



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년11월11일
 (11) 등록번호 10-1327209
 (24) 등록일자 2013년11월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C12M 3/02 (2006.01) C12M 1/42 (2006.01)
 C12M 1/34 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2011-0059186
 (22) 출원일자 2011년06월17일
 심사청구일자 2011년06월21일
 (65) 공개번호 10-2012-0139399
 (43) 공개일자 2012년12월27일
 (56) 선행기술조사문헌
 JP2010252753 A*
 KR100915605 B1*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 서울대학교산학협력단
 서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
 (72) 발명자
 임기택
 서울특별시 관악구 남부순환로206길 28 (봉천동)
 정종훈
 서울특별시 서초구 서초중앙로29길 28, 미도아파
 트 307동 1410호 (반포동)
 정필훈
 서울특별시 종로구 연건동 28번지 서울대학교치과
 병원 7층 711호
 (74) 대리인
 특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 13 항

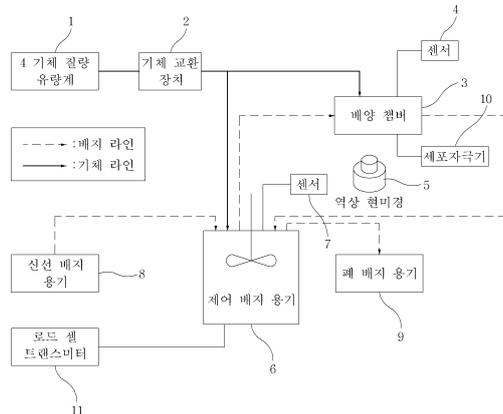
심사관 : 이현송

(54) 발명의 명칭 **성체 줄기세포를 위한 초음파 자극형 관류식 배양 자동화시스템**

(57) 요약

본 발명은 성체줄기세포를 생체 내 (in vivo)와 유사한 생체 외 (in vitro) 배양 위한 새로운 관류식 배양 챔버 시스템을 개발함으로써 생체모방형 생체의 세포 배양시스템을 제공한다. 또한, 본 발명은 성체줄기세포의 분화를 촉진하기 위한 생체역학적 자극방법으로서 초음파 자극을 이용하고, 그 강도 및 자극 시간에 따른 세포의 증식을 검토하여, 최적의 초음파 자극 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 새로운 관류식 배양 챔버시스템에 상기 최적의 초음파 자극 방법을 적용하여 세포의 증식 및 분화가 최적화된 새로운 관류식 배양 챔버시스템을 제공한다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

CO₂, O₂, N₂, 공기의 4-기체 혼합물 제어부,

제어 배지용기 및

배양챔버를 포함하는 관류식 배양챔버시스템에 있어서,

상기 제어 배지용기 및 상기 배양챔버가 상기 4-기체 혼합물 제어부로부터 4-기체 혼합물을 공급받고, 상기 배양챔버가 상기 제어 배지용기로부터 배양 환경이 조절된 배지를 공급받으며, 상기 배양챔버의 세포 배양이 연속적으로 모니터링되는 관류식 배양챔버시스템으로서,

상기 배양챔버가 세포자극기를 포함하고, 세포자극이 초음파 자극인 관류식 배양챔버시스템.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 제어 배지용기가 신선 배지 용기로부터 배지를 공급받는 관류식 배양챔버시스템

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 배양챔버로부터 배출된 배지가 상기 제어 배지용기로 회수되는 관류식 배양챔버시스템.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 배양챔버가 역상 현미경을 포함하는 관류식 배양챔버시스템.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 제어 배지용기가 pH 센서, DO 센서, 암모니아 센서 및 온도 센서로 이루어진 군으로부터 선택되는 센서를 1종 이상 포함하는 관류식 배양챔버시스템.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 배양챔버가 pH 센서, DO 센서, CO₂ 센서, O₂ 센서, 온도 센서 및 습도 센서로 이루어진 군으로부터 선택되는 센서를 1종 이상 포함하는 관류식 배양챔버시스템.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 배양되는 세포가 성체 줄기세포인 관류식 배양챔버시스템.

청구항 10

제 1 항에 있어서, 상기 배양챔버가 일정한 작업 부피를 갖는 관류식 배양챔버시스템.

청구항 11

제 1 항에 있어서, 초음파 자극이 200mW/cm² 이하의 강도인 관류식 배양챔버시스템.

청구항 12

제 1 항에 있어서, 초음파 자극이 5% 이상 50% 미만의 듀티 사이클을 갖는 관류식 배양챔버시스템.

청구항 13

제 1 항에 있어서, 초음파 자극이 1분/일 내지 10분/일 범위의 자극시간인 관류식 배양챔버시스템.

청구항 14

제 1 항에 있어서, 초음파 자극이 $200\text{mW}/\text{cm}^2$ 이하의 강도, 30% 이하의 듀티 사이클, 10분/일의 자극시간인 관류식 배양 챔버시스템.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 초음파 자극이 $50\text{mW}/\text{cm}^2$ 의 강도, 5% 의 듀티 사이클, 10분/일의 자극시간인 관류식 배양 챔버시스템.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 생체역학적 자극기술로서 초음파 자극방법을 이용한, 성체줄기세포의 생체의 분화를 촉진하기 위한 생체모방형 관류식 배양챔버시스템에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 종래, 세포에 유체 흐름을 가한 전단응력에 대한 기계적 자극 영향에 대한 연구가 생체 내 배양환경을 생체모방 하려는 연구의 일환으로 최근 중요시되고 있다. 생체 내의 역학적전이 (mechanotransduction) 는 세포에게 기계적 자극을 가하면, 생체화학적 신호로 전환되는 에너지 변환의 일환이다. 세포에 유체흐름을 가한 전단 응력 등의 기계적 자극 영향은 역학적 전이활동을 증대시킴으로써 가장 중요한 자극 중의 일부로 보고되고 있다. 또한 생체 세포의 근원이 되는 줄기세포를 생물체를 이루는 많은 종류의 서로 다른 세포로 분화시키고자 하는 의료 분야의 연구에 있어서, 분화를 촉진하기 위한 배양액의 조성분과 분화 유도 물질의 처리를 통한 생화학적 처리 외에 세포에 인장력, 전단력, 압축력 및 초음파 등 다양한 기계적 처리법들이 적용되고 있다.

[0003] 인간 및 동물의 기계-반응 (mechano-responsive) 조직에 포함된 세포의 경우 인장력, 전단력, 압축력 등과 같은 다양한 기계적 자극에 노출되어 있으며, 관절 연골 (articular cartilage) 조직의 경우 반복적인 기계적 자극은 관절염 (arthritis) 과 같은 질병의 원인이 된다. 따라서, 최근 들어 기계적 자극이 유발하는 세포 반응에 대한 연구가 주목받고 있다.

[0004] 또한, 줄기세포로부터 인간 및 동물에 대한 대체 조직 (replacement tissue), 특히 기계-반응 조직의 경우, 완전한 기능을 가지는 조직으로 줄기세포를 분화시키기 위해서는 줄기세포를 배양하는 동안 배양 중인 세포에 기계적 자극을 인가하는 것이 필요하다. 이 경우 세포에 인가되는 자극의 정도는 세포의 유형 및 분화시키고자 하는 조직의 종류에 따라 다양하다.

[0005] 세포 반응의 연구 및 줄기세포 분화를 위해 인장력, 전단력, 압축력 등의 기계적 자극에 대한 연구가 수행되어 왔다. 예를 들면, 한국 특허공개공보 제10-2006-0134264호에는, 줄기세포의 분화를 유도하기 위한 기계적 자극으로서 초음파를 이용할 수 있는 세포 자극 및 검출용 바이오칩에 대하여 기재하고 있다. 또한, 한국 특허공개공보 제10-2004-0028700호에는, 자기력을 이용하여 세포에 국부적인 아이덴테이션 (indentation) 을 인가하여 줄기 세포로부터 특정 조직의 분화를 촉진하는 장치에 대하여 기재하고 있다. 또한, 한국 특허공개공보 제10-2002-0015575호에는, 추상적인 개념의 기계적 자극을 이용한 조직 재생에 관하여 기재하고 있다. 또한, 한국 특허공개공보 제10-2008-0004881호에는, 골수유래 중간엽 줄기세포에 초음파 처리하여 중간엽 줄기세포의 세포부착능력 및 증식능력을 향상시키는 것을 특징으로 하는 골수유래 중간엽 줄기세포의 수득 방법을 개시하고 있고, 초음파 처리 방법으로 5-50분/day 로 배양초기부터 1-12일간 처리하는 방법, 초음파로 10-1000mW/cm² 강도로 처리하는 방법 등이 개시되어 있다.

[0006] 그러나, 상기 자극 방법은 장치내부에서 배양된 세포에 대하여 기계적 자극을 가할 수 없고, 또한 소수의 세포

만을 대상으로 할 수 있으므로, 세포의 분석에 필요한 충분한 세포를 획득할 수 없는 문제점이 있다.

[0007] 한편, 생체조직공학과 관련해서, 동물의 세포 및 조직을 생체 외에서 배양하고자 하는 많은 노력이 있어 왔다. 그러나, 동물의 세포 및 조직을 생체 외에서 배양하는 경우, 생체 내 배양에 비해 배양 효율이 떨어지며, 또한 배양시 고가의 영양 배지에 의존하고 있다. 특히, 성체 줄기세포의 배양은 일반 동물의 세포 및 조직을 배양하는 것보다 어려워, 생체 외에서 이들 성체 줄기세포를 3차원적으로 배양할 수 있는 시스템의 개발이 필요한 실정이다. 이와 관련하여, 성체 줄기세포 배양을 위한 관류식 바이오리액터시스템은 3차원 조직을 생체 외에서 재생시키고자 세포의 증식 및 분화용으로 적용될 수 있고, 특히 장기 (organ) 의 장기적 배양을 위한 지지 장치로서 부각되고 있다. 일반적으로, 세포배양시스템은 세포가 자랄 수 있는 생체 외 (in vitro) 환경을 제공하도록 설계한 것으로, 관류식 흐름형태인 배양시스템은 일반적인 환경, 즉 온도 37°C, CO₂ 5% 환경에서 이루어지지만, 정밀한 세포성장의 환경 제어 (정밀한 계측센서 및 가스제어) 및 실시간 세포배양의 이미지 모니터링 기능은 가능하지 못한 실정이다.

