



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년10월10일
(11) 등록번호 10-2586360
(24) 등록일자 2023년10월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/36 (2006.01) A61L 27/56 (2006.01)
A61L 27/60 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61L 27/3687 (2013.01)
A61L 27/362 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0060730
(22) 출원일자 2021년05월11일
심사청구일자 2021년05월11일
(65) 공개번호 10-2022-0153306
(43) 공개일자 2022년11월18일
(56) 선행기술조사문헌
Reiza D. Ventura et al. "Enhanced decellularization technique of porcine dermal ECM for tissue engineering applications." Materials Science and Engineering: C (2019), Vol. 104, pp.1-12*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
박종철
서울특별시 은평구 백련산로 36, 백련산 힐스테이트 4차 403동 403호(응암동)
구민아
서울특별시 종로구 송월길 99 경희궁자이 209동 502호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
파도특허법인유한회사

전체 청구항 수 : 총 16 항

심사관 : 이수희

(54) 발명의 명칭 전기 천공법과 초음파 처리를 이용한 탈세포화를 위한 조직의 전처리 방법

(57) 요약

본 발명은 조직 투과성을 향상시켜 조직으로부터 탈세포화의 효율을 높이는 전처리 방법과 이를 이용한 조직의 탈세포화 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61L 27/3691 (2013.01)

A61L 27/56 (2013.01)

A61L 27/60 (2013.01)

A61L 2430/34 (2013.01)

A61L 2430/40 (2013.01)

(72) 발명자

이미희

서울특별시 영등포구 도림로108가길 11-3(도림동)

정하경

전라북도 전주시 덕진구 송천로 1 송천동센트럴파크아파트 101동 502호

홍승희

경기도 용인시 기흥구 흥덕중앙로105번길 40, 1503동 106호(영덕동, 흥덕마을15단지 우남퍼스트빌리젠트)

선경미

서울특별시 영등포구 영중로 169, 807호

(56) 선행기술조사문헌

KR100469661 B1*

US20170209620 A1*

Marko Sustarsic et al. "Optimized delivery of fluorescently labeled proteins in live bacteria using electroporation" *Histochem Cell Biol* (2014) Vol. 142, pp.113-124*

KR101362402 B1

KR1020210095040 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 분리된 피부 조직에 소듐 도데실 설페이트(sodium dodecyl sulfate; SDS)를 처리하는 단계;
- (b) 상기 피부 조직에 트리톤 X-100(Triton X-100)을 처리하는 단계;
- (c) 상기 피부 조직에 초음파 처리하는 단계;
- (d) 상기 피부 조직에 전기 천공 처리하는 단계; 및,
- (e) 상기 피부 조직에 초음파 재처리하는 단계;를 포함하는 피부 조직의 탈세포화 방법으로서, 상기 (c) 단계, 및 (e) 단계에서의 초음파 처리는 20 내지 40 kHz 주파수로 30분 내지 6 시간 동안 수행하는 것이고, 상기 (d) 단계에서의 전기 천공은 인가되는 펄스 전류의 세기 0.1 내지 5 A로 지속 시간은 1 초 내지 5 초, 및 휴지 시간은 3 초 내지 10 초로 처리하는 것인, 피부 조직의 탈세포화 방법.

청구항 2

- 제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 소듐 도데실 설페이트(SDS)의 농도는 0.1 내지 10 중량/부피%인, 피부 조직의 탈세포화 방법.

청구항 3

- 제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 소듐 도데실 설페이트(SDS)의 처리 시간은 1 일 내지 10 일인, 피부 조직의 탈세포화 방법.

청구항 4

- 제1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 트리톤 X-100의 농도는 0.1 내지 10 중량/부피%인, 피부 조직의 탈세포화 방법.

청구항 5

- 제1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 트리톤 X-100의 처리 시간은 0 초과 24 시간 이하인, 피부 조직의 탈세포화 방법.

청구항 6

- 제1항에 있어서, 상기 탈세포화 방법은 상기 (a) 단계에 앞서, 분리된 피부 조직에 염화나트륨(NaCl) 수용액을 처리하는 단계를 더 포함하는, 피부 조직의 탈세포화 방법.

청구항 7

- 제6항에 있어서, 상기 염화나트륨 수용액의 농도는 0.1 내지 10 M인, 피부 조직의 탈세포화 방법.

