

생분해성 고분자를 사용한 다공성 구조 지지체

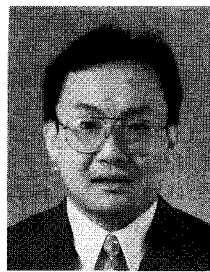
박 태 관 · 윤 준 진

1. 서 론

현대 사회의 급격한 생활 양식 변화에 의한 각종 질환은 매년 증가 추세에 놓여 있다. 특히 이러한 질환 등은 대부분 신체의 여러 가지 장기의 손상을 유발하는 경우가 대부분이다. 또한 각종 재해 등에 의한 신체의 손상은 사회 문제로까지 일컬어지고 있는 실정이다. 이에 따라서 발달된 의학의 도움으로 각종 신체 장기의 이식이 활발해 지고 있으나 장기 기증자의 부족에 의한 이식 대기자의 증가는 날로 심화되고 있다. 그 예로 골다공증의 경우 국내에 약 200만명의 환자가 있는 것으로 추정되고 있으며 매년 100만명 이상이 뼈나 연골 이식수술을 기다리고 있다. 미국의 경우에도 7-800만명의 환자가 보고되었다. 또한 미국의 경우에만 현재 조직이나 장기의 이식에 소요되는 비용은 연간 4,000 억불정도가 소요되고 신체의 장기 중 생명 유지에 필수적인 간의 경우에도 연간 200,000명의 환자가 발생하나 30,000명의 환자가 죽고, 다만 3,000명의 환자가 간이식을 받을 뿐이다. 이러한 외국의 통계로 볼 때, 현재 우리나라에서의 상황은 더욱 어려울 것으로 예측되고 있다. 그에 따라 대두된 분야가 생체조직공학으로서 이는 손상된 생체조직의 복원을 위하여 적절한 담체에서 조직 세포를 체외 배양하여 실제의 장기와 유사한 구조와 기능을 가진 인공 조직을 형성하고 이를 체내에 이식하여 생체내의 결손된 장기나 조직을 재생하거나 대체하고자 하는 분야이다.

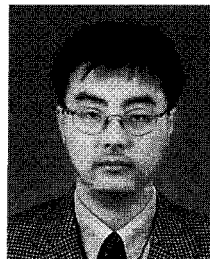
생체조직공학의 성공적인 개발을 위해서는 체내에서 분리된 조직 세포를 체외에서 삼차원 구조를 가

진 조직의 형태로 재구성하기 위한 지지체가 필수적인 요소이다. 이를 위하여 종래에는 기능성 장기인 간이나 췌장을 이루는 세포를 갈슘-알지네이트 등의 하이드로 겔에 고정화하여 체내에 이식하는 방법을 취하여 왔으나 최근에는 생체적합성의 생분해성 고분자를 사용하여 스펀지형태의 다공성 지지체(porous scaffold)를 제조하여 조직 세포를 지지체에 포집하여 삼차원 구조의 세포/지지체 복합체를 체내에 이식하고자 하는 연구가 진행되고 있다.¹ 이렇게



박태관

1980 서울대학교 공업화학(학사)
1983 한국과학기술원 생물공학과(석사)
1990 Univ. of Washington(의공학 박사, 생체재료전공)
1990~ MIT 화학공학과(Post-Doc.)
1991 Temple Univ. 조교수
1992~ 1995 중앙대학교 생물공학과 부교수
1995~ 1996 한국과학기술원 생물공학과 부교수
현재



윤준진

1997 중앙대학교 생물공학과(학사)
1999 중앙대학교 생명공학과(석사)
1999~ 한국과학기술원 생물공학과
현재 인턴연구원

Porous Scaffolds Using Biodegradable Polymers

한국과학기술원 생물공학과(Tae Gwan Park and Jun-Jin Yoon, Department of Biological Science, Korea Advanced Institute of Science and Technology, 373-1 Kusong-dong, Yusong-ku, Taejon 305-701, Korea)

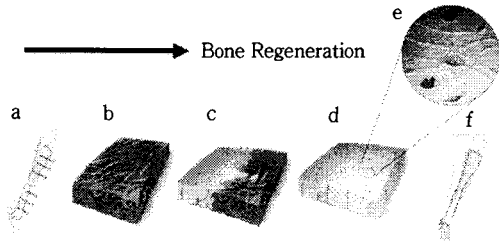


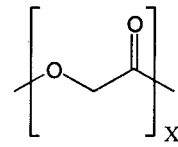
그림 1. 생분해성 다공성 지지체에 주입된 조직 세포를 이용한 골조직의 재생 과정.²⁵

생체분해성 다공성 지지체를 사용하여 만든 삼차원의 인공 조직을 체내에 이식할시 예상되는 장점은 그림 1에서 보였듯이, 체내 이식 초기에는 이식된 조직 세포들이 신체내에서 사멸하지 않고 본래의 기능을 유지하는 기반을 제공한다. 그리고 시간이 경과함에 따라서 생분해성 고분자는 점차 소멸하고 신체 내부에 충분히 적응한 이식 세포만으로 구성된 자연 조직과 동일한 형태와 기능을 지닌 인공 조직을 형성할 수 있게 된다.¹ 따라서 최근 활발히 연구 중인 다공성 지지체는 조직 세포가 흡착하여 성장 및 분화하여 조직으로서의 기능을 발휘할 수 있도록 적절한 구조와 재료의 개발에 주안점을 두고 있다. 이를 위한 생체적합성 재료로는 금속, 세라믹, 그리고 고분자들을 들 수 있는데, 현재는 천연 및 합성 고분자를 조직 세포배양용 표면재료로서 가장 많이 사용하고 있다. 그리고 높은 밀도의 세포접착을 가능하게 하는 큰 표면적과 생체내로의 이식이후에 혈관의 형성 및 영양분, 성장인자, 호르몬 등의 물질 전달을 가능하게 하는 큰 공극의 크기와 공극들 사이의 높은 상호연결성을 가지고 있어야 한다.

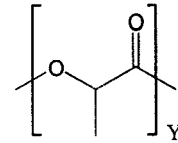
이와 같은 조건을 충족하는 다공성 지지체를 개발하기 위한 다양한 연구가 대학제간에 이루어지고 있으며, 본 논고에서는 생분해성 고분자를 사용한 다공성 지지체의 개발에 대한 이해를 돕고자, 생체조직공학에 이용하기 위하여 개발 중인 다양한 다공성 지지체의 제조와 그 응용에 대하여 기술하고자 한다.

