



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년05월25일

(11) 등록번호 10-2256501

(24) 등록일자 2021년05월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 21/35 (2014.01) A61L 27/36 (2006.01)

C09D 11/10 (2014.01) G01N 17/04 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 21/35 (2013.01)

A61L 27/36 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0064683

(22) 출원일자 2020년05월29일

심사청구일자 2020년05월29일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020180089474 A*

KR1020190068187 A*

KR1020190052942 A

KR1020200029656 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

박혜상

강원도 춘천시 삭주로 77 춘천성심병원 이비인후과

정혜리

경기도 구리시 응달말로52번길 31-8 동지타운 10 2동 402호

이재준

강원도 춘천시 삭주로 77, 춘천성심병원 마취통증의학과

(74) 대리인

김남혁

전체 청구항 수 : 총 5 항

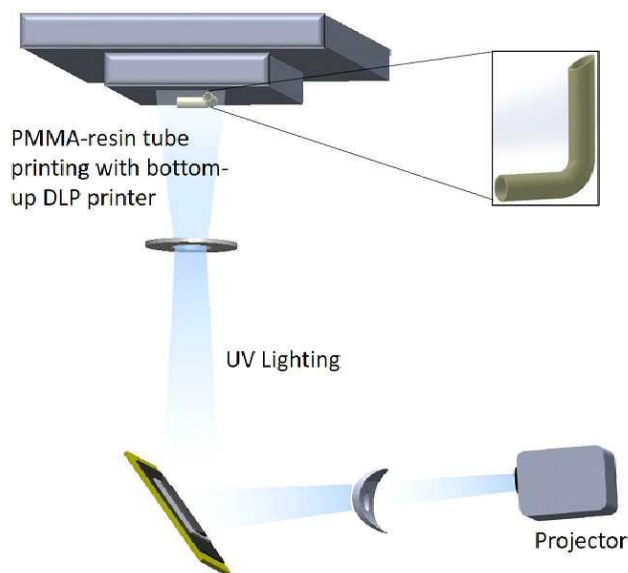
심사관 : 장일석

(54) 발명의 명칭 햄스터 볼 점막 주머니를 이용한 바이오 잉크 적합성 평가 방법

(57) 요약

본 발명은 햄스터 볼 점막 주머니를 이용한 바이오 잉크 적합성 평가 방법 및 이러한 평가 방법에 의해 채택된 바이오 잉크를 이용하여 인쇄된 기관절개관에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C09D 11/10 (2013.01)

G01N 17/04 (2013.01)

G01N 2021/3595 (2013.01)

G01N 2203/0652 (2013.01)

G01N 2333/195 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711104550
과제번호	NRF-2017M3A9E8033206
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	임상의과학자 연구역량강화사업
연구과제명	3D 프린터 기술을 이용한 환자 맞춤형 기관절개관 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한림대학교 산학협력단
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

햄스터 볼 점막 주머니를 이용한 폴리메틸메타아크릴레이트의 바이오 잉크로서의 적합성 평가 방법.

청구항 2

폴리메틸메타아크릴레이트를 3D 프린터로 인쇄하여 스캐폴드를 제조하는 단계;

상기 스캐폴드를 햄스터 볼 점막 주머니에 삽입하는 단계; 및

상기 삽입 1 주 내지 3주 후, 햄스터 볼 점막 주머니에서 스캐폴드를 제거하여 특성을 분석하는 단계;를 포함하는, 햄스터 볼 점막 주머니를 이용한 폴리메틸메타아크릴레이트의 바이오 잉크로서의 적합성 평가 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 분석은 푸리에 변환 적외선(FTIR) 분광법에 의한 스펙트럼 분석, 단축 압축 분석 및 바이오 필름 분석 중 적어도 어느 하나인 것인, 햄스터 볼 점막 주머니를 이용한 폴리메틸메타아크릴레이트의 바이오 잉크로서의 적합성 평가 방법.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 스캐폴드를 햄스터 볼 점막 주머니에 삽입하기 전과 제거한 후의 푸리에 변환 적외선(FTIR) 스펙트럼을 측정하여 작용기에 차이가 없다면, 바이오 잉크로 적합하다고 판단하는, 햄스터 볼 점막 주머니를 이용한 폴리메틸메타아크릴레이트의 바이오 잉크로서의 적합성 평가 방법.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 바이오 필름 분석은 햄스터 볼 점막 주머니에서 제거한 스캐폴드의 항균 활성을 평가하여 박테리아 수가 감소하면 바이오 잉크로 적합하다고 판단하는, 햄스터 볼 점막 주머니를 이용한 폴리메틸메타아크릴레이트의 바이오 잉크로서의 적합성 평가 방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 햄스터 볼 점막 주머니를 이용한 바이오 잉크 적합성 평가 방법 및 이러한 평가 방법에 의해 채택된 바이오 잉크를 이용하여 인쇄된 기관절개관에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 기관 절개술은 장기간 인공호흡기를 유지해야 하거나, 후두 및 기관 종양, 협착으로 인해 기도를 유지하기 위해 시행하는 수술 방식이다. 일반적으로는 상용화된 기관절개관을 사용하지만, 소아나 비만, 후두 및 기관의 해부학적 이상이 있는 경우에는 상용화된 기관절개관으로는 적절한 기도 유지를 할 수 없는 경우가 있다.

[0003] 한편, 3D 프린팅은 환자의 CT, MRI 등의 촬영 영상을 기반으로 환자 개개인에게 맞는 의료기기를 제작할 수 있는 장점이 있어, 정형외과, 치과, 두개 안면 분야에서 많이 사용되고 있다. 또한, 3D 프린팅 및 CAD (Computer-Aided Design)에서 큰 발전을 거듭하면서 이러한 기술은 시뮬레이션 및 수술 전 계획에서 라이브 셀 인쇄 (Atala A, Yoo JJ. Essentials of 3D-Biofabrication and Translation. Amsterdam: Elsevier Inc.; 2015. pp. 43-59)에 이르기까지 의료 분야에서 널리 적용되었다. 현재, 호흡기 관련 의료기기에 대한 연구도 보고 되고 있지만, 이들 연구는 환자의 CT 영상을 기반으로 기관 절개관이나 스텐드 3D 모델을 만들고, 실제 기관 절개관이나 기관 스텐트의 제작은 3D 프린팅이 아닌 종래 제작방법을 이용하고 있다. 하지만, 종래 제작 방법과 비교하였을 때, 3D 프린팅 방법을 훨씬 쉽고, 빠르고, 유연성 있게 지지체를 제작할 수 있다는 장점이 있다. 따라서 3D 프린터를 이용하여 기관 절개관을 직접 제작하는 경우 여러가지 의학적 원인으로 특수 기관절개관이 필요한 환자에게 매우 유용하다. 이에 본 발명자들은 이러한 기술적 요구에 따라 세계 최초로 3D 프린터로 기관 절개관을 제작 및 연구하였다.

