

조직공학용 다공성 Polycaprolactone 멤브레인의 제조 및 특성

김진태·김태형*·최재하**[†]

(주)네오바이오택 치과재료연구소, *국립강원대학교 방사선학과, **국립충북대학교 신소재공학과
(2015년 11월 30일 접수, 2015년 12월 15일 수정, 2015년 12월 31일 채택)

Preparation and Characterization of Porous Polycaprolactone Membrane for Tissue Engineering

Jin-Tae Kim, Tae-Hyung Kim*, and Jae Ha Choi**[†]

R&D Center, Neobiotech co., Ltd., Seoul 08382, Korea

*Department of Radiological Science, Kangwon National University, Samcheok 25949, Korea

**Department of Advanced Material Engineering, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

(Received November 30, 2015, Revised December 15, 2015, Accepted December 31, 2015)

요약: 폴리카프로락톤(PCL)에 NaCl을 혼합한 용액을 블레이드법에 의하여 막형태로 제조한 후 NaCl을 추출하는 염출법을 이용하여 조직공학적으로 사용할 3차원 다공망을 갖는 멤브레인 형태의 지지체를 제조하였다. 본 연구에서는 성형된 멤브레인의 건조조건과, NaCl 입자의 크기, NaCl의 혼합량을 각각 다르게 하여 제조하였다. 별도로 제작한 고분자용액 공급장치를 이용하여 PCL/클로로포름(CHCl₃) 용액에 NaCl 입자가 균일하게 혼합된 용액을 유리판에 분주하여 필름 어플리케이터를 사용하여 블레이드법에 의한 멤브레인을 제조하였다. 멤브레인 지지체에는 NaCl 입자에 의한 거대기공과 거대기공을 이루는 구조벽에서는 CHCl₃의 증발에 의한 미세기공이 함께 복합적으로 상호 연결되어 형성되었다.

Abstract: Polycaprolactone (PCL) has been fabricated into the membrane type scaffolds of 3 dimensional pore network for the tissue engineering applications by the blade method of salt (NaCl) leaching and solution casting. In this study, the experimental designs have each conditions of drying temperature, salt particle size, salt content. The modified dispensing pump connected up to homogenizing mixer system is used for mixing the PCL/CHCl₃ solution and NaCl particles. The membrane fabricated use by the film applicator to poured mixed solution on the glass plate. The great pore by NaCl particles and the small pore by the evaporated CHCl₃ in the frame wall of great pores are multiply formed in membrane scaffolds.

Keywords: polycaprolactone, membrane, salt leaching, 3D pore, tissue engineering

1. 서론

조직공학적으로 사용되는 지지체는 체내에 이식된 후 신생조직이 형성되어 침투 및 성장할 수 있도록 생물학적으로 안전성을 확보해야 하며 결손조직공간에 위치하여 조직이 재생되는 기간 동안 공간을 유지할 수 있는 강도가 요구된다. 또한 중요한 기능으로는 지지체의 표면부터 내부까지 열린 기공에 의한 다공망이 형성

되어 신생조직의 성장에 필요한 영양분과, 혈액이 공급될 수 있는 통로를 확보해야 하며, 신생조직이 성장하여 결손부가 재생치료 됨과 동시에 체내에서 생분해되어 체외로 배출되어야 하는 특성이 요구된다.

일반적으로 체내에서 분해되는 요건은 효소와 물에 의한 가수분해특성이다. 현재 조직공학적으로 많이 사용되는 생분해성 재료로는 천연고분자인 콜라겐[1-2], 히알루론산[3-7], 알긴산[8] 등이 있으며 생물학적 안전

[†]Corresponding author(e-mail: jachoi@chungbuk.ac.kr, <http://orcid.org/0000-0003-4758-8684>)

성이 높고 생체적합성이 우수하지만 가공성이 비교적 떨어지고 수일에서 수주 동안에 분해되는 반감기를 갖고 있어 물리/화학적 가교를 통하여 체내유지기간을 늘리고 기계적인 강도를 개선하고 있다[9-10]. 생분해성 합성고분자에는 대표적으로 poly lactic acid (PLA) [11-12], polycaprolactone (PCL)[13-17], poly(lactico-glycolic acid)(PGA)[18] 등이 있으며 이들은 천연고분자보다 가공성과 강도가 우수한 반면 비교적 생체적합성과 분해성이 낮아 천연고분자와의 합성, 또는 생분해기간을 단축하기 위한 친수성 재료와의 복합화에 대한 연구도 활발히 진행되어왔다.