[0008] 한국 특허등록공보 제849516호에는 배양되는 세포가 세포 배양챔버 내에 배양액이 유출입되는 것에 영향받지 않고 균일하게 분포된 상태에서 배양될 수 있는 세포배양 챔버 및 이를 포함한 세포배양장치가 개시되어 있고, 특히, 배양챔버에 세포배양에 필요한 가스 및 배양액의 공급 양을 조절하는 제어를 할 수 있는 구성이 개시되어 있다. 그러나, 구체적인 제어 방법이 기재되어 있지 않으며, 세포 배양을 촉진하기 위한 생체역학적 자극기술을 사용하고 있지 않아, 원하는 만큼의 세포 배양을 얻기가 곤란하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은, 상기를 감안하여 예의 연구를 거듭한 결과, 산소의 전달, pH, DO, 온도, 기계적 자극뿐 아니라 멸균상태 고려 등 종합적인 적정 세포배양환경 운전이 가능하도록 제어할 수 있는 관류식 배양챔버시스템을 개발하고, 생체역학적 자극방법으로서 초음파 자극을 이용하고, 그 강도 및 자극 시간에 따른 최적 세포의 증식 방법을 알아내어 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

[0010] 따라서, 본 발명은 성체줄기세포를 생체 내 (in vivo)와 유사한 생체 외 (in vitro) 배양 위한 새로운 관류식 배양 챔버시스템을 개발함으로써 생체모방형 생체외 세포 배양시스템을 제공하는 것을 목적으로 한다. 또한, 본 발명은 성체줄기세포의 분화를 촉진하기 위한 생체역학적 자극방법으로서 초음파 자극을 이용하고, 그 강도 및 자극 시간에 따른 세포의 증식을 검토하여, 최적의 초음파 자극 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 또한, 본 발명은 새로운 관류식 배양 챔버시스템에 상기 최적의 초음파 자극 방법을 적용하여 세포의 증식 및 분화가 최적화된 새로운 관류식 배양 챔버시스템을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명에서, 관류식 배양챔버시스템은 CO₂, O₂, N₂, 공기의 4-기체 혼합물 제어부, 제어 배지용기 및 배양챔버를 포함하고, 상기 제어 배지용기 및 상기 배양챔버는 상기 4-기체 혼합물 제어부로부터 4-기체 혼합물을 공급받고, 상기 배양챔버는 상기 제어 배지용기로부터 배양 환경이 조절된 배지를 공급받으며, 상기 배양챔버의 세포 배양이 연속적으로 모니터링된다.

[0012] 한 실시태양에서, 상기 제어 배지용기는 신선 배지 용기로부터 배지를 공급받을 수 있고, 상기 배양챔버로부터 배출된 배지는 상기 제어 배지용기로 회수되어 재사용될 수 있다.

[0013] 한 실시태양에서, 상기 배양챔버는 역상 현미경을 포함할 수 있고, 추가로 세포자극기를 포함할 수 있다.

[0014] 한 실시태양에서, 배양챔버에 포함된 세포자극기는 초음파 자극을 가할 수 있다.

[0015] 한 실시태양에서, 상기 제어 배지용기에는 pH 센서, DO 센서, 암모니아 센서 또는 온도 센서 등을 포함할 수 있다.

[0016] 한 실시태양에서, 상기 배양챔버는 pH 센서, DO 센서, CO₂ 센서, O₂ 센서, 온도 센서 또는 습도 센서 등을 포함할 수 있다.

[0017] 한 실시태양에서, 상기 배양챔버에서 배양되는 세포는 성체 줄기세포일 수 있다.

[0018] 한 실시태양에서, 상기 배양챔버는 일정한 작업 부피를 갖도록 설계될 수 있다.

[0019] 한 실시태양에서, 초음파 자극은 $200\text{mW}/\text{cm}^2$ 이하의 강도를 갖거나, 5% 이상 50% 미만의 듀티 사이클을 갖거나, 1분/일 내지 10분/일 범위의 자극시간을 가질 수 있다.

[0020] 한 실시태양에서, 초음파 자극은 $200\text{mW}/\text{cm}^2$ 이하의 강도, 30% 이하의 듀티 사이클, 10분/일의 자극시간을 가질 수 있다.

[0021] 한 실시태양에서 초음파 자극은 $50\text{mW}/\text{cm}^2$ 의 강도, 5% 의 듀티 사이클, 10분/일의 자극시간을 가질 수 있다.

발명의 효과

[0022] 본 발명에서는, 생체 내 (in vivo)와 유사한 생체 외 (in vitro) 배양 위한 새로운 관류식 배양 챔버시스템을 제공하여, 배양이 용이하지 않은 성체줄기세포의 배양이 가능하고, 나아가, 새로운 관류식 배양 챔버시스템에 최적의 초음파 자극 방법을 적용하여 세포의 증식 및 분화가 최적화된 새로운 관류식 배양 챔버시스템을 제공한다. 또한, 본 발명에서는 생체 외에서 동물의 세포 및 조직을 스트레스를 받지 않고 3차원으로 배양할 수 있는 배양시스템을 제공하여, 세포 배양기술, 생체자극 기술 등을 이용한 인공조직 제조 등에 응용될 수 있다.

또한 본 발명은 기존의 세포배양 과정과 달리 장기 (organ) 에 영양과 기체를 공급하여야하는 기술에도 적용할 수 있어, 살아있는 인체와 가장 비슷한 환경의 3차원 배양시스템을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1 은 한 예시적인 실시태양에 따른 관류식 배양챔버시스템의 도면이다.

도 2 는 한 예시적인 실시태양에 따른 배양챔버의 설계도이다.

도 3 은 한 예시적인 실시태양에 따른 3차원 세포배양 챔버의 도면이다.

도 4 는 듀티 사이클에 대해 간략화하여 나타낸 도면이다.

도 5 는 한 예시적인 실시태양에 따른 실시예 14 내지 17에서 사용된 관류식 배양챔버시스템의 도면이다.

도 6 은 참고예 1 및 실시예 14 에 따라 배양된 치조골 줄기세포의 세포 분화 및 성장 모습을 전자 현미경으로 관찰한 도면이다.

도 7 은 실시예 1 에 따라 배양된 세포수를 나타낸 도면이다.

도 8 은 실시예 2 에 따라 배양된 세포수를 나타낸 도면이다.

도 9 는 실시예 3 에 따라 배양된 세포수를 나타낸 도면이다.

도 10 은 실시예 4 에 따라 배양된 세포수를 나타낸 도면이다.

도 11 은 실시예 5 에 따라 배양된 세포수를 나타낸 도면이다.

도 12 는 실시예 6 에 따라 배양된 세포수를 나타낸 도면이다.

도 13 은 실시예 7 에 따라 배양된 세포수를 나타낸 도면이다.

도 14 는 실시예 8 에 따라 배양된 세포수를 나타낸 도면이다.

도 15 는 실시예 9 에 따라 배양된 세포수를 나타낸 도면이다.

도 16 은 실시예 10 에 따라 배양된 세포수를 나타낸 도면이다.

도 17 은 실시예 11 에 따라 배양된 세포수를 나타낸 도면이다.

도 18 은 실시예 12 에 따라 배양된 세포수를 나타낸 도면이다.

도 19 는 실시예 13 에 따라 배양된 세포수를 나타낸 도면이다.

도 20 은 실시예 14 에 따라 배양된 치조골 줄기세포의 3차원 지지체 상에서의 세포 분화 및 성장 모습을 전자 현미경으로 관찰한 도면이다.

도 21 은 실시예 15 및 16 에 따라 배양된 세포의 생존도를 나타낸 도면이다.

도 22 는 실시예 17 에 따라 배양된 세포의 생존도를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 이하, 본 발명의 실시형태에 대해 도면을 참조하면서 상세하게 설명한다. 상세한 설명, 도면 및 청구범위에 기재된 예시적인 실시태양은 제한적인 것으로 의도된 것이 아니다. 본원에 제시된 주제 대상의 사상 또는 범위로부터 벗어남 없이, 다른 실시태양이 이용될 수 있고, 다른 변경이 이루어질 수 있다. 본원에 전반적으로 기재되고, 도면에서 예시된 바와 같이, 본원에 개시된 사항은 매우 광범위하고 상이한 구성으로 배열, 치환, 조합 및 설계될 수 있으며, 이들 모든 구성은 명백하게 고려되고 본 개시의 일부를 이룬다는 점은 용이하게 이해될 것이다.
- [0025] 생체조직공학과 관련해서, 성체 줄기세포 배양을 위한 관류식 바이오리액터시스템은 3차원 조직을 생체 외에서 재생시키고자 세포의 증식 및 분화용으로 적용될 수 있고, 특히 장기 (organ) 의 장기적 배양을 위한 지지 장치로서 사용될 수 있다. 이러한 배양시스템은 산소의 전달, pH, DO, 온도, 기계적 자극뿐 아니라 멸균상태 고려 등 종합적인 적정 세포배양환경 운전이 가능하도록 제어되어야 할 뿐만 아니라, 이를 가능하도록 자동적인 운전시스템이 요구된다. 이러한 시스템을 설계할 때 가장 중요한 설계인자들로서는 세포의 접촉성을 고려하고, 배지의 순환, 영양소의 상태파악, pH, 온도, 배양배지내의 용존산소량 (DO) 상태, CO₂, O₂, 유체 관류 속도, 기계적 자극과 같은 자극기술 등을 모두 고려해야 한다.
- [0026] 도 1 은 본 발명의 관류식 배양시스템의 간단한 공정도를 간략히 나타낸 것이다. 본 발명의 관류식 배양시스템은 신선한 배지를 공급하기 위한 신선 배지용기 (8), 배지를 순환시키기 전 신선 배지를 제어해주는 제어 배지용기 (Control based Vessel, 교반 및 pH, DO 등 계측부 포함) (6), 세포가 배양될 수 있는 공간을 제공하고, 세포를 직접 배양시키는 배양 챔버 (3) 및 세포환경을 계측하는 센서 (4), 배지의 pH 및 DO를 유지시키고 세포배양 환경을 최적화시키기 위한 CO₂, O₂, N₂, 공기의 4-기체 혼합물 제어부 ((1) 및 (2)), 사용된 배지를 적정 조건별로 선택하여 배출시킬 수 있는 폐 배지 용기 (waste vessel) (9) 등으로 구성될 수 있다.
- [0027] 도 1 에서 4-기체 혼합물 제어부는 배양 챔버시스템의 세포의 배양환경을 제어하기 위한 것으로, 공기, N₂, CO₂, O₂ 의 4 가지 기체를 제어하기 위해 사용되며, 통상적으로 사용되는 어떠한 제어기라도 사용될 수 있다. 구체적으로, 본 발명에서는 상기 4-기체 혼합물 제어부는 4 기체 질량 유량계 (mass flow controller) (1) 및 기체교환장치 (2) 등을 포함할 수 있다. 4 기체 질량 유량계 (1) 에는 공기, N₂, CO₂ 및 O₂ 의 공급원이 연결되어 있으며, 공기, N₂, CO₂ 및 O₂ 의 유량을 0 내지 500CC/min 의 속도로 조절할 수 있다. 또한, 4 기체 질량 유량계 (1) 와 배양챔버 (3) 사이에 기체교환장치 (2) 가 설치되어 배양챔버 (3) 내의 공기, N₂, CO₂, O₂ 등의 기체 성분을 적절히 조절하는 것이 가능하다. 또한, 기체교환장치 (2) 로부터 배출된 공기, N₂, CO₂, O₂ 등의 기체 성분은 배양챔버 (3) 뿐 아니라 제어 배지용기 (6) 에도 공급되어, 제어 배지용기 (6) 내의 배지환경을 최적의 상태로 적절하게 조절할 수 있다.
- [0028] 도 1 에서 배양챔버 (3) 는 세포가 직접 배양되는 공간으로, 4 기체 혼합물 제어부로부터 기체가 공급되고, 제어 배지용기 (6) 로부터 신선한 배지가 공급되어, 최적의 세포 배양환경이 유지되도록 설계되었다. 또한, 제어 배지용기 (6) 와 배양챔버 (3) 에는 관류 유량 조절을 위한 정밀 연동 펌프가 설치될 수 있으며, 신선한 배지가 배양챔버 (3) 에 유입된 후, 사용된 배지는 다시 제어 배지용기 (6) 로 회수될 수 있다. 사용된 배지의 배출 및/또는 회수를 위해 배양챔버 (3) 와 제어 배지용기 (6) 사이에는 관류 유량 조절을 위한 정밀 연동 펌프가 설치될 수 있으며, 상기 정밀 연동 펌프는 제어부와 연결되어 원하는 범위 내에서 자동적으로 조절될 수 있다. 또한, 사용된 배지는 배양챔버 (3) 로부터 직접 폐 배지 용기 (9) 로 배출될 수도 있고, 배양챔버 (3) 와 폐 배지 용기 (9) 사이에는 관류 유량 조절을 위한 정밀 연동 펌프가 설치될 수 있으며, 상기 정밀 연동 펌프는 제어부와 연결되어 원하는 범위 내에서 자동적으로 조절될 수 있다.
- [0029] 또한, 배양챔버 (3) 에는 pH, DO, CO₂, O₂ 및 온도, 습도 등을 검출하여 세포의 배양 환경을 실시간으로 모니터링할 수 있도록 센서 (4) 가 설치될 수 있으며, 또한 상기 센서 (4) 로부터 계측된 정보를 표출할 수 있는 영상 표시부 (도면에 나타내지 않음) 가 설치될 수 있다. 또한, 배양챔버 (3) 의 내부 압력을 측정하기 위한 압력 전송기 (pressure transmitter) 가 설치될 수 있으며, 상기 센서 (4) 및 압력 전송기의 수치는 제어부를 통

해 원하는 수치 범위로 조절될 수 있다.

