

레이저 소결 적층 시스템을 이용한 3차원 수산화인회석 인공지지체 제작에 관한 연구

최승혁*, 사민우**, 김종영***,#

*경북대학교 기계공학과, **에스제이티 기업부설연구소, ***안동대학교 기계공학과

A Study on Fabrication of 3D Hydroxyapatite Scaffolds Using a Laser Sintering Deposition System

Seung-Hyeok Choi*, Min-Woo Sa**, Jong Young Kim***,#

*Department of Mechanical Engineering, Kyungpook National Univ., **R&D Center, SJT,

***Department of Mechanical Engineering, Andong National Univ.

(Received 07 September 2021; received in revised form 27 September 2021; accepted 09 December 2021)

ABSTRACT

Calcium-phosphate-based bioceramics are promising biomaterials for scaffolds because they can assist in bone regeneration. In this study, a laser sintering deposition system was developed, and 3D hydroxyapatite (HA) scaffolds were fabricated. The main process conditions of the HA scaffolds were laser power, table velocity, and laser focal distance. As the laser power increased, the line width, line height, and layer thickness also increased. Further, the line width, line height, and layer thickness decreased as the table velocity increased. As the laser focal distance increased, the line width increased, but the line height and layer thickness decreased. The fabricated green scaffolds were sintered at 1050 °C and 1150 °C. The sintered scaffolds had a uniform and continuous interconnected shape, with pore sizes ranging from 850 to 950 μm having 53% porosity. The compressive strength of the scaffolds decreased from 0.72 MPa (1050 °C) to 0.53 MPa (1150 °C). The biocompatibility of the scaffolds was investigated by analyzing the adhesion of osteoblast-like MG-63 cells cultured on the surfaces of the scaffolds. The results indicate that the scaffold sintered at 1050 °C had good mechanical and biological properties compared to that at 1150 °C.

Keywords : Bone Tissue Engineering(골 조직 공학), Laser Sintering Deposition System(레이저 소결 적층 시스템), 3D Scaffold(3차원 인공지지체), Hydroxyapatite(수산화인회석)

1. 서 론

최근 골조직 공학에서는 사고나 질병으로 인한 손상된 골 재생, 복원 및 대체를 위해 다양한 생

체재료를 사용하고 있다. 또한, 실제 인체 조직과 유사한 구조 및 기능을 가지기 위해 인공지지체를 이용하여 인체의 조직 및 장기를 재생하고자 한다^[1,2]. 인공지지체를 제작하는 방식에는 사출조형법(Melting molding), 스폰지복제법(Sponge replica), 염 침출법(Salt leaching), 동결주조법(Freeze casting) 등과 같은 종래의 방식이 있다. 하지만 최

Corresponding Author : jykim@anu.ac.kr

Tel: +82-54-821-6339, Fax: +82-54-821-6129

근에는 열 용해 적층법(Fused deposition modeling), 선택적 레이저 소결법(Selective laser sintering), 그리고 광 조형법(Stereolithography)과 같은 방식이 널리 사용되고 있다³⁻⁵⁾.

골조직 공학에 사용되는 생체재료로는 고분자(Polymer), 세라믹(Ceramic), 그리고 금속(Metal) 등이 있다. 세라믹은 골조직과의 화학적 성분이 가장 유사하여 골조직 재생을 위한 목적으로 많이 사용되고 있다. 하지만, 세라믹 특성상 고분자, 금속에 비해 취성이 강하다는 단점이 있으며, 복잡한 구조체 제작에 대한 한계가 있다⁶⁾.

본 연구에서는 자체 개발된 선택적 레이저 소결법을 기반으로 한 CO₂ 레이저 소결 적층 시스템(Laser Sintering Deposition System, LSDS)을 이용하여 골조직 재생에 적합한 수산화인회석(Hydroxyapatite, HA) 인공지지체를 제작하는 연구를 수행하였다. 주요 공정변수로는 레이저 파워, 스테이지 이송속도, 그리고 포커싱 거리이며, 이와 같은 공정 조건을 이용하여 3차원 인공지지체를 제작하기 위해 단선 패턴링 실험을 수행하였다. 제작된 인공지지체의 표면 분석이 수행되었고, 2차 소결 공정 후 기계적 강도 평가 및 세포 증식 평가를 수행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 재료

본 연구에서는 200-400 nm의 입자크기, M_w 1004.62의 분자량을 가지는 수산화인회석(Hydroxyapatite, HA, OssGen, Korea)을 사용하였다. 칼슘(Ca), 인(P)이 주성분으로 이루어져 있으며, HA 분말은 시스템의 분말 공급함에 채워 준비되었다.

