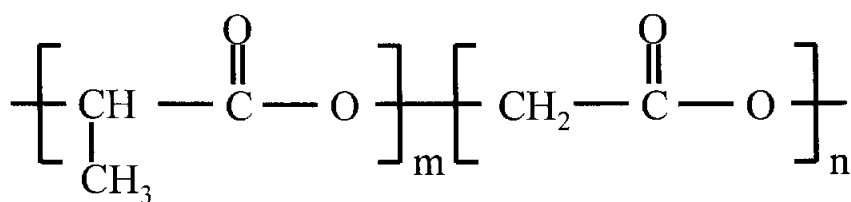
물성을 비교하였다. 본 연구에서 제조된 다공성 지지체는 주사전자 현미경 (SEM, scanning electron microscope)으로 다공 형태 및 크기를 관찰하였고, 수은다공도계 (porosimeter)로 다공도와 다공 분포도를 측정하였으며 다공 생성 메카니즘 등을 고찰하였다 [8].



Poly(glycolic acid)



Poly(lactic acid)



Poly(lactide-co-glycolide)

Figure 2-1. The chemical structures of synthetic biodegradable polymers.

2. 실험

2-1. 시약 및 재료

PLGA (lactide/glicolide mole ratio, 75/25, Resomer[®] RG 756, Boehringer Ingelheim, Germany)는 평균분자량이 90,000 g/mole인 것을 사용하였다. 염화나트륨 (Orient Chem. Co., Korea)과 파라핀 (Junsei Chem. Co., Japan)은 다공 생성 물질로 사용하였는데 본 실험에서 요구되는 크기로 선별하기 위하여 각 크기별 분자체를 사용하였다. n-헥산은 덕산 약품 주식회사에서 구입하였으며, 메틸렌클로라이드 (MC, Tedia Co. Inc., USA) 등의 모든 화학약품과 유기용매는 HPLC 등급을 사용하였다.

2-2. 조직공학적 다공성 지지체의 제조

2-2-1. 파라핀 분말 추출법을 이용한 다공성 지지체의 제조.

PLGA와 파라핀 분말을 일정 비율로 혼합하여 0.25 g을 칭량한 후 자체 제작한 내경 10 mm 및 외경 55 mm 크기의 실린더형 몰드에 넣은 후 프레스 (MH-50Y CAP 50 tons, Japan)를 이용하여 상온에서 40 kgf/cm²의 압력으로 30초간 가압하여 디스크 형태의 지지체를 제조하였다. 이들의 실험 변수를 Table 2-1에 나타내었으며, 파라핀 분말을 추출하기 위해서 n-헥산을 이용하여 30분간 파라핀을 제거하였다. 제거되지 않은 파라핀은 위의 과정을 3회 정도 반복하여 완전 제거한 후 30 mTorr, -55 °C 조건에서 48시간 동안 동결 건조 하였다. 잔존 n-헥산을 제거하기 위하여 최소 1주일 동안 25°C

진공오븐에서 건조시킨 후, 진공 상태에서 보관하여 실험에 사용하였다. 이들의 제조 모식도를 Figure 2-2에 나타내었다.

Table 2-1. Processing Variables for Fabrication and Results of Average Porosities, and Median Pore Size of PLGA Scaffolds using Novel Paraffin Particles Leaching Method

sample No.	ratio of PLGA/paraffin	size of paraffin (μm)	remark	average porosity (%)	median pore size (μm)	specific pore area (m^2/g)
1-a	1 : 1	355 ~ 425		48.40	19.81	43.57
1-b	1 : 1	425 ~ 600	too dense	49.18	22.11	47.61
1-c	1 : 1	600 ~ 710		45.41	40.41	39.50
1-d	1 : 4	355 ~ 425		81.47	44.19	74.34
1-e	1 : 4	425 ~ 600	formed	74.05	51.66	86.16
1-f	1 : 4	600 ~ 710		77.84	93.18	76.59
1-g	1 : 7	355 ~ 425		87.43	50.68	111.66
1-h	1 : 7	425 ~ 600	formed	83.88	70.11	123.64
1-i	1 : 7	600 ~ 710		97.60	94.05	278.07

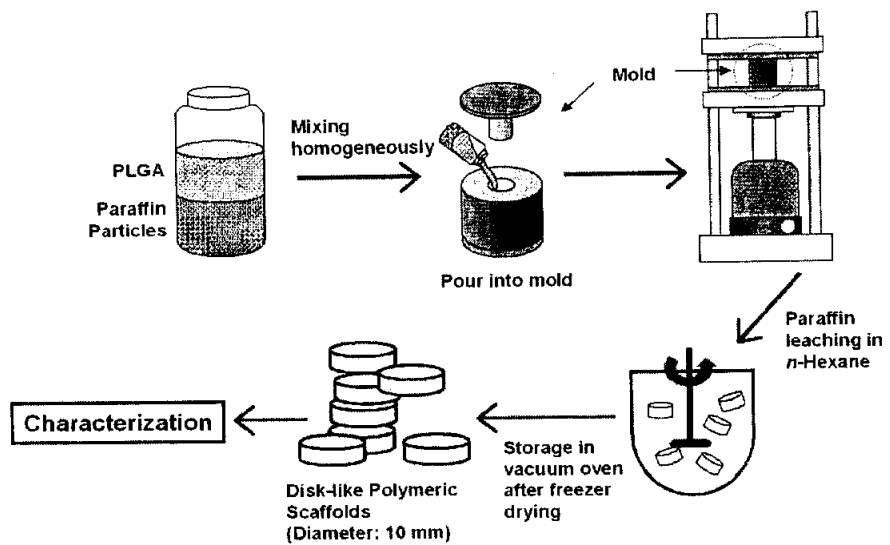


Figure 2-2. Schematic representation of novel paraffin particles leaching method to fabricate PLGA scaffolds.

2-2-2. 유화동결 건조법에 의한 다공성 지지체의 제조

일정량의 PLGA를 MC에 용해한 후, 일정량의 초 순수와 혼합한 후, 두 비혼합상을 강제 유화 시키기 위하여 초음파혼합기로 출력은 10 W, 30초 동안 유화시켰다. 이들 실험조건은 Table 2-2에 나타내었다. 이 과정에서 유화제의 효과를 살피기 위하여 0.1 v/w %의 Span 80을 혼합하였다. 이를 -198 ℃의 액체질소로 냉각시켜 놓은 테플론 몰드에 부어 충분히 냉각 시킨 후, 30 mTorr -55 ℃ 조건에서 48시간 동안 동결 건조 하였다. 잔류용매인 MC를 제거하기 위하여 최소 1주일 동안 25℃ 진공 오븐에서 건조시킨 후, 진공 상태에서 보관하여 실험에 사용하였다. 이들의 제조 모식도를 Figure 2-3에 나타내었다.

Table 2-2. Processing Variables for Fabrication and Results of Average Porosities, and Median Pore Size of PLGA Scaffolds using Emulsion Freeze Drying Method

sample No.	PLGA concentration (w/v%)	volume of PLGA solution to water (v/v%)	remark	average porosity (%)	median pore size (μm)
2-a	5	70	not formed		
2-b	5	60	not formed		
2-c	10	70	formed	94	14.1
2-d	10	60	formed	96	20.94
2-e	20	70	too dense		
2-f	20	60	too dense		

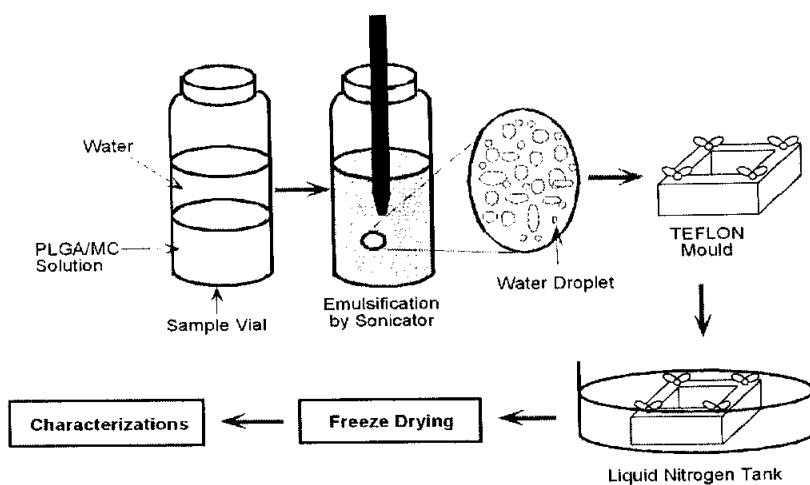


Figure 2-3. Schematic representation of emulsion freeze drying method to fabricate PLGA scaffolds.

2-2-3. 용매 캐스팅 / 염 추출법을 이용한 다공성 지지체의 제조.

PLGA를 MC에 일정 농도로 용해한 후 체에 의해서 선별된 염을 일정 비율로 혼합하였다 (Table 2-3). 용해된 PLGA와 염의 혼합물을 직경 15 mm 및 두께 5 mm 크기의 실리콘 몰드에 넣은 후 프레스(MH-50Y, CAP 50 tons, Japan)를 이용하여 상온에서 60 kgf/cm²의 압력으로 24시간 동안 가압하였다. 다공을 형성해 내는 물질인 염을 추출하기 위해서 초순수에서 24시간 동안 염을 추출하였다. 30 mTorr, -55 °C 조건에서 48시간 동안 동결 건조 하였다. 잔류용매인 MC를 제거하기 위하여 최소 1주일 동안 25°C 진공오븐에서 건조시킨 후, 진공 상태에서 보관하여 실험에 사용하였다. 이들의 제조 모식도를 Figure 2-4에 나타내었다.

Table 2-3. Processing Variables for Fabrication and Results of Average Porosities, and Median Pore Size of PLGA Scaffolds using Solvent Casting / Salt Leaching Method

sample No.	ratio of PLGA/salt	size of salt (μm)	remark	average porosity (%)	median pore size (μm)
3-a	1 : 10	180 ~ 250	formed	83.56	106.77
3-b	1 : 10	250 ~ 425	formed	86.03	93.63
3-c	1 : 10	425 ~ 600	formed	117.10	100.02
3-d	1 : 10	600 ~ 710	not formed		
3-e	1 : 4	255 ~ 425	formed	35.37	46.25
3-f	1 : 6	255 ~ 425	formed	60.30	67.10
3-g	1 : 8	255 ~ 425	formed	79.35	85.36
3-h	1 : 12	255 ~ 425	formed	91.52	99.35
3-i	1 : 14	255 ~ 425	not formed		

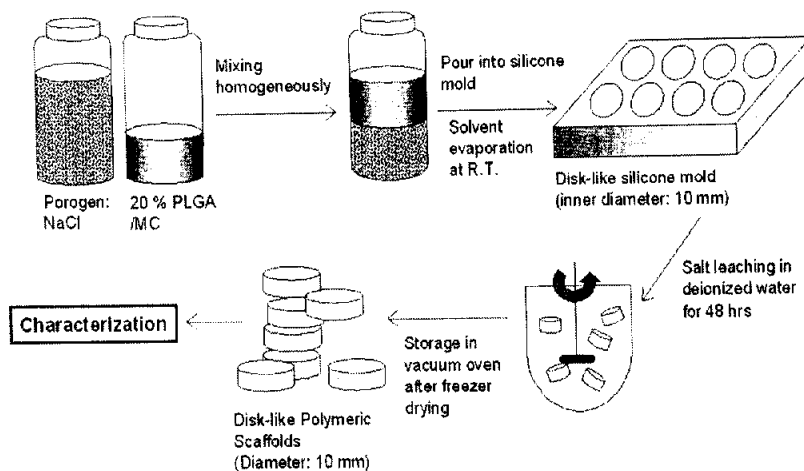


Figure 2-4. Schematic representation of solvent casting salt leaching method to fabricate PLGA scaffolds.

2-3. 다공성 지지체의 특성 결정

2-3-1. 파라핀 분말 추출법으로 제조된 다공성 지지체의 잔존 파라핀 확인.

파라핀 분말을 이용하여 다공성 지지체를 제조한 후의 잔존 파라핀 분말의 정도를 확인하기 위하여 파라핀 분말의 추출 전후의 무게 변화를 비교하였다. 무게의 변화는 각각 다음과 같은 식에 의해서 계산되었다.

$$\text{Mass loss (\%)} = (W_i - W_f)/W_i \times 100 \quad (1)$$

여기에서 W_i 는 파라핀 분말 추출 전의 초기무게이고, W_f 는 파라핀 분말 추출 후의 나중무게로써 일정 시간 파라핀 분말을 추출 후 25 건조한 무게이다. 각 시료의 초기 무게는 0.25 g으로 일정하게 하였으며 추출 후 무게는 3회 반복 실시하여 평균값으로 하였다.

2-3-2. SEM에 의한 다공 크기 및 다공 형태의 분석.

상기의 방법들을 사용하여 제조한 각 다공성 PLGA 지지체의 표면, 옆면, 및 내부의 다공 형태를 분석하기 위하여 SEM (S-2250N, Hitachi, Japan)으로 관찰하였다. 면도칼로 $5 \times 5 \times 1$ mm (두께)의 크기로 절단하고 양면테이프를 이용하여 샘플 폴더에 고정시키고 플라즈마 스퍼터 (Emscope, Model SC 500K, UK)를 이용하여 200 Å 두께의 금 코팅하여 촬영한 사진으로 다공의 형태 및 크기를 확인하였다.

2-3-3. 수은 다공도계 분석.

상기의 여러 방법들을 사용하여 제조한 다공성 PLGA 지지체의 다공 크기 분포, 비다공면적, 평균 다공직경 및 다공도를 측정하기 위하여 수은 다공도계 (Micromeritics Co., Model AutoPore I I 9220, USA)를 이용하였다. 사용된 PLGA 지지체의 질량, 측정수은체적, 수은압력 및 최대압력은 각각 0.1 g, 6.7~7.3 mL, 3.4 KPa 및 414 MPa 이었다. 수은압력 (P)과 구멍 반지름 (r)의 관계는 다음의 Washburn 식

$$r = -2 \gamma \cos \theta \cdot P \quad (2)$$

에 의해서 정의된다. 여기서 γ 은 수은표면장력으로 485 dyne/cm를 사용하였으며 θ 는 수은과 PLGA 표면의 접촉각인데 접촉각 측정기 (Model 100-0, Rame-Hart Inc., USA)를 이용하여 실측한 결과 160° 이었다.

다공도 ε 는 다음의 식

$$\varepsilon = \frac{V_i}{V_i + \frac{1}{\rho}} \quad (3)$$

에 의해서 정의된다. 여기서 V_i 는 전체 침투 체적이며, ρ 는 밀도를 나타낸다.

3. 결 과

3-1. 조직공학적 다공성 지지체의 제조

3-1-1. 파라핀 분말 추출법을 이용한 다공성 지지체의 제조.

본 연구에서는 기존의 여러 가지 지지체 제조방법에서 발생하는 단점을 개량하기 위하여 다공 형성 물질로 파라핀 분말을 이용하여 PLGA 다공성 담체화를 시도하였다. 파라핀 분말 추출법으로 제조된 조직공학용 PLGA 지지체의 다공성은 파라핀 분말 조성 변화에 의해 조절되며 이는 다공도, 평균다공 크기, 표면체적비 및 다공형태에 대하여 영향을 미친다. PLGA와 파라핀 분말 조성비에 따른 지지체의 다공 특성의 결과를 Table 2-1에 나타내었다. PLGA 대 파라핀 분말 함유량에 따라서, 즉 1:1 인 경우 (샘플 No. 1-a, 1-b, 1-c)에서는 40% 이상의 다공도 결과를 나타내었고, 1:4 인 경우 (샘플 No. 1-d, 1-e, 1-f)에서 70% 이상의 다공도 결과를 나타내었으며, 그리고 1:7 인 경우 (샘플 No. 1-g, 1-h, 1-i)에서는 80% 이상의 다공도를 나타내었다. 이는 파라핀 함유량이 많을수록 다공도는 증가하였으며, 이는 염의 함량에 따라서 다공도를 조절하는 용매 캐스팅 / 염 추출법에서와 같이 지지체의 다공을 형성해 내는 역할을 하는 파라핀 분말의 양에 따라서 다공도를 조절할 수 있음을 알 수 있었다.

기존의 용매 캐스팅 / 염 추출법에서는 고분자를 유기용매에 용해하여 고 점성의 상태에 염화 나트륨 등의 염을 혼합하여 원하는 형태로 성형한 후, 유기용매를 증발시켜 고상화 시키고 물에서

염을 추출하여 다공성 지지체를 만드는 방법이다. 반면 본 연구에서 제시한 방법은 유기용매 등을 사용한 고분자의 화학적 결합 없이 기계적 결합에 의하여 고분자/파라핀 분말 혼합물을 원하는 형태의 몰드에서 성형한 후 물 대신 헥산에서 파라핀만을 제거하여 다공을 만드는 방법이다. 본 방법에 의한 다공성 지지체는 압축성형에 의한 기계적 결합으로 제조 되었는데, 유기용매 등을 사용한 화학적 결합과 같은 분자 상호간의 결합을 형성해 주었다. 기계적 결합만으로 분자간의 결합이 가능했던 이유는 고분자 계면의 양쪽이 유동상태가 되어서 계면을 통해 고분자 사슬이 상호 확산되었다고 사료된다. 이런 고압상태가 충분히 오래 지속된다면 계면은 결국 사라지고 결합부분은 재료 그 자체의 강도를 갖게 된다는 것이다. 이런 기계적 결합에 의한 강도는 유기용매를 사용하여 제조된 담체의 강도보다 강할 것으로 사료된다[34] (Figure 2-5, 2-6).