2. 생분해성 고분자

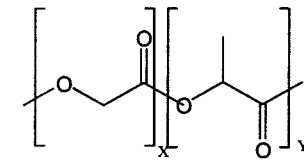
생분해성 고분자는 생체내에서 서서히 화학적 분해가 일어나면서 그 형태와 무게가 점차 소멸되는 고분자를 총칭하는 것으로서, 천연고분자로는 콜라겐, 젤라틴, 키토산, 하이아론산 등을 다공질성의 스



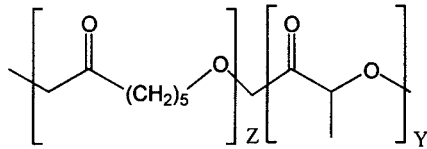
PGA



PLA



PLGA



Poly (D,L-lactide-co-ε-caprolactone)

그림 2. 다공성 지지체에 사용되는 대표적인 생분해성 고분자들.

폰지로 가공하여 사용하였으나 이들 재료는 그 자체로는 기계적 강도가 매우 약하여 화학적 가교의 방법으로 강도를 높여 사용한다. 이들 다공성 재료는 보통 동결건조의 방법으로 만들어지는데 급냉시의 물결정의 생성속도와 결정 크기가 건조후의 공극의 형태 및 크기에 영향을 미치게 된다. 합성 고분자로는 poly(lactic acid), poly(glycolic acid) (PGA), poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA)와 그 유사 공중합체들과 poly(ε-caprolactone), polyanhydrides, polyorthoesters 등이 있다(그림 2). 천연 생분해성 고분자가 인위적으로 생분해속도를 조절하기 어려운 것에 비해서 이들 고분자는 단량체의 조성을 조절함에 의해서 생분해속도를 조절할 수 있는 장점이 있다(표 1).^{2,3}

PLGA족 고분자는 지방족 폴리에스테르로서 젓산(lactic acid)과 글리콜산(glycolic acid)이 에스

표 1. 생분해성 고분자의 단량체 조성에 따른 분해 시간

고 분 자	약 어	분해 시간 (달)
Poly(L-lactide)	PLLA	18-24
Poly(D,L-lactide)	PDLA	12-16
Poly(glycolide)	PGA	2-4
Poly(D,L-lactide-co-glycolide, 50:50)	PLGA 50:50	2
Poly(D,L-lactide-co-glycolide, 75:25)	PLGA 75:25	6
Poly(D,L-lactide-co-glycolide, 85:15)	PLGA 85:15	10
Poly(D,L-lactide-co-caprolactone)		2

테르 결합으로 서로 연결되어 있다. 이들 고분자는 분해하여 젖산과 글리콜산으로 분해되어 생체내의 대사산물로 전환되어 결국 이산화탄소와 물로서 체외 배설되는 완전 생분해성이고 우수한 생체적합성을 지니고 있다. 이러한 생체재료로서의 장점을 이용하여 체내 흡수용 수술용 봉합사로서 오래 전부터 사용되어 왔고, 근래에는 펩타이드나 약물들의 지속성 약물전달용 담체로서 널리 사용되고 있다.⁴ 그리고 이 고분자는 미국 식품보건안전원(FDA)의 승인하에 장기간에 걸쳐 의료용 재료로 사용된 체내 이식용 고분자로도 알려져 있다. 상용화된 생체조직공학용 다공성 지지체로서는 Advanced Tissue Science사에서 상용화에 성공한 인공피부의 지지체인 세포 점착용 망상구조물이 있다.

2.1 생분해성 고분자의 생체적합성

다공성 지지체의 재료로 고려되는 생체고분자의 생체적합성은 개발된 지지체의 임상적용에 있어서 중요한 요소이다. 시험동물의 재료이식 부위 주변의 조직학(histological)과 병리학적(pathological) 검사에 의하여 일차 판단하고, 더 나아가 재료에 대한 면역학적(immunological), 암 유발성(carcinogenic, teratogenic, and mutagenic), 그리고 혈액적합성(thrombogenic)에 대한 이식 거부 반응을 고려하여 결정된다.²⁷ 비분해성 고분자를 생체에 이식하는 경우에는 이식 기간 중에 (1) 재료에서 유출되는 불순물이 없어야 하고, (2) 화학적으로 무반응이어야 하고, (3) 기계적으로 안정한 최소한의 조건을 만족시켜야 한다. 반면에 분해성 고분자를 사용하는 경우, 재료와 국부 조직간의 상호작용을 최소화하여야 하고 재료의 화학적 분해에 따른 분해산물의 안정성을 검토하여야 한다.

앞서 언급한 PLA나 PLGA를 device로 제조하여 생체내에 이식한 경우, 그 분해산물들은 신체내의 생화학적인 대사과정을 거쳐 최종적으로 ATP,

이산화탄소, 물로 전환된다. 이들 생분해성 고분자는 분해가 진행됨에 따라 약한 염증반응(inflammatory responses)과 국부적인 foreign-body giant cell (FBGC) 반응을 일으키는 것으로 알려져 있으나 분해산물 농도의 감소에 따라 그 조직 반응도 감소하는 것으로 나타났다. 대체적으로 PLA나 PLGA는 다른 분해성, 비분해성의 고분자와는 달리 생체적합한 분해성 고분자 재료로 인식되어 있다. 그러나 분해가 진행되면서 생기는 산물인 젖산의 양이 갑자기 늘어 날 경우의 낮은 pH가 조직의 재생에 문제가 될 수 있고, 분해 과정이 진행되면서 수반되는 분해가 매우 느린 결정화 입자의 생성은 foreign body 염증을 수반하는 경우가 있다.