2.2 레이저 소결 적층 시스템

본 연구에서 사용된 레이저 소결 적층 시스템은 크게 레이저 파트(Laser part), 제작 파트(Bed part), 스테이지 파트(Stage part)로 나뉜다. Fig. 1에서는 레이저 소결 적층 시스템을 이용한 3차원 바이오 세라믹 인공지지체를 제작하기 위한 개략도

를 나타낸다.

레이저 파트는 CO₂ 레이저(CO₂ laser), 빔 익스펜더(Beam expander), 반사경(Reflection mirror), 그리고 포커싱 렌즈(Focusing lens)로 이루어져 있다. CO₂ 레이저는 재료를 소결하기 위한 에너지원이며, 최대 30W까지 조절된다. 빔 익스펜더는 CO₂ 레이저를 확장하여 원하는 위치까지 일정하게 도달하게 한다. 반사경은 CO₂ 레이저의 경로를 바꾸어 주는 역할을 하고, 포커싱 렌즈는 CO₂ 레이저의 초점을 조절하는 역할을 한다.

제작 파트는 실제 3차원 바이오 세라믹 인공지지체가 제작되는 부분이다. 제작 파트에서 사용되는 Z, A, B, C 축은 스텝 모터(Step motor, Moos's, China)와 볼 스크류(Ball screw, Samick THK, Japan), LM 가이드(LM guide, Samick THK, Japan)를 이용하여 수직 및 수평운동을 가능하게 한다.

스테이지 파트는 2차원 패턴을 결정한다. 스테이지 파트에서 사용되는 X, Y축은 리니어 모터(Linear motor, Yaskawa, Japan), 리니어 엔코더(Linear encoder, RSF, Elcktronik, Austria, 그리고 LM 가이드(LM guide, Samick THK, Japan)로 구성되어 있으며, 높은 반복정밀도와 고해상도 수평운동을 가능하게 한다. Fig. 1은 자체 개발된 레이저 소결 적층 시스템의 개략도를 나타내며, Fig. 2는 자체 개발된 레이저 소결 적층 시스템의 실물 사진을 나타낸다.

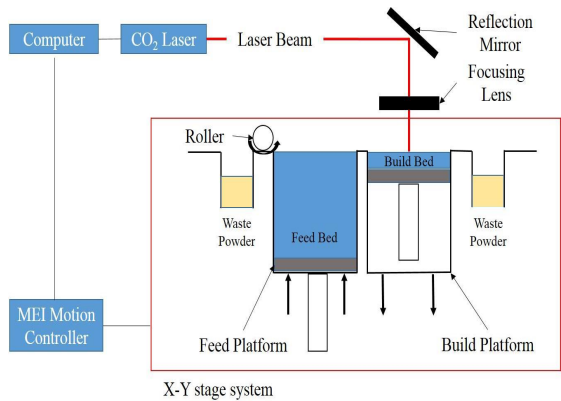


Fig. 1 Schematic diagram of laser sintering deposition system

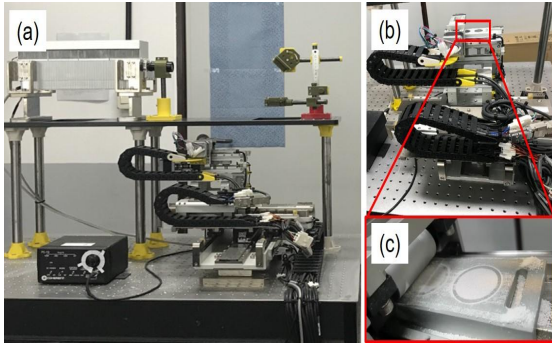


Fig. 2 Actual images of laser sintering deposition system

2.3 단선 패턴링 실험

HA 분말의 소결 특성을 평가하기 위해 레이저 파워는 0.2, 2.5, 5.5, 7.3, 10.6W, 테이블 이송속도는 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400mm/min, 그리고 레이저 초점거리는 125, 135, 145, 155, 165mm로 설정하였다.(Table 1) 세 가지 공정 조건을 이용하여 선 폭, 선 높이, 그리고 층 두께에 대한 결과를 얻었다. Fig. 3은 단선 패턴링과 인공지지체의 개략도를 보여준다.