[0004] 3D 프린팅은 물질을 적층하는 방식에 따라 다양한 타입으로 나눌 수 있으며, 그 타입에 따라 적용되는 잉크도 다양하다. 이에, 본 발명에서는 다양한 3D 프린팅용 바이오 잉크로 기관절개관을 제작함에 있어서 물질의 안전성을 검증하기 위한 동물 모델을 제안하고, 실제 기관절개관을 제작하여 유용성을 평가하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 햄스터 볼 점막 주머니를 이용하여, 3D 프린터에 적합한 바이오 잉크의 특성을 평가하고, 적합한 바이오 잉크를 이용하여, 특수 기관절개관이 필요한 환자 개인 특성에 맞는 기관 절개관을 3D 프린터로 인쇄하여 제작하고자 하는 것이다.

[0006] 한편, 본 발명이 해결하고자 하는 과제들은 이상에서 언급된 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 햄스터 볼 점막 주머니를 이용한 바이오 잉크 적합성 평가 방법이 제공된다.

[0008] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 바이오 잉크를 3D 프린터로 인쇄하여 스캐폴드를 제조하는 단계, 상기 스캐폴드를 햄스터 볼 점막 주머니에 삽입하는 단계 및 상기 삽입 1 주 내지 3주 후, 햄스터 볼 점막 주머니에서 스캐폴드를 제거하여 특성을 분석하는 단계;를 포함하는 햄스터 볼 점막 주머니를 이용한 바이오 잉크 적합성 평가 방법이 제공된다.

[0009] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 상기 분석은 푸리에 변환 적외선(FTIR) 분광법에 의한 스펙트럼 분석, 단층 압축 분석 및 바이오 필름 분석 중 적어도 어느 하나 일 수 있다.

[0010] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 상기 스캐폴드를 햄스터 볼 점막 주머니에 삽입하기 전과 제거한 후의 푸리에 변환 적외선(FTIR) 스펙트럼을 측정하여 작용기에 차이가 없다면, 바이오 잉크로 적합하다고 판단할 수 있다.

[0011] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 상기 상기 바이오 필름 분석은 햄스터 볼 점막 주머니에서 제거한 스캐폴드의 항균 활성을 평가하여 박테리아 수가 감소하면 바이오 잉크로 적합하다고 판단할 수 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 폴리메틸메타아크릴레이트(PMMA, Polymethylmethacrylate)를 포함하는 바이오 잉크가 제공된다.

[0013] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 폴리메틸메타아크릴레이트(PMMA, Polymethylmethacrylate)를 포함하는 바이오 잉크로 인쇄된 기관 절개관이 제공된다.

[0014] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 상기 인쇄는 3D 프린터이고, 바람직하게는 DLP 방식의 3D 프린터일 수 있다.

발명의 효과

[0015] 본 발명의 바이오 잉크 적합성 평가 방법은 햄스터 볼 점막 주머니를 이용함으로써, 실제로 기관절개관을 제작해서 동물에게 기관절개술을 시행하지 않고도 3D 프린터에 적합한 바이오 잉크를 선정할 수 있으며, 이에 따라, 특수 기관절개관이 필요한 환자의 개인 특성에 맞는 기관 절개관을 손쉽게 제공할 수 있는 이점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 3D 프린트 PMMA 수지 튜브의 3D 인쇄 공정 개요를 나타낸 그림이다.

도 2는 스캐폴드의 외관, SEM 이미지 및 CCK-8 분석을 사용한 세포 생존력 분석 그래프이다.

도 3은 FTIR 분석(A) 및 기계적 특성(B)을 나타낸 것이다.

도 4는 삽입된 스캐폴드 및 볼 주머니 점막에서의 바이오 필름 분석한 것이다.

도 5는 3D 인쇄된 기관절개관을 포함하는 기관 절개술을 나타낸 것이다.

도 6은 기관 절개술 후 절차 평가를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 사용한 햄스터 볼 주머니의 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명하기로 한다. 이에 앞서, 본 명세서 및 특허청구범위에 사용된 용어 또는 단어는 통상적으로 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 안되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다. 따라서, 본 명세서에 기재된 실시예에 기재된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일 실시예에 불과할 뿐이고, 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원시점에서 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

[0018] 본 발명의 일 실시예에 따라, 햄스터 볼 점막 주머니를 이용한 바이오 잉크 적합성 평가 방법이 제공된다. 구체적으로, 바이오 잉크를 3D 프린터로 인쇄하여 스캐폴드를 제조하는 단계, 상기 스캐폴드를 햄스터 볼 점막 주머니에 삽입하는 단계; 및 상기 삽입 1 주 내지 3 주 후, 햄스터 볼 점막 주머니에서 스캐폴드를 제거하여 특성을 분석하는 단계를 포함할 수 있다.

[0019] 본 명세서에 있어서, 햄스터 볼 주머니는 햄스터의 구강 점막이 연장된 곳으로써 음식을 저장하는 장소로, 본 명세서 전체에 있어서, 햄스터 볼 주머니, 햄스터 볼 점막 주머니, hamster cheek pouch, HCP, HCP 모델 등의 용어로 혼용되어 사용될 수 있다.

[0020] 본 명세서에 있어서, 기관 절개관(Tracheostomy Tube, TT)은 인공기도를 의미하는 것으로, 튜브와 내장된 커프로 구성된 단일 내강 튜브와 커프가 부착된 튜브, 밀폐장치, 내부 캐놀라로 구성된 이중 내강 튜브가 있으며, 본 명세서 전체에 있어서, 기관 절개관, Tracheostomy Tube, TT, 기관절개튜브, 튜브 등의 용어로 혼용되어 사용될 수 있다.

[0021] 본 명세서에 있어서, PMMA는 폴리메틸메타아크릴레이트(Polymethylmethacrylate)를 의미하고, PCL는 폴리카프로락톤(polycaprolacton)을 의미하고, PLA는 폴리락트산 (polylactic acid)을 의미한다.