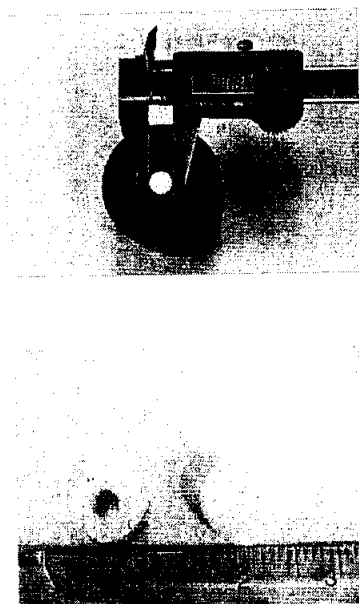


Figure 2-5. Photographs of PLGA scaffolds by novel paraffin particles leaching method.

3-1-2. 유화 동결 건조법에 의한 다공성 지지체의 제조.

유화 동결 건조법으로 제조된 다공성 지지체는 평균 다공도는 94~96%, 평균 다공크기 범위는 14.1~20.94 μm 이었다 (Table 2-2). 평균 다공도는 여타 방법에 의하여 제조된 다공성 지지체와 마찬가지로 우수한 편이었으나, 평균 다공크기가 작다는 단점을 가지고 있었다 (Figure 2-7). 본 방법은 평균 다공크기와 여타 물성은 PLGA 용액의 농도 및 유화를 생성할 때 첨가되는 물의 양에 의하여 비교적 용이하게 조절되었다. 이러한 결과는 다공의 구조 생성에 있어서 유화 제조시 유화의 안정화 보다는 불안정화가 우세하게 기여함을 알 수 있었다. 본 방법은 수용성 인자를 함유 할 수 있는 장점을 가지고 있으나 PLGA 용액의 농도 및 유화를 생성할 때 첨가되는 물의 양에 의하여 다공크기를 조절한다는 한계, 상대적으로 작은 평균 다공크기 및 실험조건에 따라 다공도와 다공크기가 좌우되는 단점을 가지고 있었다 [5].

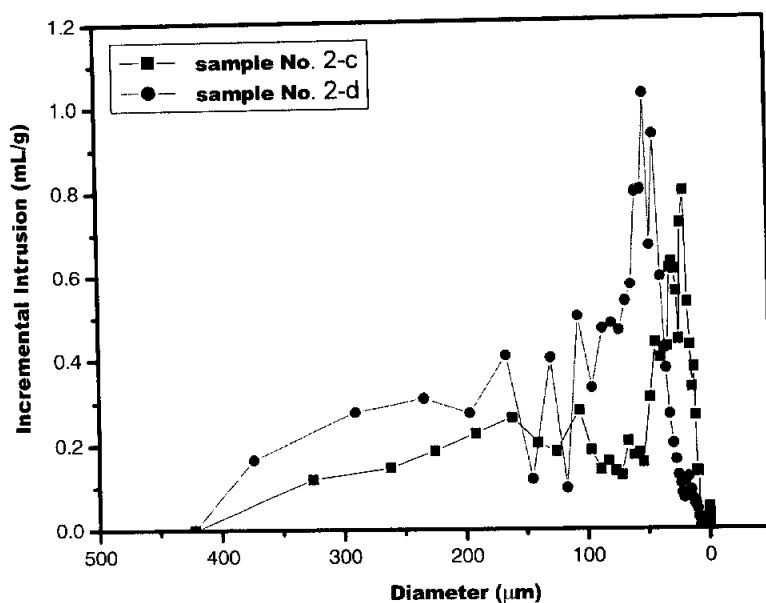


Figure 2-6. Porosities and Pore size distribution of PLGA scaffolds by emulsion freeze drying method.

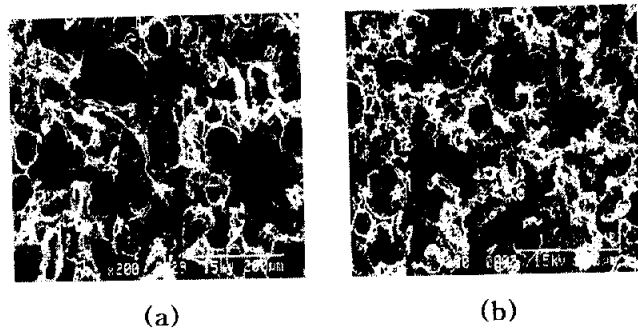


Figure 2-7. SEM micrographs of PLGA scaffolds by emulsion freeze drying method (cross section x200). ; (a) sample No. 2-c (b) sample No. 2-d

3-1-3. 용매 캐스팅 / 염 추출법을 이용한 다공성 지지체의 제조.

용매 캐스팅 / 염 추출법으로 제조된 다공성 PLGA 지지체의 다공도와 평균 다공크기는 염의 비율과 염의 크기로 조절이 가능하다. Table 2-3과 Figure 2-8에서 나타낸 것과 같이 평균 다공도는 35.36%에서 117.10%까지 PLGA 고분자에 대한 염 비율을 조절함으로써 다양한 다공도를 얻을 수 있었고, 염 비율이 증가할수록 다공도도 증가함을 알 수 있었다. No. 2-i에서는 염의 비율이 고분자에 비해 14배 이상일 때는 지지체가 형성되지 않았다. 평균다공 크기는 46.25 μm 에서 106.77 μm 까지 다양한 크기의 다공을 얻을 수가 있었고, 이는 다공을 형성해 내는 역할을 하는 염의 크기가 증가할수록 평균 다공크기도 증가함을 알 수 있었다. 그러나, 염의 크기가 610~700 μm 인 No. 2-d에서는 지지체가 형성되지 못했다 (Table 2-3). 유화동결 건조법에 의해서 제조된 다공성 지지체보다는 원하는 다공도를 용이하게 얻을 수 있었고 원하는 평균다공 크기를 얻을 수 있었다. 이에 반해 다공성 지지체내에 수용성 인자를 함유시 염 추출과정에서 수용액에 의해 수용성 인자가 손실되는 단점을 가지고 있다 (Figure 2-9).

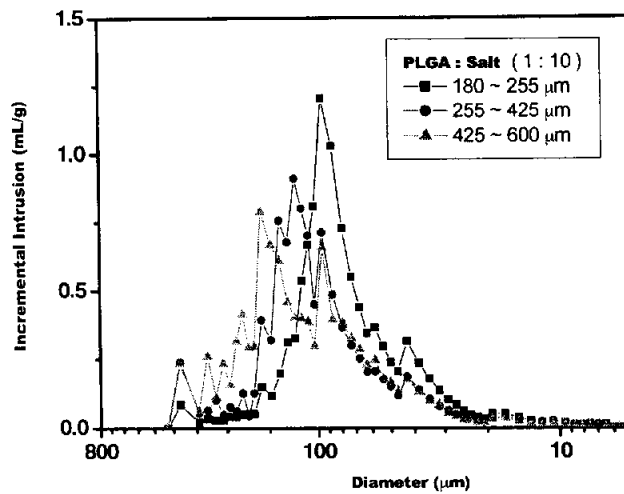
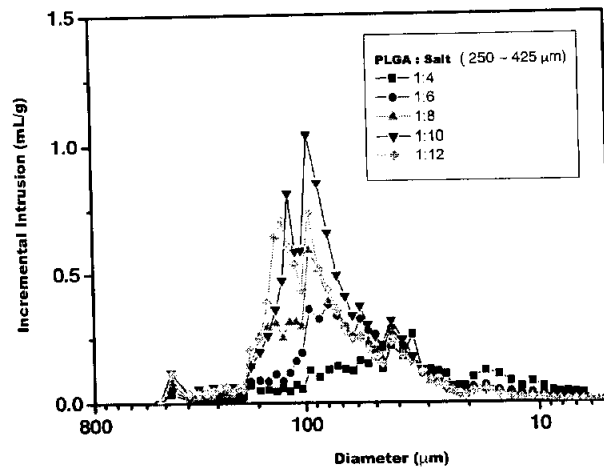


Figure 2-8. Porosities and Pore size distribution of PLGA scaffolds by solvent casting / salt leaching method.

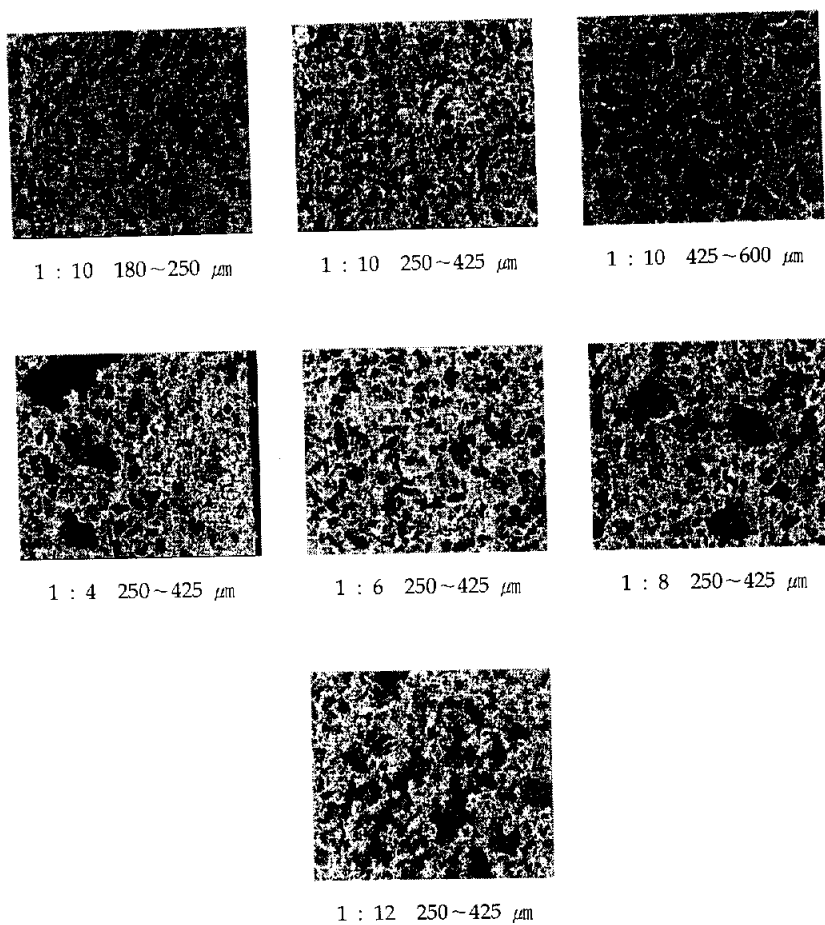


Figure 2-9. SEM micrographs of PLGA scaffolds by solvent casting / salt leaching method (cross section x 50).

3-2. 파라핀 분말 추출법으로 제조한 다공성 지지체의 특성 결정

3-2-1. 파라핀 분말 추출법으로 제조된 다공성 지지체의 잔존 파라핀 확인.

Table 2-4 에서 보는 바와 같이 샘플 No. 1-a, 1-b, 1-c를 제외한 샘플 No. 1-d, 1-e, 1-f와 1-g, 1-h, 1-i에서 파라핀 분말 추출 전후의 무게 변화를 비교해 보면 파라핀이 추출되고 고분자는 남아 있다는 사실을 알 수 있었다. 샘플 No. 1-a, 1-b, 1-c의 경우는, 파라핀 추출 후 무게 변화율이 적은 이유는 상대적으로 PLGA에 비해 파라핀 분말이 적어 열린 다공 구조를 형성하지 못했기 때문이라 추측된다.

3-2-2. SEM에 의한 다공 크기 및 다공 형태의 분석.

Figure 2-10은 파라핀 분말 추출법으로 제조한 다공성 PLGA 지지체의 전자현미경 사진으로 샘플 No. 1-a, 1-b, 1-c, 1-d, 1-e, 1-f, 1-g, 1-h 및 1-i를 나타내었다. 외형적 형태는 몰드의 빈 공간과 똑같은 원기둥 형태로 얻어졌으며, 수축, 부풀림, 불규칙한 크기의 구멍 및 여타 결함이 없는 것으로 관찰되었다. 몰드의 형태에 따라 가운데가 빈 원기둥 형태도 제조가 가능했고, 또 몰드 직경에 따라 지지체의 직경도 조절이 가능했고, 두께 역시 조절이 가능함을 알 수 있었다. 지지체의 내부, 옆면의 다공 구조는 샘플 No 1-d, 1-e, 1-f, 1-g, 1-h, 1-i 에서는 용매 캐스팅 염 추출법과 유화 동결 건조법에 비해서 상대적으로 다공과 다공 사이의 연결이 양호하고 대부분이 열린 셀 구조를 하고 있는 것으로 나타났다. 하지만 지지체

표면의 다공 구조는 거의 모든 샘플에서 대부분 닫힌 셀 구조를 나타내었다. 그 이유는 지지체의 내부 및 옆면과는 달리 표면은 몰드에서 받는 직접적인 압력으로 인해 다공이 약간 눌린 듯한 모양이 나타났다. 그러나 조직세포가 성장하여 내부로 이행하는 데는 문제가 없을 것으로 예측된다.

3-2-3. 수은 다공도계 분석.

파라핀 분말 추출법으로 제조한 다공성 PLGA 지지체의 샘플 No 1-a, 1-b, 1-c에서는 평균 다공크기는 20, 22, 40 μm 인 것으로 나타났다. 샘플 No 1-d, 1-e, 1-f에서는 평균 다공크기는 44, 52, 93 μm 인 것으로 나타났고, 샘플 No 1-g, 1-h, 1-i에서는 평균 다공크기는 51, 70, 94 μm 인 것으로 나타났다. 이는 파라핀 분말의 조성비가 일정할 경우 파라핀 분말의 크기가 증가할수록 평균 다공크기가 증가함을 알 수 있었다. 또한 샘플 No 1-a, 1-d, 1-g에서는 평균 다공도가 48, 81, 87%인 것으로 나타났다. 샘플 No 1-b, 1-e, 1-h에서는 평균 다공도가 49, 74, 83%인 것으로 나타났고 샘플 No 1-c, 1-f, 1-i에서는 평균 다공도가 45, 78, 98%인 것으로 나타났다. 이는 파라핀 분말의 크기가 일정할 경우 파라핀 분말의 조성비가 증가할수록 평균 다공도가 증가한다고 사료된다. 본 실험의 다공성 PLGA 지지체 제조방법에서 다공크기의 조절은 파라핀 분말 크기의 조절로 가능하였고 다공도의 조절은 파라핀 분말 조성비로써 조절이 가능함을 알 수 있었다 (Table 2-1, Figure 2-11).

Table 2-4. Amounts of Residual Paraffin with Mass Loss before and after Paraffin Particles Leaching Processing

sample No.	initial weight (g)	final weight (g)	ratio of experimental mass loss (%)	ratio of theoretical mass loss (%)
1-a	0.25	0.1340	46.60	50
1-b	0.25	0.1367	45.32	50
1-c	0.25	0.1476	40.96	50
1-d	0.25	0.0517	79.32	80
1-e	0.25	0.0539	78.44	80
1-f	0.25	0.0541	78.36	80
1-g	0.25	0.0319	87.24	87.5
1-h	0.25	0.0317	87.32	87.5
1-i	0.25	0.0312	87.52	87.5

Ratio of PLGA/Paraffin

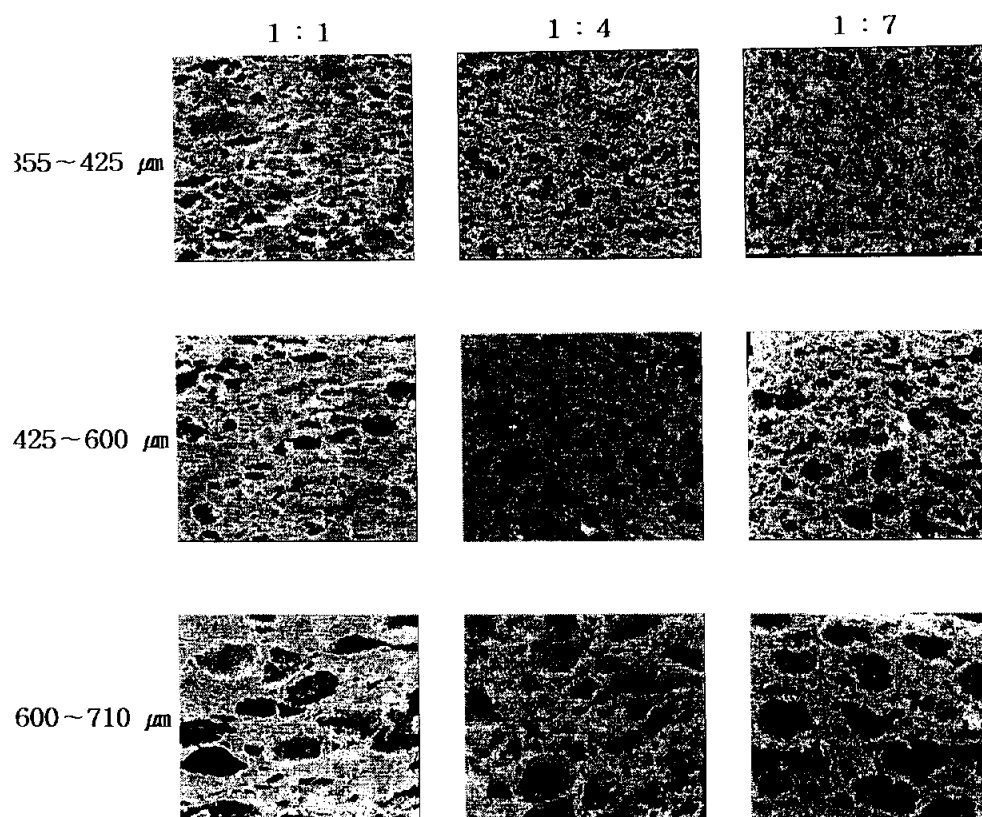


Figure 2-10. SEM micrographs of PLGA scaffolds by novel paraffin particles leaching method (cross section x 50).