청구항 8

- 제6항에 있어서,

상기 염화나트륨 수용액의 처리 시간은 0 초과 24 시간 이하인, 피부 조직의 탈세포화 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 탈세포화 방법은 상기 (a) 단계에 앞서, 분리된 피부 조직에 트립신-EDTA(trypsin-EDTA) 용액을 처리하는 단계를 더 포함하는, 피부 조직의 탈세포화 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 트립신-EDTA(trypsin-EDTA) 용액의 농도는 0.01 내지 1 중량/부피%인, 피부 조직의 탈세포화 방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 트립신-EDTA(trypsin-EDTA) 용액의 처리 시간은 0 초과 24 시간 이하인, 피부 조직의 탈세포화 방법.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 탈세포화 방법은 상기 (a) 단계에 앞서, 분리된 피부 조직을 1차 세척하는 단계를 더 포함하는, 피부 조직의 탈세포화 방법.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 탈세포화 방법은 상기 (b) 단계 후에, 상기 피부 조직을 2차 세척하는 단계를 더 포함하는, 피부 조직의 탈세포화 방법.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

제1항에 있어서,

상기 (d) 단계의 전기 친공은 상기 전처리된 조직에 0.1 내지 10 M 농도의 염화나트륨 수용액을 첨가하고 전류를 인가하여 수행하는, 피부 조직의 탈세포화 방법.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

제1항에 있어서,

상기 (d) 단계의 전기 친공 시 총 펄스 전류의 인가 시간은 5 분 내지 60 분인, 피부 조직의 탈세포화 방법.

청구항 20

제1항에 있어서,

상기 (d) 단계의 전기 천공은 37 °C이하의 온도를 유지하면서 수행되는, 피부 조직의 탈세포화 방법.

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 전기 천공법과 초음파 처리를 통한 조직의 탈세포화 효율을 높이기 위한 조직의 전처리 방법과, 이렇게 전처리된 조직에 대하여 전기 천공법과 초음파 처리를 통한 탈세포화 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 탈세포화(decellularized) 생체 조직은 이의 3차원 구조에 대한 세포 반응성 조사, 조직 이식, 조직 재생 등 세포외기질(ECM, extracellular matrix) 단백질을 필요로 하는 다양한 조직공학 분야에 적용할 수 있는 기술로 최근 각광받고 있다.

[0003] 조직 탈세포화는 생체로부터 획득한 조직에서 세포 성분을 선별적으로 제거한 후, 잔류의 세포외기질을 이용하기 위한 기술로, 탈세포화된 조직은 조직재건수술, 인공장기 이식용 소재, 피부 대체재 등으로 광범위하게 사용되고 있다.

[0004] 기존에 보고된 탈세포화 방법은 주로 물리적, 화학적, 효소적 처리를 병용한다. 일반적인 탈세포화 방법은 물리적 처리나 이온성 용액(ionic solution)을 이용하여 세포막을 파괴시키고, 효소적 처리를 통해 세포외기질로부터 세포의 구성성분(cellular component)을 분리시킨 다음, 세정액을 이용하여 세포 내 물질, 세포핵 물질, 세포 잔류물(debris)을 제거하는 과정으로 이루어진다.

[0005] 피부와 같이 세포외기질이 풍부한 조직은 탈세포화 이후에도 비교적 손상 없는 원형을 유지하므로, 탈세포화 후 3차원적 구조가 유지된 조직을 그대로 이용할 수 있다. 반면 세포 성분이 많은 조직의 경우, 탈세포화 후 확보한 세포외기질을 용해시켜 3D 프린팅을 위한 바이오잉크로 사용하는 등 후처리 공정이 필수적으로 수반된다. 특히, 인체 조직과 같이 현실적, 윤리적 문제 때문에 한정된 자원을 이용하는 경우 극히 제한된 조직만이 탈세포화 후 활용 가능한 한계가 있다.

[0006] 기존의 물리적, 화학적, 효소적 방법을 이용하여 탈세포화를 진행하면 생체조직 고유의 구조가 붕괴되거나 세포외기질 단백질의 손실이 발생한다. 또한, 이러한 처리 과정을 거치면서 생체조직이 물리적으로 약화되는 문제가 발생하기도 한다. 특히, 대형 동물의 장기 탈세포화는 장시간의 처리 과정이 요구되고, 이는 필연적으로 세포외기질 단백질의 손실과 구조 특성의 붕괴를 초래한다. 탈세포화 시간을 단축시키기 위해 세정액을 강하게 사용하거나 물리적 힘을 증가시키는 등 추가의 조치가 이루어지고 있으나, 이 또한 세포외기질 단백질의 손실과 구조 특성의 붕괴를 수반한다.

[0007] 따라서, 조직으로부터 탈세포화를 수행함에 있어, 탈세포화 시간을 단축시키는 등으로 탈세포화 효율을 높이고 세포의 손상을 최소화하는 방법이 요구되고 있는 실정이다.