[0022] 한편, 본 명세서에 있어서, FDM 프린터는 고체로 된 재료에 열을 가해주어 재료를 녹인 후 3D 프린터 노즐을 이용하여 겹겹히 쌓아올리는 방식의 3D 프린터를 의미하며, 본 명세서에 있어서, FDM 프린터, FDM, FDM 방식 등의 용어로 혼용되어 사용될 수 있다.

[0023] 또한, 본 명세서에 있어서, DLP 프린터는 광경화성 액상 수지를 빔프로젝터로 응고시키는 방식으로, 거울을 사용하지 않고 빔프로젝터를 사용하고, 빔프로젝터에서 빛을 비추게 되면 빛의 모양에 따라 레진이 굳게 되어 하나씩 쌓는 방식의 3D 프린터를 의미하며, 본 명세서에 있어서, DLP 프린터, DLP, DLP 방식 등의 용어로 혼용되

어 사용될 수 있다.

- [0024] 한편, 본 발명자들은 햄스터 볼 주머니(hamster cheek pouch, HCP) 모델을 사용하여 3D 프린트의 바이오 잉크의 특성을 평가하고, 3D 프린터로 인쇄되는 기관 절개관(Tracheostomy Tube)으로서의 용도를 결정하였다. 또한, 본 발명자들은 생의학 응용 분야에서 널리 사용되는 FDM 프린터 및 DLP 프린터 방법을 적용하기 위해 폴리카프로락톤 (PCL, polycaprolactone), 폴리락트산 (PLA, polylactic acid) 및 폴리메틸메타아크릴레이트(PMMA, Polymethylmethacrylate) 수지를 사용하였다. 이때, PCL과 PLA는 우수한 기계적 강도와 유사한 생체 적합성을 가진 FDM 프린터용 생분해성 합성재료이다. PMMA 수지는 DLP 프린터용 광경 화성, 3D 인쇄 가능 수지로, 3D 인쇄 인공 치아, 의치상, 임시 용두 및 치과 교량 재료와 같은 치과 보철물 제조에 많은 이점을 제공한다. 기관 절개관(Tracheostomy Tube)은 기관 내강에 위치한 유치 카테터이므로, 튜브의 화학적 및 기계적 변화 및 바이오 필름 형성은 임상 적용의 안전성을 결정하는 중요한 요소이다. 이에 본 발명자들은 이러한 특성을 평가하기 위해 햄스터 볼 주머니(hamster cheek pouch, HCP) 모델을 도입하였으며, 동물 기관 절개술을 수행하여 3D- 인쇄 된 기관 절개관(Tracheostomy Tube, TT)의 가능성을 평가하였다.
- [0026] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들의 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.
- [0028] HCP 모델 사용될 튜브 재질 선택 및 시편 준비를 위한 CAD, 3D 인쇄
- [0029] CAD 소프트웨어 (SOLIDWORKS, Dassault Systemes SolidWorks Corp., MA, Waltham, USA) (외경 4.1 mm, 내경 3.1 mm, 높이 10 mm)를 사용하여 원통형 스케폴드를 생성하였다. PLA (CAS 번호 26100-51-6, Sigma-Aldrich, 미국 세인트루이스, MO) 및 PCL (Purasorb®PC 12, Corbion Purac, 네덜란드 암스테르담)을 가열 재킷에 넣고 강철 노즐을 통해 압출 FDM 3D 프린터 (경기도 시흥시 T & R Biofab) (온도 PLA, 190 ° C; PCL, 110 ° C)를 사용하였으며, 노즐의 내경은 500 μ m이고, 각 층의 두께는 400 μ m였다. PMMA수지 (네덜란드 Soesterberg, NextDent™ C & B, NextDent™) 시편을 DLP 3D 프린터 (MiiCraft Ultra 50X, MIICRAFT, 독일 Jena)를 사용하여 제조하였다. 인쇄 두께 15 μ m 및 경화 시간 1.5 초의 인쇄 파라미터를 사용하였다. 인쇄 후, 인쇄된 스케폴드를 탈 이온수로 간단히 행구어 반응하지 않은 용액을 제거하였다. 시판되는 폴리 염화 비닐 (PVC) 기관 절개관 (Tracheostomy Tube, TT) (Portex®Blue Line® 미 수술 기관 절개 튜브, 미국 미네소타 주 미니애폴리스에 소재한 Smiths Medical, Inc.)를 대조군에 사용하였다. 외경 9.7 mm, 내경 7 mm 및 높이 10 mm를 달성하도록 절단되었다.
- [0031] SEM 촬영
- [0032] 한국 춘천 한국기초과학원에 위치한 저 진공 주 사형 전자 현미경 (일본 도쿄 히타치 S-350N)을 사용하였다. 스케폴드 샘플은 이온 스퍼터 (일본 도쿄 히타치 1010)를 사용하여 15mA의 방전 전류에서 30초 동안 10nm의 얇은 금/팔라듐 층으로 코팅되었다. 3 kV의 가속 전압에서 현미경 사진을 얻었다.
- [0034] CCK-8 분석을 사용한 세포 생존력 분석
- [0035] NIH3T3 섬유 아세포를 10 % 태아 소 혈청 (FBS; 미국 뉴욕 주 그랜드 아일랜드 킵코)과 함께 DMEM/고혈당 (한국 경산 웰젠 (Welgene Inc.))에서 배양하고 5% CO₂ 분위기, 37°C에서 배양하였다. 세포 생존능 분석 키트 (Quanti-Max, Dojindo Molecular Technologies, Inc., 일본 구마모토)를 사용하여 2 일째에 NIH3T3 섬유 아세포의 증식 활성을 정량화 하였다. 세포를 인산 완충 식염수 (PBS, pH 7.4)로 행구고 37 °C에서 30 분 동안 100 μ l의 배지로 희석된 10 μ l CCK-8 시약에 침지시켰다. 450 nm에서의 흡광도 측정 값을 72 시간 및 96 시간에서 GloMax 시스템 (Promega, GloMax Navigator Microplate Luminmeter, 미국 위스콘신 주 매디슨)을 사용하여 얻었다.
- [0037] 스케폴드를 햄스터 볼 주머니에 삽입
- [0038] 대략 120g의 12 마리의 수컷 황금 시리아 햄스터 (일본 SLC, 일본 나고야)가 사용되었다. 1 ml 케타민 (8.3 μ l/g, Huons, 경기도 성남, 대한민국) 및 0.5 ml Rumpun®(4.1 μ l / g, 자일 라진 클로라이드, 바이엘 코리아)의 혼합물의 복강 내 주사를 사용하여 동물을 마취시켰다. 볼 주머니를 노출시킨 후, 단일 스케폴드를 각 볼 파우치에 삽입하였다. 각 그룹은 3 마리의 동물로 구성되었으며 각 그룹마다 총 6 개의 스케 폴드가 사용되었다. 볼 주머니 개구부를 3-0 실크 (미국 뉴저지 주 서머 빌에 소재한 에 티콘 인크.)로 봉합 한 끈으로 봉합하여 닫았다. 삽입 2 주 후, 스케 폴드는 햄스터의 볼 주머니에서 제거되었다. 이 연구는 한국 춘천 한림대학교 (Hallym 2018-67) 기관 검토위원회의 승인을 받았다.