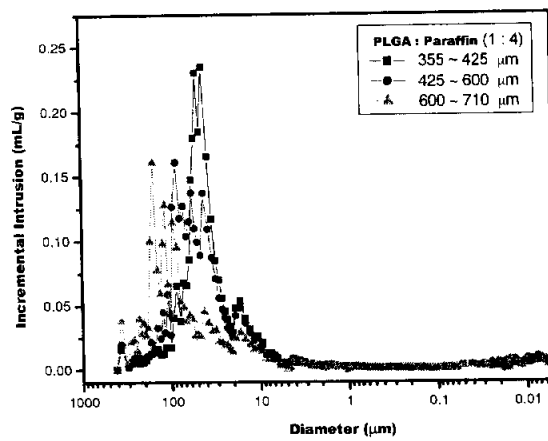
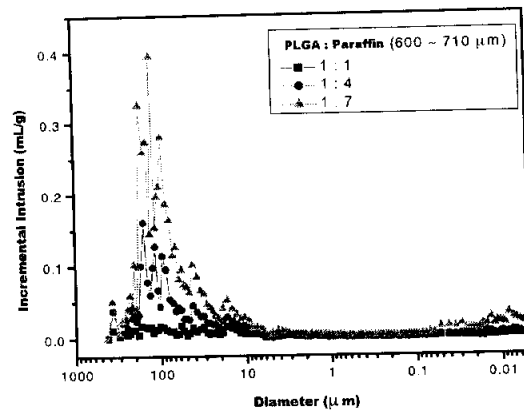


Figure 2-11. Porosities and Pore size distribution of PLGA scaffolds by novel paraffin particles leaching method.

함유할 수 있을 것으로 사료되어진다. 고분자의 성형과정에서 유기 용매에 의한 화학적 결합 없이 기계적 결합만을 사용했기에, 용매 캐스팅/염 추출법보다는 상대적으로 잔존 유기 용매의 위험을 해소 하였고, 지지체의 표면은 부드럽고 매끄러웠으며 열린 다공 구조를 가지고 있었다. 몰드의 형태에 따라 인체의 복잡다양한 장기 형태를 제조가 가능할 것이며, 용매 캐스팅/염 추출법에 비해서 상대적으로 다공과 다공 사이의 연결도 양호한 것으로 보아 세포의 파종도 우수하다고 판단된다.

파라핀 분말 추출법으로 제조한 다공성 지지체는 수용성 약물, 단백질, 섬유아세포성장인자 (fibroblast growth factor, FGF), 인슐린유사성장인자(insuline-like growth factor, IGF), 혈소판유래성장인자 (platelet derived growth factor, PDGF), 신경성장인자 (nerve growth factor, NGF), 및 전환성장인자 (transforming growth factor, TGF)등과 같은 성장인자를 지지체 내에 함유하여 골, 연골, 신경, 근육, 및 혈관 등의 조직공학적 장기 재생에서의 다공성 지지체로서 유용하게 사용할 수 있을 것이라고 추측된다.

4. 결 론

본 연구에서 비교 제시한 방법은 용매 캐스팅 / 염 추출법, 유화 동결 건조법 및 파라핀 분말 추출법이다. 첫째로 용매 캐스팅 / 염 추출법의 평균 다공도는 35~117% 까지 저다공도부터 고다공도까지 다양하게 조절할 수가 있었고, 평균 다공크기도 46~106 μm 까지 다양하게 조절할 수 있었으며 파종되는 세포의 형태에 따라 요구되는 지지체의 다공크기 수준을 만족하는 것으로 사료된다. 반면 용매 캐스팅 / 염 추출법은 다공성 지지체 내에 수용성 인자를 첨가 할 수 없는 점, 유기 용매 사용으로 인한 잔존 문제, 제조 과정중의 유기 용매 증발에 따른 지지체 표면이 거칠어지는 점 및 다공과 다공사이의 연결성이 떨어지는 단점들이 있다고 사료된다.

둘째로 유화 동결 건조법은 다공성 지지체 내에 수용성 인자를 함유할 수 있는 장점이 있다. 하지만 유화 동결 건조법의 평균 다공도는 94 % 이상으로 우수한 편이었으나 평균 다공크기는 14~20 μm 사이로 극히 작은 다공크기를 얻을 수 있었다. 그리고 지지체의 표면이 용매 캐스팅 염 추출법과는 달리 부드럽고 매끈한 편이었으나 닫힌 다공 구조를 가져 세포의 파종에 부적합한 것으로 사료된다.

셋째로 새롭게 개발한 파라핀 분말 추출법의 평균 다공도는 45~97% 까지 다양한 크기로 조절이 가능하였으며, 평균 다공크기도 19~94 μm 까지 조절이 가능하였다. 용매 캐스팅/염 추출법과 마찬가지로 파종되는 세포의 형태에 따라 요구되는 지지체의 다공크기의 수준을 만족하는 것으로 사료된다. 그리고 파라핀 분말 추출시 물 대신 헥산을 사용하기 때문에 수용성 인자를 다공성 지지체 내에

5. 참 고 문 헌

1. L. G. Griffith and G. Naughton, *Science*, **295**, 1009 (2002).
2. G. Khang, I. Jo, J. H. Lee, I. Lee, and H. B. Lee, *Polymer Sci. Tech.*, **10**, 640 (1999).
3. S. J. Holland, B. J. Tighe, and P. L. Gould, *J. Controlled Release*, **4**, 155 (1986).
4. L. E. Freed, J. C. Marquis, A. Nohria, J. Emmanuel, A. G. Mikos, and R. Langer, *J. Biomed. Mater. Res.*, **11**, 27 (1993).
5. G. Khang, J. H. Jeon, J. C. Cho, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **23**, 3 (1999).
6. J. H. Aubert and R. L. Clough, *Polymer*, **26**, 2047 (1985).
7. K. Whang, T. K. Goldstick, K. E. Healy, *Biomaterials*, **21**, 2545 (2000).
8. A. P. Marques, R. L. Reis, and J. A. Hunt, *Biomaterials*, **23**, 6, 1471 (2002).

제 3장. 플라즈마 방전 처리에 따른 고분자 지지체의 친수성 증대

1. 이론적 배경

통상적으로 행해지는 멸균법을 살펴보면 고압증기 멸균법, ethylene oxide gas (EOG) 멸균법, 에탄올 등의 유기용매를 이용한 멸균법, 방사선 멸균법 그리고 플라즈마 멸균법 등이 있다. 첫째로, 고압증기 멸균법은 습열에 의한 세포 내 효소, 단백질의 변성에 요구되는 물성은 내열성과 실투, 변형 등이 없어야 되고 외의한 작용기전으로 살균하는 원리이다. 고압증기 멸균법에 적용되는 고분자재료로 관 및 형상의 안정성, 강도의 안정성 및 용출물 등의 증대가 없는 화학적인 안정성이 포함되는 것이어야 한다. 둘째로, EOG 멸균법은 일정한 습도 (40~100% RH) 및 온도 (40~60℃)의 EO (비점 : 50.8℃) 가스분위기 중에서 수 시간 이상 폭로시켜 멸균시키는 방법으로서 대부분의 고분자재료에 적용이 되고 있다. EO의 풍부하고도 특이한 반응성은 미생물 세포를 구성하는 단백질 말단기 (-OH, -SH, -COOH, -CO, -NH₂)에 EO의 개환을 통한 수산기 (-CH₂CH₂OH) 형태로 반응하여 미생물을 살균시키는 방법으로서, 금속화물 또는 염산과 반응하여 에틸렌클로로하이드린 (ECH)을 생산하고, 물과 반응하면 글리콜이 생성된다. 이러한 화학 반응성이 풍부하고 강한 살균력을 가지는 EO는, 한편으로는 강한 독성을 지니고 있어 점막과 피부에 대하여 자극성, 용혈성, 변이원성 등에 유의해야 하는 것으로 알려져 있다. 따라서, EOG 멸균법으로는 고분자재료에 남아 있는

EO와 EO가스의 반응생성물의 대책이 중요하다 [1-2]. 셋째로 에탄올 등을 이용한 유기용매를 사용한 멸균법은 Mikos 등에 의해서 제안된 방법으로 멸균효과와 함께 전적심 (prewetting)의 효과로 제안되었으나 잔류용매에 대한 문제가 있다. 넷째로 방사선 멸균법은 일정 방사선 조사량에 의해서 적용된다. 방사선 조사시 미생물 세포 내에는 전이와 여기작용에 의해 미생물의 생체분자사슬의 절단과 라디칼의 생성, 소멸반응이 일어나 미생물이 죽는 것이다. 방사선멸균법은 무가열 멸균법이며 원정 포장한 상태에서 멸균되므로 재래식 가열멸균법이나 가스멸균법에 비해 뚜렷한 장점이 있다. 북미주 등에서는 전체의료용품의 30%이상, 1회용 의료용품의 90%이상을 방사선멸균법으로 소독하고 있다. 그러나 방사선 조사효과가 고분자재료의 내부에 영향을 주어 고분자재료의 사슬에 분해와 가교가 생기고 고분자의 분자량도 상당히 감소시키는 물리적, 화학적 특성을 변화시킨다 [3]. 마지막으로 본 연구에서 긍정적으로 제시한 방법인 플라즈마 멸균법은 최근 시도되는 방법으로 멸균 효과와 함께 소수성 재료의 표면을 친수성으로 표면개질 시키는 방법으로 알려져 있다 [4-6].

본 연구에서는 조직공학에 필수요소인 다공성 지지체를 ethylene oxide gas (EOG) 멸균법, 방사선 멸균법 및 플라즈마 멸균법을 각각 실시한 후 겔 투과 크로마토그래피를 이용하여 분자량의 변화와 주사전자현미경으로 다공 구조의 변화를 관찰하였으며 플라즈마 멸균법의 친수성 증대 효과를 살피기 위해 수분 흡수 시험을 실시하였다.

2. 실험

2-1. 시약 및 재료

PLGA (lactide/glicolide mole ratio, 75/25, Resomer[®] RG 756, Boehringer Ingelheim, Germany)는 평균분자량이 90,000 g/mole인 것을 사용하였다. 염화나트륨 (Orient Chem. Co., Korea)은 다공 생성 물질로 사용하였는데 본 실험에서 요구되는 크기로 선별하기 위하여 각 크기별 분자체를 사용하였다. 메틸렌클로라이드 (MC, Tedia Co. Inc., USA) 등의 모든 화학약품과 유기용매는 HPLC 등급을 사용하였다.

2-2. 용매 캐스팅/염 추출법을 이용한 다공성 지지체의 제조

PLGA를 MC에 일정 농도로 용해한 후 체에 의해서 선별된 염을 일정 비율로 혼합하였다. 용해된 PLGA와 염의 혼합물을 직경 15 mm 및 두께 5 mm 크기의 실리콘 몰드에 넣은 후 프레스 (MH-50Y, CAP 50 tons, Japan)를 이용하여 상온에서 60 kgf/cm²의 압력으로 24시간 동안 가압하였다. 다공을 형성해 내는 물질인 염을 추출하기 위해서 초 순수에서 24시간 동안 염을 추출하였다. 30 mTorr, -55 °C 조건에서 48시간 동안 동결 건조 하였다. 잔류용매인 MC를 제거하기 위하여 최소 1주일 동안 25°C 진공오븐에서 건조시킨 후, 진공 상태에서 보관하여 실험에 사용하였다 [7].

2-3. 다공성 지지체의 멸균

2-3-1. ethylene oxide gas (EOG)에 의한 지지체의 멸균

EOG 멸균법이란 Steam 대신 GAS를 이용하여 바이러스 및 기타 미생물을 사멸 시키는 화학적 소독 방법을 말하며 스팀소독은 (121℃~132℃)의 온도를 필요로 하는데 비하여 38℃~55℃의 저온에서 소독이 이루어지므로 저온 멸균법이라고도 한다 (Figure 3-1).

PLGA 지지체를 20 ml vial에 넣은 후 외부로부터의 수분 및 공기의 침입을 방지하기 위하여 밀봉을 한 후, 카톨릭 성모병원 임상의학연구소에 의뢰하여 EOG 멸균을 실시하였다. 55℃의 온도에서 4시간 동안 노출시켜 EOG 멸균을 실시하였다.

2-3-2. 방사선 조사에 의한 지지체의 멸균

PLGA 지지체를 20 ml vial에 넣은 후 외부로부터의 수분 및 공기의 침입을 방지하기 위하여 밀봉을 한 후, 한국 원자력 연구원에 의뢰하여 감마선 조사를 실시하였으며, 샘플을 드라이 아이스가 들어있는 아이스 박스에 넣어서 감마선 조사에 의해서 발생할 수 있는 분해를 방지하였다. 감마 조사 선량은 0, 2.5, 5, 7.5 Mrad로 조사하였고, 시간당 0.8 Mrad 선량 속도로 감마선 조사를 실시했다.

2-3-3. 플라즈마 방전 처리에 의한 지지체의 멸균

지지체의 플라즈마 방전처리는 본 연구팀에서 자체 제작한 방전기를 이용하여 수행하였으며 고주파 발전기의 출력은 20 V, 0.2 A이었고 -11.12 PSI의 진공상태에서 20초 동안 수행하였다. 위와 같이 플라즈마 방전처리 조건을 동일하게 하고, 방전처리 시간에 따른

변수 (0, 0.5, 1.5, 3.0, 4.5, 6.0 min)를 두었다. 플라즈마 방전 처리된 지지체의 적심성을 보기 위하여 붉은 염색 수용액 법을 사용하였고 물 흡수력 시험을 실시하였으며 GPC를 이용하여 처리 전후의 분자량의 변화를 측정하였다.

2-3-4. 플라즈마 방전 처리된 다공성 지지체의 수분 흡수 시험

플라즈마 방전 처리에 따른 지지체의 친수성 증대 효과를 살피기 위해서 일정 부피의 3차 증류수에 지지체를 일정시간 동안 담그어 두어 수분의 흡수량을 측정하였다. 상기의 조건에 의해서 각각 플라즈마 방전 처리된 지지체를 0.5, 1.5, 3.0 min 동안 10 ml, 3차 증류수가 담겨진 비이커에 넣은 후, 시간마다 지지체를 칭량 하여 수분의 흡수력을 알고자하였다.

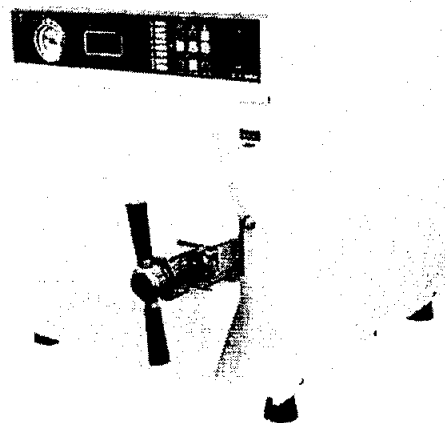


Figure 3-1. Photographs of EOG sterilizer.