2.2 생체조직공학용 재료로서의 생분해성 고분자

생체조직공학에 응용되는 생분해성 고분자는 그 조직 세포의 표면점착과 세포의 증식 분화가 효과적으로 유도될 수 있는 성질이 요구된다. 또한 다공성 지지체 내에서 배양되는 세포에 유익한 생리활성물질(표 2)을 적극적으로 공급하는 방법이 연구되기도 한다. 일반적으로 표면의 친수성을 증가시키기 위해 생분해성 고분자 표면처리를 하거나 세포외기질(ECM) 단백질인 collagen, fibronectin, vitronectin 등을 고분자 표면에 흡착시켜 세포의 점착을 유도하는 방법이 널리 이용되고 있다.⁵ 후자의 경우, 표 3에서와 같이 여러 가지 방법으로 각종 생리활성 물질을 고정화하거나 봉입하기도 한다. 특히, 고분자 표면의 특이한 화학적 관능기에 의한 친수성/소수성과 그에 따른 표면에너지 분포 및 표면의 굴곡, 매끈한 정도와 상분리된 도메인의 존재 등에 따라 세포점착 유도 단백질들의 흡착의 정도, 배열구조 등이 세포의 점착기능을 결정한다. 이러한 관점에서 볼 때, 생체재료의 생체적합성은 사실 재료표면에 따른 단백질 흡착층의 형성의 차이와 세포와의 상호작용에 의한 것이다. 이에 따라 세포의 점착, 퍼짐, 분화의 작용이 달리 일어나게 된다. 최근에는 적극적으로 세포의 점착을 유도하기 위하여 고분자 재료표면에 직접 세포점착 펩타이드 아미노산 서열인 arginine-glycine-aspartic acid(RGD)기를 갖는 올리고펩타이드를 고정화시킴으로 세포의 점착과 퍼짐을 크게 증대시켰다. 이때 고정화된 펩타이드의 밀도가 중요한 변수로 작용하게 되는데, 그 표면밀도에 따라 세포의 퍼짐과 펩타이드 수용체가 모이지고(clustering), 세포의 골격(cytoskeleton)의 형성이 일어나는 것을 관찰하였다. 그 후 생체재료의 표면에 세포점착

표 2. 생체고분자에 고정화되거나 봉입되는 생리활성물질의 예²⁷

Proteins/Peptides	Drugs
Enzymes	Antithrombogenic agents
Antibodies	Anticancer agents
Antigens	Contraceptives
Cell adhesion molecules	Drug antagonists
"Blocking" proteins	Peptide, protein drugs
Saccharides	Ligands
Sugars	Hormone receptors
Oligosaccharides	Cell surface receptors
Polysaccharides	(peptides, saccharides)
	Avidin, biotin
Lipids	Nucleic acids, nucleotides
Fatty acids	Single or duple-stranded
Phospholipids	DNA, RNA(e.g., antisense
Glycolipids	oligonucleotides)
Other	
Conjugates or mixtures of the above	

표 3. 생리활성물질의 고정화법²⁷

Physical Adsorption van der Waals Electrostatic Affinity Adsorbed and cross-linked
Physical "entrapment" Barrier systems Hydrogels Dispersed(matrix) systems
Covalent Attachment Soluble polymer conjugates Solid surfaces Hydrogels

기능을 갖는 올리고펩타이드의 고정화를 이용한 생체인식 적합성 재료에 대한 연구가 많이 진행되었다. PLGA는 생분해성 고분자로서 고분자 사슬이 에스테르 결합으로 연결되어 있다. 그러므로 고분자 주쇄에 펩타이드의 결합이 어렵다. 고분자 주쇄의 말단기에 존재하는 하이드록실기나 카복실기는 반응성이 있는 관능기이어서 세포접착 펩타이드의 공유 결합이 가능하지만 재료로 가공할 경우 표면에 노출되는 펩타이드의 밀도는 낮으리라 예상된다. 세포조직공학용 재료는 앞에서 언급하였듯이 재료표면이 생체적합성을 결정하기 때문에, 표면이 아닌 재료내

부의 펩타이드의 수식은 필요가 없다. 따라서 PLGA의 표면개질에 의한 여러 펩타이드의 선택적 표면고정화가 현재 활발히 연구되고 있다. 새로운 반응성 관능기의 도입은 플라즈마나 오존 등에 의한 PLGA 표면개질에 의해서 이루어질 수 있다. 그러나 다공성의 생체재료일 경우 공극내부에는 플라즈마 이온이나 라디칼의 침투가 어려워 내부 공극의 표면처리가 어려운 단점이 있다.

3. 다공성 지지체의 제조

생분해성 고분자를 간, 연골, 뼈 등의 생체조직 재생용 재료로 사용하여야 하는 경우, 재료의 생분해성, 생체적합성 이외에도, 각각 hepatocytes, chondrocytes, osteoblasts의 점착과 분화가 원활히 이루어질 수 있는 최대의 공극률과 상호연결성이 우수한 공극 구조를 지닌 다공성의 3차원 고분자 지지체의 제조가 필요하다. 이는 세포의 점착에 필요한 표면적을 제공할 뿐만 아니라 세포외기질의 재생을 위한 공간의 확보, 그리고 체외 배양에서 원활한 산소와 영양소의 공급을 위한 효과적인 물질전달을 위하여 필요하다.

일정 수준의 기계적 강도를 유지하도록 일정 범위의 크기를 갖는 공극이 골고루 분포하는 구조의 다공성 지지체가 바람직하며 이러한 다공성 지지체의 공극율과 공극의 크기는 조직 세포의 공극 내부로의 침투와 성장에 큰 영향을 미친다. 뼈의 재생의 경우 조직의 침투는 지름 150 μm 이상의 공극에서 일어나는 것으로 알려져 있다. Fibroblast는 50 μm 정도의 공극에서 지지체 내부로의 생장이 최적인 것으로 보고되었다. 더욱이 생체이식시 조직의 재생에 필요 불가결한 혈관의 형성(vascularization)도 공극의 크기에 따라 영향을 크게 받는다. 하지만 PLGA와 같은 분해가 되는 고분자를 세포의 점착에 사용할 경우, 분해에 따른 국부적인 낮은 pH 환경의 조성과 그에 따른 세포의 기능에 대하여는 여전히 의문으로 남는다. 간세포의 경우 현재까지는 비교적 짧은 기간동안에서 세포점착 효과나 특정 세포기능 및 대사산물을 정량함으로써 PLGA가 간 조직 재생에 사용될 수 있다는 가능성을 보인 것에 불과하다.

3.1 PGA Fiber Mesh

섬유상의 매트릭스는 높은 공극률과 더불어 단위 부피당 최대의 표면적을 지니게 된다. 이것은 조직

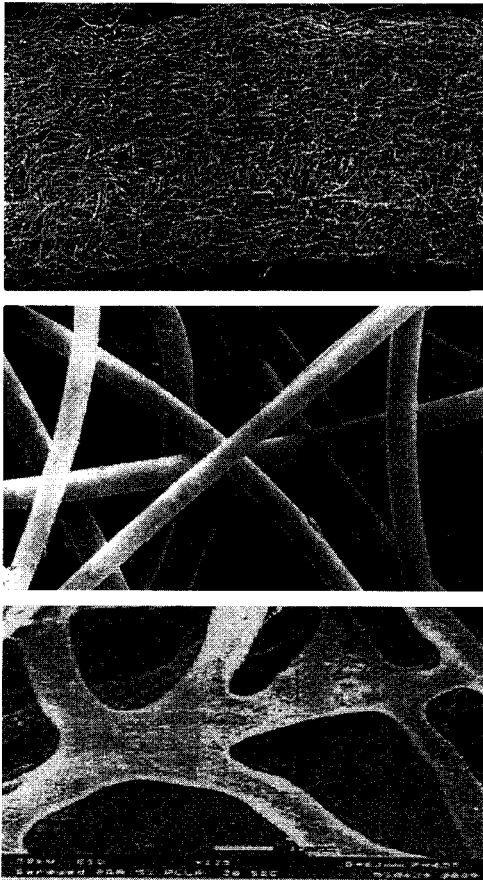


그림 3. Nonwoven PGA fiber mesh로 제조된 다공성 지지체와²⁵ mesh표면을 PLLA 용액으로 코팅하여 보강한 다공성 지지체.