- [0040] FTIR (푸리에 변환 적외선) 분광법
- [0041] 생체 내 삽입 후 스캐폴드의 2 차 화학적 전이를 확인하기 위해 프론티어 옵티 카 (PerkinElmer Inc., 영국 버킹엄 셔, 영국 버킹엄 셔) 분광계를 사용하여 스캐폴드의 감쇠된 총 반사 (ATR) -FTIR 스펙트럼을 분석하였다. 스펙트럼은 0.4 cm^{-1} 해상도 및 32 스캔으로 $8,300\text{ cm}^{-1}$ 내지 350 cm^{-1} 로 기록되었다.
- [0043] 기계적 시험
- [0044] 각 스캐폴드의 단축 압축 특성은 200 kN 용량 로드셀 및 0.5 mm min^{-1} 의 크로스 헤드 로딩 속도를 갖는 범용 시험기 (QM100S, qmesys, 경기도)를 사용하여 측정하였다. 시험편을 잡아당기는 데 필요한 힘과 파단 전의 샘플 강도의 크기를 측정했다. 이 분석에는 각 스캐폴드의 3 개의 샘플이 사용되었다.
- [0046] 바이오 필름 분석
- [0047] 삽입한지 2 주 후에 각 스캐폴드를 햄스터 볼 주머니(hamster cheek pouch, HC로부터 제거하고, 볼 주머니 점막 조직을 수확하였다. 볼 주머니 점막을 수거하여 스캐폴드의 외부 및 관강 표면을 멸균된 0.9 % 식염수 10 ml로 행구었다. 행균 용액의 미생물 농도는 표준 미생물 연속 희석법을 사용하고 상이한 배양 한천 배지상의 도금을 사용하여 측정하였다. 슈도모나스 아에 루기 노사 (*P. aeruginosa*)의 성장 배지는 38g의 슈도모나스 아가 F (BD Biosciences, 미국 매사추세츠 주 베드포드 소재의 BD Biosciences)를 10g의 글리세롤을 함유하는 기본 완충액 1ℓ에 현탁시켜 제조하였다. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)의 성장 배지는 950 ml의 탈 이온수에 *Staphylococcus* 배지 110 (BD Biosciences) 63 g을 현탁시켜 제조하였다. 1 분 동안 비등시킨 후, 분말을 완전히 용해시키고 121°C 에서 15분 동안 오토 클레이브 하였다. 스캐폴드 및 구강 점막 조직을 위한 행균 용액을 37°C 에서 24 시간 동안 성장 배지에 접종하고 콜로니 형성 단위 (CFU)를 수동으로 계수 하였다. 칸디다 알비 칸스 (*C. albicans*)를 3M 페트리 필름 (미국 미네소타 주 세인트 폴 소재의 3M 페트리 필름)을 사용하여 분석하고 37°C 에서 48 시간 동안 배양하였다.
- [0049] 3D 인쇄 기관 절개관의 적합성 평가
- [0050] 3D 프린팅
- [0051] 기관 절개관(Tracheostomy Tube, TT)의 3D 설계에 대한 기도 해부학을 관찰하기 위해 20 주령 토끼의 컴퓨터 단층 촬영 (CT) 이미지를 촬영하였다. 내경은 약 6.5mm, 외경은 약 7.5mm 인 것이 확인되었다. 이 결과에 기초하여, 토끼에 대한 기관 절개관(Tracheostomy Tube, TT)의 3D 모델이 생성되었다 (SOLIDWORKS, Dassault Systèmes SolidWorks Corp., Waltham, USA, USA). 기관 절개관(Tracheostomy Tube, TT)의 3D 모델은 튜브 샤프트와 넥 플랜지로 구성되었으며 곡선 및 직선 부분이 있는 각진 튜브 (90°)로 설계되었다. PMMA 수지를 사용하여 DLP 3D 프린터 (Miicraft Ultra 50X, MIICRAFT, 독일 Jena)로 튜브 샤프트를 제조했으며 인쇄 매개 변수는 원통형 스캐 폴드와 동일했다. 도 1은 3D 프린팅PMMA 수지 튜브의 3D 인쇄 공정 개요로, PMMA- 수지 기관절개관은 PMMA- 수지의 자외선에 의한 광중합을 통해 층별로 제조되었다. 목 플랜지는 FDM 3D-Discovery™ 3D 바이오 프린터 (regenHu, Fribourg, Switzerland)를 사용하여 실리콘 (Dow Corning®SE 1700, 미국 미시간 주 미들랜드)으로 제조되었다. 노즐의 내경은 0.25 mm이고, 각 층의 두께는 0.22 mm였다.
- [0053] 기관 절개술
- [0054] 뉴질랜드 토끼 (20 주령, 체중 3.5 ~ 3.7kg, n = 2)를 사용하였다. 이 연구는 한국 춘천 한림 대학교 생명 윤리 심의위원회의 승인을 받았다 (Hallym 2017-67). 2 ml 케타민 (0.6 ml/kg , Huons) 및 1 ml Rumpun®(0.3 ml/kg xylazine chloride, Bayer Korea)의 혼합물을 근육 내 주사하여 동물을 마취시켰다. 기관을 노출시킨 후, 하나의 연골 링을 제거하고, 제조된 3D 인쇄된 기관 절개관을 기관 종에 삽입하였다. 기관 절개관을 제자리에 유지하기 위해 목 끈이 사용되었다. 기관 지경 검사 (강성 $4\text{ mm } 0^{\circ}$ 내시경, Karl Storz, Tuttlingen, Germany) 및 CT 스캔을 수행하였다.
- [0056] 조직학
- [0057] 기관 시험편은 기관 절개술 3 주 후에 회수되었다. 시험편을 파라핀 블록에 매립하고 $5\text{ }\mu\text{m}$ 두께의 슬라이스로 절단하고 슬라이드 위에 놓은 후 헤 마톡 실린-에오신 (H & E)으로 염색하였다.
- [0059] 통계 분석
- [0060] 모든 데이터는 평균 $\pm$ 표준 편차로 표시된다. 실험 결과의 통계 분석은 통계 과학 패키지 소프트웨어 프로그램

(SPSS) (SPSS Inc., 미국 일리노이 주 시카고)을 사용하여 수행되었다. 통계적 유의성이 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 및 *** $p < 0.005$ 로 설정된 Student's t test로 p 값이 생성되었다.