2-4. 멸균 처리된 지지체의 특성 결정

2-4-1. 분자량 측정

멸균 전과 후의 PLGA 지지체의 분자량을 측정하기 위해 Shodex[®] RI-71 검출기가 장착된 겔 투과 크로마토그래피 (gel permeation chromatography)를 사용하였다. 컬럼은 Shodex[®] GPC K-802, Asahipak GF-510 HQ 및 GF-7M HQ를 직렬 연결하여 사용하였으며 표준 시료는 polystyrene을 사용하였다. 이동상은 클로로포름을 사용하고 1 ml/min의 유속으로 분석하였다. 펌프는 NS 2001PC (Futechs Co., Ltd, Korea)를 사용하였고 컬럼 온도를 35.1 °C로 일정하게 유지시키기 위해 AT-3000 (Futechs Co., Ltd, Korea) 오븐을 사용하였다.

2-4-2. SEM에 의한 다공 크기 및 다공 형태의 분석

상기에 제시한 멸균처리를 거친 다공성 PLGA 지지체의 표면, 옆면, 및 내부의 다공 형태를 분석하기 위하여 SEM (S-2250N, Hitachi, Japan)으로 관찰하였다. 면도칼로 5×5×1 mm (두께)의 크기로 절단하고 양면테이프를 이용하여 샘플 폴더에 고정시키고 플라즈마 스퍼터 (Emscope, Model SC 500K, UK)를 이용하여 200 Å 두께의 금 코팅하여 촬영한 사진으로 다공의 형태 및 크기를 확인하였다.

3. 결 과

3-1. 다공성 지지체의 제조

용매 캐스팅 염 추출법에 의해서 다공성 지지체를 제조한 결과, 본 실험에 적합한 양호한 다공 구조를 가지는 샘플을 얻을 수 있었다. 수은 다공도계로 제조된 지지체의 다공도 및 다공 크기를 측정된 결과, 다공도 95% 이상, 평균다공 크기 $81.05 \mu\text{m}$ 이상의 크기를 갖는 지지체를 얻을 수 있었다.

3-2. 다공성 지지체의 멸균

3-2-1. ethylene oxide gas (EOG)에 의한 지지체의 멸균

EOG 멸균 처리 전후의 지지체의 부피를 측정한 결과 원래 부피에서 대략 50% 이상 감소됨을 알 수 있었다. 그리고 SEM으로 표면과 내부의 EOG 처리 전후의 다공 구조를 관찰한 결과 열린 다공 구조에서 닫힌 다공 구조의 형태로 변하는 것을 알 수 있었다 (Figure 3-2, 3-3, 3-4).

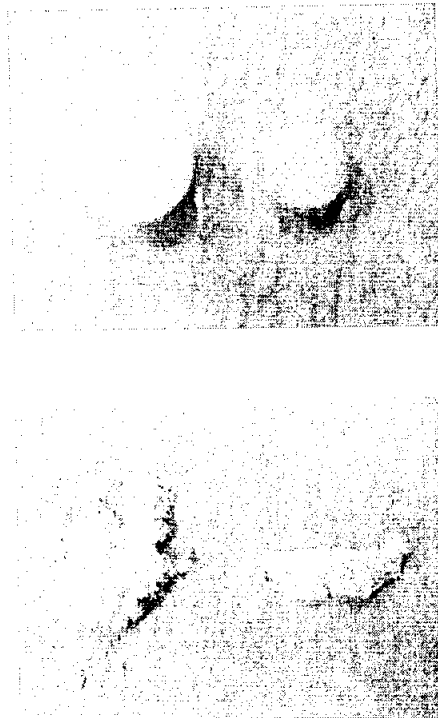


Figure 3-2. Change of scaffolds shape before and after E.O gas processing.

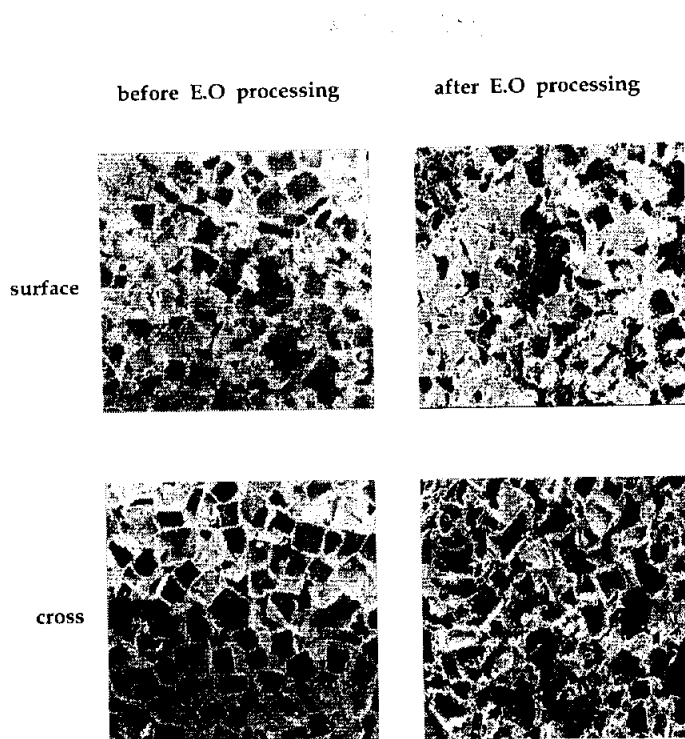


Figure 3-3. SEM micrographs of PLGA scaffolds After E.O gas treatment ($\times 50$).

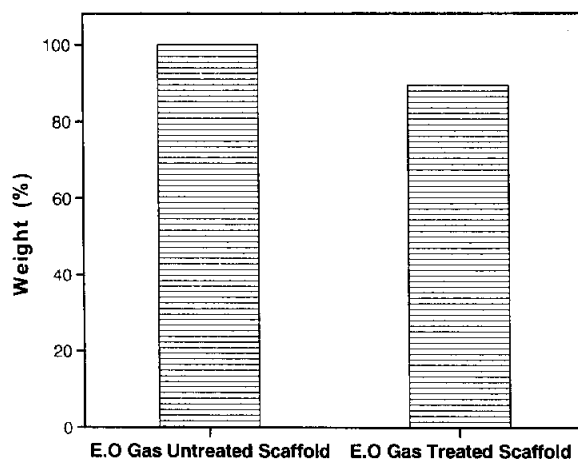
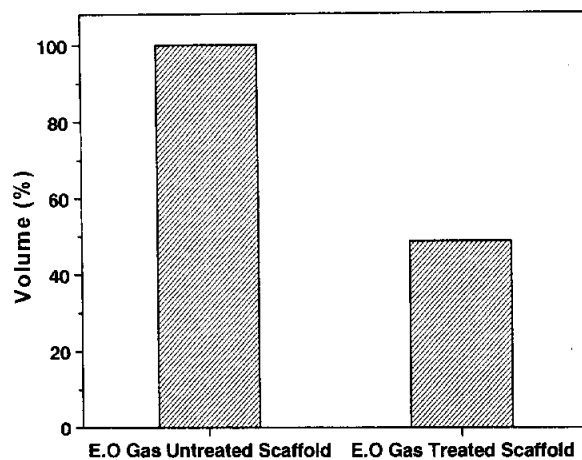


Figure 3-4. Variation of scaffolds weight / volume after E.O gas treatment.

3-2-2. 방사선 조사에 의한 지지체의 멸균

감마선 조사전후 지지체의 다공 구조 변화를 SEM으로 관찰한 결과, 감마선 조사전보다 조사 후에 전체적으로 미세한 다공 (micro pore)의 형성이 훨씬 많았고, 조사량이 증가할수록 미세한 다공의 형성이 증가함을 알 수 있었다 (Figure 3-5). 1.5 Mrad의 조사에서는 조사전인 0 Mrad와 거의 유사한 다공 형태를 관찰 할 수 있었고, 3 Mrad 이상의 조사에서는 다공과 다공 사이의 연결이 끊어지는 현상을 관찰할 수 있었다. GPC로 분자량을 측정한 결과, 감마선 조사량이 증가 할수록 지지체의 분자량은 서서히 감소하였다 (Figure 3-6).

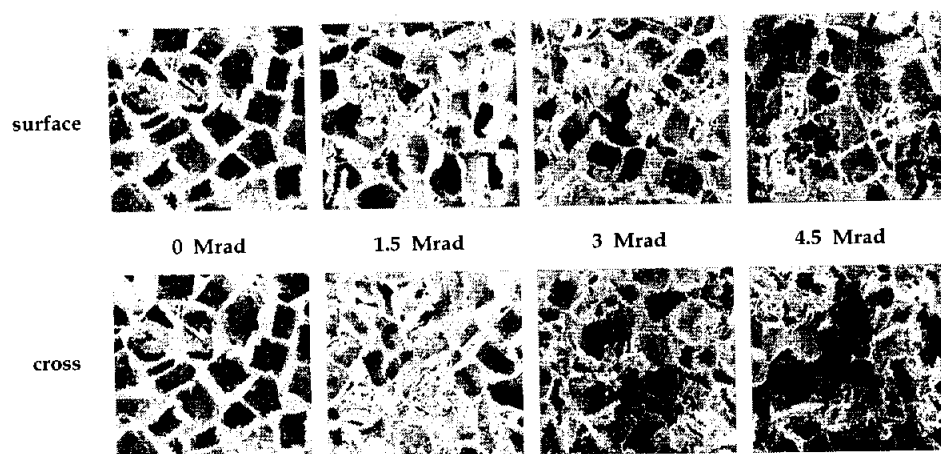


Figure 3-5. Sem micrographs of PLGA scaffolds after γ -irradiation ($\times 50$).

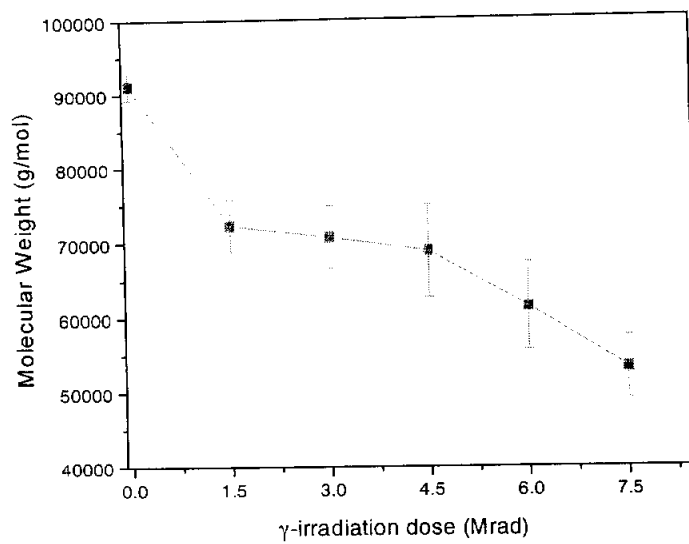


Figure 3-6. Comparison of changes Mw as γ -irradiation dosage.

3-2-3. 플라즈마 방전 처리에 의한 지지체의 멸균

플라즈마 처리시간 1분 30초, 3분, 4분 30초 전후의 지지체의 다공 구조 변화를 SEM으로 관찰한 결과, 표면구조는 처리시간이 증가할수록 다공 구조 막힘 현상이 나타났고 내부구조는 1분 30초 처리시간에서는 처리하지 않은 지지체와 거의 유사한 다공 구조 모습을 보였으나 3분 이상의 처리에서는 다공 간의 연결이 파괴되는 현상이 나타났다 (Figure 3-7). GPC로 플라즈마 처리전후의 분자량을 분석한 결과 일정 처리 시간까지는 처리 시간이 증가할수록 분자량도 동시에 증가하는 경향을 보이다가 처리시간 6분 정도에서는 분자량이 감소하는 현상이 나타났다 (Figure 3-8).

3-2-4. 플라즈마 방전 처리된 다공성 지지체의 수분 흡수 시험

플라즈마 방전 처리된 지지체를 처리하지 않은 것과 처리한 것을 비교한 결과, 플라즈마 처리한 쪽이 훨씬 수분 흡수력이 우수하였다 (Table 3-1, Figure 3-9).

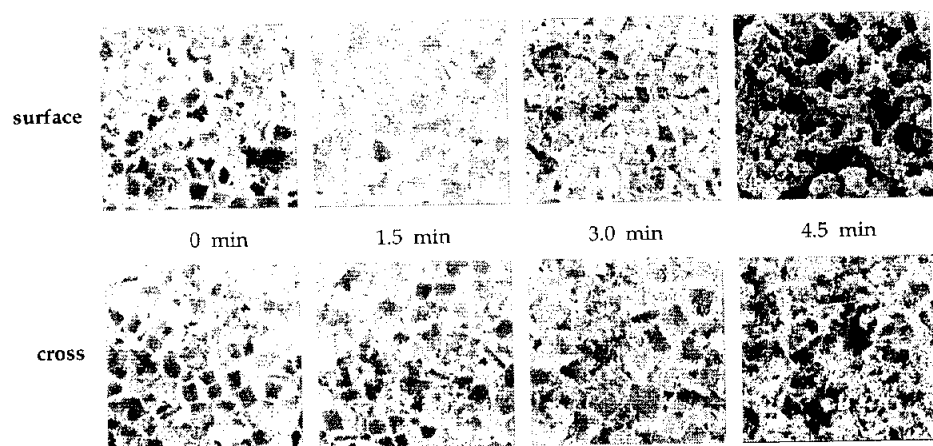


Figure 3-7. Sem micrographs of PLGA scaffolds as plasma treatment ($\times 50$).

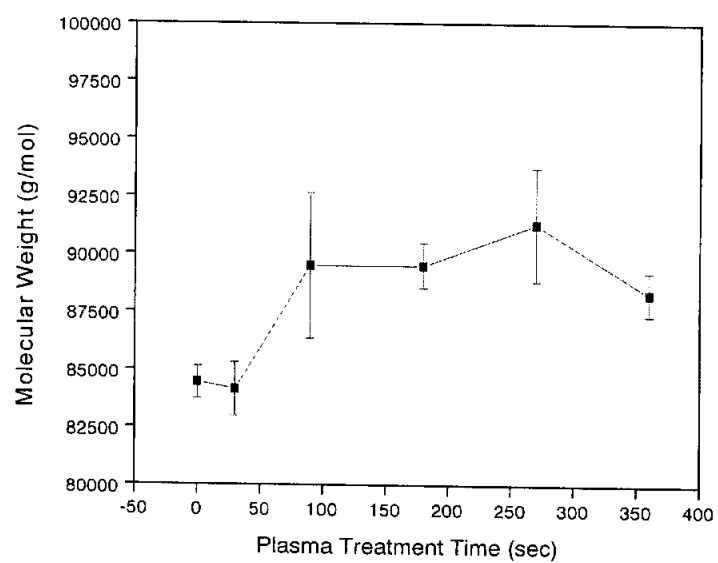


Figure 3-8. Comparison of changes Mw as plasma treatment.

Table 3-1. Measurement of Wetting Property of Plasma Treated Scaffolds

water contacted time (sec) plasma treatment time (min)	0	30	90	180
0	0.0607	0.0921	0.1067	0.1360
	0.0490	0.0968	0.1054	0.1114
	0.0409	0.1098	0.1369	0.1497
1.5	0.0557	0.2037	0.2105	0.3023
	0.0598	0.2092	0.2495	0.2907
	0.0541	0.2328	0.3031	0.3168
3.0	0.0352	0.2474	0.3023	0.3465
	0.0355	0.1539	0.2004	0.3234
	0.0415	0.1978	0.2475	0.3435
4.5	0.0409	0.1934	0.3308	0.3879
	0.0450	0.2675	0.3142	0.3543
	0.0506	0.1678	0.3245	0.3989

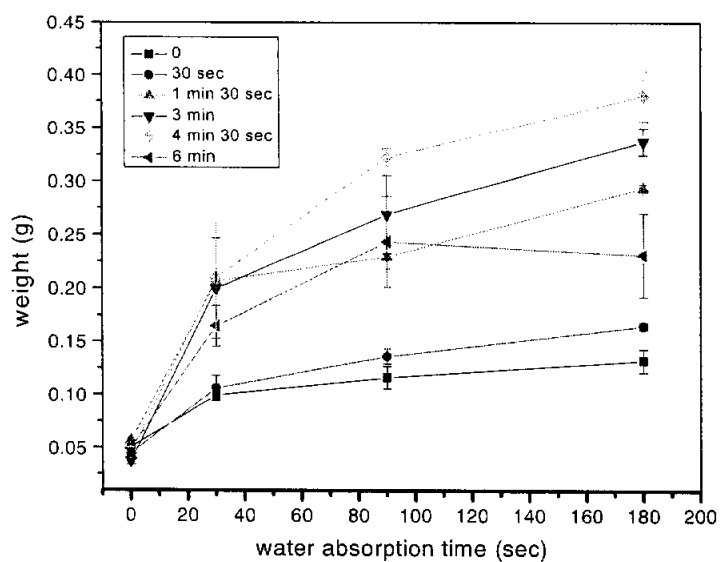


Figure 3-9. Effect of different plasma treatment time on water absorption.

4. 결 론

생분해성 고분자 지지체를 체내 이식시 반드시 요구되는 지지체의 무균 상태는 제조 공정 중에서 무균 생산시설을 하게 되면 제반 되는 여러 가지 문제도 한꺼번에 해결할 수 있는 방법이다. 그러나 제조 공정 기술상으로나 비용상으로 무균 생산 시설 하에서 생산하기는 여러 어려움이 있다. 그래서 지지체를 제조한 후 여러 가지 멸균 처리법으로 지지체를 무균 상태로 만드는 방법이 여러모로 효과적이다.