(선행문헌 1) Reiza D. Ventura et al. "Enhanced decellularization technique of porcine dermal ECM for tissue engineering applications." Materials Science and Engineering: C (2019), Vol. 104, pp.1-12

(선행문헌 2) 국내등록특허공보 제10-0469661호

(선행문헌 3) 미국공개특허공보 제2017-0209620호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 일 목적은 조직 투과성을 향상시켜 조직의 탈세포화의 효율을 높이는 전처리 방법에 관한 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 상기한 전처리 방법을 통해 조직 투과성이 향상되어 높은 효율로 조직을 탈세포화하는 방법에 관한 것이다.
- [0010] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 조직의 탈세포화 전처리 방법에 관한 것이다.
- [0012] 본 발명에서 상기 "탈세포화(decellularization)"는 조직의 세포외기질(extracellular matrix; ECM)을 상기 조직에 존재하는 세포로부터 분리하여 인공 장기 및 조직 재생에 사용할 수 있는 원래 조직의 ECM 스펙트럼을 남기는 데 사용되는 프로세스이다.
- [0013] 본 발명에서 상기 탈세포화의 대상이 되는 조직은 척추 동물 유래의 생체 조직이라면 특히 제한되지 않으며, 포유류인 가축, 조류인 가축 또는 인간 유래의 생체 조직이 보다 바람직하다. 포유류의 가축으로서는, 소, 말, 낙타, 라마, 당나귀, 야크, 양, 돼지, 염소, 사슴, 알파카, 개, 너구리, 족제비, 여우, 고양이, 토끼, 햄스터, 기니피그, 랫트, 마우스, 다람쥐, 아메리카너구리 등을 들 수 있다. 또한, 조류의 가축으로서는, 잉꼬, 앵무새, 닭, 오리, 칠면조, 거위, 헬멧닭(helmeted guinea fowl), 꿩, 타조, 메추라기, 에뮤(emu) 등을 들 수 있으나, 바람직하게는 마우스 소, 돼지, 토끼 또는 인간의 생체 조직일 수 있다.
- [0014] 본 발명에서 상기 조직의 부위로서는, 세포 외 매트릭스 구조를 가지는 부위가 사용되며, 이러한 부위로서는 예를 들면, 간장, 신장, 요관, 방광, 요도, 혀, 편도, 식도, 위, 소장, 대장, 항문, 췌장, 심장, 혈관, 비장, 폐, 뇌, 뼈, 척수, 연골, 정소, 자궁, 난관, 난소, 태반, 각막, 골격근, 건, 신장, 피부 등을 들 수 있으나, 본 발명의 목적 상 피부 조직인 것이 바람직하다.
- [0015] 본 발명의 탈세포화 전처리 방법은 분리된 조직에 대하여 염화나트륨(NaCl) 수용액; 트립신-EDTA(trypsin-EDTA) 용액; 소듐 도데실 설페이트(sodium dodecyl sulfate; SDS); 및 트리톤 X-100(Triton X-100)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상, 바람직하게는 염화나트륨(NaCl) 수용액; 트립신-EDTA(trypsin-EDTA) 용액; 소듐 도데실 설페이트(SDS); 및 트리톤 X-100(Triton X-100)를 처리하는 단계를 수행할 수 있다.
- [0016] 본 발명의 탈세포화 전처리 방법은 먼저 분리된 조직에 대하여 잔류하는 혈액 또는 불순물 등을 제거하는 1차 세척하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0017] 본 발명에서 상기 제1차 세척은 조직을 증류수를 포함하는 세척액으로 세척하며 수행할 수 있다.
- [0018] 본 발명에서 상기 제1차 세척의 수행 시간은 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면, 0 초과 24 시간 이하, 바람직하게는 8 초과 20 시간 이하로 수행될 수 있다.
- [0019] 본 발명의 탈세포화 전처리 방법은 1차 세척된 조직에 염화나트륨(NaCl) 수용액을 처리하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0020] 본 발명에서 상기 염화나트륨 수용액의 농도는 특별히 제한하지는 않지만, 예를 들면 0.1 내지 10 M일 수 있고, 바람직하게는 1 내지 3 M일 수 있다.
- [0021] 본 발명에서 상기 염화나트륨 수용액의 처리 시간은 특별히 제한하지는 않으나, 예를 들면, 0 초과 24 시간 이하, 바람직하게는 12 내지 18 시간 동안 수행될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 탈세포화 전처리 방법은 염화나트륨 수용액이 처리된 조직에 트립신-EDTA(trypsin-EDTA) 용액을 처리하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0023] 본 발명에서 상기 트립신-EDTA(trypsin-EDTA) 용액의 농도는 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면, 0.01 내지 1 중량/부피%의 농도일 수 있고, 바람직하게는 0.05 중량/부피%일 수 있다.
- [0024] 본 발명에서 상기 트립신-EDTA(trypsin-EDTA) 용액의 처리 시간은 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면, 0 초과

24 시간 이하, 바람직하게는 12 내지 18 시간 동안 수행될 수 있다.