2.4 소결공정

본 실험에서는 레이저 소결 적층 시스템으로 제작된 인공지지체를 소결로(Furnace, MF-12H, JEIO TECH, Korea)를 통해 2차 소결공정을 하였다. 소결 공정은 상온-600℃(1단계:상승), 600℃(2단계:유지), 600-1050, 1150℃(3단계:상승), 1050, 1150℃(4단계:유지), 1050, 1150℃-(5단계:하강) 순서로 진행되었으며, 이전 연구 자료를 참고하였다⁷⁾.

Table 1 LSDS process parameters

Items	Conditions
Wavelength(μm)	10.2
Beam size (mm)	1.8
Scan spacing(mm)	2.175
Laser power(W)	0.2, 2.5, 5.5, 7.3, 10.6
Feed rate(mm/min)	50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400
Focusing distance(mm)	125, 135, 145, 155, 165

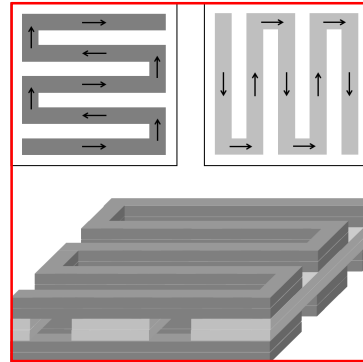


Fig. 3 Scheme of single line pattern and 3D scaffold

2.5 현미경 관찰

인공지지체의 형상 및 표면 분석을 위해 주사전자현미경(Scanning electron microscopy, Tescan Vega-II, Czech)과 전자현미경에 장착되어 전자빔의 시편과 반응하여 시편의 구조 및 화학 조성 정보를 분석하는 장비로 X-ray 스펙트로미터(Energy Dispersive X-Ray Spectrometer)가 사용되었다.

2.6 기계적 강도 평가 준비

제작된 3차원 인공지지체의 기계적 강도를 평가하기 위해 압축시험기(JSV H1000, JISC, Japan)를 사용하였다. 기계적 강도 평가는 압축시험기 작업 공간 내에 제작된 3차원 인공지지체를 압축 헤드와 수직 방향으로 위치하여 실험하였다. 압축 헤드의 이송속도는 1mm/min으로 설정하였다.

2.7 세로 평가 준비

본 연구에서 세포 실험을 진행하기 위해 Himan Osteosarcoma(MG-63 cell line, Korea Cell Line Bank, Korea)세포를 사용하였다. 세포를 배양하기 위해 DMEM(D-minimum essential medium/high glucose, Hyclone, Logan, UT, USA), 우태혈청(Fetal bovin serum, Gibco, Rockvill, MD, USA)과 1% 항생제(Penicillin streptomycin, Sigma, St. Louis, USA)를 적절히 혼합하여 사용하였다. 세포는 37℃, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였으며, 배양액은 24시간 간격으로 교체하였다. 세포를 파종하기 위해서 제작된 인공지지체를 70% 에탄올을 이용하여 24시간

자외선 살균 처리한 후, PBS에서 2-3회 세척하였다. 또한, 배양된 세포가 잘 파종될 수 있도록 3-4시간 pre-wetting을 시켰다. 세포는 100 ϕ 배양접시에서 3일 동안 충분히 배양 후, 0.25% Trypsin-EDTA solution (Gibco, Rockvill, MD, USA)를 사용하여 배양된 세포를 떼어내어 사용하였다. 세포는 각 인공 지지체마다 2 × 10⁵씩 충분히 파종하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 단선 패터닝 평가