세포를 고밀도로 배양할 수 있는 표면적을 제공하며, 배양시에도 원활한 물질 교환을 기대할 수 있는 구조이다.²⁶ 이러한 이유로 현재 가장 많이 사용되는 다공성 지지체는 PGA 봉합사로 이루어진 지지체이다. 그림 3에서처럼 무작위적으로 풀어진 봉합사의 가닥들을 열처리하여 삼차원적 형태를 구성한 것으로 매우 높은 공극률과 공극의 크기 및 공극 사이의 상호연결성을 갖추고 있으나, 기계적 강도가 매우 약해 그 응용이 제한되어왔다.⁶

이러한 점을 보완하기 위하여 PLLA나 PLGA 50 : 50을 유기 용매에 용해 후 mesh에 분무하여 PLLA나 PLGA로 코팅된 형태의 지지체를 사용하기도 하였다.⁷ 이 방법을 통해서 PGA의 표면에 분사된 PLLA 용액이 건조됨에 따라 봉합사의 교차지점이 접합되어 PGA fiber mesh의 전반적인 기계

적 강도를 증진시키거나 sheet형태의 fiber mesh를 재료로 하여 튜브 등의 3차원적인 형태로 변경할 수 있다(그림 3). 그러나 표면코팅에 의한 단위 부피당 표면적의 감소와 PLLA나 PLGA에 의해서 조직 세포의 점착과 분화가 PGA fiber mesh와 다른 점이 고려되어야 한다. 또한 코팅된 생분해성 고분자의 두께에 따라서 지지체의 강도와 생분해속도가 상이하게 변화하는 문제점이 있다. 이 방법으로 Mooney 등은⁷ PGA fiber mesh의 기계적 강도를 증가시킨 것으로 보고하였다.

3.2 염침출법 (Solvent-casting/Particulate leaching Technique)

다공성 지지체는 여러 방법으로 제조될 수 있다. PGA fiber mesh이외의 다공성 지지체 제조에 이용되는 여러 가지 생분해성 합성고분자 중에서 PLGA의 큰 장점으로는 생체적합성이나 생분해성 이외에 쉬운 가공성을 들 수 있다. PLGA는 필름, 원통, 중공사, 미립구 등의 모양으로 디바이스를 유기용매를 사용하거나 혹은 용융 상태에서 제조할 수 있다. PLGA족 고분자를 이용하여 가장 쉽게 할 수 있는 다공성 지지체의 제조는 염침출법이다. 그림 5에서와 같이 생분해성 고분자를 메칠렌클로라이드와 같은 용매에 용해한 후 NaCl의 결정을 혼합하고 주물에 주입하여 용매를 제거한다. 최종적으로 수용액에서 고분자/염 복합체 상의 염결정을 침출, 제거하여 완성하는 방법으로, 염결정의 크기와 혼합 비율을 조절함으로써 원하는 공극의 크기와 공극률을 갖는 다공성 구조를 손쉽게 얻을 수 있다.

그리고 Mikos 등은⁸ 본 방법 중에 열처리를 첨가하여 PLLA의 결정화도를 조절하기도 하였다. 클로로포름에 녹인 PLLA와 NaCl 결정을 혼합하고 건조하여 PLLA의 녹는점 이상으로 가열한 후, 냉각속도를 조절하여 PLLA의 결정화도를 조절할 수 있음을 확인하였다. 그러나 본 방법은 그림 5에서와 같이 염결정의 형태에 따라서 공극의 형태가 결정되므로 지지체의 전반적인 표면이 거친 형상을 가지게 되며 제조방법이 기본적으로 고분자 막을 제조하는 방법인 solvent-casting법을 응용하였기 때문에 용매를 제거하는 과정에서 다공성 지지체 표면에 두꺼운 표피층이 형성(그림 4의 왼쪽)되어 공극이 차단된다. 또한 두꺼운 지지체를 만드는 경우 내부의 염결정의 침출이 원활하지 못해 잔류 염결정이 존재하는 단점을 안고 있다. 이러한 단점은 조직 세포의 주입과 배양을 저해하는 문제를 야기한다.⁹

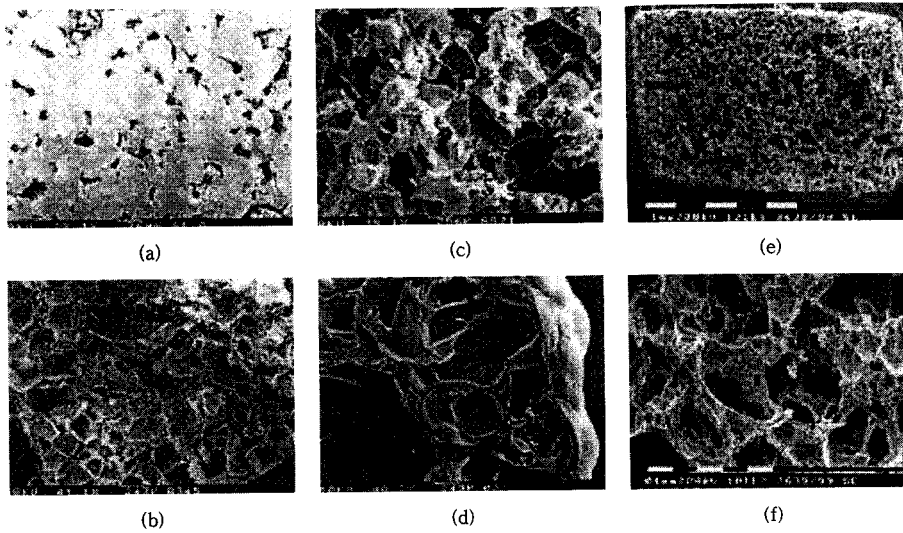


그림 4. 염침출법 (a, b) 과 고압기체팽창법 (c, d)¹⁷, 염발포법 (e, f) 으로³⁰ 제조한 다공성 지지체의 주사 전자현미경 사진.