- [0025] 본 발명의 탈세포화 전처리 방법은 트립신-EDTA(trypsin-EDTA) 용액이 처리된 조직에 소듐 도데실 설페이트(sodium dodecyl sulfate; SDS)를 처리하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0026] 본 발명에서 상기 "소듐 도데실 설페이트(sodium dodecyl sulfate; SDS)"는 음이온성 계면활성제의 일종으로, 분자식은 $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$ 이며, 분자량은 288.38, 밀도는 1.01 g/cm^3 , 녹는점은 $206 \text{ }^\circ\text{C}$ 이며, 백색 또는 옅은 황색의 결정으로 약간 특이한 냄새가 난다. SLS는 도데칸올(로릴 알코올, $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{OH}$)과 황산의 에스터화 반응으로 만들어 진다.
- [0027] 본 발명에서 상기 소듐 도데실 설페이트(SDS)의 농도는 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면, 0.1 내지 10 중량/부피%의 농도일 수 있고, 바람직하게는 1 내지 5 중량/부피%의 농도일 수 있으며, 보다 바람직하게는 2 중량/부피%일 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 상기 소듐 도데실 설페이트(SDS)의 처리 시간은 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면, 1 일 내지 10 일일 수 있으나, 바람직하게는 3일 동안 수행될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 탈세포화 전처리 방법은 소듐 도데실 설페이트(SDS)가 처리된 조직에 대하여 트리톤 X-100(Triton X-100)을 처리하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0030] 본 발명에서 상기 "트리톤 X-100(트라이톤 X-100, Triton X-100, $\text{C}_{14}\text{H}_{220}(\text{C}_2\text{H}_{40})_n$)"은 친수성 폴리에틸렌 옥사이드 사슬 (평균 9.5 에틸렌 옥사이드 단위를 가짐)과 방향족 탄화수소 친유성 또는 소수성 그룹을 갖는 비이온성 계면 활성제이다.
- [0031] 본 발명에서 상기 트리톤 X-100의 농도는 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면, 0.1 내지 10 중량/부피%의 농도 일 수 있고, 바람직하게는 1 중량/부피%일 수 있다.
- [0032] 본 발명에서 상기 트리톤 X-100의 처리 시간은 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면, 0 초과 24 시간 이하, 바람직하게는 12 내지 18 시간 동안 수행될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 탈세포화 전처리 방법은 트리톤 X-100(Triton X-100)이 처리된 조직에 대하여 파괴된 세포의 부산물이나 잔류하는 불순물 등을 제거하는 2차 세척하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 상기 2차 세척은 증류수 또는 염화나트륨 수용액을 사용하여 수행될 수 있다. 여기서, 상기 염화나트륨 수용액의 농도는 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면 0.1 내지 10 M일 수 있고, 바람직하게는 1 M일 수 있다.
- [0035] 또한, 본 발명에서 상기 2차 세척 시 사용되는 용액에는 살균과 소독을 위해 항생제가 포함될 수 있다. 여기서 상기 항생제의 종류를 특별히 제한하지는 않으나, 예를 들면 페니실린 스트렙토마이신 (penicillin/streptomycin)이 사용될 수 있다.
- [0036] 일반적으로 생체 조직 중에서 특히 피부 조직은 다른 조직에 비하여 탈세포화 효율이 낮아, 탈세포화 과정 시 고농도의 화학 용액의 처리와 함께 많은 시간이 소요되어 세포외기질 단백질의 손실과 구조 특성의 붕괴 등이 수반되는 문제점이 있습니다. 그런데, 본 발명에 따르는 일련의 탈세포화 전처리 방법을 수행하는 경우, 피부 조직의 투과성이 증가하여 이후 수행되는 탈세포화 과정으로, 전기 천공법 및/또는 초음파 처리 시 피부 조직에 가해지는 전기 자극 영향 정도를 높여 탈세포화 효율을 현저히 높일 수 있고, 더욱이 상기한 탈세포화 과정에서 용해된 세포가 조직으로부터 유출되는 효율을 높여 세포외기질 단백질의 손실과 구조 특성의 붕괴 등의 문제점을 해소할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 본 발명의 전처리 방법으로 전처리된 조직의 탈세포화 방법에 관한 것이다.
- [0039] 본 발명의 탈세포화 방법은 전처리된 조직에 대하여 전기 천공을 수행하는 단계를 수행할 수 있다.
- [0040] 본 발명에서 상기 전기 천공은 상기 전처리된 조직에 염화나트륨 수용액을 첨가하고 전류를 인가하여 수행할 수 있다.
- [0041] 본 발명에서 상기 전기 천공 시 사용되는 염화나트륨 수용액의 농도는 바람직하게는 0.1 내지 10 M일 수 있고, 보다 바람직하게는 1 M일 수 있다.