이들 중 PCL은 ϵ -caprolactone의 개환중합에 의해 생성되는 선형 지방족 폴리에스터의 일종으로 분자량 50,000 이상에서는 기계적 강도가 비교적 우수하고 60°C의 저융점 특성으로 인해 취급이 용이하다는 장점이 있다. 조직공학용 다공성 지지체의 일반적인 제조방법으로는 염출법[19-20], 발포법[21], 상분리법[22], 동결건조법[2], 전기방사법[16], 3-D프린팅법[23]이 있으며 또한 중공체 자가접착 방법[24]에 의한 다공성 지지체 제작법도 발표된 바 있다. 이들 제작방법 중 프린팅은 기공의 크기가 균일한 장점이 있으나 설비가 고가이고 가공 재료가 제한적인 단점이 있으며 중공체 접착방법은 미세한 기공형성이 어렵다는 단점이 있다. 또한 기타 방법은 미세기공형성이 가능하지만 다공망의 균일적 형성이 곤란하다는 단점이 있다.

본 연구에서는 생분해성 고분자인 PCL을 이용하여 3차원적 다공망을 갖는 멤브레인 지지체를 제조하기 위해 재료에 제한이 없으며 양산성을 고려한 경제적인 방법인 염출법 선택하고 PCL/CHCl₃/NaCl 혼합용액을 casting blade법으로 기공의 크기가 제어가능하며 거대기공(> 50 μ m)과 미세기공(< 10 μ m)이 복합적으로 형성된 멤브레인 형태의 다공성 지지체를 제조하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

미리 건조시켜 수분을 제거한 약 3 mm 크기의 펠렛 PCL (polycaprolactone)(Mw : 70,000~90,000, Sigma Aldrich, USA)을 40°C로 예열된 CHCl₃ (> 99.8%, Sigma Aldrich, USA)에 2시간 동안 가열식 자력교반기에서 200 rpm으로 용해시켜 5 wt% PCL 용액을 제조하였다. PCL 멤브레인에 기공을 부여하기 위한 기공형성체는 NaCl (99.0%, Daejung, Korea)을 사용하였으

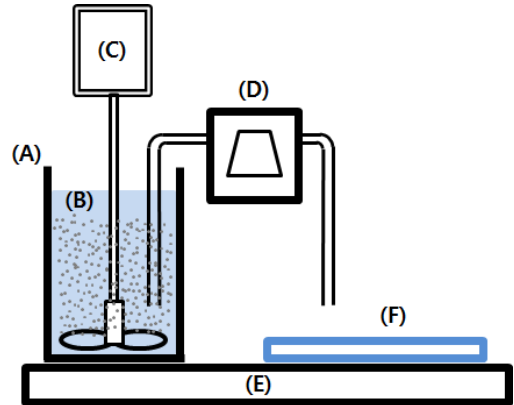


Fig. 1. Fabrication system for membrane scaffolds. (A) mixing chamber, (B) PCL/CHCl₃/NaCl solution, (C) homogenizer, (D) constant delivery pump, (E) heating plate, (F) fabricating plate.

며 PCL 용액에 혼합하기 전에 미리 분쇄/분급하여 45 μ m-100 μ m의 범위를 갖는 크기만 사용하였다.

PCL/CHCl₃ 혼합용액에 각각 10, 30, 50 wt%의 조성으로 NaCl을 첨가하여 침전되지 않도록 실험실에서 제작한 균질혼합장치(Lab. made)(Fig. 1)에서 지속적으로 교반하며 분산교반 중인 혼합액을 정량펌프로 이송하여 성형판 위에 분주하였다.

성형판 위에 분주한 PCL/CHCl₃/NaCl 혼합용액을 500 μ m 높이로 설정된 필름어플리케이터로 필름형 지지체를 즉시 제조하였다. 성형된 지지체는 실온에서 건조를 시행하였으며 건조된 지지체는 성형판에서 분리하여 교반 중인 30°C의 증류수에 24시간 침지시키는 방법으로 6시간마다 신선한 증류수를 교체하여 NaCl을 추출한 후 25 × 25 mm의 크기로 재단하여 에탄올(95%, Daejung, Korea)에 침지하여 한 시간 동안 2회, 증류수에서 12시간 동안 4시간 간격으로 증류수를 교체해주며 세척을 시행하여 다공성 PCL 멤브레인을 제작하였다.