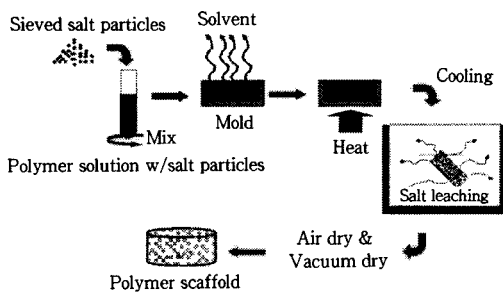


그림 5. 염침출법의 도식.

3.3 고압기체팽창법 (High Pressure Gas Expansion)

생분해성의 합성고분자를 사용하여 제조하는 다공성 지지체의 경우, 일반적으로 고분자를 유기용매에 용해하여 다공성 지지체를 제조한 후 용매를 동결 건조나 진공 건조로 제거한다. 그러나 잔류용매가 있을 경우 지지체에서 배양되는 조직 세포나 체내 이식 부위에 심각한 손상을 야기할 수 있다. 또한 유기용매는 펩타이드나 단백질 계열의 약물의 변성을 초래한다.¹⁶ 따라서 유기용매의 사용을 배제한 합성고분자 다공성 지지체 제조가 연구되었다.

Mooney 등은¹⁶ 이 문제의 해결을 위하여 생분해성 고분자를 주형에 넣고 압력을 가해 펠렛을 만들어 T_m 이나 T_g 이상의 열을 가한 후, 매트릭스내에 가스가 포화될 때까지 고압의 CO_2 가스를 생분해성 고분자에 주입한 후 서서히 압력을 낮추어서 매트릭스내의 CO_2 가스가 방출되어 공극을 형성할 수 있는

방법을 보고하였다(그림 4의 d). 고분자 용액에 포화되는 가스의 농도에 의해서 공극을 조절할 수 있고, 유기용매를 사용하지 않는다는 장점이 있으나, 상호연결성이 약한 형태의 공극이 형성되어 세포의 주입이 어려운 점이 있다. Harris 등은¹⁷ 그림 6과 같은 고압기체팽창법과 염침출법을 혼합한 방법으로 개방된 형태의 공극을 형성하고 염침출법과 유사한 방법으로 공극의 크기와 공극률을 조절할 수 있었다. 또한 염침출법의 문제점으로 지적되어 온 두터운 표피층이 형성되지 않는다는 장점을 가지고 있다(그림 4의 c).

3.4 염발포법 (Gas Foaming/Salt Leaching)

염침출법은 다른 지지체 제조법에 비해서 공정이 단순하고 공극률이나, 공극의 크기를 조절하기 쉽다는 이점이 있으나 언급한 바와 같이 두터운 표피층의 형성과 잔류 염결정에 의한 문제점들이 있다. 생체조직공학용으로 다공성 지지체를 이용하기 위해서는 일정한 기계적 강도를 유지할 수 있도록 적절한 재료의 선택과 균일한 공극 분포를 갖는 지지체 구조가 요구된다. 일반적으로 다공성 지지체 제조에 널리 이용되는 무정형의 PLGA는 결정형 고분자에 비해서 기계적 강도가 약한 것으로 알려져 있다. 따라서 PLGA로 제조된 다공성 지지체 역시 상대적으로 강도가 약한 문제점을 안고 있다. 이 문제는 다른 생분해성 고분자와 공중합을 하여 생분해성 고분자의 물성을 조절하는 방법 등으로 경감할 수 있다. 그리고 공극의 크기와 분포가 균일한 벌집 모양의

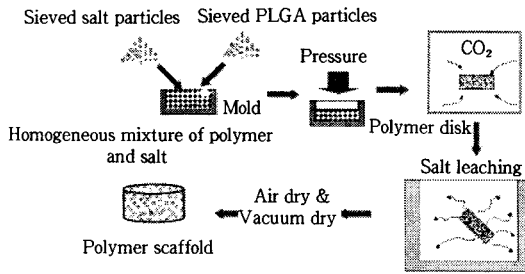


그림 6. 고압기체팽창법과 염침출법을 병용하는 다공성 지지체 제조법.¹⁷

구조물이 높은 기계적 강도를 유지할 수 있다는 것은 익히 알려진 사실이다. 염침출법으로부터 파생된 방법들은 일반적으로 불균일한 구조를 가지게 되어 기계적 강도가 일정하지 않은 문제를 안고 있다.¹⁷ 고압기체팽창법이나, 염발포법은 염침출법에 비하여 균일한 구조의 지지체를 제조 가능하게 하여 지지체의 기계적 강도를 향상시키는 것으로 보고되었다.

Park 등은^{18,29,30} 염침출법의 단점으로 지적되어온 문제점을 해결하고자 산화-환원 반응에 의해 가스 발포가 발생하는 발포성 염을 사용하는 방법을 새롭게 제시하였다. 산성 수용액이나 고온의 물과 반응하여 이산화탄소와 암모니아 가스로 분해되는 암모늄 바이카보네이트 결정 입자를 혼합한 생분해성 고분자 용액으로 매트릭스를 만들어 유기용매를 일부 제거한 후, 염입자를 이산화탄소와 암모니아 가스로 분해하여 발포시켜 제거하는 방법이다(그림 7).^{29,30} 염침출법과 마찬가지로 혼합되는 염결정의 입자크기와 양에 의해서 공극의 크기와 공극률이 조절되는 방법이다. 그러나 기존의 염침출법과 달리 유기용매가 완전히 제거되지 않은 겔상의 생분해성 고분자와 염결정의 복합체를 이용하므로 주형을 이용하지 않고도 원하는 형태의 디바이스를 제조할 수 있는 장점을 가지고 있다.^{18,30} 또한 고분자/염 복합체 겔상의 발포과정은 가스의 팽창력과 고분자 겔의 신축성을 이용하므로 공극간의 상호연결성이 우수하고 표피층이 형성되지 않는 다공성 지지체를 형성할 수 있다(그림 4의 e, f). 이 방법은 현재 여러 가지 조직 세포들을 사용하여 체외 배양 및 조직 재건에 이용되고 있다.