- [0042] 본 발명에서 상기 전기 천공 시 인가되는 펄스 전류의 세기는 바람직하게는 0.1 내지 5 A일 수 있고, 보다 바람직하게는 1 내지 3 A일 수 있으며, 가장 바람직하게는 2 A일 수 있다.
- [0043] 본 발명에서 상기 전기 천공 시 인가되는 펄스 전류의 지속 시간은 1 초 내지 5 초, 바람직하게는 1 초 내지 3 초이고, 휴지 시간, 즉 펄스 간 간격은 3 초 내지 10 초, 바람직하게는 3 초 내지 5 초일 수 있다.
- [0044] 또한, 본 발명에서 총 펄스 전류의 인가 시간은 5 분 내지 60 분, 바람직하게는 10 분 내지 30 분일 수 있다.
- [0045] 본 발명에서 상기 전기 천공은 37 °C 이하의 온도를 유지하며 수행될 수 있다.
- [0046] 본 발명의 탈세포화 방법은 상기 전기 천공의 수행 전, 수행 후 또는 수행 전과 후에 전처리된 조직에 대하여 1 회 이상 초음파 처리하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0047] 본 발명에서 상기 초음파 처리는 바람직하게는 30 분 내지 6 시간 동안 수행될 수 있고, 보다 바람직하게는 1 내지 3 시간 동안 수행될 수 있다.
- [0048] 본 발명에서 상기 초음파 처리는 20 내지 40 kHz의 주파수, 바람직하게는 30 내지 40 kHz 주파수의 범위 내에서 수행될 수 있다.
- [0049] 기존의 화학적 방법에 의한 탈세포화 과정 시 고농도의 화학 용액의 처리와 함께 오랜 시간 동안 처리해야 하는 문제점이 있었고, 탈세포화 과정 후 필연적으로 발생하는 유기용매로 인한 오페수의 문제점이 있었다. 본 발명에서는 탈세포화 과정 시 전기 천공법과 초음파 처리를 병용하고, 이에 앞서 조직의 전처리 과정을 수행함으로써 상기한 문제점을 모두 해결할 수 있었다.

발명의 효과

- [0050] 본 발명의 탈세포화 전처리 방법에 의하는 경우, 탈세포화 효율이 매우 낮은 피부 조직의 투과성을 높여 이후의 탈세포화 과정으로 전기 천공법 및/또는 초음파 처리 시 피부 조직에 가해지는 전기 자극의 영향 정도를 높임에 따라 탈세포화 효율이 증가하고, 더욱이는 상기한 탈세포화 과정에서 용해된 세포가 조직으로부터 유출되는 효율을 높이거나 온화한 조건 하에서 탈세포화를 수행할 수 있어 세포외기질 단백질(ECM, extracellular matrix)의 손실과 구조 특성의 붕괴 등의 문제점을 해소할 수 있다.
- [0051] 또한, 본 발명의 탈세포화 방법은 전기 천공법과 초음파 처리를 수행함으로써 기존의 일반적인 탈세포화 과정에서 사용하는 화학 용매와 효소의 처리 시간과 사용량을 줄여 탈세포화에 소요되는 시간을 단축시킬 뿐만 아니라, 탈세포화 수행 후 필연적으로 발생하는 유기용매로 인한 오페수의 양을 줄일 수 있어 바람직하다.