- [0030] 본 발명에서는, 배양챔버 (3) 의 상단 뚜껑부와 하단 바닥부가 유리로 구성될 수 있으며, 특히 세포 배양을 모니터링할 수 있는 창의 역할을 하는 구형 유리가 바닥부에 설치되는 것이 바람직하다. 하단 바닥부에는 역상 현미경 (5) 을 설치하여 세포 배양을 연속적으로 실시간 모니터링할 수 있도록 구성할 수 있으며, 배양되는 줄기세포의 세포 이미지를 위상차 현미경 (예를 들면, Nikon TS100, Japan) 및 디지털 카메라 (예를 들면, SocpeTek DCM200, China) 를 사용하여 촬영할 수 있다. 본 발명의 관류식 배양 챔버시스템은, 상기 실시간 모니터링 시스템을 도입함으로써, 세포의 배양 모습을 육안 및 이미지로 확인할 수 있는 장점을 제공할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 관류식 배양챔버시스템에는, 줄기세포의 분화를 촉진하기 위한 생체역학적 자극방법이 사용될 수 있으며, 배양챔버 (3) 의 하단부에 세포자극기 (10) 을 설치하여, 관류 흐름으로부터 유발되는 유체 전단력 이외의 초음파, 미세전류, 전자기장 등의 자극 방법이 추가로 사용될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 관류식 배양챔버시스템에는, 배양챔버 (3) 에 공급되는 배지환경을 조절 및 유지하기 위하여 제어 배지용기(Control based Vessel) (6) 를 포함한다. 제어 배지용기 (6) 는 배양챔버 (3) 의 배지 관류를 위한 입력부와 연결되어 있어, 배지를 순환시키기 전 신선 배지를 제어할 수 있도록 구성된다. 또한, 제어 배지용기에는 pH, DO, 암모니아, 온도 등을 측정할 수 있는 센서가 설치되며, 제어 배지용기 (6) 내의 신선 배지의 균일성을 위해 상단에 교반기가 설치될 수 있으며, 상기 교반기에는 교반 모터가 설치될 수 있다.
- [0033] 제어 배지용기 (6) 는 배양챔버 (3) 의 배지 입력부와 연결되며, 가변식 정량펌프를 통해 신선한 배지를 배양챔버에 연속적으로 공급할 수 있다. 하나의 실시태양으로서, 상기 가변식 정량펌프로써 가변 속도 연동 펌프 (Variable Speed Peristaltic Pump) 이 사용될 수 있다.
- [0034] 배양챔버 (3) 에 공급되는 신선 배지는 상기 정밀제어가 가능한 정량펌프를 이용하여 공급되는데, 약 0.03~0.3 ml/min 의 관류량으로 공급될 수 있다. 상기 관류량은 배양하고자 하는 세포에 따라 달라질 수 있고, 세포에게 적당한 전단응력 (shear stress)를 유발하여 성장에 긍정적인 환경적 영향을 제공해 줄 수 있다면 제한되지 않는다.
- [0035] 또한, 본 발명에서는, 제어 배지용기 (6) 는 배양챔버 (3) 의 배지 출력부를 통해 연결될 수 있다. 즉, 본 발명에서는, 제어 배지용기 (6) 가 배지 입력부 및 출력부 모두에 연결될 수 있으며, 배양챔버 (3) 의 배지 출력부로부터 배출되는 미사용 배지를 제어 배지용기 (6) 에 공급하여, 미사용 배지의 재사용이 가능할 수 있다. 일반적인 미생물 또는 세포 배양을 위한 배지와는 달리, 줄기세포의 배양에 사용되는 배지에는 NaCl, NaHCO₃, D-글루코스, L-글루타민 등 다양한 영양 성분이 포함되어야 하므로, 상당히 고가이다. 또한, 배양 챔버 (3) 의 배지 출구부의 배지의 영양 성분은 사용되지 않은 상태로 배출되는 경우가 많으므로, 출구부의 미사용 배지를 재순환시키는 구성을 통해 본 발명의 관류식 배양챔버시스템은 경제성 또한 확보할 수 있다. 또한, 본 발명에서는, 제어 배지용기에 암모니아, DO, pH 등을 측정할 수 있는 센서 (7) 가 설치될 수 있고, 출구부로부터 회수되는 배지의 부산물이 많아지거나 영양 성분의 소모가 많을 경우, 제어부를 통해 제어 배지용기 (6) 로부터 폐 배지 용기 (9) 로 배출되도록 조절될 수 있으며, 또한 4 기체 혼합물 제어부로부터 산소 등을 공급받도록 조절될 수 있다. 제어 배지용기 (6) 로부터 폐 배지 용기 (9) 로의 배지의 배출은 임의로 구비된 펌프 시스템을 통해 조절될 수 있다. 구체적으로, pH 가 5 이하이거나, DO 측정시의 산소 함량이 10ppm 이하인 경우에는, 제어 배지용기 (6) 로부터 폐 배지 용기 (9) 로 배지의 일부 이상이 배출되는 것이 바람직하다. 이 때, 배출된 배지 양만큼 로드 셀 트랜스미터의 신호를 받아 신선한 배지를 공급받을 수 있다.
- [0036] 또한, 본 발명에서는, 제어 배지용기 (6) 와 미사용 신선 배지 용기 (8) 를 연결하여 제어 배지용기 (6) 내의 배지 환경을 적절하게 조절할 수 있다. 제어 배지용기 (6) 의 하단에는 제어 배지용기 전체의 무게를 측정할 수 있는 로드 셀 트랜스미터 (Load Cell Transmitter) (11) 이 설치될 수 있으며, 폐 배지 용기 (9) 로 배출되는 배지의 양에 따라 신선 배지 용기 (8) 로부터 적절량의 미사용 신선 배지가 제어 배지용기 (6) 에 보충될 수 있다.
- [0037] 이하에서는, 본 발명에서 사용되는 배양챔버의 구조에 대해 도 2 를 통해 보다 구체적으로 살펴본다. 도 2 는 본 발명에서 사용되는 배양챔버의 설계도를 간략히 나타낸 것이다. 상술한 바와 같이, 본 발명에서 사용되는 배양챔버는 세포의 배양환경을 실시간으로 모니터링할 수 있도록 설계되었으며, 세포 환경제어가 가능하도록 pH, DO, CO₂, O₂ 및 온도, 습도 등의 센서를 설치하여 실시간으로 자료수집하여 분석할 수 있다. 또한, 배양챔버에는 신선한 배지가 주입되어 세포배양에 사용된 후 세포조직을 신선한 상태로 유지하기 위해서 연속적

으로 교환되어야 하므로, 배양챔버와 이를 포함하는 배양 챔버시스템에는 지속적인 배지의 공급과 배출과정을 원활히 수행할 수 있는 구성이 필수적이며, 본 발명에서는 상술한 정량 펌프에 의해 정밀하게 조절 및 유지될 수 있다.

[0038] 특히, 본 발명에서 사용되는 배양챔버는 가변식 정밀 연동 펌프를 통해서 배양챔버에 배지가 연속적으로 공급되더라도, 작업 부피 (working volume) 를 약 3 ml로 정밀하게 유지할 수 있도록 기구학적으로 설계될 수 있다.

[0039] 또한, 본 발명에서 사용되는 배양챔버는 정밀한 온도유지를 위하여 수냉식 구조로 설계될 수 있으며, 이를 위해 물의 입출구부를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에서 사용되는 배양챔버는 도 3의 3차원 세포배양 챔버를 도 2의 세포 배양챔버 내부에 장착할 수 있는 구조로서, 3차원 세포배양을 정밀제어할 수 있는 구조를 갖는다. 또한, 본 발명에서 사용되는 배양챔버는 배지의 관류를 위한 입출구부 외에도, 혼합가스의 입출구부, 다양한 센서의 설치부를 포함할 수 있다.

[0040] 또한, 본 발명에서 사용되는 배양챔버는 가장 중요한 설계 인자 중 하나인, 가압밀균을 고려하여, 그림 2에서 나타낸 바와 같이 배양 챔버시스템의 다양한 센서류의 이찰탁 (재구성) 이 용이하도록 뚜껑부, 챔버부, 바닥부, 봉합부, 입출구부 등이 쉽게 분리될 수 있는 구조를 갖는 것이 바람직하다.

[0041] 또한, 본 발명의 관류식 배양챔버시스템에는, 줄기세포의 분화를 촉진하기 위한 생체역학적 자극방법이 사용될 수 있다. 인체 내의 조직을 이루는 다양한 세포들은 일정한 물리적 영향을 받고 있는데, 혈액의 흐름에 따른 혈관 내피세포는 전단응력, 연골 세포의 경우 압축하중, 인대 세포의 경우 인장자극 등에 주로 영향을 받는다. 이에 실제 생체와 유사한 환경을 체외에서 제공하고 생체 적응 능력을 향상시키기 위해 바이오리액터를 이용한 물리적 자극을 세포에 직접 부가하는 시스템이 도입되었다 (Sodian 외, 2002). 이러한 생체 외부에서의 물리적 환경이 세포의 증식과 분화 등의 기능에 많은 영향을 끼치며 이에 대한 많은 연구가 이루어져 왔다. 이와 같이 생체 내 각 조직은 각각 특이한 물리적 자극을 일정하게 받고 있으며, 조직의 분화와 형성에도 각각의 조직마다 특이한 물리적 자극이 영향을 줄 수 있다. 따라서, 관류식 배양챔버시스템에도 세포 성장과 분화를 촉진하기 위한 물리적, 기계적 자극이 일반적인 화학적인 자극과 함께 사용될 수 있다.

[0042] 본 발명에서는 인장력, 전단력, 압축력 및 초음파 등 다양한 기계적 처리법 뿐 아니라, 미세전류, 전자기장, 및 자기장 자극 등의 생체역학적 자극방법이 다양하게 사용될 수 있으며, 상기 자극방법의 복수의 조합도 가능하다.

[0043] 특히, 본 발명에서는, 생체역학적 자극방법 중 초음파 자극방법을 이용할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 사용하는 초음파 자극시스템은 기존 공지된 어떠한 초음파 자극시스템도 사용될 수 있으며, 특별히 제한되는 것은 아니다.