[0062] **평가예**

[0063] SEM 데이터 및 CCK-8 분석

[0064] 도 2의 A는 스캐폴드의 외관과 SEM 이미지로, FDM 프린터에 의해 인쇄된 PCL 및 PLA 스캐폴드는 침착된 섬유 구조를 나타냈으나, DLP 프린터에 의해 인쇄된 PMMA-수지 스캐폴드는 섬유 구조를 나타내지 않았다. 또한, 도 2은 B는 CCK-8 분석을 사용한 세포 생존력 분석을 나타낸 그래프로, 각 스캐폴드는 세포 독성을 나타내지 않았다.

[0065] FDM 프린터는 아래에서 위로 계층 구조를 구축하기 때문에 SEM 이미지를 사용하여 스캐폴드에 퇴적된 PLA 또는 PCL 섬유를 관찰할 수 있다. 그러나, DLP 프린터에 의해 인쇄된 PMMA-수지 스캐폴드는 섬유 구조를 나타내지 않았다. 이러한 인쇄 방법의 차이(FDM 대 DLP)를 제외하고, 다른 유형의 발판에서 표면에 오염 물질이 오염되거나 균열이 발견되지 않았다. NIH3T 섬유 아세포에 대한 세포 생존력 값은 대조군과 비교하여 모든 그룹에서 더 높았으며, 이는 발판에 독성 효과가 기인할 수 없음을 나타낸다. 스캐폴드 사이의 시간에 기초하여 통계적으로 유의한 세포 생존율 차이는 없었다

[0067] HCP를 사용한 생체 내 연구 - FTIR 분광법

[0068] 도 3은 FTIR 분석(A) 및 기계적 특성(B)을 나타낸 것으로, 삽입 전 및 삽입 후 2주 후에 각 스캐폴드의 FTIR 스펙트럼은 작용기에서 유의미한 차이를 나타내지 않았다. 이들 결과는 생체 내 삽입 동안 스캐폴드에서 구조적 전이가 없음을 나타냈다

[0070] HCP를 사용한 생체 내 연구 - 기계적 성질

[0071] 주입 전 압축 강도는 PVC 스캐폴드에서 679.8 ± 28.6 kPa, PCL 스캐폴드에서 4977.1 ± 4.2 kPa, PLA 스캐폴드에서 7121.5 ± 6.4 kPa, PMMA-수지 스캐폴드에서 9734.9 ± 4.2 kPa였다. HCP에서 2주간의 이식 후, 각 스캐폴드는 삽입 전 값에 비해 압축 강도가 감소된 것으로 나타났다. PVC 스캐폴드의 경우 555.0 ± 7.1 kPa, PCL 스캐폴드의 경우 3386.4 ± 5.7 kPa, PLA 스캐폴드의 경우 6678.8 ± 16.3 kPa, PMMA-수지 스캐폴드의 경우 7428.5 ± 2.8 kPa였다. 3D 인쇄된 PCL, PLA 및 PMMA-수지 스캐폴드는 기존 PVC 스캐폴드보다 높은 삽입 전 및 삽입 후 압축 강도를 보여주었다. 또한 PMMA 기반 수지는 삽입 전/후 압축 강도가 가장 높았다(도 3 참조).

[0073] HCP를 사용한 생체 내 연구 - 바이오필름 분석

[0074] 도 4는 삽입된 스캐폴드 및 볼 주머니 점막에서의 바이오 필름 분석한 것으로, A는 스캐폴드의 외부 및 내강 표면의 SEM 이미지이고, B는 S. 아우레우스, P. 아에루기노사 및 C. 알비칸스(*S. aureus*, *P. aeruginosa*, and *C. albicans*.)에 대한 CFU 계수이다(CFU: Colony-forming unit. $\times 30,000 \mu m^2$ (SEM). * $p < 0.05$, and *** $p < 0.005$). 바이오필름은 기관 절개관(Tracheostomy Tube, TT)과 같은 유치 의료 장치와 관련된 일반적인 문제로 남아 있다. 따라서 본 발명에서는 S. aureus (gram-positive bacteria)와 P. aeruginosa (gram-negative bacteria)를 실험 균주로 선정하여 다양한 스캐폴드의 항균 활성을 평가하였다. 바이오 필름은 SEM 이미지에서 스캐폴드의 표면 및 내부 루멘 모두에서 형성되는 것으로 나타났다. 특히, 부착성 박테리아 세포의 수의 현저한 증가는 PVC 스캐폴드에서 명백했다. 구균, 막대 모양의 박테리아 및 Candida spp를 관찰할 수 있었다. 바이오 필름에 내장. PMMA-수지는 다른 스캐폴드와 비교하여 박테리아 세포의 수가 현저히 감소함을 보여주었다(도 4). S. aureus 및 P. aeruginosa의 CFU 수는 PCL, PLA 및 PMMA-수지 스캐폴드보다 PVC 스캐폴드에서 유의하게 더 높았다(그림 4). PMMA-수지 스캐폴드는 네 가지 유형의 스캐폴드 중 S. aureus 수가 가장 낮았으며($p < 0.05$), PLA 스캐폴드에 대한 P. aeruginosa 수는 다른 스캐폴드에 비해 유의하게 낮았다($p < 0.05$). 그러나, PCL 스캐폴드는 3D 인쇄 스캐폴드(PCL, PLA 및 PMMA-수지) 중에서 가장 높은 박테리아 수를 나타냈다. HCP 조직에서 S. 아우레우스 및 P. 에어루지노사에 대한 CFU 수는 스캐폴드의 CFU 수와 유사하였다. C. 알비칸스에 대한 CFU 수는 PLA 스캐폴드에서 다른 스캐폴드(PVC, PCL 및 PMMA-수지 스캐폴드)에서보다 상당히 높았으며, PMMA-수지 스캐폴드는 가장 낮은 값을 나타냈다($p < 0.005$). 그러나 C. albicans는 볼 주머니 조직에서 검출되지 않았다.