단선 패터닝의 경향성 평가를 위해 세 가지 공정 조건(레이저 파워, 테이블 이송속도, 레이저 초점거리)을 사용하였다. 세 가지 공정변수 중 두 가지 공정변수는 중간값으로 고정하고, 나머지 하나의 공정변수를 조절하였다. 각 변수가 HA 분말 소결 시 형성되는 단선 패터닝에 미치는 영향 및 경향성을 분석하기 위해 사용되었다. Fig. 4는 레이저 파워에 따른 측정 데이터를 그래프로 보여주고 있다. 이송속도와 레이저 초점거리가 각각 200mm와 145mm일 때, 레이저 파워가 증가할수록 선폭은 1350 μ m에서 1900 μ m까지, 선 높이는 770 μ m에서 1500 μ m까지, 그리고 층 두께는 350 μ m에서 603 μ m까지 모두 증가하는 추세를 나타내었다. Fig. 5는 테이블 이송속도에 따른 측정 데이터를 보여주는 그래프이다. 레이저 파워와 레이저 초점거리가 각각 5.5W와 145mm일 때, 테이블 이송속도가 증가할수록 선폭은 1320 μ m에서 850 μ m로, 선 높이는 1290 μ m에서 390 μ m로, 그리고 층 두께는 480 μ m에서 170 μ m로 모두 감소하는 경향을 보였다. Fig. 6은 레이저 초점거리에 따른 결과 그래프를 보여준다. 레이저 파워와 이송속도가 각각 5.5W와 200mm일 때, 레이저 초점거리가 멀어질수록 선폭은 1050 μ m에서 2170 μ m까지 증가하였으나, 선 높이는 970 μ m에서 490 μ m로, 층 두께는 450 μ m에서 270 μ m로 모두 감소하는 경향을 나타내었다.

3.2 인공지지체 제작

앞서 2차원 단선 패터닝 결과를 통해 얻어진 데이터를 이용하여 선폭 1000 μ m, 공극 900 μ m, 공극률 55%인 HA 인공지지체를 제작하고자 하였다. 이를 위해 HA 인공지지체의 공정 조건은 레이저 파워

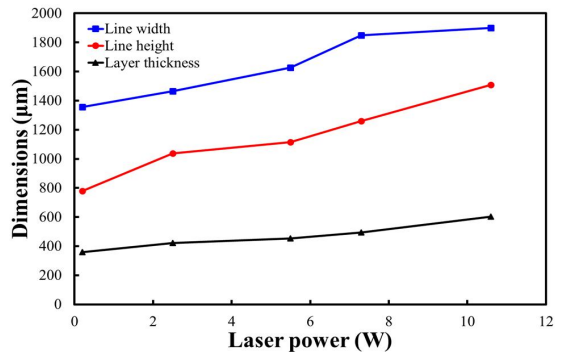


Fig. 4 Variation of line width, line height, and layer thickness with laser power(Feed rate: 200mm/min & Focusing distance : 145mm)

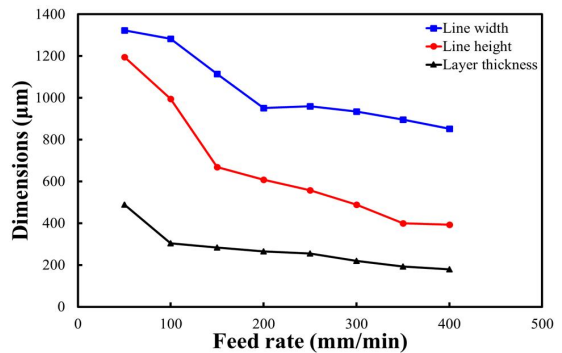


Fig. 5 Variation of line width, line height, and layer thickness with feed rate(Laser power: 5.5W & Focusing distance : 145mm)

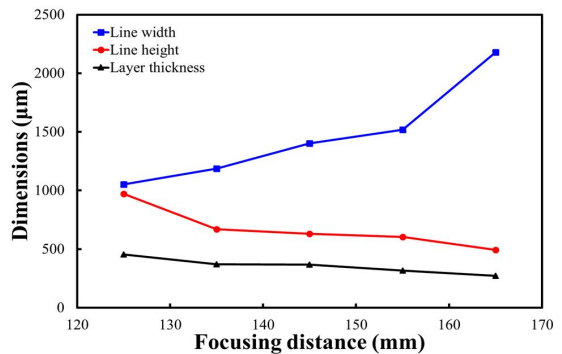


Fig. 6 Variation of line width, line height, and layer thickness with focusing distance(Laser power: 5.5W & Feed rate : 200mm/min)