NaCl의 함량별(10, 30, 50 wt%) 실험은 각각의 실험 변수에 따라 NaCl의 함량만 변경하고 나머지 조건은 동일한 방법으로 제조하였다.

제조된 PCL 멤브레인은 주사전자현미경(SEM : S-300H, Hitachi, Japan)을 이용하여 다공망 형성상태를 관찰하였으며 각 실험군에 대하여 기공률을 측정하기 위해 건조된 상태에서 PCL 멤브레인의 중량을 측정 후 24시간 동안 증류수에 침지하여 아르키메데스의 이론에 의한 밀도를 측정하고 아래 식과 같이 PCL 멤브레인의 부피에 대한 기공부피의 비로서 기공률을 측정하였다.

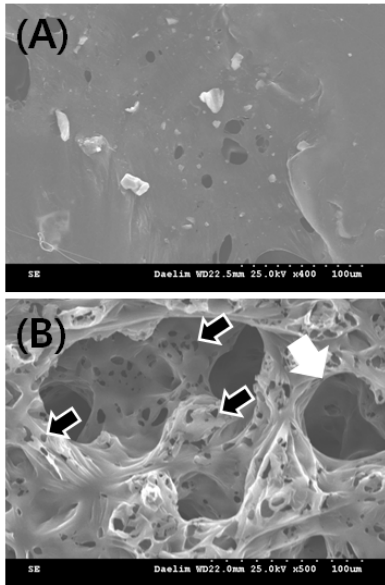


Fig. 2. SEM images of the PCL membrane to multiple size pore. (A) without NaCl, (B) porous membrane by NaCl. Note. white arrow: great pore, black arrow: small pore.

$$\text{기공율(\%)} = \frac{PCL\text{멤브레인부피} - PCL\text{부피}}{PCL\text{멤브레인부피}} \times 100 \quad (1)$$

3. 결과 및 고찰

다공망 형성을 관찰하기 위해 기공형성체인 NaCl 혼합을 제외한 나머지 방법은 동일하게 진행하여 비교시료를 제작하였다. Fig. 2의 (A)에서와 같이 기공형성체를 혼합하지 않은 PCL 멤브레인에서는 건조 시 발생된 수축에 의하여 공극만 발생하였고 기공이 형성되지 않았다.

NaCl을 혼합하여 기공을 형성시킨 멤브레인은 Fig. 2의 (B)에서와 같이 PCL/CHCl₃/NaCl 혼합 용액을 멤브레인으로 제조 후 NaCl이 추출되어 NaCl이 존재하던 자리에 거대 기공이 표면 전반적으로 균일하게 형성되어 있었으며 그 외의 공간에서는 CHCl₃가 증발되면서 형성된 미세 기공이 형성되어 있음을 볼 수 있다. 이러한 거대 기공(백색 화살표)이 열린기공으로서 3차원적으로 상호 연결되어 다공망이 형성되어 있는 것을 관찰할 수 있으며 거대 기공을 이루고 있는 PCL 구조벽에서는 CHCl₃의 증발로 인한 미세 기공(흑색 화살표)이 형성되어 있었다. 또한 이들 두 가지의 기공이 복합적으로 형성되는 결과로서 Fig. 3에서 나타난 기공의 양

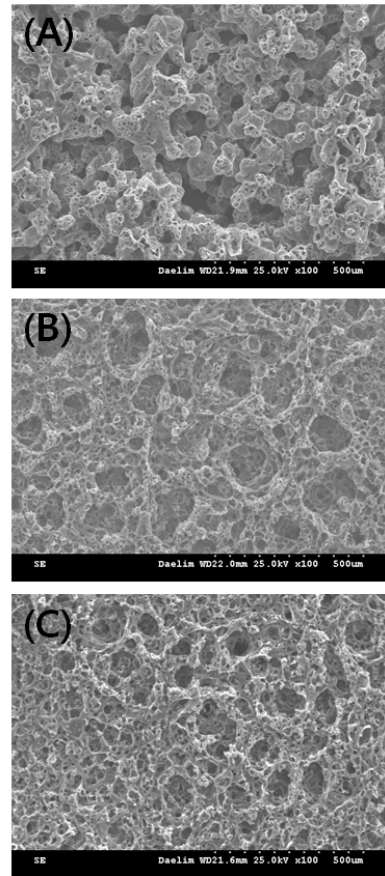


Fig. 3. SEM images of the PCL membrane by NaCl increased. (A) 10 wt% NaCl, (B) 30 wt% NaCl, (C) 50 wt% NaCl.