3.5 상분리법(Phase Separation)

염침출법 이외의 방법으로는 상분리법에 의한 다공성 지지체 제조가 연구되었다. 지지체 자체가 약물전달담체로서의 역할을 하여 조직 세포의 증식과 분화에 영향을 미치는 각종 인자들을 공급할 수 있

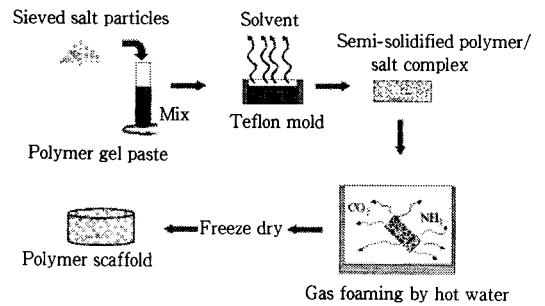


그림 7. 발포성 염을 사용한 다공성 지지체 제조법의 도식.

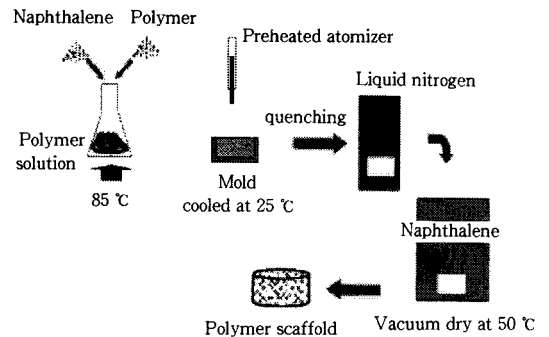


그림 8. 상분리 현상을 이용한 다공성 지지체의 제조.

도록 하는 것이 목적으로,¹¹ 그림 8과 같이 생분해성 고분자를 유기용매에 용해한 후, 나프탈렌과 같은 승화성이 있는 물질을 혼합하여 용융시킨 후, 승화에 따른 상분리에 의하여 다공성의 지지체를 제조하였다. 이 방법은 고분자 용액의 냉각속도에 의해서 승화성 물질의 승화를 조절함으로써 공극의 크기를 조절할 수 있음을 보였으나(그림 9), 조직 세포를 공극내로 주입하여 배양하기에는 작은 크기의 공극이 형성되는 문제점이 있다. 또한 약물전달의 담체로서 저분자량의 성장인자들은 비교적 효과적으로 봉입이 가능한 것으로 확인하였으나, 단백질과 같은 고분자량의 약물은 높은 봉입 효율을 얻기 어려운 것으로 알려져 있다.¹²

최근에는 두 개의 용매를 사용하여 PLGA를 가용화시킨 후, 온도를 상승시켜 두 개의 용매 상에서 PLGA의 상분리를 유도하므로 다공성의 구조를 갖는 PLGA를 제조하였다.¹³⁻¹⁵ 다공성 구조는 PLGA를 두 개의 용매에 녹인 후 급냉한 온도에 의한 두 용매의 상분리 현상(한 용매는 온도가 감소함에 따라서 고분자에 대해서 불용성이 되나 다른 한 용매는 가용성을 나타내며, 이를 spinodal decomposi-

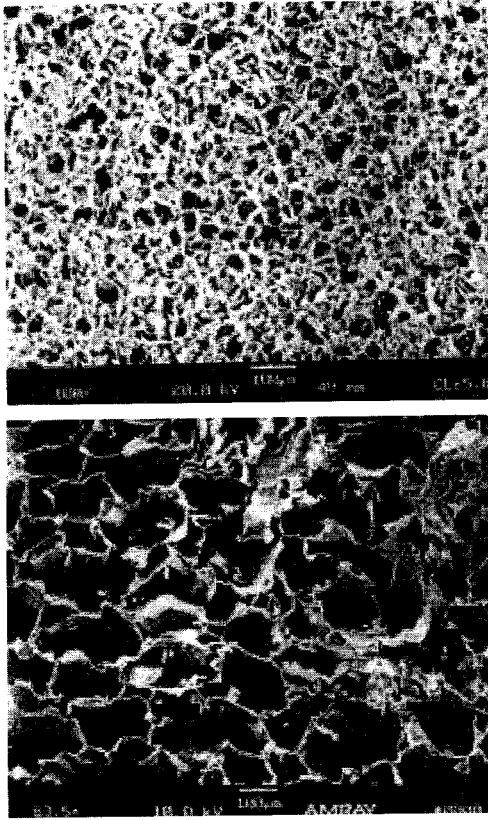


그림 9. 상분리현상을 이용하여 제조한 다공성 지지체의 주사전자현미경 사진.¹²

tion이라 한다)을 이용하여 다공성의 구조를 갖는 지지체를 제조한다. 이 때 다공성의 구조는 생분해성 고분자의 종류 및 농도, 사용되는 용매의 종류, 냉각속도 그리고 건조시의 용매제거속도 등에 의해서 결정된다.

3.6 유화동결건조법(Emulsion Freeze-drying)

최근에는 물/유기용매 유화 방법에 의한 지지체의 제조도 보고되었다.¹⁰ 상분리법이나 유화동결건조법, 고압기체팽창법 등은 다공성 지지체에 조직 세포 배양이나 지지체의 체내 이식시 효과를 발휘하는 약물의 봉입이 가능한 방법이라는 공통점이 있다. 이는 다공성 지지체 내부에서 배양되는 조직 세포가 생장하거나 분화되지 못하고 괴사하거나 탈분화하는 문제점을 해결하고, 체내에 이식된 세포의 생존과 조직으로서의 기능을 수행하는데 필수적인 모세혈관의 형성 등을 유도하기 위한 성장인자를 적극적으로 공급하여 체외에서 재생된 인공 조직의 성공 가능성을 증진하기 위함이다.²⁷

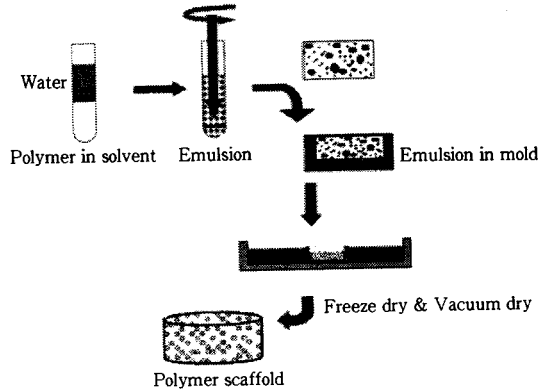


그림 10. 유화동결건조법을 사용한 다공성 지지체의 제조방법.