도면의 간단한 설명

- [0052] 도 1은 준비예 1에서 이하의 실험에 대상인 인체 유래의 피부 조직 사진을 나타낸 것이다.
- 도 2는 준비예 1에서 상기 피부 조직에 대하여 1 M 농도의 염화나트륨 수용액을 처리하고 헤마톡실린&에오신(H&E) 염색을 한 뒤 현미경으로 관찰한 사진을 나타낸 것이다.
- 도 3은 실험예 1에서 염화나트륨 수용액이 처리된 피부 조직에 대하여 전기 천공; 및/또는 초음파; 처리 후 조직 내 이중 나선 DNA 함유량을 측정된 결과를 그래프로 나타낸 것이다.
- 도 4는 본 발명의 일 예시에 따른 인체 유래의 피부 조직에 대한 전처리 및 탈세포화 공정의 순서도를 나타낸 것이다.
- 도 5는 실험예 2에서 전처리된 피부 조직을 전자 현미경으로 관찰한 사진을 나타낸 것이다.
- 도 6은 실험예 2에서 전처리된 피부 조직에 대하여 헤마톡실린&에오신(H&E) 염색을 수행한 뒤 현미경으로 관찰한 사진을 나타낸 것이다.
- 도 7은 실험예 2에서 탈세포화된 피부 조직에 대하여 헤마톡실린&에오신(H&E) 염색을 수행한 뒤 현미경으로 관찰한 사진을 나타낸 것이다.
- 도 8은 실험예 3에서 전처리된 피부 조직에 대하여 전기 천공을 수행함에 있어 펄스 전류 인가 후 챔버 내부에 첨가하는 염화나트륨의 온도 변화를 측정하여 그 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 9는 실험예 3에서 전처리된 피부 조직에 대하여 다양한 조건으로 초음파 처리-전기 천공-초음파 처리의 탈세포화 과정을 수행한 뒤 피부 조직에서의 이중 나선 DNA 함유량을 측정하여 그 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명의 일 예시에 따른 인체 유래의 피부 조직에 대한 전처리 및 탈세포화 공정의 순서도를 나타낸 것이다.

도 11은 실험예 4에서 탈세포화 처리된 피부 조직에서의 이중 나선 DNA 함유량을 측정한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0055] **실시예**

[0057] [준비예 1]

[0058] 실험예 사용될 인체 유래의 피부 조직을 취하여 그 사진을 도 1에 나타내었다. 이러한 피부 조직에 대하여 1 M 농도의 염화나트륨 수용액을 처리하고 헤마톡실린&에오신(H&E) 염색을 한 뒤 현미경으로 상기 피부 조직의 변화를 관찰한 결과를 도 2에 나타내었다.

[0059] 도 2에서 보는 바와 같이, 1 M 농도의 염화나트륨 수용액의 처리로 피부 진피층과 표피층의 분리가 일어나는 것을 확인할 수 있었다.

[0061] [실험예 1]

[0062] 상기 준비예 1에서 염화나트륨 수용액이 처리된 피부 조직에 대하여 하기 표 1에 나타낸 조건으로 전기 천공; 및/또는 초음파; 처리를 수행한 뒤, 각 처리 후 조직 내 이중 나선 DNA 함유량을 측정하여 그 결과를 도 3에 나타내었다.

표 1

[0063]

구분	처리 조건
전기 천공	펄스 전류 세기: 2 A
	펄스 전류 지속 시간/휴지 시간: 2s/4s
	총 펄스 전류 인가 시간: 1 시간
초음파 처리	처리 시간: 2 시간
	주파수: 40 kHz

[0064] 도 3에서 보는 바와 같이, 염화나트륨 수용액에 담근 피부 조직에 대하여 전기 천공 또는 초음파 처리를 단독으로 수행한 경우에 비하여, 이들 처리를 모두 수행한 경우, 특히 초음파 처리-전기 천공-초음파 처리의 순으로 수행한 경우 DNA 함유량이 가장 감소한 것을 확인할 수 있었다. 하지만, 이러한 처리만으로는 DNA 함유량의 감소 효과가 미미하여 피부 조직의 탈세포화가 어려운 것을 알 수 있었다. 이에 따라 본 발명의 발명자는 피부 조직의 탈세포화 전처리 공정을 개발하여 아래의 실험을 수행하였다.

[0066] [실험예 2]

[0067] 도 4는 본 발명에 따른 인체 유래의 피부 조직에 대한 전처리 및 탈세포화 공정의 순서도를 나타낸 것이다. 상세하게는 상기 피부 조직에 증류수로 16 시간 동안 조직에 남아 있는 혈액 또는 불순물 등을 제거하는 1차 세척을 수행한 뒤 1 M의 염화나트륨 수용액을 16 시간 동안 처리하고, 0.05 중량/부피%의 트립신-EDTA(trypsin-EDTA) 용액을 16 시간 동안 처리하였다. 이후 2 중량/부피% SDS로 3일 동안 처리한 뒤 1 중량/부피% Triton X-100으로 16 시간 처리하였다. 이후 증류수로 불순물 또는 세포 부산물을 제거하는 2차 세척을 수행하였다. 이후 상기 표 1에 나타낸 조건으로 초음파 처리-전기 천공-초음파 처리를 순차적으로 수행하였다. 상기 2차 세척을 수행한 뒤 전처리된 피부 조직을 전자 현미경으로 관찰한 사진을 도 5에 나타내었고, 전처리된 피부 조직에 대하여 헤마톡실린&에오신(H&E) 염색을 수행한 뒤 현미경으로 관찰한 사진을 도 6에 나타내었다. 또한, 전기 천공과 초음파 처리를 마친, 즉 탈세포화된 피부 조직에 대하여 헤마톡실린&에오신(H&E) 염색을 수행한 뒤 현미경으

로 관찰한 사진을 도 7에 나타내었다.