[0044] 통상적으로 초음파 자극시스템은 본체와 초음파 자극부 및 전원부로 구성된다. 또한, 일반적으로, 초음파 파형은 연속모드와 펄스모드 두 가지로 구별되고, 펄스 모드에서는 듀티 사이클(duty cycle)이 규정되는데, 펄스 모드의 듀티 사이클은 방형파가 하이 레벨에 있을 때의 사이클당 시간을 의미하고, 펄스 듀티 사이클은 하이와 같이 정의된다.

[0045] 듀티 사이클(duty cycle) = {(펄스폭)/(사이클)} × 100

[0046] 도 4는 상기 식의 이해를 위하여, 듀티 사이클에 대해 간략화하여 나타낸 것이다. 여기서, 펄스폭은 펄스 상승 구간의 임계값 50%부터 다음 하강 구간의 임계값 50%까지의 시간을 의미한다.

[0047] 본 발명자들은 생체자극으로서 초음파 자극에 대해 연구한 결과, 적절한 강도의 초음파 자극만이 세포의 증식에 긍정적인 영향을 미칠 수 있고, 적정 조건이 아닐 경우에는 오히려 세포의 증식에 부정적인 영향을 미칠 수 있음을 확인하였다. 세포 배양에 사용되는 평판 배양 (culture plate) 에서, 초음파를 다양한 강도로 자극을 줄 경우, 평판 배양의 중앙 부분에는 세포가 잘 자라지 못하고, 가장자리 부분에서는 세포가 보다 잘 자란다. 즉, 중앙에서 가장자리로 갈수록 세포가 더 잘 자라는 모습을 확인할 수 있다. 또한, 가장자리에 있는 세포는 그 핵의 모습이 뚜렷하였고 세포 각각의 크기가 초음파 자극을 가하지 않은 대조군에 비해 좀 더 크고 굵은 형상으로 자란다. 이는 초음파 변환기 바로 위에 해당하는 표평판 배양의 중앙 부분에서는 초음파 자극으로 인해 세포가 가장자리로 이동하는 것으로 예측된다. 따라서, 적절한 강도의 초음파 자극만이 세포의 증식에 긍정적인 영향을 미칠 수 있을 것이며, 세포의 분화 및 증식에 최적화된 초음파 조건을 발견하는 것은 용

이하지 않다.

- [0048] 본 발명자들이 연구한 결과, 본 발명에서 사용되는 초음파 자극은 저강도가 바람직하고, 초음파 센서로부터 적당한 거리의 초음파 자극이 세포 증식에 바람직하며, 초음파 강도가 너무 강하면 오히려 세포 배양에 오히려 악영향을 미칠 수 있다. 구체적으로, 본 발명에서 사용되는 초음파 강도는 200 mW/cm^2 이하로 조절될 수 있으며, 300 mW/cm^2 이상의 자극은 그 강도가 너무 강하여 오히려 성체줄기세포의 증식에는 역효과를 미칠 수 있다.
- [0049] 또한, 본 발명에서 사용되는 초음파 자극은 특정 듀티 사이클을 갖는 범위 내에서 사용되는 것이 바람직하다. 구체적으로, 본 발명에서 사용되는 초음파는 5% 이상 50% 미만 범위의 듀티 사이클로 조절될 수 있으며, 바람직하게는 5% 이상 30% 이하의 듀티 사이클로 조절될 수 있다. 50% 이상의 듀티 사이클에서는 오히려 줄기세포의 증식에 역효과를 미칠 수 있다.
- [0050] 또한, 본 발명에서 사용되는 초음파 자극은, 자극시간 1분/일 ~ 10분/일 범위의 조건이 바람직하다. 자극시간이 20분/일, 30분/일과 같이 길어질수록 오히려 세포 증식에는 역효과를 미칠 수 있다.
- [0051] 따라서, 초음파 자극시간 10분/일에서 30% 이하의 듀티 사이클과 200 mW/cm^2 이하의 저강도 초음파 강도가 적절히 조합되었을 경우 성체 줄기세포의 증식에 바람직하며, 50 mW/cm^2 강도, 5% 듀티 사이클, 자극시간 10 분/일 조건의 저강도 초음파 자극이 줄기세포의 증식에 보다 바람직하다.
- [0052] 반대로, 동일한 초음파 자극 강도라도 듀티 사이클과 자극시간에 따라 성체 줄기세포의 증식에 미치는 영향은 달라지며, 초음파 강도가 커질수록 듀티 사이클과 자극시간은 낮은 조합이 보다 바람직하다.
- [0053] 본 발명에서는, 성체줄기세포를 생체 내 (in vivo)와 유사한 생체 외 (in vitro) 배양 위한 새로운 관류식 배양 챔버시스템을 제공하고, 나아가, 새로운 관류식 배양 챔버시스템에 최적의 초음파 자극 방법을 적용하여 세포의 증식 및 분화가 최적화된 새로운 관류식 배양 챔버시스템을 제공한다. 또한, 본 발명에서는 생체 외에서 동물의 세포 및 조직을 스트레스를 받지 않고 3차원으로 배양할 수 있는 배양시스템을 제공하여, 세포 배양기술, 생체자극 기술 등을 이용한 인공조직 제조 등에 응용될 수 있다.
- [0054] 하기 실시예를 통해 본 발명의 주제의 특징과 장점들을 추가로 설명하고자 하나, 하기 실시예에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 주제는 본원에 기재된 특정 실시태양 및 실시예에 제한되는 것으로 여겨져서는 아니된다. 본 개시의 관점에서, 다양한 예시적인 실시태양 및 실시예 외에도, 당업자는 본원에 개시된 일부 구성의 변형, 치환, 부가 및 그들의 조합이 가능함을 용이하게 인식할 수 있을 것이다.
- [0055] [실시예]
- [0056] 참고예 1
- [0057] Alpha-MEM 배지에 10% SERUM (FBS, Welgene Inc., Korea) 과 10 nM의 아스코르브산 (L-ascorbic acid), 항생제와 중탄산나트륨을 넣은 배양배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂농도 및 95 % 의 상대습도를 갖는 인큐베이터 (Steri-Cycle 370 Incubator, Thermo Fisher Scientific. USA)에서 성체 줄기세포를 정적 배양하였다. 줄기세포는 서울대 치과대학 바이오인터페이스공학 연구실에 의해 수집된 치조골 골수 유래 줄기세포를 사용하였다. 약 4일 동안 배양한 후, 세포의 분화 및 성장을 관찰하였으며, 4 회 반복한 결과를 도 6 (상단의 Control) 에 나타내었다.
- [0058] 또한, 치조골 세포의 생존도를 WST-1 분석법 (EZ-Cytox Cell Viability Assay Kit, Daeillab Service Co., LTD)을 이용하여 분석하였다. 상기 분석법은 배양 배지에 tetrazolium salts을 넣어 살아있는 세포를 분석하는 염색적 방법으로서, 그 원리는 tetrazolium salt WST-1가 세포 내 미토콘드리아의 환원효소에 의해 수용성의 포르마잔을 형성하는 성질을 이용하는 것으로, 포르마잔의 양은 살아있는 세포수와 직접적인 관계가 있다. 수용성 포르마잔의 양은 다중 분광광도계 (Victor 3, Perkin Elmer, USA)로 460 nm에서의 흡광도를 측정하여 정량하였다.
- [0059] 치조골 세포의 생존도를 도 21 에 나타내었다 (static 참조).

[0060] 초음파 자극 강도의 세포 증식 효과

[0061] 실시예 1

[0062] 생체자극으로서 초음파 자극이 줄기세포의 배양에 미치는 영향을 확인하기 위하여 하기 실험을 실시하였다.

[0063] 인큐베이터에서 37 °C, 95 % 수분, 5 % CO₂ 조건으로 서울대 치과대학 바이오인터페이스공학 연구실에 의해 수집된 치조골 골수 유래 줄기세포를 배양하였으며, 100 mm 배양 접시 (culture plate)에 3.0 × 10⁴ cell/ml로 씨딩 (seeding) 하여 24시간 배양한 후 초음파 자극에 사용하였다.

[0064] 초음파는 1 MHz의 주파수로 50, 100, 200, 300, 400, 500 mW/cm²의 강도로 조사하였으며, 듀티 사이클 50%, 자극시간 10분/일은 동일하게 유지하였다.

[0065] 세포의 오염을 방지하기 위해 인큐베이터 안에 들어가는 초음파 자극부는 70 % 에탄올로 소독하였으며, 초음파 자극부를 향한 배양기 내에 위치하여 37 °C, 95 % 상대습도, 5 % CO₂ 조건이 잘 유지된 상태에서 3일 동안 초음파 자극을 가하였다. 대조군으로 상기 초음파 자극을 주지 않은 것 (즉, 초음파 강도 0) 도 동일한 상태에서 3 일간 배양하였다.

[0066] 100 mm 배양 접시의 바닥과 초음파 변환기 사이에는 공기가 접하지 않고 효과적인 초음파 자극을 주기 위해 초음파용 겔 (Choongwae Pharma Co., Korea)을 사용하였다.

[0067] 배양이 모두 끝난 후 세포 수 측정을 위해 일반적으로 사용되는 trypsin-EDTA (Gibco, USA) 를 사용하여 세포를 수확하였다. 살아있는 세포의 수를 확인하기 위해서 trypan blue 염색방법을 사용하며, 혈구 계수기를 사용하여 세포수를 계산하여 세포 증식 여부를 측정하여, 그 결과를 도 7 에 나타내었다.

[0068] 도 7 에서 확인할 수 있는 바와 같이, 초음파를 50, 100, 200 mW/cm² 강도로 자극을 준 경우 대조군에 비해 치조골 골수 유래 줄기세포가 잘 증식하였고, 300 mW/cm² 강도의 자극부터 대조군에 비해 세포수가 감소하였다. 특히 400 mW/cm², 500 mW/cm² 강도에 대해서는 세포수의 현저한 감소하였다.

[0069] 이를 통해, 듀티 사이클 50% 에서는 200 mW/cm² 이하 강도의 초음파 자극은 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식을 촉진하지만 300 mW/cm² 이상 강도의 초음파 자극은 그 강도가 강하여 오히려 줄기세포의 증식에 역효과를 미치는 것을 확인할 수 있었다.

[0070] 초음파 듀티 사이클의 세포 증식 효과

[0071] 실시예 2

[0072] 다양한 듀티 사이클의 초음파 자극이 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위해 자극시간 10분/일에서 듀티 사이클별 세포 증식 정도를 측정하였다.

[0073] 초음파 자극 조건을 하기와 같이 변화시킨 것을 제외하고는 실시예 1 과 동일한 조건에서 치조골 골수 유래 줄기세포를 배양하였다. 초음파는 1 MHz의 주파수로 50, 100, 200 mW/cm²의 강도로 조사하였으며, 듀티 사이클 5%, 자극시간 10분/일은 동일하게 유지하였다. 대조군으로 상기 초음파 자극을 주지 않은 것 (즉, 초음파 강도 0) 도 동일한 상태에서 배양하였다.

[0074] 살아있는 세포의 수를 확인하기 위해서 trypan blue 염색방법을 사용하며, 혈구 계수기를 사용하여 세포수를 계산하여 세포 증식 여부를 측정하여, 그 결과를 도 8 에 나타내었다.

[0075] 도 8 에서 확인할 수 있는 바와 같이, 100 mW/cm² 강도로 자극을 준 경우 대조군에 비해 근소한 차이로 치조골 골수 유래 줄기세포가 증식하였고, 50 mW/cm² 와 200 mW/cm² 강도의 자극에서 대조군에 비해 세포수가 각각 약 136%와 약 157% 증가하였다. 300 mW/cm² 강도에 대해서는 오히려 세포수의 감소하였다.