유화동결건조법은 그림 10에서처럼 일정한 점도와 농도의 생분해성 고분자 용액과 물을 사용한 에멀전을 제조하여 주형에 주입한 후 동결건조법으로 유기용매와 물을 제거하는 방법이다.²² 다공성 지지체의 공극의 크기와 공극률은 에멀전의 제조시 발생하는 요소들(고분자 용액의 점도와 농도, 물과의 혼합정도 등)을 조정함으로써 결정된다. 또한 혼합되는 물 대신 여러 가지 성장인자나 단백질의 수용액을 사용하여 효과적으로 다공성 지지체내에 약물을 봉입할 수 있을 것으로 예상된다. Whang 등은¹⁰ 공극간의 상호연결성에 대해서는 언급된 바가 없는 상태로 이 방법을 통해서, 90% 이상의 공극률과 균일한 범위내에서 공극의 크기를 조절할 수 있는 것으로 보고하였다. 그러나 이 방법은 공극간의 상호연결성이 낮아 세포 주입시 원활한 효과를 얻지 못할 것으로 예상된다.

이상의 방법들은 세포의 점착과 분화를 유도할 수 있는 삼차원적 고분자 지지체를 제조하기 위한 것들이나, 아직까지 생체분해성 고분자로 삼차원 조직재 생용 지지체를 만드는 방법에는 많은 문제점들이 남아있으며, 현재 Advanced Tissue Science나 Texas Biotechnology 등에서 PGA 봉합사를 이용하여 소규모로 생산되는 제품외에는 상품화가 이루어지지 못하고 있다.

4. 생분해성 다공성 지지체를 이용한 조직 세포의 배양

다공성 지지체내에 조직 세포를 주입하여 배양할 경우 고려할 점은 되도록 고밀도 세포 배양이 가능

한 배양 기술과 조직 세포가 지지체내에 균일하게 분포할 수 있는 세포 주입기술의 확립이다. 이 두 가지 점은 언급한 바와 같이 다공성 지지체의 공극 간의 상호연결성과 공극의 크기 등에 크게 좌우되며 이외에도 지지체의 형태나 크기 등이 중요한 요인으로 작용한다. 조직 세포를 다공성 지지체내에 주입하는 방법은 크게 static seeding과 dynamic seeding으로 나누어 진다(그림 11). Kim 등은¹⁹ PGA fiber mesh를 사용하여 static, stirred, agitated method간의 조직 세포 주입 효율을 평활근 세포(smooth muscle cell)를 이용하여 비교하였다. 세포의 주입효율은 세포의 종류와 지지체의 형태에 따라 상이한 결과를 야기할 수 있으나, dynamic seeding에 의한 세포 주입이 보다 효과적인 것으로 보고되고 있다. 이는 현탁상의 조직 세포와 다공성 지지체의 표면의 접촉이 적극적으로 일어나는 반면에 정적의 세포 주입은 다공성 지지체의 한쪽 면에 집중적으로 세포가 주입됨에 따라 공극내로의 세포 주입이 원활하지 못한 것으로 알려져 있다. 다공성 지지체에 조직 세포를 주입시 또 다른 문제는 지지체의 두께가 커질수록 주입효율이 낮아지는 것이다. 알려진 바로는 두께 5 mm내외의 다공성 지지체는 spinner flask를 사용한 stirred method를 사용한 경우에만 효율적으로 세포가 주입되는 것으로 확인되고 있다.²⁰ 이로 인해 다공성 지지체를 사용하여 여러 가지 형태와 크기를 갖는 조직 대체물을 제작하는데 어려움을 겪고 있다.

MIT의 Lisa Freed와 Robert Langer 등은^{21,22} 상품화된 봉합사 PGA 섬유가닥을 여러 가공과정을 거쳐 제조한 97% 다공성 지지체에 소의 무릎에서 추출한 chondrocytes를 생체 외에서 점착시켜 삼차원적으로 배양 후, 콜라겐과 glycosaminoglycan의 시간에 따른 증가를 통해 연골조직의 재생의 가능성을 확인하였다. 더 나아가 토끼의 무릎 관절에서 분리한 chondrocytes를 생체 외에서 배양하여 다시 다른 토끼의 연골조직이 파손된 무릎관절에 이식한 경우(allografts)에도 연골조직의 재생 및 지지체의 형태가 유지된 상태로 세포외기질이 형성된 것으로 관찰됨으로써 타가 이식에 의한 관절조직 회복이 가능함을 보고하였다. 이러한 경우에 있어서 지지체내의 조직 세포가 증식함에 따라 물질 전달 효율이 감소하는 것이 관찰되었다.¹ 현재는 이를 방지하기 위한 관류형의 생물반응기를 설계하여 운용한 결과가 보고되고 있다.^{22,23} 뼈의 손상 부위의 조직재생을 위

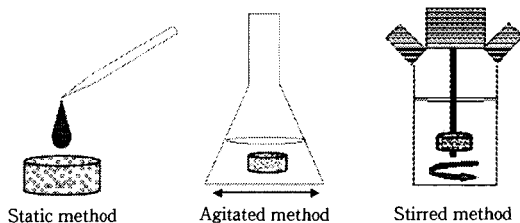


그림 11. 조직 세포를 생분해성 다공성 지지체에 주입하는 방법들.¹⁹

한 연구로는 osteoblasts의 세포를 점착·이식시켜 뼈조직의 회복을 시키는 동시에 지지체의 분해에 이어지는 소멸로 인한 조직재생도 보고되었다. 그 외에 신경세포의 재생에는 파손된 신경세포가 한 방향으로 성장하도록 유도하여 주는 nerve cell guide로서 PLGA를 이용한 관(tubular)형의 template 지지체들도 선보이고 있다.^{24,25}

5. 결 론

앞장에서 알 수 있듯이 생분해성 고분자를 생체 재료로 이용한 생체조직의 재생 연구에는 여러 분야의 다학제간의 연구가 필요하다. 고분자 재료를 원하는 모양과 다공성의 스펀지 형태의 지지체 제조를 위해서는 고분자 물리 및 가공에 대한 이해가 필요하며 이러한 고분자 재료의 표면을 개질하거나 표면의 물리화학적 구조를 원자 수준에서 규명하고 새로운 생리 활성 펩타이드나 단백질 분자를 접합시키기 위해서는 고분자의 합성 및 유기합성과 표면 분석화학의 분야가 필요하다. 좋은 예로 최근의 반도체 제조공정에서 사용하는 photolithography의 원리를 이용하거나 엑시머 레이저로 재료표면을 미세하게 가공하여 재료의 표면을 2차원적인 요철을 주는 micropatterning 하여 세포의 점착 및 성장이 한 방향으로만 지향하게 하는 연구가 있다. 이러한 나노-기술의 응용은 전자 공학과 같은 타분야에서 각광받는 기술이 생체조직공학에서도 병용될 수 있다는 중요한 예가 되겠다. 또한 조직 세포의 배양은 영양소 및 산소의 확산과 물질전달 등의 공학적 지식을 바탕으로 삼차원적인 세포 배양이 요구되기에 생물화학공학의 도움이 필요하다.