[0076] 3D 프린팅 된 TT의 타당성 테스트- 인쇄 능력 및 임상 적 유용성

[0077] 도 5는 3D 인쇄된 기관절개관을 포함하는 기관 절개술을 나타낸 것으로, (A)는 3D 인쇄 PMMA 수지 튜브의 CAD 모델 및 전체 모습, (B)는 뉴질랜드 토끼의 기관 절개술 절차. 화살표는 삽입된 튜브를 나타낸다. 생체 내 삽입

시험의 결과에 기초하여, 다음과 같은 이유로 PMMA- 수지가 3D 인쇄된 기관 절개 튜브의 재료로 최종 선택되었다. 1) PMMA- 수지는 다른 스캐폴드보다 우수한 삽입 전 및 삽입 후 기계적 특성을 나타냈다. 2) 명확한 세포 독성 효과도 보이지 않았다. 3) 생체 내 삽입 동안 명확한 화학적 변화는 없었으며, 4) 다른 스캐폴드보다 상대적으로 낮은 바이오 필름 형성을 보여주었다. 그림 5는 3D 인쇄 튜브의 전체 모습을 보여준다. 앵글형 실린더인 기관절개관은 지지대 (희생 금형)없이 3D 프린팅되었다. 3D- 인쇄 된 기관절개관의 평균 길이, 내부/외부 직경 및 각도가 표 1에 제시되어있다. 3 개의 샘플이 테스트되었다. 모든 매개 변수는 CAD 설계와 상당히 유사했다. 기관 절개 중에 3D 인쇄 PMMA 수지 튜브를 토끼 기관에 어려움없이 삽입했다 (그림 5). 기관지경 검사 결과 PMMA- 수지 튜브가 기관 내강의 적절한 위치에 삽입되었고 튜브의 직경이 기관의 직경에 맞게 조정되었다는 것을 나타냈다. 기관 절개술 후 3 주째에 기공 주위에서 약한 과립 화조직이 관찰되었다. 그러나, 캐놀러는 여전히 기관 내강에 올바르게 배치되었다 (그림 6). 도 6은 기관 절개술 후 절차 평가를 나타낸 것으로, A는 기관지경술 직후 및 3 주 후 기관 지경 검사 결과이고, B는 기관 절개술 3 주 후 토끼의 CT 이미지이고, C는 기관 절개술 3 주 후 수확 된 기관의 총 발견 및 H & E- 염색 된 섹션으로, 화살표는 기관 상피를 나타낸다. 축, 시상 및 3D 재구성 CT 스캔 이미지는 감염, 튜브 변위 또는 기관 협착증과 같은 관련 합병증의 징후없이 적절하게 위치된 기관 절개관을 보여주었다. 3 주 후 기관 표본의 조직학은 기관의 전방 부분 주위의 상피 및 염증성 조직 잔해가 두꺼워지는 것을 보여주었다 (구두 부위). 그러나 기관 내강의 정상적인 구조 (점막, 점막하 및 연골)는 비교적 잘 유지되었다. 후측 기관 벽은 정상적인 내강 구조를 갖는 명확한 염증 세포를 보이지 않았다.

표 1

[0079]

(mm)	3D Model	PMMA 기관절개관
Length A	17	17.10±0.05
Length B	20	20.13±0.08
Length C	22	22.07±0.03
Length D	26	26.07±0.06
Inner diameter	3	3.03±0.03
Outer diameter	4	4.03±0.03

[0080]

본 발명은 컴퓨터 보조 3D 모델과 생체 재료 3D 인쇄의 사용을 결합한 3D 인쇄 TT의 첫 번째 연구이다. 기관 내강을 유지하기 위한 적절한 강성, 기관 점막에 대한 세포 독성 영향 감소, 상처 감염, 호흡기 감염, 튜브 막힘 및 기관 협착과 같은 관련 합병증 예방을 위한 항균 막 활동과 같은 이상적인 TT에 대한 몇 가지 요구 사항이 있다. 또한, 기관절개관은 기관 내강에서 최소 1 주일 및 최대 수개월 동안 지속되는 유치 의료 보철물이므로 삽입 중 튜브의 화학적 및 기계적 변화가 중요한 요소이다. 이러한 측면을 평가하기 위해 연구에서 햄스터 볼 주머니(hamster cheek pouch, HCP) 모델을 발명하였다. 동일한 생리적 조건 (절개술을 받은 동물)에서 기관 절개관(Tracheostomy Tube, TT)의 변화를 평가하는 것이 가장 좋지만, 이 방법은 비용 및 수술의 침습성을 포함하여 몇 가지 단점이 있다. 햄스터 볼 주머니(hamster cheek pouch, HCP)는 구강 점막의 양측 침습이며 구강 발암 및 구강 점막염에 대해 가장 잘 알려진 동물 모델 중 하나이다. 햄스터 볼 주머니(hamster cheek pouch, HCP)의 주요 역할은 음식과 침구를 저장하는 것이기 때문에, 스캐폴드를 위한 저장/삽입 공간으로 HCP를 사용했다. 햄스터 볼 주머니(hamster cheek pouch, HCP) 개구부의 간단한 지압 스트링 봉합으로 2 주 동안 HCP에 스캐 폴드를 쉽게 운반할 수 있었다. 햄스터 볼 주머니(hamster cheek pouch, HCP)는 구강 점막으로부터의 분비(타액) 및 정상적인 세균 상을 포함하여 기관 내강과 유사한 생체 내 환경을 제공할 수 있다. 이 관점에서, 본 발명자들은 기관 절개관(Tracheostomy Tube, TT) 및 구강/치과 보철물과 같은 유치 의료 장치를 평가하기 위한 생체 내 모델로서 햄스터 볼 주머니(hamster cheek pouch, HCP) 를 제안할 수 있다. 햄스터 볼 주머니(hamster cheek pouch, HCP) 모델을 사용하여, 삽입 동안 어떠한 물질도 중대한 화학적 변화를 나타내지 않음을 관찰하였다. 또한, PMMA 수지는 가장 높은 압축 강도를 나타냈다.