상을 보면 기공형성체인 NaCl의 함량이 높아짐에 따라 기공이 많아짐을 육안으로도 확인할 수 있다. 이 결과는 동일한 양의 PCL/CHCl₃/NaCl 혼합 용액 중 NaCl의 함량이 높아질수록 용액 내에서 분산된 NaCl의 입자간격이 좁아져 비교적 용이한 CHCl₃의 증발에 의한 미세 기공의 형성이 되므로 미세 기공의 형성은 거대 기공을 이루고 있는 구조벽의 두께에 의존한다고 볼 수 있으며 미세 기공과 거대 기공의 직경은 각각 약 10 μm 이하, 50~60 μm이었으며 대표적으로 Fig. 4에서 나타내었다. 이 측정에 사용된 PCL 멤브레인은 45 μm 이하의 NaCl 입자를 기공형성체로 사용한 것으로서 사용된 NaCl 입자 크기보다 기공이 크게 형성된 것은 PCL의 수축에 의한 것으로 사료된다. Fig. 4는 비교적 균일한 크기의 거대 기공 부분을 나타내었는데 사용된 NaCl의 입자 크기 범위로 인하여 기공의 크기가 다소 차이가 낮지만 이는 NaCl의 분급 범위를 줄이면 차이가 감소할 것으

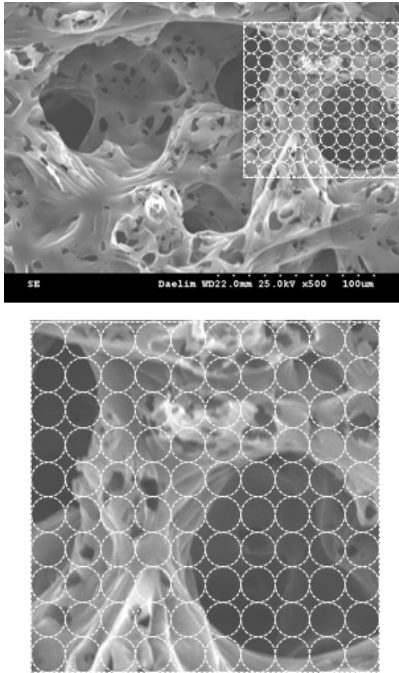


Fig. 4. Measuring size of pore (great and small) 10 μm (each white circle diameter).

로 보인다. 이 거대 기공의 구조벽에 대한 미세 기공 형성의 의존도는 기공률에서도 Fig. 5와 같이 10 wt%와 50 wt%의 기공률은 상당한 차이를 나타내는 것이 확인되었다.

일반적으로 염출법은 경제적이고 공정이 간단하다는 장점이 있지만 염과 고분자용액의 비중차이에서 발생하는 염의 침전에 의해 균질분포제어가 어렵고, 형성된 기공간의 연결성이 일정하지 못하는 등 기공의 제어가 쉽지 않고 불균일하다는 단점이 있다[20]. 그러나 본 연구에서는 블록형태의 지지체가 아닌 필름형태의 멤브레인 지지체로서 두께가 상대적으로 감소되었으며 기공형성체인 NaCl의 크기조절 및 용액 내에서의 균질분산에 의해 거대 기공의 균일한 형성이 가능하게 되었다.

또한 이들 거대 기공을 형성하는 PCL 구조벽의 두께 감소에 따라 CHCl_3 의 증발이 용이하게 되어 거대 기공 사이에서 미세 기공이 함께 형성되었다. 이러한 결과는 비교적 두께가 작은 멤브레인은 물론 블록형태의 두께가 큰 지지체에서도 기공형성체인 NaCl의 균일한 분산 조건에서 증류수에 접촉된 표면에서부터 시작된 염의 추출로 인하여 점차적으로 내부까지 연결된 기공에 의해 염의 추출이 가능할 것으로 보이며 NaCl의 함량의 증가에 따라 형성된 거대 기공을 이루는 PCL 구조벽