본 연구에서는 ethylene oxide gas (EOG) 멸균법, 방사선 멸균법 및 플라즈마 멸균법을 각각 실시한 후 다공성 지지체에 있어서 중요한 요소인 다공 구조, 지지체의 외부형태 그리고 분자량의 변화에 대해서 고찰하였고, 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

첫번째로 ethylene oxide gas (EOG) 멸균법은 다공성 지지체의 외부 형태를 40% 정도 부피 감소를 관찰 할 수 있었고, 멸균 처리 과정 중에 도입되는 열원으로 인해 지지체를 이루고 있는 고분자 재료의 열경화 현상이 나타났다. SEM으로 내부와 표면구조를 관찰한 결과 고분자 재료의 열경화로 열린 다공 구조에서 닫힌 다공 구조로 다공 구조의 형태가 변화하는 것을 알 수 있었다. 그리고 본 방법은 여러 연구에서 알려진대로 고분자 재료 사슬사이에 강한 독성기를 가지는 작용기가 남아 있어 체내 삽입시 많은 피해가 예상된다. 조직공학적 다공성 지지체의 멸균법으로 부적절하다고 사료된다.

두번째로 방사선 멸균법은 다공성 지지체의 외부 형태는 멸균 전후에 별 차이가 없는 것으로 관찰되어졌지만 방사선 조사량이

증가할수록 미세한 다공이 형성되었으며 3 Mrad 이상에서는 다공과 다공간의 연결이 끊어지는 현상이 관찰되었다. GPC로 멸균처리전과 처리 후 조사량에 따른 분자량의 변화를 관찰한 결과 분자량이 감소되는 현상을 알 수 있었다.

세 번째로 플라즈마 멸균법은 플라즈마 처리 시간 4분 30초까지는 다공성 지지체의 외부 형태의 변화가 없었으며, 그 이상의 처리 시간에서는 다소 수축됨을 알 수 있었고, 멸균 처리 전후의 다공 구조의 변화는 1분 30초까지는 거의 변화가 없었으며 그 이상의 처리 시간이후에는 내부의 다공과 다공 간의 구조가 끊어지고, 표면 구조는 플라즈마 처리 공정 중에 발생하는 열원으로 인해 열린 다공 구조에서 닫힌 다공 구조로 변함을 알 수 있었다. 멸균 처리 전후의 분자량의 변화는 일정 처리 시간까지는 증가함을 알 수 있었다. 플라즈마 멸균법의 친수성 증대 효과는 플라즈마 처리한 것이 하지 않은 것에 비해 2배 이상 향상됨을 알 수 있었다.

본 연구에서 제시한 플라즈마 처리 멸균법은 조직공학용 지지체에 적용될 수 있는 유용한 멸균법인 동시에 세포 파종 및 조직 재생에 필수적인 친수성 증대 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

5. 참 고 문 헌

1. T. Zislis, Martin. SA, and E. Cerbas, J. Oral Implant, 15, 41 (1989).
2. C. Volland, M. Wolff, T. Kissel, J. Control Rel, 31, 293 (1991).
3. D. Gilding, AM Reed, Polymer, 20, 1459 (1979).
4. S. Gogolewski, P Mainil-Varlet, JG Dillon, J. Biomed Mater Res, 32, 227 (1996).
5. F. Ayhan, H. Ayhan, J. bioactive Biocompat Polymers, 13, 65 (1998).
6. K. Kelly-Wintenberg, A. Hodge, TC. Montie, J. Vac Sci Technol A, 17, 1539 (1999).

제 4장. 골분과 생분해성 고분자를 이용한 재생의학적 인공 골 재생

1. 이론적 배경

생체에서 완전히 녹아 흡수되고 세포와 친화력이 있는 화학 재료를 생체조직에 이식함으로써 새로운 실질조직을 형성케하는 일련의 기법을 생체조직공학이라고 한다. 이러한 조직공학 기법을 이용하여 연골세포와 골세포로 연골조직과 뼈조직을 얻을 수 있고 담체의 모양에 따라 그 모양을 마음대로 구조할 수가 있다. 생체조직공학에 사용되는 합성화학물의 역할은 분리된 세포를 모아줌으로써 생체내에서 세포가 왕성하게 활성화하여 새로운 기질을 분비케함으로서 분화된 조직을 만들어 주는 것이다. 분리된 세포를 인체에 해를 미치지 않으면서, 인체에서 완전히 분해되는 폴리머에 심어주게 되는데 이때 사용되는 폴리머의 구조는 화학적 형상이나, 미세구조학적 성상이 세포와 친화력이 있어야 한다 [1]. 세포를 포함한 폴리머를 생체에 이식하면 체내에서 영양분과 산소공급을 받음으로서 조직의 생성을 가능케 하는 생체조직공학은 세포배양학, 재료공학, 이식수술 분야의 발달의 기묘한 조합으로 이루어진 획기적인 신기술 분야이다.

현대 산업 사회에서 사고 및 재해에 의한 빈번한 골조직의 파괴 및 결손, 나이에 따라 골밀도의 감소로 인한 골절, 그리고 선천적인 골형성 부전증 같은 질환에 의한 성장 부진 등과 같은 다양한 문제들에 대한 효과적인 재건 방법이 요구되고 있다. 전통적인 골결손 처리방법으로는 자가골 이식 (autografting)과 동종골 이식

(allografting)등이 있다. 자가골 이식이 지금까지는 골형성 측면에서 가장 효과적인 방법으로 알려져 있으나 골 채취 부위의 감염, 동통, 혈종등과 같은 합병증이 발생할 수 있고 동종골 이식은 공여자로부터 질병의 전염, 감염, 그리고 자가골이식에 비해 골유합 및 골형성 효과가 저조한 단점을 가지고 있다.

조직공학적인 골 형성이 이런 단점을 해결하고 골결손을 치료할수 있도록 많은 연구가 진행되고 있는데 골조직공학의 목적은 골이 필요한 부위에 골형성을 유도하고 실제 골조직을 개발하는데 있다. 조직공학에 의한 골조직의 형성을 위해 골생성을 유도하는 골아전구세포, 이런 세포들이 적당한 위치에서 증식분화할 수 있는 담체, 그리고 골조직 형성의 유도분화를 촉진하는 골유도 성장인자들이 필요하다.

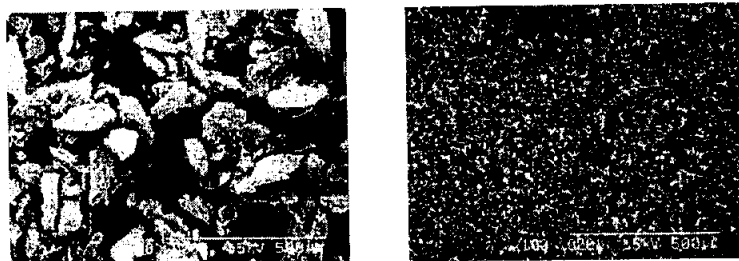
본 논문에서는 조직공학적 골 형성의 두 가지 모델을 제안하였다. 첫째로 동종골 이식을 통한 조직공학적 골형성이다. 탈무기질화 (demineralized)된 뼈를 생분해성이면서 생체적합성 고분자인 PLGA와 PLA 등과 복합화하고 여기에 간엽줄기세포로부터 분화한 골아전구세포를 이용하여 새로운 골 형성을 유도하고자 하였다 [2-3]. 탈무기질화된 뼈는 재료 자체에 세포들이 없기 때문에 체내에서도 면역거부 반응이 일으킬 가능성이 없으며 골 형성을 촉진시킬수 있는 골 형성 단백질 (BMP, bone morphogenic protein)과 같은 여러 가지 cytokine이 함유되어 있다고 알려져 있다 [4-9].

2. 실험

2-1. 시약 및 재료

PLGA (lactide/glicolide mole ratio, 75/25, Resomer[®] RG 756, Boehringer Ingelheim, Germany)는 평균분자량이 90,000 g/mole인 것을 사용하였고, PLA (lactide, Resomer[®] RG 206, Boehringer Ingelheim, Germany)는 평균분자량이 90,000 g/mol인 것을 사용하였다. 미네랄이 제거된 골분은 osteotech사에서 구입하여 freezer/mill (SPEX 6700, USA)을 사용하여 10~30 μ m 크기로 분쇄하여 사용하였다 (Figure 4-1)=. 메틸렌 클로라이드 (MC)는 Tedia Chemical사에서 암모늄 비카보네이트는 Oriental Chemical사에서 구입하여 사용하였다.

골수 간엽줄기세포의 배양액인 Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)과 영양액인 우태 혈청 (FBS), 인산 완충용액 (PBS), 세포수확제인 Trypsin-EDTA는 Gibco BRL에서 구입하였고, 세포가교제인 글루타르알데히드와 L-아스코빅산, 덱사메타손, 비타민 D₃ 및 β -글리세로포스페이트는 Sigma Chemical사의 제품을 사용하였다.



After pulverization

Figure 4-1. SEM microphotographs before and after pulverized DBP (original magnification ; $\times 100$).

2-2. 세포의 배양

성인의 골수를 뽑아내어 percoll 구배용액으로 간엽줄기세포를 분리하였다. 이때 골수 10 ml를 DMEM 배양액 10 ml로 희석하고 이를 percoll 구배용액에 서서히 떨어뜨려 섞이지 않게 하여 500 g로 25분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 세포 층을 분리하여 새로운 배양액에 희석하여 다시 500 g로 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고 10% FBS와 아스코빅산이 함유된 DMEM 배양액으로 세포 배양용기에 넣어 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다. 배양액은 3일에 한번씩 교환하였다.

2-3. 뼈 세포로의 분화 (Osteogenesis)

골수 간엽줄기세포는 인체 내에서 쉽게 분리해 낼 수 있으며 여러 가지 요인으로 뼈 세포나 연골세포, 섬유아세포, 지방세포 등으로 분화가 용이하고 실험실적으로 대량배양이 가능하여 인체의 조직 재생 측면에서 중요한 세포이다. 배양된 간엽줄기세포를 β -글리세로포스페이트와 덱사메타손, 비타민 D₃를 이용하여 모두 4군으로 나누어 뼈 세포로 분화하고자 하였다. 분화된 뼈 세포를 확인하기 위한 조직학적 소견은 H&E와 von Kossa 염색을 통해 시행하였다. 또, 알카라인 포스파타제 활성도 (alkaline phosphatase activity; ALP)를 측정하였다. β -글리세로포스페이트는 뼈 세포화에 가장 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 덱사메타손은 세포내 단백질 합성을 촉진시키는 역할을 하며 비타민 D₃는 생체 내의 칼슘 농도를 높여주며 뼈 세포의 무기질 분비에 많은 영향을 준다고 알려져 있다. 이러한 인자들을 통해 간엽줄기세포의 뼈 세포화가 원활하게 이루어 질 것이라 사료되어 진다.

2-4. 천연/합성고분자 지지체의 제조

미네랄 성분이 제거된 골분은 골 형성에 유용한 여러 가지 사이토카인과 성장인자와 같은 생리활성물질을 함유하고 있어 이를 이용한 조직공학적 골 재생은 매우 유용한 재료로 사용되어질 수 있다. 이러한 천연재료인 골분과 합성 고분자인 폴리락타이드 또는 락타이드-글리콜라이드 공중합체를 복합화하여 조직공학용 지지체를 제조하였다. 먼저 폴리락타이드 또는 락타이드-글리콜라이드 공중합체를 메틸렌 클로라이드에 20 w/v%로 녹인 다음 골분과 염인 암모늄 비카보네이트 (직경 180~250, 250~355 μm)을 일정량 혼합하여 디스크 형태 (직경이 10 mm)의 실리콘 몰드에 넣고 용매를 48 시간 동안 상온에서 증발시켰다. 지지체의 다공도와 다공 크기는 염의 크기와 함유량을 조절하여 원하는 다공 크기와 다공도를 획득하고자 하였다. 용매가 완전히 제거된 후 이를 증류수에 넣고 24 시간 동안 염을 추출하였다. 염을 추출하는 동안 추출 되지 않고 잔존하는 염의 유무를 알아보기 위하여 이온크로마토그래피 (Metrohm, Switzerland)를 이용하여 NH_4^+ 를 정량하였다. 염이 완전히 제거된 후에 이를 동결건조기에서 건조하여 진공오븐에서 보관하였다.

2-5. 천연/합성고분자 지지체의 평가

용매 캐스팅 / 염 추출법으로 제조된 지지체의 내부 다공 형태를 분석하기 위하여 주사전자현미경 (S-2250N, Hitachi, Japan)으로 관찰하였다. 주사전자현미경을 촬영하기 위해 샘플을 날카로운 칼로 측정부위를 절단하고 양면테이프를 이용하여 금속판 위에 충분히 건조된 샘플을 고정시킨 후 플라즈마 스퍼터 (SC 500K, Emscope, UK)를 이용하여 아르곤 가스 분위기 하에서 1분간 백금

으로 코팅하였다. 수은 다공도계 (Autopore II, Micromeritics, Norcross, GA)를 이용하여 다공도와 다공 크기를 측정하였다. 사용된 지지체의 질량, 측정수은체적, 수은 압력 및 최대압력은 각각 0.1 g, 6.7~7.3 mL, 3.4 KPa 및 414 Mpa이다. 수은 압력 (P)과 구멍 반지름 (r)의 관계는 다음의 Washburn 식

$$r = -2 \gamma \cos \theta \cdot P$$

에 의해서 정의된다. 여기서 γ 은 수은표면장력이며 485 dyne/cm를 사용하였으며 θ 는 수은과 고분자 표면의 접촉각인데 접촉각 측정기를 이용하여 실측한 결과 160° 이었다.

다공도 ϵ 는 다음의 식

$$\epsilon = \frac{V_i}{V_i + \frac{1}{\rho}}$$

에 의해서 정의된다. 여기서 V_i 는 전체 침투 체적이며, ρ 는 밀도를 나타낸다.

2-6. *In vivo* 에서의 골 형성

미네랄이 제거된 골분이 함유된 PLA와 PLGA 지지체를 면역성이 결핍된 누드 마우스 (athymic nude mouse)에 이식하여 골분이 함유되지 않은 지지체와 비교하였고, 간엽줄기세포가 분화된 뼈 세포를 파종한 것과 하지 않은 것을 비교하였다. 먼저 세포가 파종된 샘플의 경우 뼈 세포로 분화된 세포를 트립신-EDTA 용액으로

수확한 후 이를 담체에 $2 \times 10^6/\text{mL}$ 의 밀도로 파종하였다. 파종된 세포가 지지체에 점착되기까지 12시간 동안 세포배양기 내에서 배양하였다. 이는 세포의 점착없이 이식할 경우 대부분의 세포가 지지체에서 벗어날 수 있기 때문이다. 각 샘플이 준비된 후 흡입마취제를 이용하여 마우스를 마취한 후 등 부위의 피하를 절개하고 각 샘플을 이식하였다 (Figure 4-2). 이식된 샘플을 4주 후에 H&E와 von Kossa 염색을 하여 조직학적 소견을 평가하였다. H&E 염색을 통해 뼈 형성의 형태를 관찰하고, von Kossa 염색을 통해서 칼슘화반응을 통한 무기질 침착 여부를 관찰하고자 하였다.

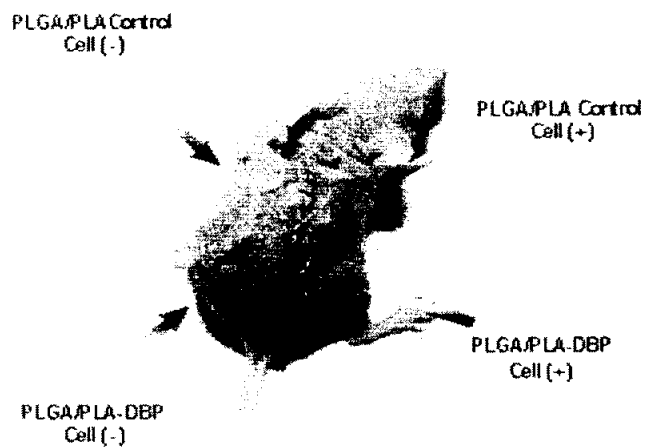


Figure 4-2. Implantation athymic nude mouse for 4 weeks of the DBP impregnated PLGA/PLA scaffolds.