[0081]

항균 및 항진균 특성은 기관 절개관(Tracheostomy Tube, TT)용 3D 인쇄 가능 재료를 선택할 때 또 다른 문제이다. S. 아우 레 우스, 포도상 구균 표피, 녹농균 및 칸디다 종 등은 기관 절개관(Tracheostomy Tube, TT) 내강을 오염시키는 가장 빈번한 병원체로 확인되었다. 바이오 필름은 황색 포도상 구균 및 슈도모나스 종에 의한 상부 호흡기 감염, 기관 절개관(Tracheostomy Tube, TT) 폐쇄 및 상처 감염과 관련이 있다. 따라서, 바이오 필름의 존재를 줄임으로써 상처 감염을 줄이기 위한 몇 가지 새로운 시도가 있었다. 이 관점에서, 본 발명자들은 각 스캐폴드에서 바이오필름 형성을 평가했다. PLA 및 PMMA- 수지 스캐 폴드는 다른 스캐 폴드에 비해 S. 아우 레

우스 및 녹농균에 대해 더 낮은 박테리아 수를 나타냈다. 그러나 PLA는 Candida 수가 가장 많았다. 종합하면, PMMA- 수지는 S. 아우 레 우스, P. 아에 루기 노사 및 C. 알비 칸스에 대해 비교적 일관되게 낮은 CFU 수를 나타냈다. 재료의 특성과 관련하여, 임플란트의 소수성, 거칠기, 표면 화학 및 표면 자유 에너지는 바이오필름 형성에 중요한 역할을 할 수 있다. 본 발명에서 PCL과 PLA는 S. aureus, P. aeruginosa 및 C. albicans에서 가장 높은 CFU를 나타냈다. 이러한 결과는 3D 프린팅 방법 (FDM, DLP)에 따른 스캐폴드 사이의 표면 거칠기 차이와 재료의 물리적 화학적 특성의 차이 때문일 수 있다.

[0082] 이러한 결과를 바탕으로 PMMA- 수지가 최종적으로 3D 프린트 된 기관 절개관(Tracheostomy Tube, TT)의 재료로 선택되었다. 3D 설계 모델은 DLP 프린터를 사용하는 지원 시스템없이 3D 인쇄에 성공했다. 토끼 기관 절개술 실험에서, 3D- 인쇄된 PMMA- 수지 튜브는 토끼 기관에 쉽게 삽입되었다. 또한, 튜브가 합병증없이 3 주 동안 기관 내강에 적절하게 위치되었음을 확인하였다. 조직학은 또한 기관 점막에서 PMMA- 수지에 대한 감염, 알레르기 또는 이물질 반응의 명확한 징후를 나타내지 않았다.

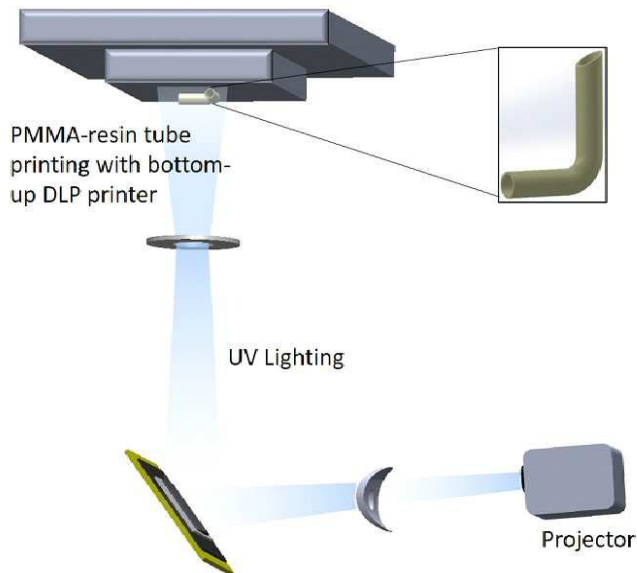
[0083] PMMA 수지는 DLP 3D 프린터에 사용될 수 있는 대안적인 3D 인쇄 기관 절개관(Tracheostomy Tube, TT) 재료로 제안될 수 있다. 1) PMMA 수지는 우수한 삽입 전 및 삽입 후 기계적 특성을 나타냈다. 2) 명확한 세포 독성은 보이지 않았다. 3) 생체 내 삽입 동안 명확한 화학적 변화는 없었으며, 바이오필름 형성은 낮았으며, 4) TT의 3D 프린팅에서 치수 정확도를 나타냈다.

[0085] 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

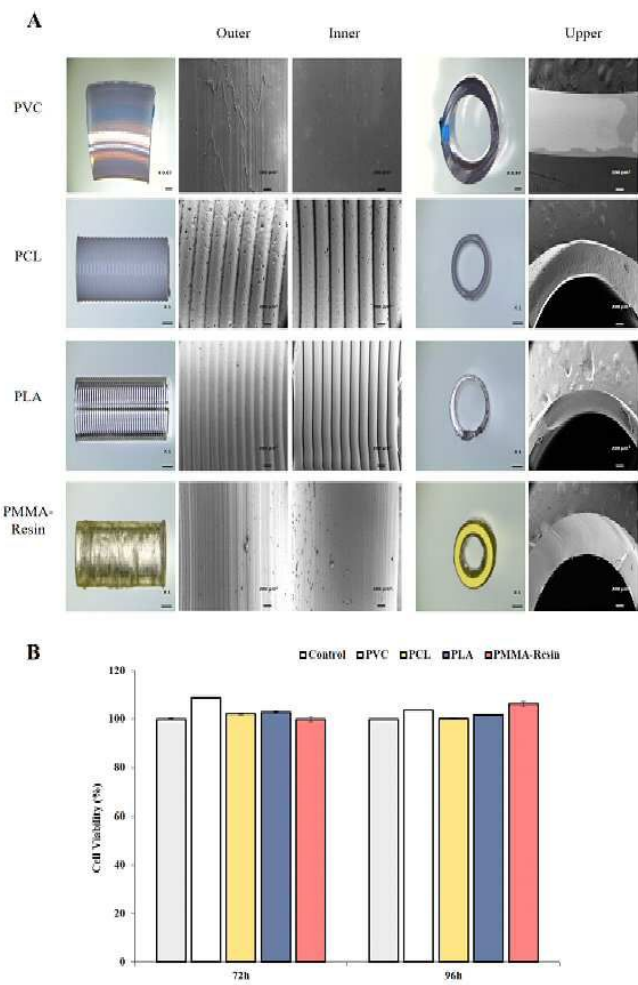
[0086] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