10.6W, 테이블 이송속도 250mm/min, 그리고 레이저 초점거리는 135mm로 설정되었다. 그 결과, Fig. 7은 본 연구에서 제작된 3차원 인공지지체의 SEM 사진이다. 제작된 인공지지체의 크기는 $9.7 \times 9.7 \times 4.7\text{mm}$, 선폭은 $1000 \pm 30\mu\text{m}$, 공극크기는 $900 \pm 50\mu\text{m}$, 그리고 공극률은 $53 \pm 0.2\%$ 로 측정되었다. 또한, 1050, 1150°C로 2차 소결공정을 거친 인공지지체들의 공극률은 각각 $55 \pm 0.7\%$, 그리고 $50 \pm 1.3\%$ 로 측정되었다. 3차원 인공지지체를 보면, 매우 거친 표면 상태를 확인할 수 있으며,

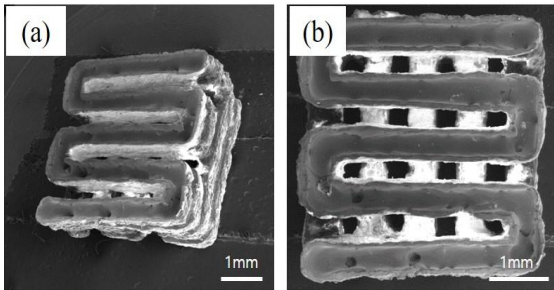


Fig. 7 SEM image of the fabricated HA scaffold :
(a) Isometric view_30x, (b) Pore pattern view_40x

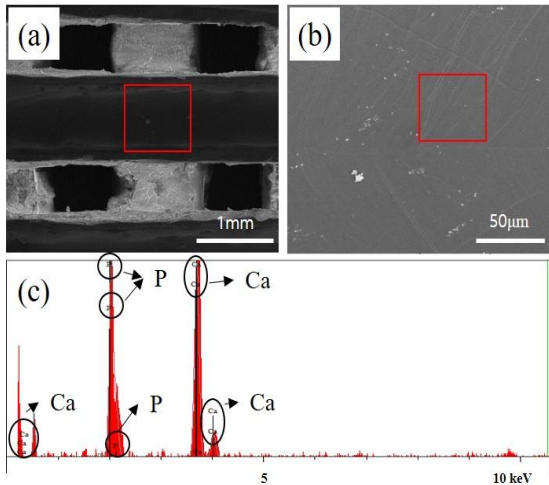


Fig. 8 EDS analysis on the surface of HA scaffold : (a) Line_55x, (b) Surface_1kx, and (c) Ion analysis

이는 바이오 세라믹 분말을 이용한 레이저 소결 방식에서 발생하는 현상이다. 그리고 표면이 거친 것은 조직 재생에 있어서 세포 부착 및 증식에 매우 유리한 특성이 있는 것으로 보고되고 있다^[8]. Fig. 8은 EDS 분석 결과 사진이다. HA 인공지지체의 표면상에 검출된 이온 성분은 Ca, P로 구성되어있는 것을 확인할 수 있었다.

3.3 기계적 강도 평가

LSDS를 이용한 수산화인회석 인공지지체는 분말들간 결합이 제대로 되지 않아 응집력이 좋지 못하고, 또한 기계적 강도가 약한 단점이 있다. 따라서, 2차 소결을 수행하기 위해 소결로를 이용하였다. 소결을 위해 적용된 온도는 1050, 1150°C였다. 소결 공정은 600°C, 2시간으로 상승시켰고, 600°C에서 1시간의 휴지시간을 가졌다. 그리고 나서, 1050°C와 1150°C, 1시간동안 상승하였고, 2시간의 휴지시간을 가졌다. Fig. 9는 소결 공정에 대한 그래프를 보여준다.