3. 결과 및 고찰

3-1. 간엽줄기세포의 뼈 세포로의 분화

골수에서 분리된 간엽줄기세포는 실험실 내에서 쉽게 분리되어 많은 수로 배양되어졌다. 이는 조직공학을 통한 인공장기의 개발에 있어 매우 유용한 세포원을 제공하여 줄 수 있다는 장점을 가진다. 이 간엽줄기세포를 뼈 세포화 하기 위해 4군으로 나누어 β -글리세로포스페이트와 덱사메타손, 비타민 D3으로 처리하여 유도하였다. ALP 측정결과, Figure 4-3에서 보는 것과 같이 4군에서의 경우가 다른 군의 경우 보다 ALP 염색이 더욱 강했으며, APL 활성도도 4군에서 가장 높은 결과를 얻었다. 결과적으로 뼈 세포로 분화하기 위해서는 β -글리세로포스페이트와 덱사메타손, 비타민 D3이 모두 함유된 배양액에서 분화가 가장 우수하였다. β -글리세로포스페이트와 덱사메타손, 비타민 D3는 간엽줄기세포를 뼈 세포로 분화시키는데 매우 유용한 역할을 하는 것으로 많은 논문에서 보고되어지고 있다. 본 논문에서도 이러한 자극인자들이 뼈 세포로 분화시키는데 유용한 것을 관찰할 수 있었고, 결과적으로 모든 인자들이 모두 사용된 경우에서 가장 월등함을 알 수 있었다. 제시된 뼈 세포로의 분화 방법을 통해 골수에서 분리된 간엽줄기세포를 분화시키고 이를 본 논문에서 제시된 천연/합성 고분자 담체에 파종하여 뼈 형성 여부를 실험하였다.

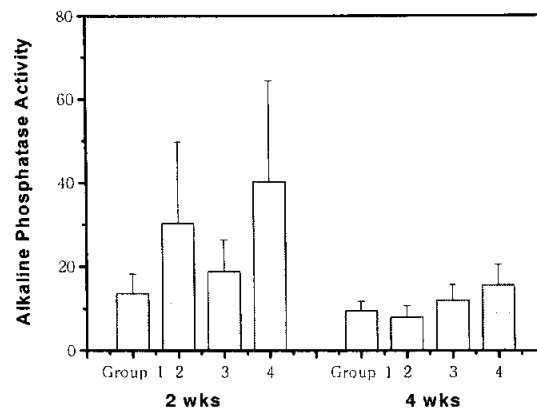
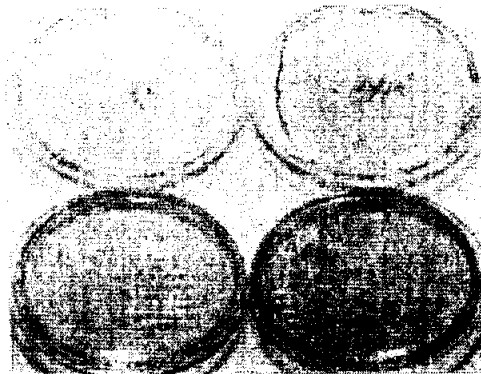


Figure 4-3. Osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells with alkaline phosphatase activity.

3-2. 천연/합성고분자 지지체의 특성결정

천연 재료인 미네랄이 제거된 골분이 함유된 고분자 지지체는 용매 캐스팅 / 염추출법에 의해서 제조되었다. 지지체의 다공도와 다공의 크기는 염의 함량과 크기에 의해 조절되었다. Figure 4-4는 골분의 함량이 0과 20, 40, 80% 함유된 PLA 고분자 지지체의 주사전자현미경 사진으로 골분의 함량이 증가할수록 지지체의 셀의 두께가 증가하는 것을 관찰할 수 있으며, 모두 일정한 다공 형태와 열린 셀을 가진 것을 관찰할 수 있다. Figure 4-5는 골분의 함유량에 따른 지지체의 다공 크기 분포도를 나타낸다. 그림에서 보는 것과 같이 골분의 함유량에 의한 다공 크기의 변화는 거의 일정하며 함유된 염의 크기와 양에 의해서 결정되어졌음을 알 수 있다. 용매 캐스팅 / 염추출법에 의해 제조된 고분자 지지체의 다공 크기와 다공도는 골분의 함유량과는 거의 상관관계가 없으며 본 연구에서는 골분의 효과를 높이기 위해 많은 양을 함유할 수 있는 성분비를 고려하여 담체를 제조하였다.

염 추출후의 지지체내의 잔존 염을 확인하기 위하여 이온크로마토 그래피로 측정한 결과를 Table 4-1에 나타내었다. 골분의 함량이 증가할수록 염의 추출이 용이하지 못한 것으로 사료된다.

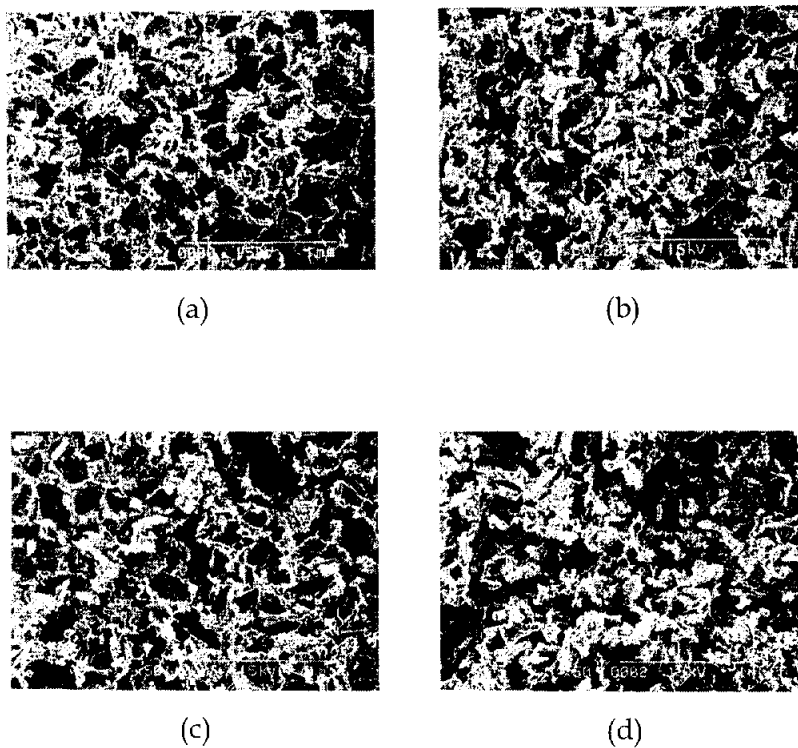


Figure 4-4. SEM microphotographs of DBP/PLA scaffolds by means of the solvent casting/salt leaching method (original magnification, $\times 50$).; (a) PLA, (b) 20% DBP, (c) 40% DBP, and (d) 80% DBP

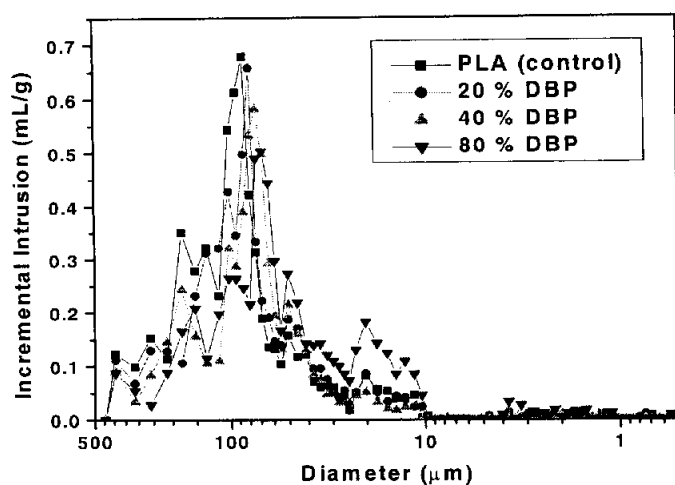


Figure 4-5. Effect of different DBP content on pore size distribution of IP/PLGA scaffolds by solvent casting/salt leaching method.

Table 4-1. Amounts of Residual Salt with Mass Loss before and after Salt Leaching Processing

leaching time (hr) DBP content (%)	6	12	24	48	unit (mg/ml)
0	1.92	no detect	no detect	no detect	
40	458	0.68	no detect	no detect	
100	762	1.62	1.40	0.22	

3-3. *In vivo*에서의 골 형성

골분이 함유된 PLA 고분자 지지체가 인공 뼈를 형성하는데 도움을 주는지를 관찰하기 위해 지지체를 이식한지 4주가 지난 뒤에 마우스의 피하를 다시 절개하여 지지체를 분리하고 분리된 지지체를 4% 포르말린 수용액으로 고정한 후 H&E 염색을 하였다. 골분이 함유된 지지체의 경우에서 뼈 세포가 파종되지 않은 지지체에서나 파종된 지지체에서나 마찬가지로 지지체를 이식한 경우에 뼈 세포가 유도되어 밀집되어 있음을 관찰할 수 있었다. 이는 골분이 함유된 지지체의 경우 뼈 형성을 유도 (osteinduction)하는 기능성을 가짐을 알 수 있다. 뼈 세포가 파종된 경우와 그렇지 않은 경우를 비교할 경우 파종된 지지체에서의 뼈 세포의 밀도가 우세했다. 뼈 세포가 파종되고 골분이 함유된 고분자 지지체에서 H&E 염색을 통해 뼈 세포의 형태를 관찰할 수 있었다 (Figure 4-6).

또, 골분이 함유된 PLGA 공중합체 지지체를 면역성이 결핍된 누드 마우스에 이식하여 골분이 함유되지 않은 지지체와 비교하였고 골수에서 분리된 줄기세포를 뼈 세포로 분화한 것을 파종한 것과 그렇지 않은 것을 비교하였다. 조직학적 소견을 평가하기 위해 H&E 염색과 von Kossa 염색을 하여 기질의 형성과 미네랄화를 확인하였다. Figure 4-7에서 보는 것과 같이 von Kossa 염색을 통해서 미네랄화가 되고 있는 것을 확인할 수 있다. 조직학적 소견 평가의 결과 뼈 세포가 파종된 것보다는 골분이 함유된 것이 뼈 형성에 유리한 작용을 하는 것으로 보아 골분이 함유된 지지체가 뼈 세포를 유도하여 뼈 형성에 유리한 조건을 만드는 것으로 사료되어 지고 이는 골분이 지지체 내에서 뼈 형성에 좋은 효과를 나타내고 있음을 확인할 수 있다.

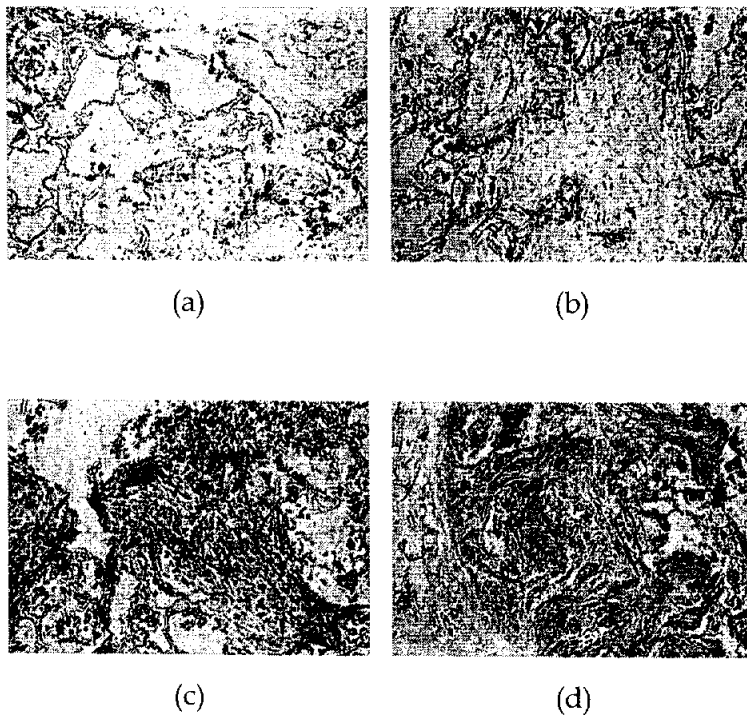


Figure 4-6. Photomicrographs of H&E histological sections of implanted (a) PLA scaffold only, (b) PLA scaffold + cell, (c) DBP-PLA scaffold, (d) DBP-PLA scaffold + cell.

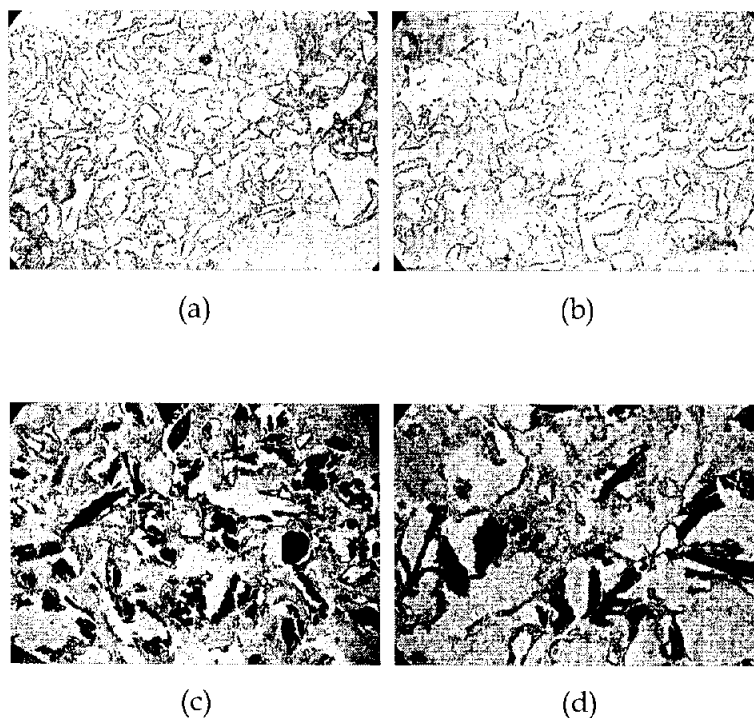


Figure 4-7. Photomicrographs of von Kossa histological sections of implanted (a) PLA scaffold only, (b) PLA scaffold + cell, (c) DBP-PLA scaffold, (d) DBP-PLA scaffold + cell.

4. 결 론

본 논문에서는 조직공학적 인공 뼈의 제조를 목적으로 하여 효과적으로 뼈 형성을 촉진하기 위해 미네랄이 제거된 골분을 합성 고분자와 복합화 하여 생분해성-다공성 고분자 지지체를 제조하였다. 고분자 지지체는 용매 캐스팅 / 염추출법을 이용하여 다공의 크기와 다공도를 효과적으로 조절하였다. 담체의 다공도는 90%이상과 다공의 크기가 80~90 μm 으로 세포의 내부로의 침투가 용이하였다. 다공과 다공 사이의 연결은 세포가 성장하기에 적합한 연결된 구조를 가지고 있었다.

현재, 조직공학용 지지체는 단백질 방출을 병행하여 보다 효과적인 지지체를 제조하는 방향으로 가는 추세이다. 그러나 단백질 (성장인자나 사이토카인류)은 그 안정성이 좋지 못하고 가격이 높기 때문에 이에 따른 문제점이 야기되기도 하다. 본 연구에서 제시된 천연 재료인 골분의 사용은 골분 자체가 뼈의 구성성분이라는 점과 골분에 함유된 뼈 형성을 촉진하는 성장인자 (예로 뼈 형성 인자인 bone morphogenic protein)로 인해 보다 효과적인 뼈 형성이 일어나는 것으로 나타났다. 이는 뼈 세포의 유도를 촉진하여 활성을 극대화 시키고 무기질 침착 등으로 신생 뼈를 형성하였다.

결과적으로, 골분이 함유된 PLA 조직공학용 지지체는 뼈의 결손과 손상의 치료에 중요한 역할을 할 것으로 사료되어 진다.

5. 참 고 문 헌

1. C. M. Agrawal, G. G. Niederauer, D. M. Micallef, and K. A. Athanasiou, *Marcel Dekker*, 2, 1055, (1995).
2. M. R. Urist, *Science*, 150, 893 (1965).
3. L. R. Higgins and M. R. Urist, *Science*, 167, 896 (1971).
4. J. Wang and M. J. Glimcher, *Calcif. Tissue Int.*, 65, 156 (1999).
5. J. Wang and M. J. Glimcher, *Calcif. Tissue Int.*, 65, 486 (1999).
6. J. Wang, R. Yang, L. C. Gerstenfeld, and M. J. Glimcher, *Calcif Tissue Int.*, 67, 314 (2000).
7. S. Mizuno and J. Glowacki, *Exp. Cell. Res.*, 227, 89 (1996).
8. C. Lasa, J. Hollinger, W. Drohan, and M. MacPee, *Plast. Resconst. Surg.*, 96, 1409 (1995).
9. S. Mizuno and J. Glowacki, *Biomaterials*, 17, 1819 (1996).

제 5장. 골다공증 치료제 이프리플라본과 생분해성

고분자를 이용한 재생의학적 인공 골 재생

1. 이론적 배경

골다공증은 뼈에 거친 경석이나 스펀지처럼 작은 구멍이 많이 나서 무르고 쉽게 부러지는 상태가 된 것을 말한다. 뼈의 크기나 용적은 같아도 뼈의 질량 자체가 매우 적어진 상태다. 이런 상태는 호르몬 질환 등 여러 질환의 증세로도 생기지만 보통은 뼈의 노화 현상으로 생긴 것이다.