[0068] 도 5 및 6에서 보는 바와 같이 전처리된 피부 조직의 경우 전처리가 되지 않은 피부 조직과 비교하여 세포외기질(Extracellular matrix)을 구성하는 섬유다발이 풀어진 형태를 하고 있으며, 표피층은 분리되고 진피층에는 미세 공간이 형성된 것을 볼 수 있다.

[0069] 또한, 도 7에서 보는 바와 같이, 무처리된 피부 조직에서는 세포가 관찰되는 반면, 전처리 후 탈세포화 과정을 거친 피부 조직에서는 이러한 세포가 관찰되지 않았다. 따라서 탈세포화가 효과적으로 이루어졌음을 확인할 수 있었다.

[0070] 이를 통해 상기한 전처리 과정을 통해 형성된 피부 조직 내 미세 공간은 전기 천공 시 피부 조직으로의 효율적인 전기 자극 전달과 동시에 초음파의 침투를 도와 종국적으로 탈세포화 효율을 높이는 것을 알 수 있었다.

[0072] [실험예 3]

[0073] 상기 실험예 1과 동일한 방법으로 인체 유래 피부 조직에 대하여 전처리 과정을 수행한 뒤 초음파 처리-전기 천공-초음파 처리의 탈세포화 과정을 수행하되, 전기 천공 시 조건을 하기 표 2에 나타낸 조건으로 수행하였다. 이때 챔버 내 시간에 따른 온도 변화를 측정하여 그 결과를 도 8에 나타내었고, 각 조건 별 전기 천공 후 2차 초음파 처리를 마친 피부 조직에서의 이중 나선 DNA 함유량을 측정하여 그 결과를 도 9에 나타내었다.

표 2

[0074]

구분	처리 조건	
전기 천공	1 조건	펄스 전류 세기: 2 A
		펄스 전류 지속 시간/휴지 시간: 2s/4s
		총 펄스 전류 인가 시간: 20 분
		총 전기 천공 시간: 1 시간
	2 조건	펄스 전류 세기: 2 A
		펄스 전류 지속 시간/휴지 시간: 5min/5min
		총 펄스 전류 인가 시간: 20 분
		총 전기 천공 시간: 40 분
	3 조건	펄스 전류 세기: 2 A
		펄스 전류 지속 시간/휴지 시간: 5min/10min
		총 펄스 전류 인가 시간: 20 분
		총 전기 천공 시간: 1 시간
	4 조건	펄스 전류 세기: 2 A
		펄스 전류 지속 시간/휴지 시간: 5min/25min
		총 펄스 전류 인가 시간: 20 분
		총 전기 천공 시간: 2 시간
초음파 처리	처리 시간: 2 시간 주파수: 40 kHz	

[0075] 도 8에서 보는 바와 같이, 2 A의 펄스 전류를 지속 시간/휴지 시간(펄스 간 간격)을 2초/4초의 조건과, 5분/25분의 조건으로 인가하였을 때 챔버 내 온도가 35 ~ 37℃를 초과하지 않으면서 최대로 인가할 수 있음을 알 수 있었다. 도 9에서 보는 바와 같이, 상기 두 조건 중에서 특히 2 A의 펄스 전류를 지속 시간/휴지 시간(펄스 간 간격)을 각각 2초/4초의 조건으로 인가한 경우가 5분/25분의 조건으로 인가한 경우보다 피부 조직 내 DNA 함유량을 현저히 낮춰 탈세포화 효율이 더욱 뛰어난 것을 알 수 있었다.

[0077] [실험예 4]

[0078] 도 4에 나타낸 일련의 전처리 과정에 의하는 경우에만 우수한 탈세포화 효율 향상의 효과를 얻을 수 있음을 증명하기 위하여 이하의 실험을 수행하였다. 구체적으로, 도 10에 나타낸 순서도에 따라 인체 유래의 피부 조직에 대하여 전처리 및 탈세포화 공정을 수행하였고, 상세하게는 상기 피부 조직에 증류수로 16 시간 동안 조직에 남아 있는 혈액 또는 불순물 등을 제거하는 1차 세척을 수행한 뒤 1 M의 염화나트륨 수용액을 16 시간 동안 처리하고, 0.05 중량/부피%의 트립신-EDTA(trypsin-EDTA) 용액을 16 시간 동안 처리하였다. 이후 증류수로 불순물 또는 세포 부산물을 제거하는 2차 세척을 수행하였다. 이후 하기 표 3에 나타낸 조건으로 초음파 처리-전기 천공-초음파 처리를 순차적으로 수행하였다. 2차 초음파 처리 후 피부 조직에서의 이중 나선 DNA 함유량을 측정하

여 그 결과를 도 11에 나타내었다.