[0076] 이를 통해, 초음파 듀티 사이클 5% 에서 200 mW/cm² 이하 강도의 초음파 자극은 대조군에 비해 5%의 유의 수준

에서 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식 효과를 확인할 수 있었다. 그러나 300 mW/cm² 강도의 초음파 자극은 그 강도가 강하여 오히려 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 역효과를 미치는 것을 확인할 수 있었다.

[0077] **실시예 3**

[0078] 초음파 자극 조건을 하기와 같이 변화시킨 것을 제외하고는 실시예 1 과 동일한 조건에서 치조골 골수 유래 줄기세포를 배양하였다. 초음파는 1 MHz의 주파수로 50, 100, 200, 300 mW/cm²의 강도로 조사하였으며, 듀티 사이클 10%, 자극시간 10분/일은 동일하게 유지하였다. 대조군으로 상기 초음파 자극을 주지 않은 것 (즉, 초음파 강도 0) 도 동일한 상태에서 배양하였다.

[0079] 살아있는 세포의 수를 확인하기 위해서 trypan blue 염색방법을 사용하며, 혈구 계수기를 사용하여 세포수를 계산하여 세포 증식 여부를 측정하여, 그 결과를 도 9 에 나타내었다.

[0080] 도 9 에서 확인할 수 있는 바와 같이, 50 mW/cm² 강도의 자극에서 대조군에 비해 세포수가 약 138% 증가하였고, 100 mW/cm² 강도로 자극을 준 경우에도 대조군에 비해 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식이 촉진되었다. 200 mW/cm² 강도의 자극에서 대조군에 비해 세포수가 감소하였고, 300 mW/cm² 강도에 대해서는 세포수가 현저하게 감소하였다.

[0081] 이를 통해, 듀티 사이클 10% 의 경우 100 mW/cm² 이하 강도의 초음파 자극이 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식을 촉진하는 것을 확인하였으며, 300 mW/cm² 강도의 초음파 자극은 그 강도가 강하여 오히려 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 역효과를 미치는 것을 확인하였다.

[0082] **실시예 4**

[0083] 초음파 자극 조건을 하기와 같이 변화시킨 것을 제외하고는 실시예 1 과 동일한 조건에서 치조골 골수 유래 줄기세포를 배양하였다. 초음파는 1 MHz의 주파수로 50, 100, 200, 300 mW/cm²의 강도로 조사하였으며, 듀티 사이클 30%, 자극시간 10분/일은 동일하게 유지하였다. 대조군으로 상기 초음파 자극을 주지 않은 것 (즉, 초음파 강도 0) 도 동일한 상태에서 배양하였다.

[0084] 살아있는 세포의 수를 확인하기 위해서 trypan blue 염색방법을 사용하며, 혈구 계수기를 사용하여 세포수를 계산하여 세포 증식 여부를 측정하여, 그 결과를 도 10 에 나타내었다.

[0085] 도 10 에서 확인할 수 있는 바와 같이, 100 mW/cm² 강도로 자극을 준 경우 대조군에 비해 치조골 골수 유래 줄기세포가 약 132% 증식하였고, 200, 300 mW/cm² 강도에 대해서는 세포수가 감소하였다.

[0086] 이를 통해, 듀티 사이클 30% 의 경우 100 mW/cm² 강도의 초음파 자극은 5% 의 유의수준에서 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식을 촉진하는 것을 확인하였으며, 200 mW/cm² 이상 강도의 초음파 자극은 치조골줄기세포의 증식에 역효과를 미치는 것을 확인하였다.

[0087] **실시예 5**

[0088] 초음파 자극 조건을 하기와 같이 변화시킨 것을 제외하고는 실시예 1 과 동일한 조건에서 치조골 골수 유래 줄기세포를 배양하였다. 초음파는 1 MHz의 주파수로 50, 100, 200, 300 mW/cm²의 강도로 조사하였으며, 듀티 사이클 50%, 자극시간 10분/일은 동일하게 유지하였다. 대조군으로 상기 초음파 자극을 주지 않은 것 (즉, 초음파 강도 0) 도 동일한 상태에서 배양하였다.

[0089] 살아있는 세포의 수를 확인하기 위해서 trypan blue 염색방법을 사용하며, 혈구 계수기를 사용하여 세포수를 계산하여 세포 증식 여부를 측정하여, 그 결과를 도 11 에 나타내었다.

[0090] 도 11 에서 확인할 수 있는 바와 같이, 100, 200 mW/cm² 강도로 자극을 준 경우 대조군과 비교해 치조골 골수

유래 줄기세포의 증식이 거의 촉진되지 않았으며, 300 mW/cm² 강도에 대해서는 세포수가 감소하였다.

[0091] 이를 통해, 듀티 사이클 50% 의 경우 200 mW/cm² 이하 강도의 초음파 자극을 이용하였을 경우 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 유의적인 효과를 나타내지 못하고, 300 mW/cm² 이상 강도의 초음파 자극은 오히려 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 역효과를 미치는 것을 확인하였다.

[0092] **초음파 자극시간의 세포 증식 효과**

[0093] **실시예 6**

[0094] 초음파 자극 조건을 하기와 같이 변화시킨 것을 제외하고는 실시예 1 과 동일한 조건에서 치조골 골수 유래 줄기세포를 배양하였다. 초음파는 1 MHz의 주파수로 50, 100, 200, 300 mW/cm²의 강도로 조사하였으며, 듀티 사이클 10%, 자극시간 1분/일은 동일하게 유지하였다. 대조군으로 상기 초음파 자극을 주지 않은 것 (즉, 초음파 강도 0) 도 동일한 상태에서 배양하였다.

[0095] 살아있는 세포의 수를 확인하기 위해서 trypan blue 염색방법을 사용하며, 혈구 계수기를 사용하여 세포수를 계산하여 세포 증식 여부를 측정하여, 그 결과를 도 12 에 나타내었다.

[0096] 도 12 에서 확인할 수 있는 바와 같이, 100, 200 mW/cm² 강도로 자극을 준 경우 대조군과 비교해 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식이 거의 촉진되지 않았으며, 300 mW/cm² 강도로 자극을 준 경우 대조군에 비해 치조골 골수 유래 줄기세포가 약 147% 증식하였다.

[0097] 이를 통해, 자극시간 1분의 경우, 200 mW/cm² 이하 강도의 초음파 자극을 이용하였을 경우 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 긍정적인 효과를 나타내지 못하며, 300 mW/cm² 강도의 초음파 자극은 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 긍정적인 효과를 나타내나, 더욱 약한 강도에서 자극시간을 늘리는 것도 가능할 것으로 생각되었다.

[0098] **실시예 7**

[0099] 초음파 자극 조건을 하기와 같이 변화시킨 것을 제외하고는 실시예 1 과 동일한 조건에서 치조골 골수 유래 줄기세포를 배양하였다. 초음파는 1 MHz의 주파수로 50, 100, 200, 300 mW/cm²의 강도로 조사하였으며, 듀티 사이클 10%, 자극시간 3분/일은 동일하게 유지하였다. 대조군으로 상기 초음파 자극을 주지 않은 것 (즉, 초음파 강도 0) 도 동일한 상태에서 배양하였다.

[0100] 살아있는 세포의 수를 확인하기 위해서 trypan blue 염색방법을 사용하며, 혈구 계수기를 사용하여 세포수를 계산하여 세포 증식 여부를 측정하여, 그 결과를 도 13 에 나타내었다.

[0101] 도 13 에서 확인할 수 있는 바와 같이, 100, 200 mW/cm² 강도로 자극을 준 경우 대조군과 비교해 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식이 거의 촉진되지 않았으며, 300 mW/cm² 강도로 자극을 준 경우 대조군에 비해 치조골 골수 유래 줄기세포가 감소하였다.

[0102] 이를 통해, 자극시간 3분의 경우 200 mW/cm² 이하 강도의 초음파 자극을 이용하였을 경우 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 긍정적인 효과를 나타내지 못하며, 300 mW/cm² 이상 강도의 초음파 자극은 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 부정적인 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0103] **실시예 8**

[0104] 초음파 자극 조건을 하기와 같이 변화시킨 것을 제외하고는 실시예 1 과 동일한 조건에서 치조골 골수 유래 줄기세포를 배양하였다. 초음파는 1 MHz의 주파수로 50, 100, 200, 300 mW/cm²의 강도로 조사하였으며, 듀티 사이클 10%, 자극시간 5분/일은 동일하게 유지하였다. 대조군으로 상기 초음파 자극을 주지 않은 것 (즉,

초음파 강도 0) 도 동일한 상태에서 배양하였다.

[0105] 살아있는 세포의 수를 확인하기 위해서 trypan blue 염색방법을 사용하며, 혈구 계수기를 사용하여 세포수를 계산하여 세포 증식 여부를 측정하여, 그 결과를 도 14 에 나타내었다.

[0106] 도 14 에서 확인할 수 있는 바와 같이, 50, 100, 200 mW/cm² 강도로 자극을 준 경우 대조군에 비해 각각 약 125%, 약 119%, 약 125% 치조골 골수 유래 줄기세포가 증식하였고, 300 mW/cm² 강도에서는 대조군에 비해 세포수가 감소하였다.

[0107] 이를 통해, 자극시간 5분의 경우 200 mW/cm² 이하 강도의 초음파 자극을 이용하여 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 긍정적인 효과를 나타내고, 300 mW/cm² 이상 강도의 초음파 자극은 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 오히려 부정적인 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

[0108] **실시예 9**

[0109] 초음파 자극 조건을 하기와 같이 변화시킨 것을 제외하고는 실시예 1 과 동일한 조건에서 치조골 골수 유래 줄기세포를 배양하였다. 초음파는 1 MHz의 주파수로 50, 100, 200, 300 mW/cm²의 강도로 조사하였으며, 듀티 사이클 10%, 자극시간 10분/일은 동일하게 유지하였다. 대조군으로 상기 초음파 자극을 주지 않은 것 (즉, 초음파 강도 0) 도 동일한 상태에서 배양하였다.

[0110] 살아있는 세포의 수를 확인하기 위해서 trypan blue 염색방법을 사용하며, 혈구 계수기를 사용하여 세포수를 계산하여 세포 증식 여부를 측정하여, 그 결과를 도 15 에 나타내었다.

[0111] 도 15 에서 확인할 수 있는 바와 같이, 50 mW/cm² 강도로 자극을 준 경우 대조군에 비해 약 138% 치조골 골수 유래 줄기세포가 증식하였다. 100 mW/cm² 강도로 자극을 준 경우 대조군에 비해 근소한 차이로 치조골 골수 유래 줄기세포가 증식하였고, 200 mW/cm² 강도의 자극에서 대조군에 비해 세포수가 감소하였다. 300 mW/cm² 강도에 대해서는 세포수의 현저한 감소를 확인하였다. 이에 100 mW/cm² 강도 조건에서 듀티 사이클 (10%) 및 자극 시간 (10 분) 을 보다 증가시킨 조건에서 실험할 필요가 있었다.

[0112] **실시예 10**

[0113] 초음파 자극 조건을 하기와 같이 변화시킨 것을 제외하고는 실시예 1 과 동일한 조건에서 치조골 골수 유래 줄기세포를 배양하였다. 초음파는 1 MHz의 주파수로 50, 100, 200, 300 mW/cm²의 강도로 조사하였으며, 듀티 사이클 30%, 자극시간 10분/일은 동일하게 유지하였다. 대조군으로 상기 초음파 자극을 주지 않은 것 (즉, 초음파 강도 0) 도 동일한 상태에서 배양하였다.