뼈의 노화는 누구에게나 생기는 것이지만 연령에 비해 빨리, 그리고 심하게 생긴 경우를 말하고 이 경우 치료대상이 된다. 이 경우 작은 충격에도 골절되기 쉬우므로 주의해야 한다. 흑인보다 백인들이 더 많이 발생하는데 이는 흑인의 골의 총량이 더 많기 때문이다. 골질의 감소는 당류부신피질호르몬의 과용, 만성 간질환, 알코올 중독, hepatoren 투여 후에 나타난다 [1].

골다공증의 발생기전은 다음과 같다. ①유전적 또는 체질적 요인으로 골의 음성평형상태가 지속되어 섬세한 골격의 자질을 가지는 상태 ②골질이 정상속도로 흡수되지만 골의 형성이 부진한 상태 ③골이 정상속도로 형성되지만 골의 흡수가 증가된 상태 등이다.

골다공증은 골질의 형성보다 감소가 더 크기 때문에 뼈의 용적은 같아도 속은 비게 되는 것이다. 그 원인은 분명하지 않지만 성호르몬의 결핍, 비타민 D와 칼슘부족 등으로 추정되고 있다. 위험인자로는 노령 · 여성 · 운동부족 · 저체중 · 흡연 · 칼슘 식이(食餌) · 폐경 · 난소절제 등을 들 수 있다 [2].

치료방법은 다음과 같다. ①골질량 감소의 방지를 한다. 현재 골질의 감소를 막는 결정적인 방법은 없지만 칼슘제, 비타민 D, 에스트로겐 같은 호르몬 등 뼈를 강화하는 약물을 투여한다. ②요배통의 완화를 위한 치료를 한다. 진통제·근이완제를 투여하거나 아픈 부위를 보온하는 온열요법을 시행한다. 그러나 장기간의 안정·투약 등은 오히려 뼈와 근육을 약하게 하므로 급성기가 지나 통증이 좀 덜하면 가벼운 체조를 한다. ③골절에 대한 치료를 한다. 등뼈의 압박골절인 경우에는 2~3주일 동안의 안정이 필요하다. 팔과 다리의 부러진 뼈를 이어주는 수술이 있지만 사람에 따라 그 효과는 다르다. ④일상생활에서 주의한다. 뼈가 약해지면 엉덩방아를 찢거나, 앞으로 구부정해져서 무거운 것을 들었을 때 등뼈가 골절되는 경우가 많다. 또한 살짝 넘어져도 늑골이나 고관절, 손목뼈가 부러지는 경우가 있으므로 주의가 필요하다 [3-4].

골다공증을 치료하는 방법중의 하나인 약물 치료는 골 흡수를 방지해서 상대적으로 골형성을 촉진시키는 역할의 약물과 골 형성을 촉진시켜 상대적으로 골흡수를 억제시키는 약물 등이 있다. 골 흡수를 방지하는 약물에는 비스포스포네이트계열의 약물이 있고, 골 형성을 촉진시키는 약물에는 플라본계열의 이프리플라본이 그 치료 약물로 현재 널리 사용중이다. 이프리플라본은 골 형성을 촉진시키는 세포의 활성을 자극함으로써 새로운 골형성을 유도한다. 이에 본 연구에서는 골세포의 활성을 촉진시키는 이프리플라본과 생분해성 고분자를 이용하여 재생의학적인 인공 골의 형성을 시도하였다. 이프리플라본을 함유한 생분해성 고분자 지지체를 제조하여 여러 가지 물성을 확인하였으며 동물실험을 통하여 체내에서의 골 형성 가능성을 확인하였다 [5-8].

2. 실험

2-1. 시약 및 재료

PLGA (lactide/glicolide mole ratio, 75/25, Resomer[®] RG 756, Boehringer Ingelheim, Germany)는 평균분자량이 90,000 g/mole인 것을 사용하였다. 염화나트륨 (Orient Chem. Co., Korea)은 다공 생성 물질로 사용하였는데 본 실험에서 요구되는 크기로 선별하기 위하여 각 크기별 분자체를 사용하였다. 골다공증 치료제 이프리플라본은 동방미래화학으로부터 구입하였고 (Figure 5-1, Figure 5-2), 메틸렌클로라이드 (MC, Tedia Co. Inc., USA) 등의 모든 화학약품과 유기용매는 HPLC 등급을 사용하였다.

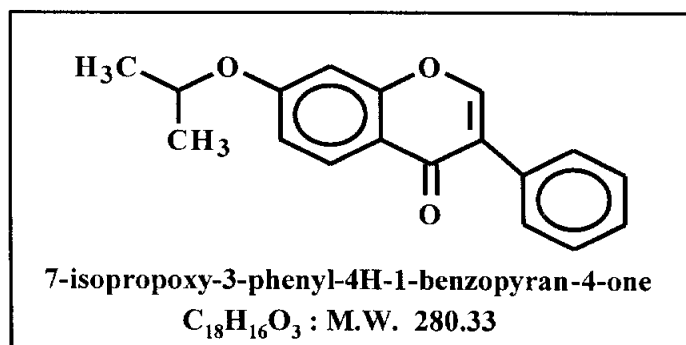


Figure 5-1. The chemical structures of ipriflavone.



(a)



(b)

Figure 5-2. Ipriflavone microphotographs of (a) SEM, (b) optical microscopy.

2-2. 용매 캐스팅 / 염 추출법을 이용한 다공성 지지체의 제조

PLGA와 이프리플라본을 MC에 일정 농도로 용해한 후 체에 의해서 선별된 염을 일정 비율로 혼합하였다. 용해된 PLGA와 염의 혼합물을 직경 15 mm 및 두께 5 mm 크기의 실리콘 몰드에 넣은 후 프레스(MH-50Y, CAP 50 tons, Japan)를 이용하여 상온에서 60 kgf/cm²의 압력으로 24시간 동안 가압하였다. 다공을 형성해 내는 물질인 염을 추출하기 위해서 초 순수에서 24시간 동안 염을 추출하였다. 30 mTorr, -55 °C 조건에서 48시간 동안 동결 건조 하였다. 잔류용매인 MC를 제거하기 위하여 최소 1주일 동안 25°C 진공오븐에서 건조시킨 후, 진공 상태에서 보관하여 실험에 사용하였다.

2-3. 이프리플라본을 함유한 다공성 지지체의 특성

상기의 방법들을 사용하여 제조한 각 다공성 PLGA 지지체의 표면, 옆면, 및 내부의 다공 형태를 분석하기 위하여 SEM (S-2250N, Hitachi, Japan)으로 관찰하였다. 면도칼로 5×5×1 mm (두께)의 크기로 절단하고 양면테이프를 이용하여 샘플 폴더에 고정시키고 플라즈마 스퍼터 (Emscope, Model SC 500K, UK)를 이용하여 200 Å 두께의 금 코팅하여 촬영한 사진으로 다공의 형태 및 크기를 확인하였다.

무정형 PLGA 고분자내에서의 이프리플라본의 결정성은 X 선회절분석기(X-ray diffractometer, XRD, D/Max-III B, Rigaku, Japan)를 사용하여 5 °/min의 속도로 2θ의 값을 0 ~ 60 °의 범위에서 측정하였다.

2-4. 수은 다공도계 분석

상기의 여러 방법들을 사용하여 제조한 다공성 PLGA 지지체의 다공 크기 분포, 비다공면적, 평균 다공직경 및 다공도를 측정하기 위하여 수은 다공도계 (Micromeritics Co., Model AutoPore I I 9220, USA)를 이용하였다. 사용된 PLGA 지지체의 질량, 측정수은체적, 수은압력 및 최대압력은 각각 0.1 g, 6.7~7.3 mL, 3.4 KPa 및 414 MPa 이었다. 수은압력 (P)과 구멍 반지름 (r)의 관계는 다음의 Washburn 식

$$r = -2 \gamma \cos \theta \cdot P \quad (2)$$

에 의해서 정의된다. 여기서 γ 은 수은표면장력으로 485 dyne/cm를 사용하였으며 θ 는 수은과 PLGA 표면의 접촉각인데 접촉각 측정기 (Model 100-0, Rame-Hart Inc., USA)를 이용하여 실측한 결과 160° 이었다.

다공도 ε 는 다음의 식

$$\varepsilon = \frac{V_i}{V_i + \frac{1}{\rho}} \quad (3)$$

에 의해서 정의된다. 여기서 V_i 는 전체 침투 체적이며, ρ 는 밀도를 나타낸다.

2-5. *in vivo* 환경에서의 이프리플라본을 함유한 지지체에서의 골 형성

in vivo 환경에서의 조직공학적 골 형성을 관찰하기 위하여 면역성이 결핍된 쥐를 이용하여 실험하였다. 생후 4주된 면역성이 결핍된 쥐의 등쪽 부분을 2~3 cm 정도 절개하고 이프리플라본이 함유된 지지체를 이식한 지 8주가 지난 후에 지지체를 4% 포르말린에 고정하였다. 고정된 지지체를 파라핀 블록을 제작한 후에 조직학적 평가를 하기 위하여 H&E 염색, type I collagen 염색 및 osteocalcin 염색 등을 실시하였다.

3. 결 과

3-1. 이프리플라본을 함유한 다공성 지지체의 제조

용매 캐스팅 / 염 추출법으로 이프리플라본을 함유한 다공성 지지체를 제조하였다. 이프리플라본은 물에 거의 녹지 않는 난용성 약물이지만 염 추출 과정 중에서 물에 의한 이프리플라본의 용해 및 염 추출시 발생할 수 있는 동반소실을 확인하였다. HPLC로 이프리플라본 정량을 한 결과, 물에 의한 용해 및 염 추출시 발생하는 동반 소실은 거의 없는 것으로 보아 이프리플라본과 같은 난용성 물질의 경우에는 용매 캐스팅 / 염 추출법으로 다공성 지지체의 제조가 가능함을 확인하였다.

3-2. 이프리플라본을 함유한 다공성 지지체의 특성

용매 캐스팅/염 추출법으로 제조한 다공성 PLGA 지지체의 전자현미경 사진으로 샘플 No. a, b, c, d, 및 e를 나타내었다 (Figure 5-5). 외형적 형태는 실리콘 몰드의 빈 공간과 똑같은 디스크 형태로 얻어졌으며, 수축, 부풀림, 불규칙한 크기의 구멍 및 여타 결함이 없는 것으로 관찰되었다. 몰드의 형태에 따라 가운데가 빈 원기둥 형태도 제조가 가능했고, 또 몰드 직경에 따라 지지체의 직경도 조절이 가능했고, 두께 역시 조절이 가능함을 알 수 있었다. 지지체의 내부, 옆면의 다공 구조는 샘플 No a, b, c, d 및 e에서는 다공과 다공 사이의 연결이 양호하고 대부분이 열린 셀 구조를 하고 있는 것으로 나타났다. 하지만 지지체 표면의 다공 구조는 거의 모든 샘플에서 대부분 닫힌 셀 구조를 나타내었다. 그 이유는 지지체의 내부 및 옆면과는 달리 표면은 몰드에서 받는 직접적인 압력

으로 인해 다공이 약간 눌린 듯한 모양이 나타났다. 그러나 조직세포가 성장하여 내부로 이행하는 데는 문제가 없을 것으로 예측된다.

난용성 약물 이프리플라본의 무정형 고분자 지지체내에서의 결정적 특성을 알아보기 위해 XRD로 결정성을 분석한 결과 무정형 고분자 지지체내에서는 이프리플라본이 가지는 고유한 특성 피크를 관찰하지 못했다. 이는 무정형 고분자에 의해 이프리플라본이 포접되어서 지지체내에서의 결정성은 나타나지 않는 것으로 사료된다. 일반적으로 이프리플라본과 같이 난용성이면서 결정성 약물은 체내 흡수율이 아주 낮고 생체이용률이 저조한 것으로 보고되고 있다. 그러나 본 실험에서 디자인한 지지체의 경우는 이프리플라본을 무정형 고분자로 싸고 있기 때문에 체내 분해도 용이하고 무정형 고분자의 분해에 따른 약물의 서방성 방출이 일어날 것으로 기대하여 지지체내부의 간엽줄기세포를 오랜시간 충분히 간엽줄기세포를 자극하여 골 세포로 분화 유도를 촉진할 것으로 사료된다 (Figure 5-6).

3-3. 수은 다공도계 분석

수은다공도계로 다공도 및 다공 크기를 분석한 결과, 샘플 No. a 경우에는 (다공도 91.7 %, 다공 크기 100.5 μm), 샘플 No. b 경우에는 (다공도 82.3 %, 다공 크기 116.3 μm), 샘플 No. c 경우에는 (다공도 87.1 %, 다공 크기 140 μm), 샘플 No. d 경우에는 (다공도 84.8 %, 다공 크기 147 μm), 샘플 No. e 경우에는 (다공도 79.8 %, 다공 크기 123.1 μm)의 결과를 얻었다. 이프리플라본 함량이 지지체의 다공 크기와 다공도의 증감에는 영향을 주지 않는 것으로 사료된다 (Table 5-1, Figure 5-4).

Table 5-1. Processing Variables and Properties of IP/PLGA Scaffolds by means of Solvent Casting/Salt Leaching Method

sample No.	IP content (%)	ratio of (polymer : salt)	salt size (μm)	median pore diameter (μm)	porosity (%)
a	0	1 : 9	250 ~ 355	100.5	91.7
b	10			116.3	82.3
c	20			140	87.1
d	30			147	84.8
e	50			123.1	79.8

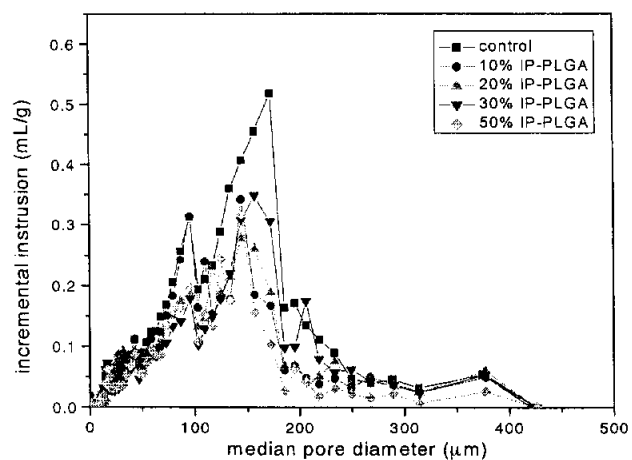


Figure 5-3. Effect of different IP content on pore size distribution of IP/PLGA scaffolds by solvent casting/salt leaching method.

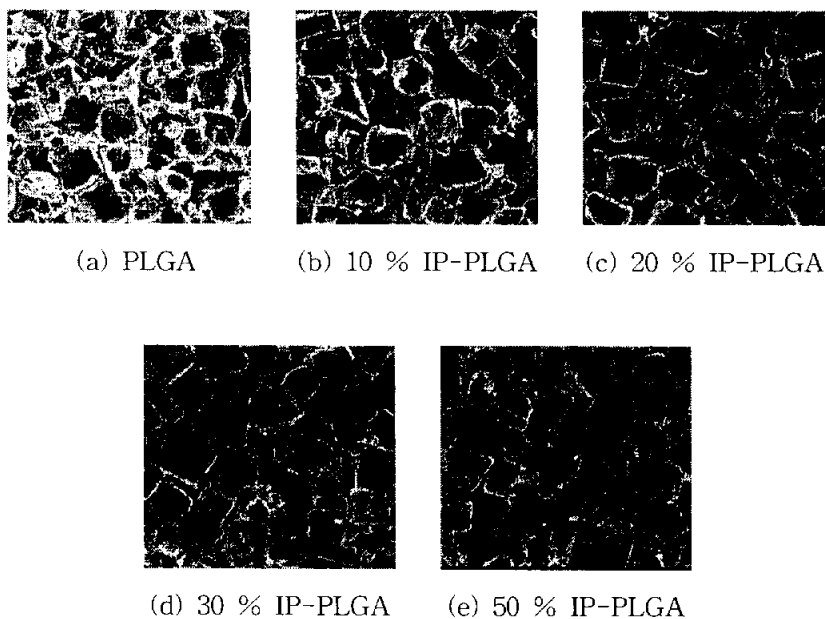
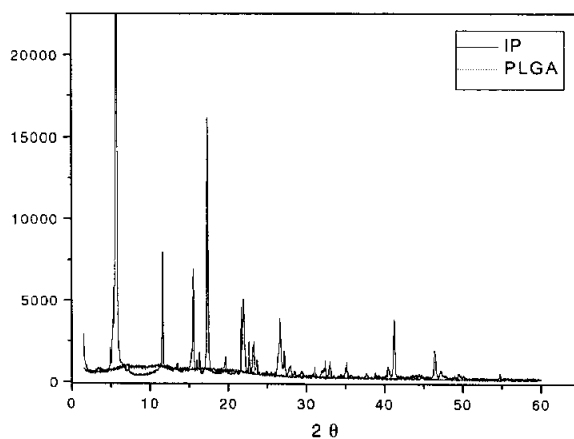
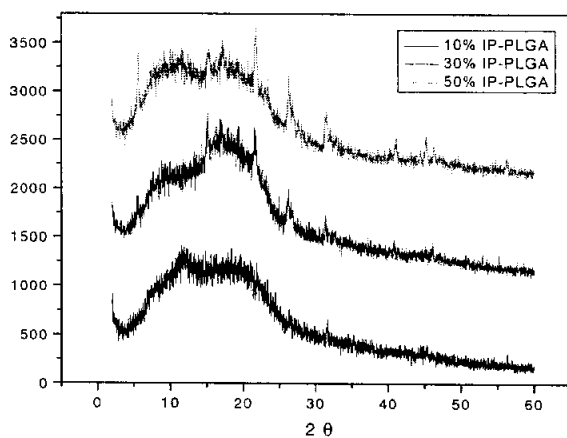


Figure 5-4. SEM microphotographs of IP/PLGA scaffolds by solvent casting/salt leaching method. (cross section, original magnifications $\times 50$)



(a)



(b)

Figure 5-5. X-ray diffractions of patterns (a) IP and PLGA, (b) 10% IP-PLGA, 30% IP-PLGA and 50% IP-PLGA.