소결 후 수산화인회석 인공지지체의 기계적 강도 평가를 수행하였다. 소결 온도가 1050°C일 때는 압축 강도가 약 0.7MPa이었고, 1150°C일 때는 약 0.5MPa로 낮아졌다^[9]. 인공지지체가 지녀야 할 압축 강도는 인체의 해면골의 압축강도와 유사하다고 보고되며, 통상적으로 2~12MPa이다. 하지만 본 연구에서는 압축강도가 충분하지 못하며, 향후 압축 강도를 향상시키는 연구는 추가되어야 한다고 판단되었다. 생체 내에서의 인공지지체는 생분해성 특성으로 인해 골 조직 재생 동안 칼슘과 인의 분해가 일어나기 때문에 무게가 감소하고, 그로 인해 압축 강도가 감소할 수 있어 충분한 기계적 강도 유지가 필요할 것으로 사료되었다. 본 연구에서 소결 온도에 의한 HA의 소결 결과는 레이저 소결 시 1100°C를 넘어가서 상 변이가 발생하였고, 2차 소결을 통해 표면상에 크랙이 발생하는 특성을 가진다는 연구 결과가 있었다^[10-11]. 따라서, 1050°C에서의 소결은 1차 레이저 소결된 분말을 더욱 단단하게 굳혀주는 역할을 하는 특성을 가진다고 판단할 수 있었다.

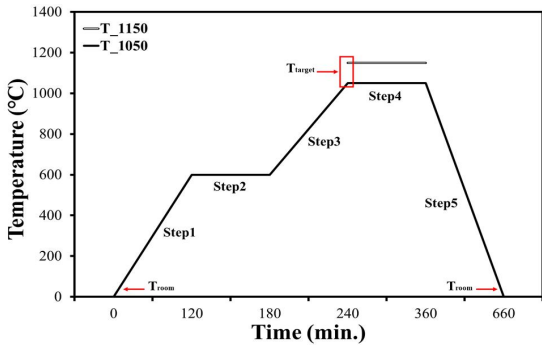


Fig. 9 Sintering process of 3D HA scaffolds

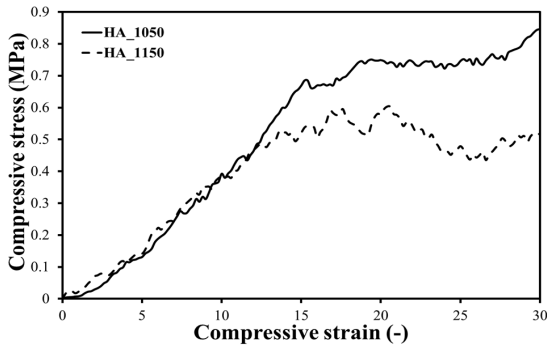


Fig. 10 Stress and strain curves of HA scaffolds

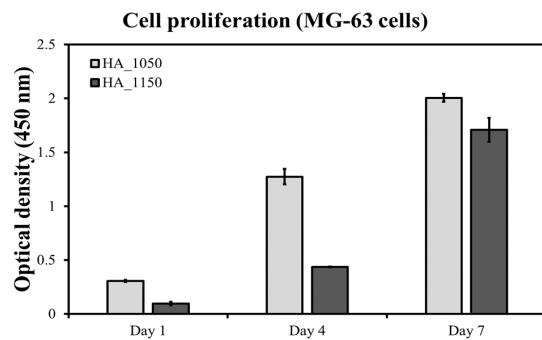


Fig. 11 Cell proliferation test of HA scaffolds

3.4 수산화인회석 인공지지체 세포 증식 평가

세포 증식 평가를 위해 준비된 HA_1050, 1150 인공지지체와 사전에 인큐베이터에서 배양된 MG-63 세포를 파종하여 1, 4, 그리고 7일 동안의 Cell counting kit(CCK-8, Dojindo, japan)를 사용하

여 평가를 수행하였다. Fig. 11은 2차 소결온도에 따른 수산화인회석 인공지지체의 7일 동안 진행된 흡광도 분석 결과 그래프를 나타내고 있다. 생체 세라믹 재료 중 HA는 생체적합성 및 생체전도도가 우수한 특징을 가지고 있는 것으로 보고 되고 있다^[11]. 따라서 각각의 인공지지체들은 세포증식이 잘 이루어짐을 확인할 수 있었다. 그리고 전반적으로 HA_1150 인공지지체 보다 HA_1050 인공지지체가 더 높은 세포증식률을 보였다. 이전 연구결과에 따르면, HA의 입자성장(Particle growth)은 1150°C 이상에서 급격히 진행된다. 소결로를 통해 2차 소결된 HA 인공지지체 표면의 다공성(Porous)이 HA_1150 인공지지체가 HA_1050 인공지지체 보다 더 낮았으며, 이는 세포가 HA 인공지지체 표면에 부착(Attachment)이 덜 이루어짐에 따라 세포가 분화에 따른 증식률의 차이를 보이는 것으로 판단되었다.