[0114] 살아있는 세포의 수를 확인하기 위해서 trypan blue 염색방법을 사용하며, 혈구 계수기를 사용하여 세포수를 계산하여 세포 증식 여부를 측정하여, 그 결과를 도 16 에 나타내었다.

[0115] 도 16 에서 확인할 수 있는 바와 같이, 100 mW/cm² 강도로 자극을 준 경우 대조군에 비해 치조골 골수 유래 줄기세포가 약 132% 증식하였고, 200 mW/cm² 강도의 자극부터는 대조군에 비해 세포수가 감소하였다.

[0116] 이를 통해, 듀티 사이클 30%, 자극시간 10분의 경우 100 mW/cm² 강도의 초음파 자극은 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식 효과를 나타내고, 200 mW/cm² 이상 강도의 초음파 자극은 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 부정적인 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0117] **실시예 11**

[0118] 초음파 자극 조건을 하기와 같이 변화시킨 것을 제외하고는 실시예 1 과 동일한 조건에서 치조골 골수 유래 줄

기세포를 배양하였다. 초음파는 1 MHz의 주파수로 50, 100, 200, 300 mW/cm²의 강도로 조사하였으며, 듀티 사이클 30%, 자극시간 20분/일은 동일하게 유지하였다. 대조군으로 상기 초음파 자극을 주지 않은 것 (즉, 초음파 강도 0) 도 동일한 상태에서 배양하였다.

[0119] 살아있는 세포의 수를 확인하기 위해서 trypan blue 염색방법을 사용하며, 혈구 계수기를 사용하여 세포수를 계산하여 세포 증식 여부를 측정하여, 그 결과를 도 17 에 나타내었다.

[0120] 도 17 에서 확인할 수 있는 바와 같이, 100 mW/cm² 강도로 자극을 준 경우 대조군에 비해 치조골 골수 유래 줄기세포가 약 113% 증식하였고, 200 mW/cm² 강도의 자극부터 대조군에 비해 세포수가 감소하였다.

[0121] 도 16 및 도 17 을 비교하면, 100 mW/cm², 듀티 사이클 30%, 자극시간 20분의 경우는 동일 조건 10분의 자극시간에 비해 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식 효과는 저하되는 것으로 나타났다.

[0122] **실시예 12**

[0123] 초음파 자극 조건을 하기와 같이 변화시킨 것을 제외하고는 실시예 1 과 동일한 조건에서 치조골 골수 유래 줄기세포를 배양하였다. 초음파는 1 MHz의 주파수로 50, 100, 200, 300 mW/cm²의 강도로 조사하였으며, 듀티 사이클 30%, 자극시간 30분/일은 동일하게 유지하였다. 대조군으로 상기 초음파 자극을 주지 않은 것 (즉, 초음파 강도 0) 도 동일한 상태에서 배양하였다.

[0124] 살아있는 세포의 수를 확인하기 위해서 trypan blue 염색방법을 사용하며, 혈구 계수기를 사용하여 세포수를 계산하여 세포 증식 여부를 측정하여, 그 결과를 도 18 에 나타내었다.

[0125] 도 18 에서 확인할 수 있는 바와 같이, 50 mW/cm² 강도의 자극부터 대조군에 비해 세포수가 감소하였고, 100 와 200 mW/cm² 강도의 자극 역시 대조군에 비해 세포수가 감소하였으며, 300 mW/cm² 강도에서는 세포의 수가 현저히 감소하였다.

[0126] 이를 통해 듀티 사이클 30%, 자극시간 30분의 너무 장시간 초음파 자극을 가하면 오히려 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 부정적인 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0127] 따라서, 초음파 자극 실험을 통해 50 mW/cm² 강도에서 듀티 사이클 10% 와 10분의 자극시간 조건에서 약 138%의 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식 효과를 나타내었다.

[0128] **실시예 13**

[0129] 성체 줄기세포로서 치조골 골수 유래 줄기세포 대신 치수 줄기세포를 사용하고, 실시예 1 과 동일한 조건에서 치수 줄기세포를 배양하였다. 단, 초음파 자극 조건은 자극시간 10분, 50 mW/cm² 강도에서, 듀티 사이클 5%, 10%, 30%, 50% 별로 초음파 자극 실험시 세포의 증식 정도를 확인하였다.

[0130] 살아있는 세포의 수를 확인하기 위해서 trypan blue 염색방법을 사용하며, 혈구 계수기를 사용하여 세포수를 계산하여 세포 증식 여부를 측정하여, 그 결과를 도 19 에 나타내었다.

[0131] 도 19 에서 확인할 수 있는 바와 같이, 5% 듀티 사이클의 자극에서 대조군에 비해 세포수가 약 150% 증가하였으며, 10% 듀티 사이클의 자극에서는 세포수가 약 134% 증가하였고, 30% 듀티 사이클의 자극에서는 세포수가 약 131%, 50% 듀티 사이클의 자극에서는 세포수가 약 114% 증가하였다.

[0132] 이를 통해, 강도 50 mW/cm², 자극시간 10분의 경우 모든 듀티 사이클에서 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 긍정적인 효과가 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 50 mW/cm² 강도, 5% 듀티 사이클의 저강도 초음파 자극을 3일간 10분씩 주었을 때, 치수줄기세포를 최대 약 150%까지 증식시킨 결과를 통해, 저강도의 5% 듀티 사이클의 짧은 초음파 자극이 세포 증식에 효과적임을 확인하였다. 이는 앞에서 치조골 골수 유래 줄기세포를 50 mW/cm² 강도, 5% 듀티 사이클의 저강도 초음파 자극을 3일간 10분씩 주었을 때 치조골 골수 유래 줄기세포를

최대 약 136%까지 증식시킬 수 있었던 결과와 유사한 결과이다.

[0133] 이에 따라, 50 mW/cm² 강도, 5% 듀티 사이클, 자극시간 10 분/일 조건의 저장도 초음파 자극이 다른 줄기세포 및 동물세포의 증식에 있어서도 아주 효과적인 방법임을 확인하였다.

[0134] **실시예 14**

[0135] 저장도 초음파 자극의 3차원 지지체 배양시 적용 가능성을 확인하고자 치조골 골수 유래 줄기세포의 실험 결과 중 증식에 효과적인 50 mW/cm², 듀티 사이클 10%, 자극시간 10분의 조건으로 저장도 초음파 자극을 처리하고 나노 파이버 배양시 치조골 골수 유래 줄기세포가 자라고 있는 형태를 전자현미경으로 관찰하여, 도 20 에 나타내었다.

[0136] 이를 통해 줄기세포의 나노지지체 배양시 저장도 초음파 자극의 적용 가능성을 확인하였다.

[0137] **관류식 배양챔버시스템**

[0138] **실시예 15**

[0139] 상체 줄기세포의 하나인 인간 치조골 골수 유래 줄기세포 배양을 위한 관류식 배양시스템을 도 5과 같은 구성으로 설계하였다.

[0140] 관류식 배양시스템에 사용된 가변식 정량펌프의 사양은 하기 표 1과 같다.

표 1

항목	사양
실리콘 튜빙	1.6 mm 월 튜빙 (wall tubing)
최대압	실리콘 튜빙으로 2.4 bar
유속 (ml/revolution)	0.001 (ID : 0.13 mm)
최대 유속	34 ml/min
최소 유속	0.01 ml/min

[0142] 상기 관류식 배양시스템에서, 500ml 의 제어 배양용기, 500ml 의 신선 배지용기, 1000 ml 의 폐 배지 용기를 사용하였으며, 배지는 (주)웰진에서 제조된 Alpha-MEM (LM 008-01, Welgene Inc., South Korea) 배지에 10% SERUM (FBS, Welgene Inc., Korea) 과 10 nM의 아스코르브산 (L-ascorbic acid), 항생제와 중탄산나트륨을 넣은 배양배지를 사용하였다.

[0143] 줄기세포는 서울대 치과대학 바이오인터페이스공학 연구실에 의해 수집된 치조골 골수 유래 줄기세포를 사용하였다.

[0144] 세포 배양챔버에서 온도는 37℃ 내외의 범위, CO₂ 농도는 5% 내외의 범위, O₂ 농도는 18~25% 의 범위, 습도는 80~95% 범위의 R.H. 로, 챔버 내부 압력은 55~70 mBar 의 범위로 조절하였다.

[0145] 제어 배양용기에서 온도는 37±1℃ 의 범위, pH 는 7~8 의 범위, DO 는 2~4% 의 범위, 교반 모터의 RPM 은 100~400 범위로 제어하였다.

[0146] 상기 관류 배양실험에서 배지 흐름속도는 가변식 정량펌프를 이용하여 약 0.3 ml/min 으로 유지하였다.

[0147] 상기 조건 하에서 치조골 골수 유래 줄기세포를 약 4일 동안 배양한 후, 세포의 분화 및 성장을 관찰하였으며, 4 회 반복한 결과를 도 6 (하단의 Medium perfusion) 에 나타내었다.

[0148] 도 6 에 나타난 바와 같이, 상용화제품인 CO₂ 인큐베이터 (참고예 1) 에서와 본 발명의 세포배양 챔버시스템에서의 줄기세포 배양시 세포의 성장 형태 (morphology) 가 거의 유사함을 관찰하였다.

[0149] 또한, 참고예 1 과 동일하게, 치조골 세포의 생존도를 WST-1 분석법 (EZ-Cytox Cell Viability Assay Kit, Daeillab Service Co., LTD) 을 이용하여 분석하여, 치조골 세포의 생존도를 도 21 에 나타내었다 (0.3 ml/min

참조). 본 발명에 따른 관류식 배양챔버시스템에서는 배지 흐름속도를 약 0.3 ml/min 으로 유지할 경우, 정적 배양과 동등한 수준의 세포 생존도를 얻을 수 있었다.

[0150] 실시예 16

[0151] 배지 흐름속도를 0.03 ml/min 로 유지한 점을 제외하고는 실시예 14 와 동일한 조건에서 치조골 골수 유래 줄기 세포를 약 4일 동안 배양한 후, 세포의 분화 및 성장을 관찰하였다.

[0152] 또한, 참고예 1 과 동일하게, 치조골 세포의 생존도를 WST-1 분석법 (EZ-Cytox Cell Viability Assay Kit, Daeillab Service Co., LTD) 을 이용하여 분석하여, 치조골 세포의 생존도를 도 21 에 나타내었다 (0.03 ml/min 참조). 본 발명에 따른 관류식 배양챔버시스템에서는 배지 흐름속도를 약 0.03 ml/min 으로 천천히 유지할 경우, 정적 배양보다 세포 생존도가 약 110-115% 향상되었다.