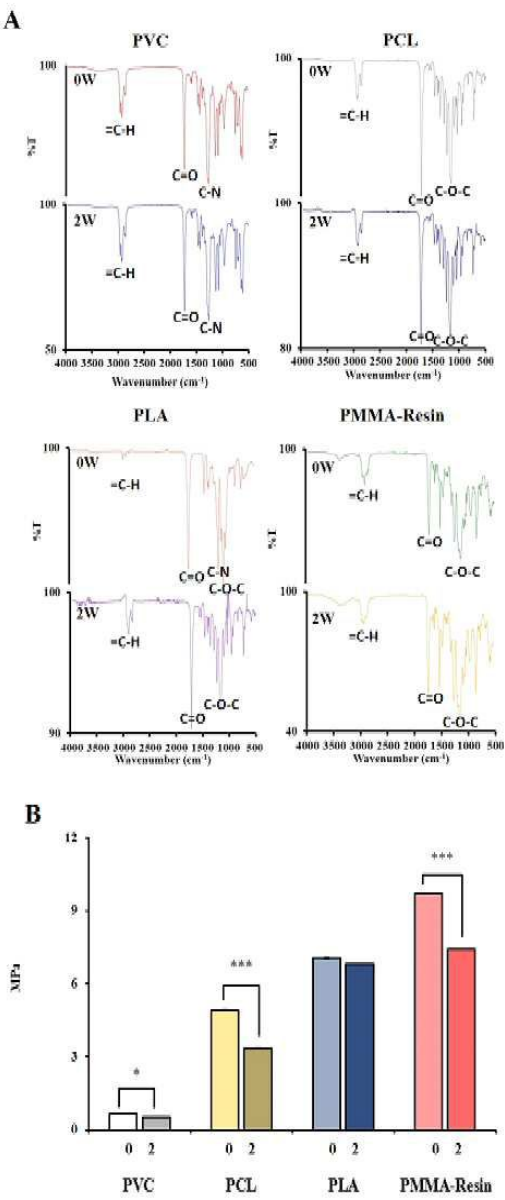
도면1



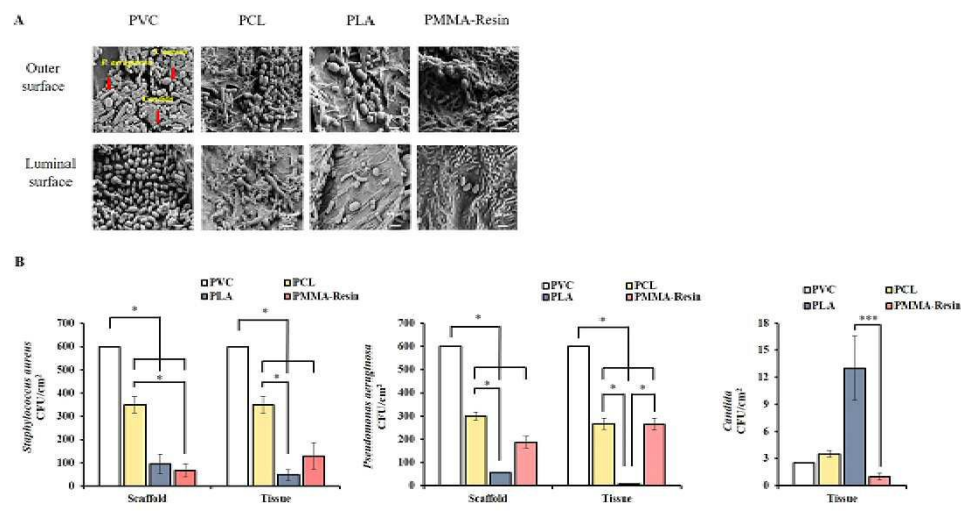
도면2



도면3



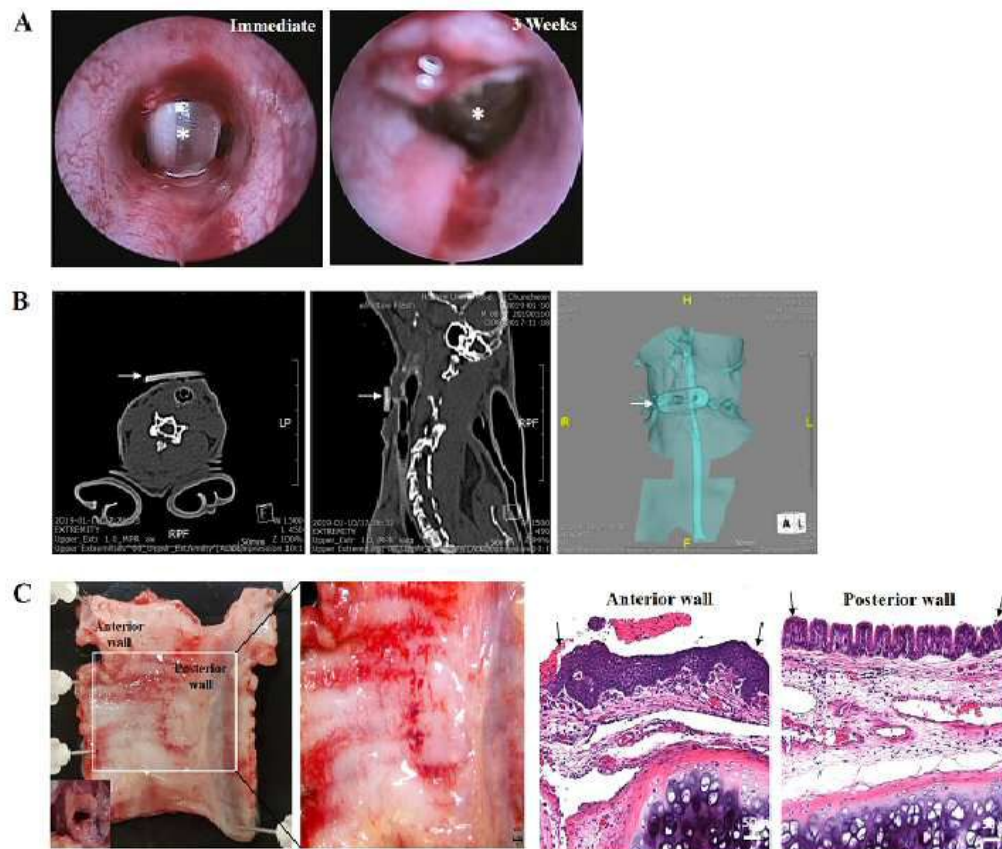
도면4



도면5



도면6



도면7