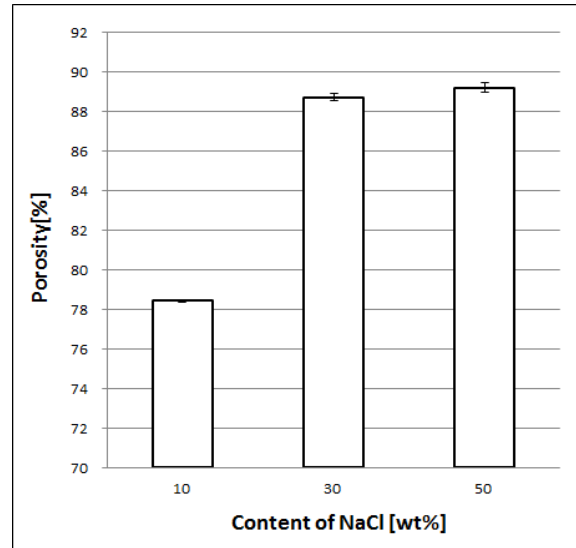


Fig. 5. Porosity of PCL membrane by NaCl increased.

두께의 감소에 의해 CHCl_3 의 증발도 효과적으로 이루어져 미세 기공도 함께 형성될 것으로 사료된다. 이때 높은 기공률에 의해 기계적 강도의 감소는 수반될 수 있으나 조직공학적 지지체에 있어 특히 멤브레인의 경우 정상조직과 결손조직간의 차폐역할과 결손조직의 재생을 촉진시키는 목적만을 위한다면, 조직재생에 필요한 신생조직의 침투, 성장과 이를 위해 영양소를 제공하는 체액과 혈액의 원활한 공급을 위해서는 높은 기계적 강도보다 다공망의 형성이 더 효과적인 선택이라고 볼 수 있다.

4. 결 론

PCL/ CHCl_3 /NaCl 혼합 용액을 필름어플리케이터로 멤브레인 형태로 가공하고 건조 및 염출에 의해 조직공학용 다공성 PCL 멤브레인을 제조하였다. 기공형성체인 NaCl은 45~100 μm 크기를 갖도록 분쇄하여 10, 30, 50 wt%로 각각 혼합했으며 성형-건조-염출-세척을 통하여 최종 멤브레인을 제조하고 SEM관찰로 기공의 형태 및 형성을 관찰하였다. 그 결과 NaCl의 함량이 높아질수록 거대 기공이 증가했으며 기공간 구조벽이 얇아지면서 미세 기공도 증가하여 두 가지의 기공이 복합적으로 형성된 멤브레인 제조에 성공하였으며 기공형성체의 크기 및 함량에 의해 기공을 조절할 수 있었다.

감 사

이 논문은 2014년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음(This work was supported by the research grant of Chungbuk National University in 2014).