[0153] 실시예 17

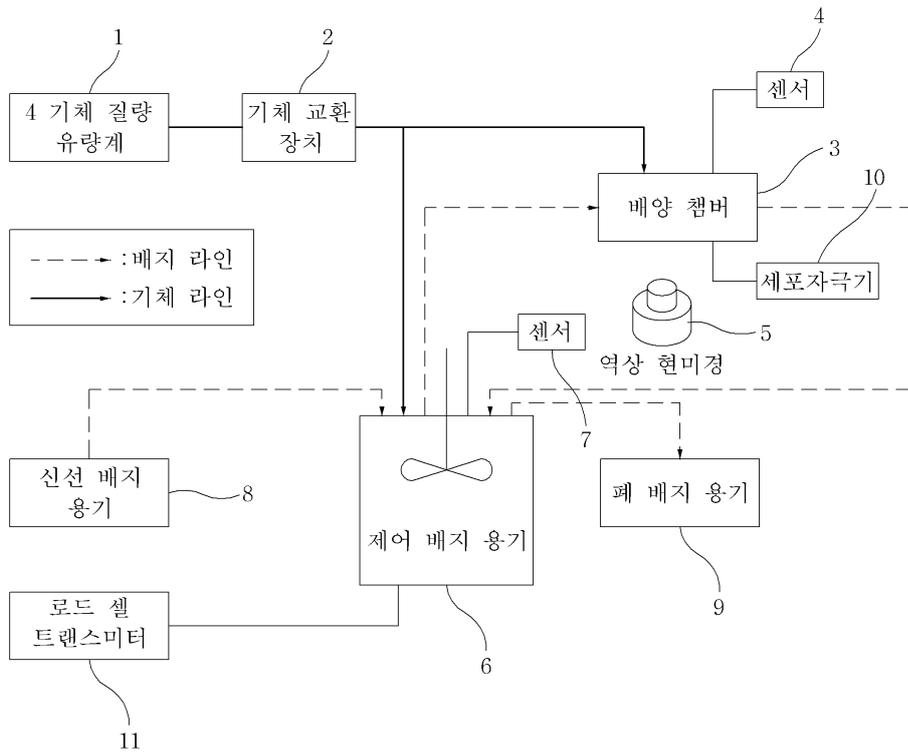
[0154] 배양챔버에 초음파 생체자극을 실시한 점을 제외하고는 실시예 14 와 동일한 조건에서 치조골 골수 유래 줄기세포를 약 4일 동안 배양한 후, 세포의 분화 및 성장을 관찰하였다. 상기 초음파는 50mW/cm², 10% 듀티 사이클, 10 분/일의 조건에서 생체자극을 위해 사용되었다. 또한, 참고예 1 과 동일하게, 치조골 세포의 생존도를 WST-1 분석법 (EZ-Cytox Cell Viability Assay Kit, Daeillab Service Co., LTD) 을 이용하여 분석하여, 치조골 세포의 생존도를 도 22 에 나타내었다 (0.03 ml/min, 0.3 ml/min 참조). 본 발명에 따른 관류식 배양 챔버시스템에서는 배지 흐름속도를 약 0.03-0.3 ml/min 으로 천천히 유지할 경우 정적 배양보다 세포 생존도가 향상되었고, 특히 0.03 ml/min 조건에서 세포 생존도가 약 140-150% 향상되었다.

부호의 설명

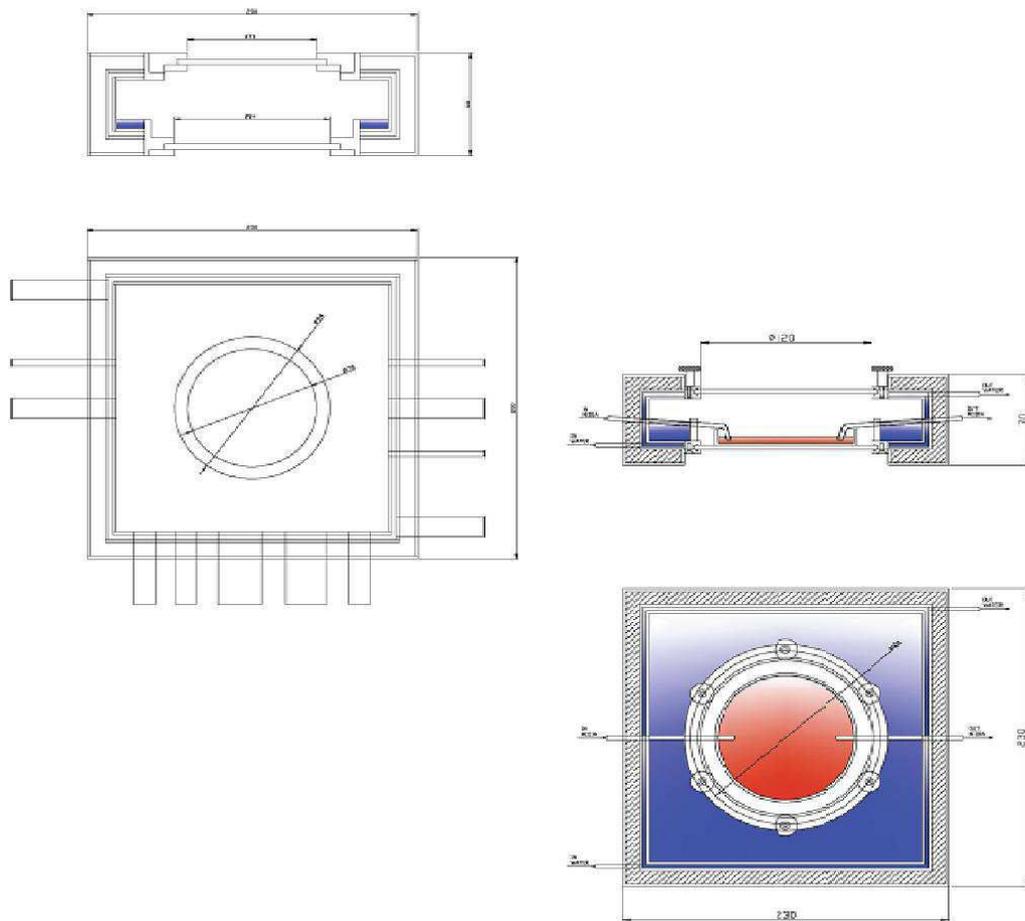
- [0155]
- | | |
|----------------|-------------|
| 1: 4 기체 질량 유량계 | 2: 기체 교환 장치 |
| 3: 배양챔버 | 4: 센서 |
| 5: 역상 현미경 | 6: 제어 배지 용기 |
| 7: 센서 | 8: 신선 배지 용기 |
| 9: 폐 배지 용기 | 10: 세포자극기 |
| 11: 로드 셀 트랜스미터 | |