표 3

구분	처리 조건
전기 천공	펄스 전류 세기: 2 A
	펄스 전류 지속 시간/휴지 시간: 2s/4s
	총 펄스 전류 인가 시간: 20 분
	총 전기 천공 시간: 1 시간
초음파 처리	처리 시간: 2 시간
	주파수: 40 kHz

[0079]

[0080]

[0082]

도 11에서 보는 바와 같이, 전기 천공 시 담지되는 염화나트륨 수용액의 농도를 조절하면서도 실험을 수행하였지만, 탈세포화 과정을 마친 피부 조직에서 DNA 함유량이 여전히 높아 다량의 세포가 피부 조직 내에 잔존하고 있는 것으로 예측되는 바, 탈세포화 효율이 낮은 것을 확인할 수 있었다.

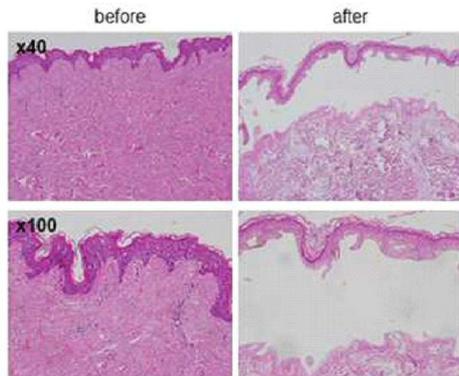
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

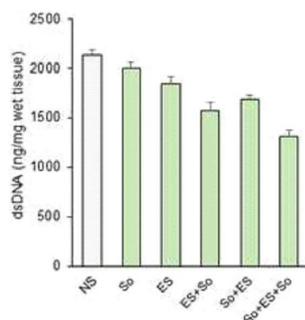
도면1



도면2



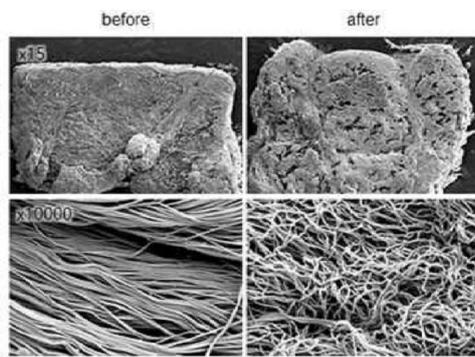
도면3



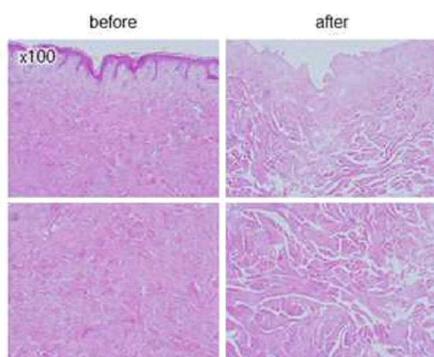
도면4

Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7			
DW	1M NaCl	0.5% Trypsin-EDTA	2% SDS		1% Triton X-100	Washing	Sonication	Electric stimulation in 1M NaCl	Sonication

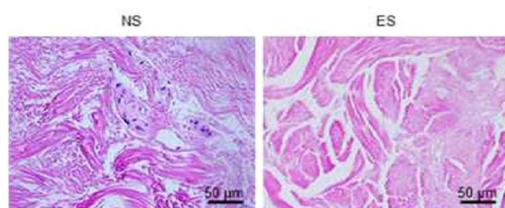
도면5



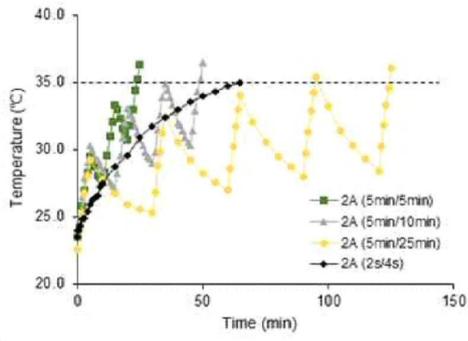
도면6



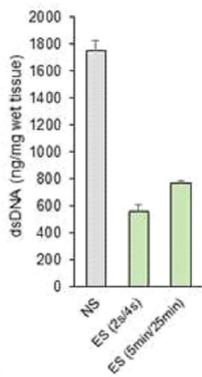
도면7



도면8



도면9



도면10

Day 1		Day 2		Day 3		
DW	NaCl	0.05% Trypsin-EDTA	Washing	Sonication	Electric stimulation	Sonication

도면11