Reference

1. K. W. Nam, T. Kimura, S. Funamoto, and A. Kishida, "Preparation of a collagen/polymer hybrid gel designed for tissue membranes. Part I: Controlling the polymer-collagen cross-linking process using an ethanol/water co-solvent", *Acta Biomaterialia*, **6**, (2010).
2. J. T. Kim, S. M. Lim, B. S. Kim, D. Y. Lee, and J. H. Choi, "Fabrication and characterization of 3-D porous collagen scaffold", *J. of Biomedical Eng. Res.*, **35** (2014).
3. S. K. Hahn, J. K. Park, T. Tomimatsu, and T. Shimoboji, "Synthesis and degradation test of hyaluronic acid hydrogels", *Inter. J. of Biological Macromolecules*, **40** (2007).
4. Y. Luo, K. R. Kirker, and G. D. Prestwich, "Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: New biomaterials for drug delivery", *J. of Controlled Release*, **69** (2000).
5. J. T. Kim, C. H. Kook, and J. H. Choi, "Production equipment and method of polymer gel for bio-implantig", *J. of Korean Soc. Of Mechanical Technology*, **11**, 3 (2009).
6. G. H. Cho and S. I. Cheong, "Degradation characteristics of cross-linked hyaluronic acid membrane", *Membr. J.*, **19**, 4 (2009).
7. G. S. Han, J. E. Bae, I. S. Kim, and S. I. Cheong, "Application of hyaluronic acid membrane cross-linked with 1,3-Butadiene diepoxide", *Membr. J.*, **18**, 2 (2008).
8. H. M. Kim, J. Y. Park, E. Y. Kim, J. E. Song, S. Y. Kwon, J. W. Chung, and G. S. Khang, "Tissue engineered cartilage reconstruction with alginate sponge containing demineralized bone particles", *Polymer(Korea)*, **38**, 3 (2013).
9. O. J. Jeon, S. J. Song, K. J. Lee, M. H. Park, S. H. Lee, S. K. Hahn, S. J. Kim, and B. S. Kim, "Mechanical properties and degradation behaviors of hyaluronic acid hydrogels cross-linked at various cross-linking densities", *Carbohydrate Polymers*, **70** (2007).
10. J. T. Kim, D. Y. Lee, E. J. Kim, J. W. Jang, and N. I. Cho, "Tissue response to implants of hyaluronic acid hydrogel prepared by microbeads", *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **11**, 1 (2014).
11. M. X. Li, S. H. Kim, S. H. Park, J. K. Lee, and W. I. Lee, "A study on the effect of CNT on crystallization kinetics and hydrolytic degradation of PKA/CNT composite", *Composites Research*, **24**, 4 (2011).
12. H. Deplaine, J. L. G. Ribelles, and G. G. Ferrer, "Effect of the content of hydroxyapatite nanoparticles on the properties and bioactivity of poly(L-lactide) - Hybrid membranes", *Composites Science and Technology*, **70** (2010).
13. W. Jen Lin, D. R. Flanagan, and R. J. Linhardt, "A novel fabrication of poly(ϵ -caprolactone) and poly(ethylene glycol)s", *Polymer*, **40** (1999).
14. A. G. A. Coombes, S. C. Rizzi, M. Williamson, J. E. Barralet, S. Downes, and W. A. Wallace, "Precipitation casting of polycaprolactone for applications in tissue engineering and drug delivery", *Biomaterials*, **25** (2004).
15. T. Tanaka, T. Tsuchiya, H. Takahashi, M. Taniguchi, and D. R. Lloyd, "Microfiltration membrane of polymer blend of poly(L-lactic acid) and poly(ϵ -caprolactone)", *Desalination*, **193** (2006).
16. S. W. Son, J. E. Choi, D. J. Kang, D. Y. Lee, J. T. Kim, and J. W. Jang, "Synthesis and characterization of porous poly(ϵ -caprolactone)/silica nanocomposites", *Polymer(Korea)*, **39**, 2 (2015).
17. T. H. Yun, K. S. Kim, S. H. Cho, and K. H. Youm, "Preparation of polycaprolactone microcapsules by membrane emulsification method and

- its drug release properties”, *Membr. J.*, **17**, 1 (2007).
18. J. E. Jang, H. M. Kim, H. S. Kim, D. Y. Jeon, C. H. Park, S. Y. Kwon, J. W. Chung, and G. S. Khang, “Inflammatory responses to hydroxyapatite/poly(lactic-co-glycolic acid) scaffolds with variation of compositions”, *Polymer(Korea)*, **38**, 2 (2013).
 19. J. H. Lee, J. R. Lee, and H. J. Kang, “Preparation of poly(lactic acid) scaffolds by the particulate leaching”, *J. of Korean Oil Chemists’ Soc.*, **20**, 4 (2003).
 20. Mikos A. G, A. J. Thorsen, L. A. Czerwonka, Y. Bao, R. Langer, E. N. Winslow, and J. P. Vacanti, “Preparation and characterization of poly(L-lactic acid) foams”, *Polymer*, **35** (1994).
 21. Y. S. Nam, J. J. Yoon, and T. G. Park, “A novel fabrication method of macroporous biodegradable polymer scaffolds using gas foaming salt as porogen additive”, *J. of Biomed. Mater. Res.*, **53** (2000).
 22. Y. S. Nam and J. G. Park, “Porous biodegradable polymeric scaffolds prepared by thermally induced phase separation”, *J. of Biomed. Mater. Res.*, **47**, 1 (1999).
 23. S. H. Lee, S. A. Park, and W. D. Kim, “Fabrication of porous 3D PCL scaffold using rapid prototyping system”, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **7**, 2 (2010).
 24. S. H. Lee, Y. S. Cho, K. P. Choi, S. H. An, and C. H. Woo, “Fabrication of PCL scaffold using autoadhesion phenomenon”, *J. of Korean Soc. of Mechanical Technology*, **14**, 2 (2012).