세포생물학이나 분자생물학의 지식도 최근에는 많이 필요하게 되었는데, 최근에는 재료표면의 친수성, 특정 관능기, 그리고 매끈한 정도 등의 성질이 세포

의 점착, 퍼짐, 성장 및 분화에 어떤 영향을 주는가를 세포내의 대표적인 세포외기질 단백질인 fibronectin과 세포골격 단백질인 actin의 합성에 관여하는 DNA나 RNA의 양을 유전자 증폭 PCR을 통하여 정량화함으로써 재료의 표면이 어떠한 신호 전달 과정을 거쳐 세포내의 생리활성에 어떤 영향을 주는가 하는 근본 문제에 대하여 연구하고 있다. 마지막으로 중요한 분야는 의사들의 몫으로 세포-조직체의 디바이스를 생체내로 이식하였을 경우의 생체내에서의 적합성과 장기간에 걸친 이식으로 인한 조직의 반응, 면역학적 적합성, 염증 등의 생체현상을 검증하고 재생된 조직의 생체기능에 대한 검토가 이루어져야 한다.

이러한 관점에서 볼 때, 생체조직공학은 한 분야의 전공 전문가가 모든 일을 다 할 수 있는 독립적 연구분야는 아니다. 따라서 우수한 고분자 합성 기술과 공정의 개발과 더불어 다양한 연구 분야의 연구인력들이 생체조직공학 분야에서 서로 협력한다면 훌륭한 연구성과를 거둘 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. D. J. Mooney, L. Cima, R. Langer, L. Johnson, L. K. Hansen, D. E. Ingber, and J. P. Vacanti, *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.*, **252**, 345 (1992).
2. T. G. Park, *J. Controlled Release*, **30**, 161 (1994).
3. T. G. Park, *Biomaterials*, **16**, 1123 (1995).
4. T. G. Park, W. Lu, and G. Crotts, *J. Controlled Release*, **33**, 211 (1995).
5. Y. S. Nam, Y. J. Yoon, J. Lee, and T. G. Park, *J. Biomaterials Science, Polymer Edition*, in press (1999).
6. A. G. Mikos, Y. Bao, L. G. Cima, D. E. Ingber, J. P. Vacanti, and R. Langer, *J. Biomed. Mater. Res.*, **27**, 183 (1993).
7. D. J. Mooney and R. Langer, *Biomaterials*, **17**, 115 (1996).
8. A. G. Mikos, G. Sarakinos, S. M. Leite, J. P. Vacanti, and R. Langer, *Biomaterials*, **14**(5), 323 (1993).
9. A. G. Mikos, A. J. Thorsen, L. A. Czerwonka, Y. Bao, R. Langer, D. N. Winslow, and J. P. Vacanti, *Polymer*, **35**(5), 1068 (1994).
10. K. Whang, C. H. Thomas, K. E. Healy, and G. Nuber, *Polymer*, **36**, 837 (1995).
11. H. Lo, M. S. Ponticello, and K. W. Leong, *Tissue Eng.*, **1**, 15 (1995).
12. H. Lo, S. Kadiyala, S. E. Guggino, and K. W. Leong, *J. Biomed. Mater. Res.*, **30**, 475 (1996).
13. Ch. Schugens, V. Maguet, Ch. Grandfils, R. Jerome, and Ph. Teyssie, *J. Biomed. Mater. Res.*, **30**, 449 (1996).
14. Y. S. Nam and T. G. Park, *Biomaterials*, **20**, 1783 (1999).
15. Y. S. Nam and T. G. Park, *J. Biomed. Mater. Res.*, **47**, 8 (1999).
16. D. J. Mooney, D. F. Baldwin, N. P. Suh, J. P. Vacanti, and R. Langer, *Biomaterials*, **17**, 1417 (1996).
17. L. D. Harris, B. S. Kim, and D. J. Mooney, *J. Biomed. Mater. Res.*, **42**, 396 (1998).
18. Y. S. Nam, J. J. Yoon, and T. G. Park, *J. Biomed. Mater. Res. (Applied Biomaterials)*, in press (1999).
19. B. S. Kim, A. J. Putnam, T. J. Kulik, and D. J. Mooney, *Biotechnol. Bioeng.*, **57**, 46 (1998).
20. G. Vunjak-Novakovic, B. Obradovic, I. Martin, P. M. Bursac, R. Langer, and L. E. Freed, *Biotechnol. Prog.*, **14**, 193 (1998).
21. L. E. Freed and G. Vunjak-novakovic, *Biotechnol. Bioeng.*, **46**, 306 (1995).
22. L. E. Freed, A. P. Hollander, I. Martin, J. R. Barry, R. Langer, and G. Vunjak-novakovic, *Exp. Cell Res.*, **240**, 58 (1998).
23. J. M. Pollok, D. Kluth, R. A. Cusick, H. Lee, H. Utsunomiya, P. X. Ma, R. Langer, C. E. Broelsch, and J. P. Vacanti, *Eur. J. Pediatr. Surg.*, **8**, 195 (1998).
24. M. S. Widmer, P. K. Gupta, L. Lu, R. K. Meszlenyi, G. R. D. Evans, K. Brandt, T. Savel, A. Gurlek, C. W. Patrick Jr., and A. G. Mikos, *Biomaterials*, **19**, 1945 (1998).
25. D. J. Mooney, A. G. Mikos, R. A. Pederson, M. J. Lysaght, P. Aebischer, N. Parenteau, R. Langer, and J. P. Vacanti, *Scientific American*, **April**, 37 (1999).
26. "Principles of Tissue Engineering", eds. by R. P. Lanza, R. Langer, and W. L. Chick, p. 225, Academic Press, 1997.
27. "Biomaterial Science; An Introduction to Materials in Medicine", eds. by B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Shoen, and J. E. Lemons, p. 64, 124, 165, Academic Press, 1996.
29. Y. S. Nam and T. G. Park, Korea Patent No. 9263 (1999).
30. J. J. Yoon and T. G. Park, Korea Patent No. 50922 (1999).