3-4. 이프리플라본을 함유한 지지체내에서의 골형성에 관한

조직학적 평가

이프리플라본이 함유된 PLGA 고분자 지지체가 조직공학적 골 형성에 도움을 주는지를 관찰하기 위해 지지체를 이식한지 8 주가 지난 뒤에 마우스의 피하를 다시 절개하여 지지체를 분리하고 (Figure 5-7) 분리된 지지체를 4% 포르말린 수용액으로 고정한 후 H&E 염색하였다. 이프리플라본이 함유된 지지체의 경우에서 뼈 세포가 유도되고 밀집되어 있음을 관찰할 수 있었다. 이는 이프리플라본이 함유된 지지체의 경우 뼈 형성을 유도 (osteinduction)하는 가능성을 가짐을 알 수 있다. H&E 염색 결과 뼈를 형성할때와 유사한 조직학적 소견 평가의 결과를 얻을 수 있었다 (Figure 5-8). 그리고 뼈 조직에만 선택적으로 발현되는 type I collagen 염색을 통해서 type I collagen의 선택적 발현을 확인할 수 있었다 (Figure 5-10). osteocalcin 염색을 통해서 뼈 조직을 형성할 때 생성되는 알카라인 포스파타제 효소의 선택적 발현을 확인할 수 있었다 (Figure 5-9). 피하층에 이식된 116.3~147 μm 다공을 통하여 피하층의 간엽줄기줄기세포들이 이동하여 지지체 내부에 정착하여 증식하였다고 사료되어 진다. 일부는 증식을 하고 나머지 일부는 지지체내에서 이프리플라본이 서서히 서방화 되어 미분화된 간엽줄기세포를 뼈 세포로의 분화를 촉진하는 작용을 한 것으로 사료된다. 결론적으로 이프리플라본이 함유된 지지체가 직접적으로 뼈를 형성할 수 있는 성장인자와 뼈 형성 단백질 등과 마찬가지로 뼈 형성에 도움을 주는 작용을 함으로서 기존의 합성고분자 담체보다 우수한 효과를 가져오는 것이라 사료되어 진다.

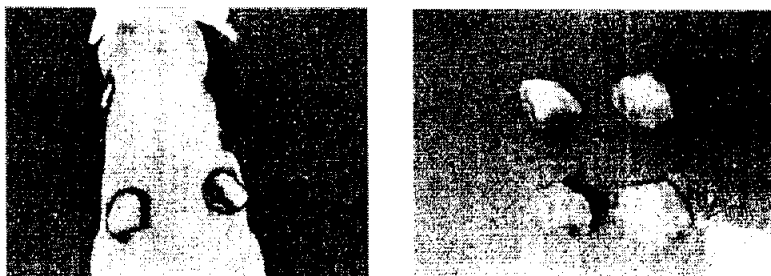


Figure 5-6. After 8 weeks, Photographs of implanted IP/PLGA scaffolds,



(a)



(b)



(c)



(d)

Figure 5-7. Photomicrographs of H&E histological sections of implanted,
 (a) PLGA scaffold only ($\times 100$), (b) IP-PLGA scaffold ($\times 100$),
 (c) PLGA scaffold only ($\times 400$), (d) IP-PLGA scaffold
 ($\times 400$)

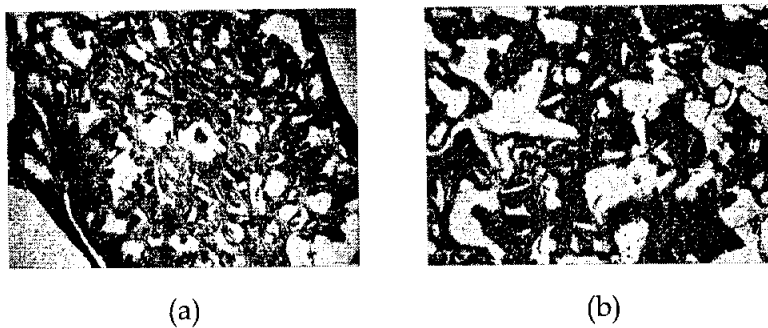


Figure 5-8. Photomicrographs of osteocalcin histological sections of implanted, (a) IP-PLGA scaffold ($\times 40$), (b) IP-PLGA scaffold ($\times 200$)

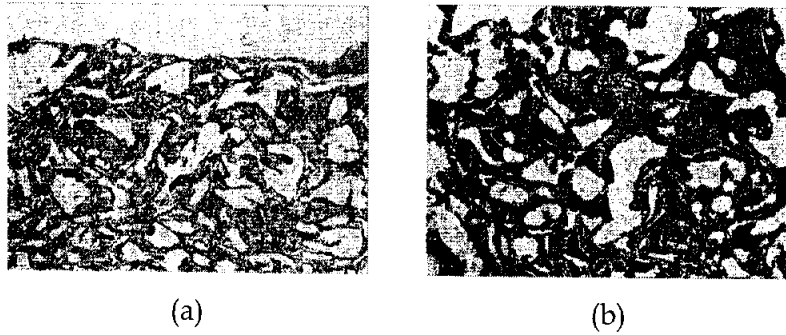


Figure 5-9. Photomicrographs of type I collagen histological sections of lanted. (a) IP-PLGA scaffold ($\times 40$), (b) IP-PLGA scaffold ($\times 200$)

4. 결 론

재생의학적, 생체조직공학적 골 재생을 하기위하여 PLGA와 이프리플라본을 이용하였다. 이프리플라본을 함유한 지지체는 다공도와 다공 크기 등이 아주 우수하였고, 무정형 고분자로 결정성 난용성 약물을 포접함으로써 지지체내에서의 결정성을 낮출수 있었고, 약물 전달의 서방화로 일정기간 지속적인 효과를 전달 할 수 있을 것이며 H&E 염색, osteocalcin 염색, collagen type I 염색을 통해서 실제 골 조직과 유사한 임상병리학적 소견을 얻을 수 있었다.

이프리플라본은 다른 단백질이나 성장인자 및 천연에서 추출한 재료에 비해서 지지체로의 제조가 용이하였고, 우수한 물성을 얻을 수가 있었다. 단백질이나 성장인자처럼 시간에 따른 변성, 사용상의 부주의, 고가 및 FDA로부터의 승인 등의 문제가 없었고, 기존에 여러 연구에서 제기한 골 재생법보다 훨씬 골 재생의 효과면이나 재료 획득의 용이성, 윤리적 문제 및 실제임상응용으로의 가능성 등이 훨씬 우수한 방법으로 사료된다.

5. 참 고 문 헌

1. E. Henri, *Eur. J. Radiology*, **20**, 165 (1995).
2. D. John, *Maturitas*, **23**, 193 (1996).
3. J. A. Kanis, *Clin. Therap.*, **23**, 1409 (2001).
4. J. W. Thomas and K. D. Marc, *Metabolism*, **50**, 912 (2001).
5. R. Civitelli, *Calcified Tiss. Intern.*, **61**, 12 (1997).
6. R. Civitelli, S. A. Abbasi-Jahromi, L. R. Halstead, and A. D. Dimarogonas, *Calcified Tiss. Intern.*, **56**, 215 (1995).
7. K. Notoya, and K. Yoshida, *Bone*, **16**, 349 (1995).
8. M. Martini, and L. Formigli, *Calcified Tiss. Intern.*, **63**, 312 (1998).

Papers

1. Sang Jin Lee, Young Moo Lee, Gilson Khang, In Young Kim, Bong Lee, and Hai Bang Lee, "Effect of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Surface with Different Wettability on Fibroblast Behavior", *Macromolecular Research*, 10(3), 150-157 (2002).
2. Gilson Khang, John M. Rhee, Philkyung Shin, In Young Kim, Bong Lee, Sang Jin Lee, Young Moo Lee, Hai Bang Lee, and Ilwoo Lee, "Preparation and Characterization of Small Intestine Submucosa Powder Impregnated Poly(L-lactide) Scaffolds: The Application for Tissue Engineered Bone and Cartilage", *Macromolecular Research*, 10(3), 158-167 (2002).
3. In Young Kim, Ji Wook Jang, Sang Jin Lee, Gilson Khang, Bong Lee, and Hai Bang Lee, "Preparation and Characterization of Porous Scaffold by Novel Paraffin Particles Leaching Method", *Macromol. Chem. Symp*, 15(4), (2002).
4. In Young Kim, Ji Wook Jang, Sang Jin Lee, Gilson Khang, Bong Lee, Il Woo Lee, and Hai Bang Lee, "Effect of Bone Induction for Ipriflavone Loading PLGA Scaffold", *Polymer (Korea)*, Submitted (2002).
5. Gilson Khang, In Young Kim, Ji Wook Jang, Sang Jin Lee, Bong Lee, Il Woo Lee, and Hai Bang Lee, "Effect of Novel Natural/Synthetic Hybrid Scaffold of the Osteogenesis and Chondrogenesis Mesenchymal Stem Cell", *Tissue Engineering*, in preparation (2002).

6. In Young Kim, Ji Wook Jang, Gilson Khang, Bong Lee, Il Woo Lee, and Hai Bang Lee, "Effect of Wettability Improvement and Sterilization according to Plasma treated Polymeric Porous Scaffold", *Macromolecular Research*, in preparation (2002).

Presentations

1. 최명규, 강길선, 김인영, 이종문, 이봉, 이해방, "Characterization and *In Vivo* Study of Demineralized Bone Particle Impregnated PLA Scaffolds for the Osteoinduction in Tissue Engineering", 한국 고분자학회 춘계 학술 대회, April, 13-14, 2001, 서울, 한국.
2. 전은경, 김인영, 강길선, 이봉, 이종문, 이해방, "Controlled Release of Transforming Growth Factor β_1 from Biodegradable Polymer Microspheres for Cartilage Regeneration", 한국 고분자학회 춘계 학술 대회, April, 13-14, 2001, 서울, 한국.
3. 김인영, 이상진, 강길선, 이봉, 이영무, 이일우, 성진형, 이해방, "Evaluation of Demineralized Bone Particle Impregnated Poly(α -hydroxy acid) Scaffolds and Osteogenic Differentiation of BMSCs for Tissue Engineered Bone", 한국 생체재료학회 추계 학술대회, September, 21-22, 2001, 부산, 한국.
4. 김인영, 이상진, 강길선, 이봉, 이영무, 이일우, 성진형, 이해경, 이해방, "Osteogenic Differentiation in Porous DBP-contained Polymer Scaffolds Induced Bone Marrow Stromal Cells and *In Vivo* Study Characterization", 한국 고분자학회 추계 학술대회, October, 12-13, 2001, 순천, 한국.
5. 이상진, 신필경, 김인영, 강길선, 이영무, 이봉, 이일우, 이해방, "The Role of Bone Marrow Stromal Cells in SIS-impregnated Polymeric Scaffolds for Tissue Engineered Bone and Cartilage", 한국 고분자학회 추계 학술 대회, October, 12-13, 2001, 순천, 한국.
6. 김인영, 강길선, 성진형, 이일우, 이해경, 이상진, 이해방, "Tissue

- Engineered Bone Induction Using DBP Impregnated Polymer Scaffolds and Osteogenic Differentiation of BMSCs", 대한 정형외과연구학회 추계 학술대회, November 19, 2001, 서울, 한국.
7. 이상진, 신필경, 김인영, 강길선, 이영무, 이봉, 이일우, 이해방, "Evaluation of Small Intestine Submucosa/Poly(lactide-co-glycolide) Scaffolds for Tissue Engineered Bone", 한국 고분자학회 춘계 학술대회, April 12-13, 2002, 서울, 한국.
 8. 김인영, 장지욱, 이상진, 강길선, 이봉, 이일우, 성진형, 이해방, "Demineralized Bone Particle Impregnated PLGA Scaffolds and Osteogenic Differentiation of BMSCs for Tissue Engineered Bone *In Vitro* Study", 한국 고분자학회 춘계 학술대회, April 12-13, 2002, 서울, 한국.
 9. 김인영, 장지욱, 안태균, 이상진, 강길선, 이봉, 이영무, 이해방, "Bone Formation of Bone Marrow Stromal Osteoprogenitor Cells in Ipriflavone Loaded PLGA Scaffold: Characterization and *In Vivo* Study", 한국 고분자학회 춘계 학술 대회, April 12-13, 2002, 서울, 한국.
 10. 김인영, 신필경, 이봉, 강길선, 이해방, Yasuhiko Iwasaki, Kazuhiko Ishihara, "Fabrication of Poly(MPC-co-EHMA)/Poly(L-lactide-co-glycolide) Scaffold", 한국 고분자학회 춘계 학술 대회, April 12-13, 장지욱, 2002, 서울, 한국.
 11. 김인영, 유제영, 이봉, 강길선, 이일우, 이해방, "Preparation and Characterization Pamidronate-impregnated PLGA Scaffold for Tissue Engineering", 한국 조직공학회 연구논문 발표회, May 4, 2002, 대전, 한국.
 12. Gilson Kang, In Young Kim, Sang Jin Lee, Bong Lee, Il Woo Lee, John M. Rhee, Hai Bang Lee, "Effect of Novel Natural/Synthetic

Hybrid Scaffold on the Osteogenesis and Chondrogenesis Mesenchymal Stem Cell", 29th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, July 22-25, 2002, Seoul, Korea.

13. 장지욱, 김인영, 이상진, 강길선, 이봉, 이해방, "파라핀 분말 추출법을 이용한 새로운 다공성 지지체의 제조 및 특성", 한국 생체재료학회 추계 학술대회, September 27-28, 대구, 한국.
14. 김인영, 장지욱, 신필경, 강조아, 강길선, 이봉, 이해방, "Wettability Improvement and Sterilization of Polymeric Porous Scaffold by Plasma Treatment", 한국 고분자학회 추계 학술 대회, October 11-12, 군산, 한국.
15. 김인영, 장지욱, 이상진, 강길선, 이봉, 이영무, 이일우, 한창환, 이해방, "Effect of Bone Induction for Ipriflavone Loading PLGA Scaffold", 한국 고분자학회 추계 학술 대회, October 11-12, 군산, 한국.
16. 김인영, 장지욱, 신필경, 이상진, 강길선, 이봉, 이영무, 이해방 "Preparation and Characterization of Porous Scaffold by Novel Paraffin Particles Leaching Method", 한국 고분자학회 추계 학술 대회, October 11-12, 군산, 한국.
17. 장지욱, 김인영, 이상진, 강길선, 이봉, 이해방, "Preparation and Characterization of Novel Porous SIS-impregnated Alginate Scaffold", 한국 고분자학회 추계 학술 대회, October 11-12, 군산, 한국.
18. Il Woo Lee, In Young Kim, Ji Wook Jang, Bong Lee, Gilson Khang, Chang Whan Han, Hai Kyong Lee, Sang Jin Lee, Hai Bang Lee, "Effect of Bone Induction for Ipriflavone Loading PLGA Scaffold", 5th Annual Meeting of the Tissue

Engineering Society International, December 8-10, 2002, Kobe,
Japan.

Patents

1. 이해방, 강길선, 이일우, 이상진, 김인영, 신필경, 최진산, 강조아, 조직공
학용 천연/합성 생분해성 하이브리드 담체 및 이의 제조방법, 출원
2002.06.19. 출원번호 2002-0034336

Projects

1. PLGA와 hydrogels을 이용한 고효율 약물전달 system개발 및 실용화 2001/01/01~2001/09/30
2. 반도체 공조용 활성탄소 합성 및 응용 2001/10/01~2001/10/31
3. 신경재생재료 및 줄기세포 응용기술 개발 2001/11/01~2002/08/31
4. PLGA와 hydrogels을 이용한 고효율 약물전달 system개발 및 실용화 2002/09/01~2002/09/30