도면

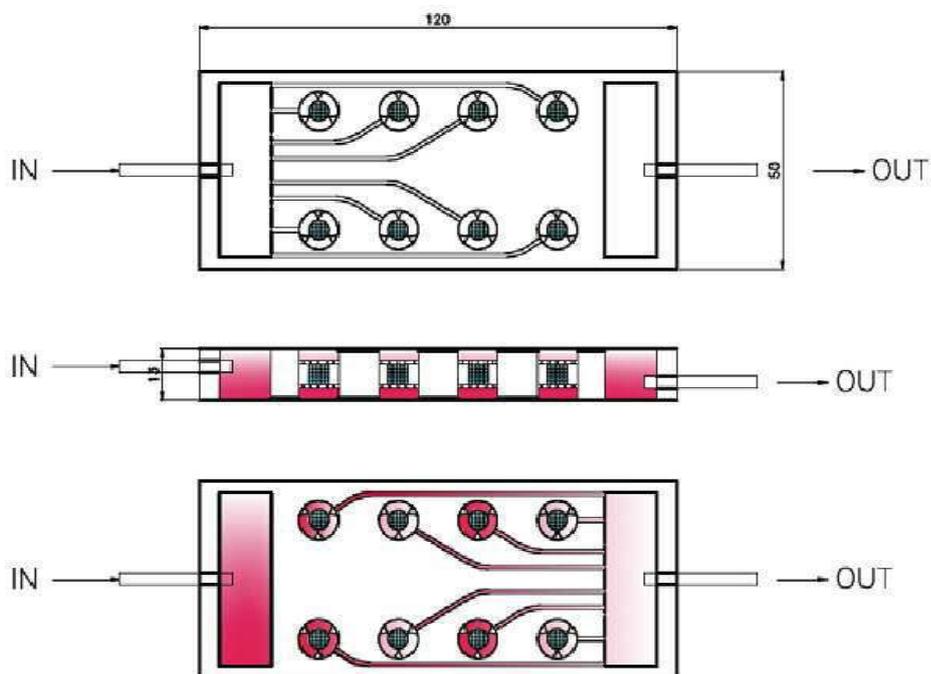
도면1



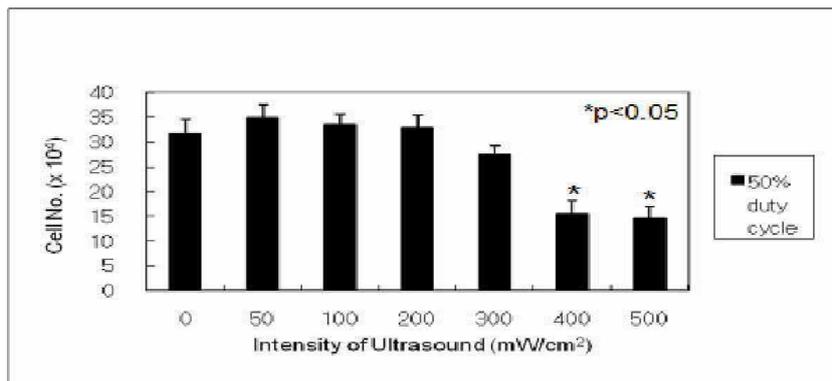
도면2



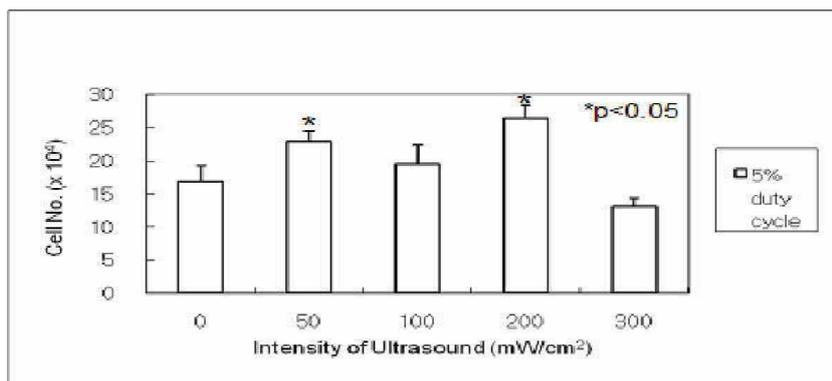
도면3



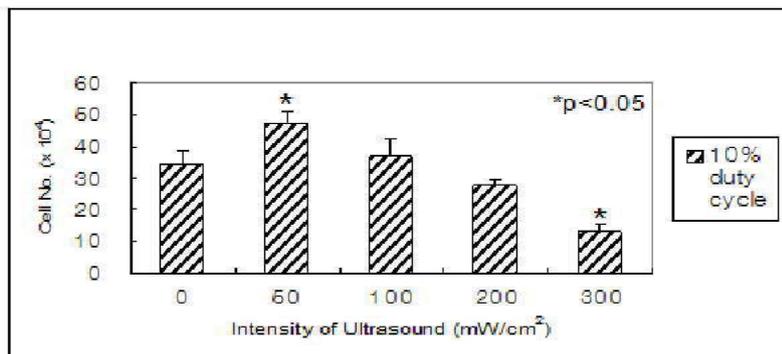
도면7



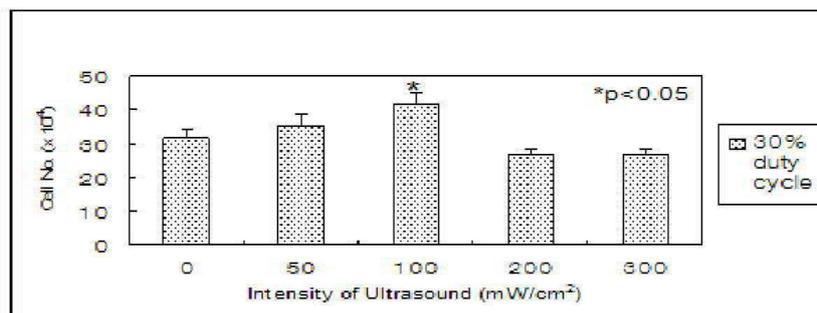
도면8



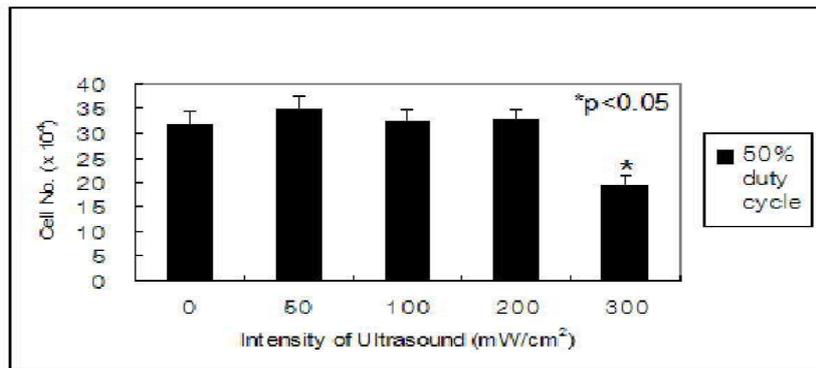
도면9



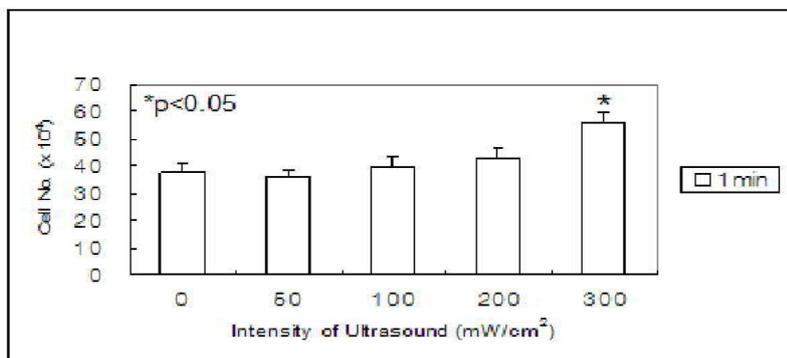
도면10



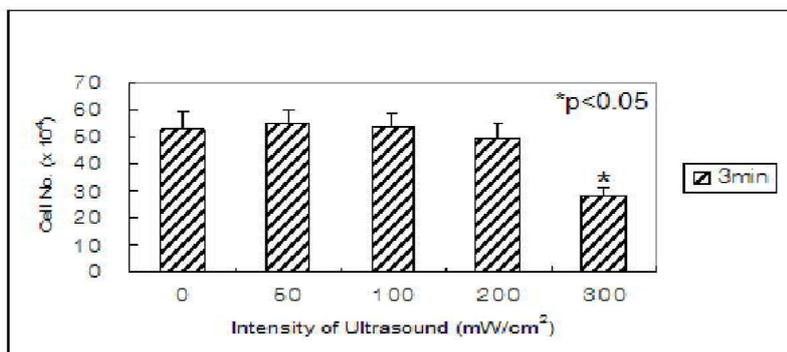
도면11



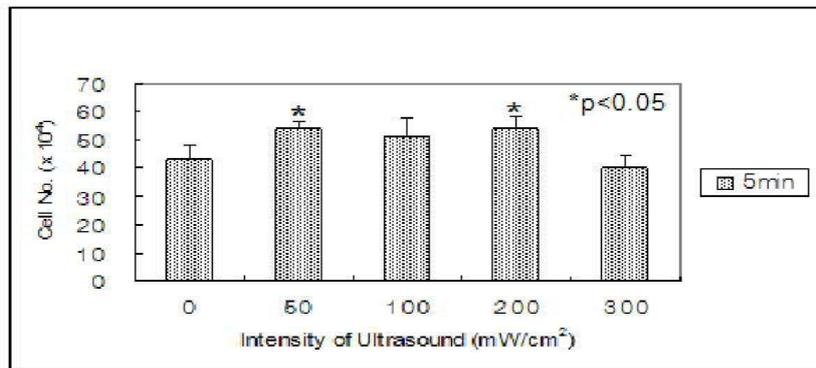
도면12



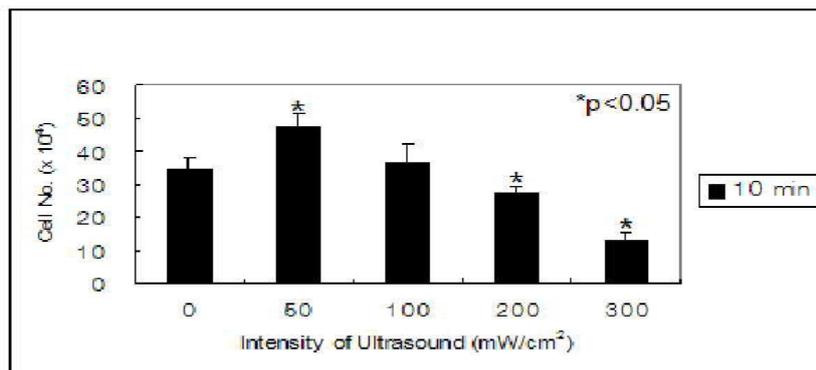
도면13



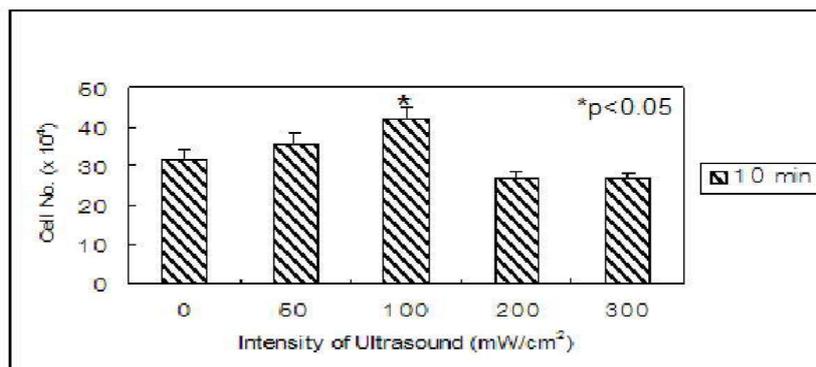
도면14



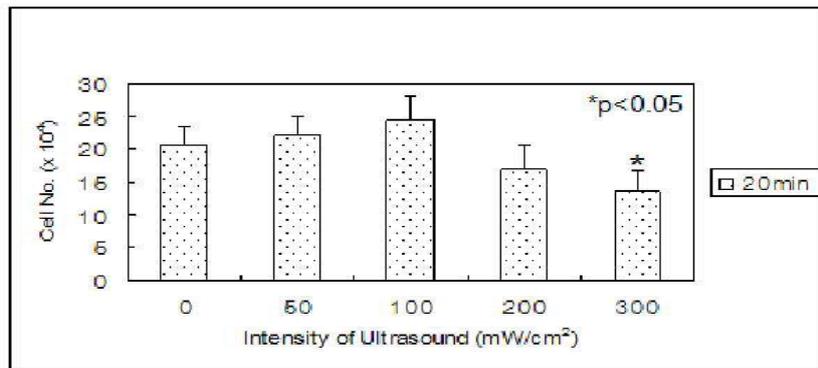
도면15



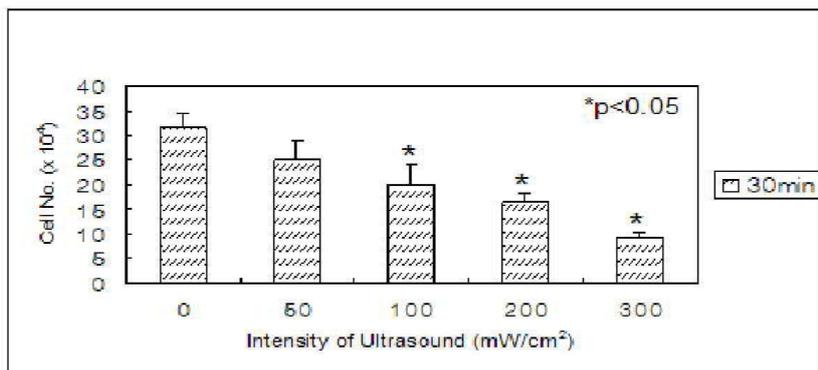
도면16



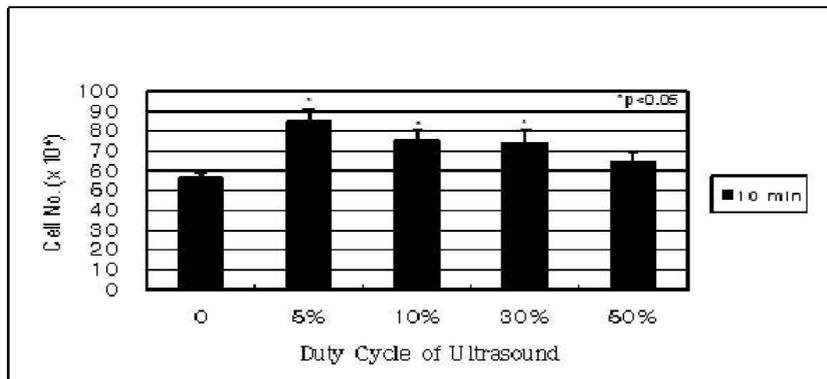
도면17



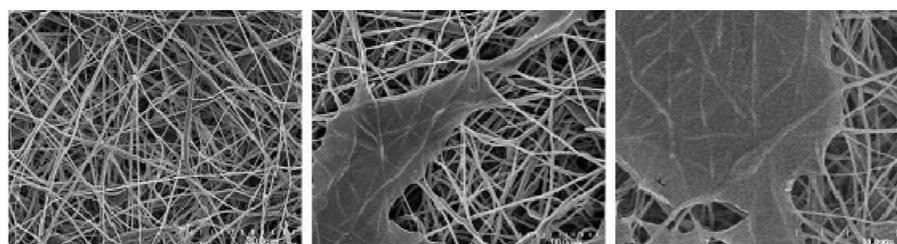
도면18



도면19



도면20

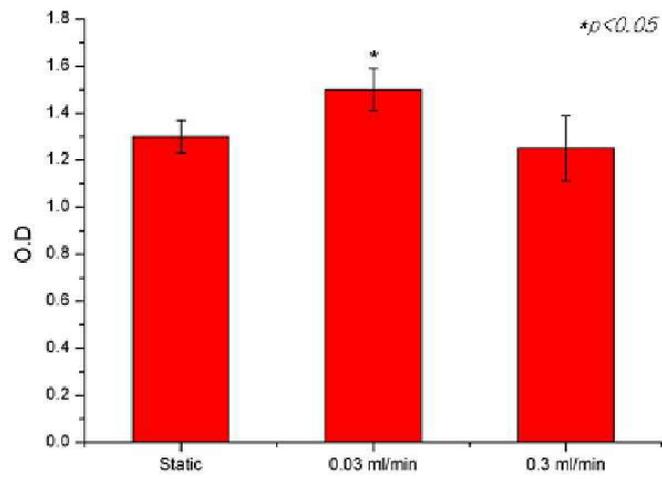


(a) nanofiber

(b) non-treatment

(c) ultrasound stimulation

도면21



도면22