4. 결론

본 연구에서는 개발된 LSDS를 이용하여 HA 분말의 소결 특성에 대해 단선 패터닝 실험을 수행하였고, 그 데이터를 이용하여 3차원 HA 인공지지체를 제작하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 단선 패터닝 실험 결과, 레이저 파워가 증가할수록 선 폭, 선높이, 그리고 층 두께는 상승하였다. 반면 테이블 이송속도가 증가할수록 선 폭, 선높이, 그리고 층 두께는 감소하였다. 레이저 초점거리가 증가할수록 선폭은 증가하였으나, 선높이와 층 두께는 감소하였다.
2. 기계적 강도 평가 결과, 1050°C에서 소결한 HA 인공지지체가 압축 강도가 더 향상된 것을 확인할 수 있었다.
3. 세포 증식 평가 결과, 1050°C에서 소결한 HA 인공지지체의 세포 증식률이 더 좋은 것을 확인할 수 있었다.

후 기

“이 논문은 안동대학교 기본연구지원사업에 의하여 연구되었음.”

REFERENCES

1. Chang, S. H. and Hsu, Y. M., Wang, Y. J., Tsao, Y. P., Tung, K. Y., and Wang, T. Y., "Fabrication of Pre-determined of Bone Segment with Collagen-Hydroxyapatite Scaffold and Autogenous Platelet-Rich Plasma," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 20, No. 1, pp. 23-31, 2009.
2. Tsuno, H., Yoshida, T., Nogami, M., Koike, C., Okabe, M., Noto, Z., Arai, N., Noguchi, M., and Nikaido, T., "Application of Human Amniotic Mesenchymal Cells as an Allogeneic Transplantation Cell Source in Bone Regenerative Therapy," *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 32, No. 8, pp. 2452-2458, 2012.
3. Shim, J. H., Moon, T. S., Yun, M. J., Jeon, Y. C., Jeong, C. M., Cho, D. W. and Huh, J. B., "Simulating of Healing within a Rabbit Calvarial Defect by a PCL/PLGA Scaffold Blended with TCP using Solid Freeform Fabrication Technology," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 23, No. 12, pp. 2993-3002, 2012.
4. Shuai, C., Gao, C., Nie, Y., Hu, H., Zhou, Y. and Peng, S., "Structure and Properties of Nano Hydroxyapatite Scaffolds for Bone Tissue Engineering with a Selective Laser Sintering System," *Nanotechnology*, Vol. 22, No. 28, 285703, 2011.
5. Seol, Y. J., Park, D. Y., Park, J. Y., Kim, S. W., Park, S. J. and Cho, D. W., "A New Method of Fabricating Robust Freeform 3D Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Regeneration," *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 110, No. 5, pp. 1444-1455, 2013.
6. Quinn, G. D., Patel, P. J., and Lloyd, I., "Effect of Loading Rate upon Conventional Ceramic Microindentation Hardness," *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*, Vol. 107, No. 12, pp. 299-306, 2002.
7. Vivanco, J., Aiqangar, A., Araneda, A., and Ploeg, H. L., "Mechanical characterization of injection molded macro porous bioceramic bone scaffolds," *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, Vol.9 pp.137-152, 2012.
8. Sa, M. W. and Kim, J. Y., "Characteristic Analysis and Fabrication of Bioceramic Scaffold using Mixing Ratios of TCP/HA by Fused Deposition Modeling," *Transactions of the Korean Society of Mechanical Engineers, A*, Vol. 38, No. 11, pp. 1273-1281, 2014.
9. Triphthi, G. and Basu, B., "A Porous Hydroxyapatite Scaffold for Bone Tissue Engineering Physic-mechanical and Biological Evaluations," *Ceramics International*, Vol. 38, No. 1, pp. 341-349, 2012.
10. Shuai, C., Li, P., Liu, J., and Peng, S., "Optimization of TCP/HAP Ratio for Better Properties of Calcium Phosphate Scaffold via Selective Laser Sintering," *Material Characterization*, Vol. 77, pp. 23-31, 2013.
11. Feng, P., Niu, M., Gao, C., Peng, S., and Shuai, C., "A Novel two-step sintering for nano-hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering," *Science Reports*, Vol. 4, No. 5599, 2014.