



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0076692
(43) 공개일자 2019년07월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/074 (2010.01)

(52) CPC특허분류
C12N 5/0696 (2013.01)
C12N 2506/025 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0178706

(22) 출원일자 2017년12월22일
심사청구일자 없음

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김병수

서울특별시 강남구 압구정동 현대아파트 201동 603호

이승진

서울특별시 은평구 연서로 11길 32-9 (구산동 공작타운)

강가원

서울특별시 종로구 난계로 241 (송인동) IBC 오피스텔, 1808호

(74) 대리인

윤대웅, 공병욱

전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 체세포에서 전능성 줄기세포로의 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지 및 이를 이용한 역분화 유도 방법

(57) 요약

본 발명은 체세포에서 전능성 줄기세포로의 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지 및 이를 이용한 역분화 유도 방법에 관한 것이다. 본 발명의 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지를 이용하는 경우, 개인 맞춤형 역분화 줄기세포를 오직 인간 유래 산물로 구성된 배지를 이용하여 안정적으로 확립할 수 있고, 인간 태반에서 유래한 환경을 제공함으로써 생체환경과 유사하게 재현하고 임상 적용에 문제가 없는 세포치료제를 제조할 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711055740

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오.의료기술개발사업

연구과제명 직접교차분화 인간 신경줄기세포 배양생산 기술 최적화 및 안정성 연구

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교

연구기간 2017.04.01 ~ 2021.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

체세포에서 전능성 줄기세포(induced pluripotent stem cell; iPS)로의 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 태반유래세포는 인간 용모막관에서 분리되어 배양된 태반유래 섬유세포-유사세포인 것인, 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 체세포는 OCT4, SOX2, c-Myc 및 KLF4로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 단백질을 코딩하는 핵산 서열로 형질변환된 것인, 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 체세포는 내피세포, 상피세포 및 태반세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 태반유래세포 조건화 배지는 세포 성장 배지에 배양한 인간 태반유래세포를 포함하는 것인, 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지.

청구항 6

다음의 단계를 포함하는 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지의 제조방법:

인간 태반유래세포를 배양액이 첨가된 세포 성장 배지에서 배양하는 태반유래세포 배양 단계; 및
세포 성장 배지로부터 배양액을 수거하는 배양액 수거 단계.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 태반유래세포는 인간 용모막관에서 분리되어 배양된 태반유래 섬유세포-유사세포인 것인, 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지의 제조방법.

청구항 8

제 6 항에 있어서, 상기 배양액은 DMEM/F-12인 것인, 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지의 제조방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 배양액은 혈청대체제를 추가적으로 포함하는 것인, 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지.

청구항 10

다음의 단계를 포함하는 체세포에서 전능성 줄기세포(induced pluripotent stem cell; iPS)로의 역분화 유도 방법:

체세포에 OCT4, SOX2, c-Myc 및 KLF4로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 형질도입하는 체세포 형질변환 단계; 및

형질변환된 체세포를 태반유래세포 조건화 배지에 배양하는 체세포 배양 단계.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 태반유래세포는 인간 용모막관에서 분리되어 배양된 태반유래 섬유세포-유사세포인 것인, 체세포에서 전능성 줄기세포로의 역분화 유도 방법.

청구항 12

제 10 항에 있어서, 상기 체세포는 내피세포, 상피세포 및 태반세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 체세포에서 전능성 줄기세포로의 역분화 유도 방법.

청구항 13

제 10 항에 있어서, 상기 역분화 유도 방법은 체세포 배양 단계에서 형성된 콜로니로부터 줄기세포를 분리하는 줄기세포 분리 단계를 추가적으로 포함하는 것인, 체세포에서 전능성 줄기세포로의 역분화 유도 방법.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 상기 줄기세포 분리 단계는 줄기세포 표지 마커인 Tra-60을 염색하여 수행되는 것인, 체세포에서 전능성 줄기세포로의 역분화 유도 방법.

청구항 15

제 13 항에 있어서, 상기 역분화 유도 방법은 콜로니로부터 분리된 줄기세포에서 OCT-4, NANOG, SSEA-4 및 Tra-81로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 단백질의 활성을 확인하는 줄기세포 활성 검증 단계를 추가적으로 포함하는 것인, 체세포에서 전능성 줄기세포로의 역분화 유도 방법.

청구항 16

제 13 항에 있어서, 상기 역분화 유도 방법은 콜로니로부터 분리된 줄기세포로 생체외에서 배아구를 형성하여 외배엽, 중배엽 또는 내배엽으로의 분화능을 확인하는 줄기세포 분화능 검증 단계를 추가적으로 포함하는 것인, 체세포에서 전능성 줄기세포로의 역분화 유도 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 체세포에서 전능성 줄기세포로의 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지 및 이를 이용한 역분화 유도 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 줄기세포 치료제의 생산을 위해서는 그 공급원이 되는 줄기세포의 대량 체외 배양이 필수적으로 이루어져야 하고, 안전하면서 경제적이어서 임상에서 세포치료제로 사용될 수 있다. 그러나 현재 인간 전능성줄기세포의 증식 배양을 위하여 동물유래 지지세포를 사용하거나 동물유래 산물을 포함하고 있는 특수 젤을 도포한 용기에서 배양하는 방법은 이중단백 오염으로 인한 안전성 문제가 발생할 수 있고 고가의 특수 젤을 사용하는 경우에는 경제적인 면에서 대량생산에 적합하지 않다.

[0003] 태반유래세포 조건화배지를 이용하는 경우 무동물, 무지지세포를 이용한 전능성 줄기세포를 배양할 수 있고, 케모카인 수용체인 CXCR2의 기전에 의해서 전능성 줄기세포의 증식 및 분화가 가능하다. 따라서 본 발명자들은 줄기세포 배양에 유용함을 입증한 태반유래세포 조건화 배지를 전능성 줄기세포로의 역분화에 적용함으로써 세포 치료제 개발에 활용할 수 있을 것으로 예상하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명자들은 체세포에서 전능성 줄기세포(induced pluripotent stem cell; iPS)로의 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 태반유래세포 조건화 배지를 이용하지 않은 경우에 비하여 체세포로부터 전능성 줄기세포로의 역분화 효율을 증가시킬 수 있음을 규명함으로써, 본 발명을 완

성하게 되었다.

- [0005] 따라서, 본 발명의 목적은 체세포에서 전능성 줄기세포로의 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지를 제공하는 것이다.
- [0006] 본 발명의 다른 목적은 체세포에서 전능성 줄기세포로의 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 또 다른 목적은 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지를 이용한 체세포에서 전능성 줄기세포로의 역분화 유도 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 체세포에서 전능성 줄기세포(induced pluripotent stem cell; iPS)로의 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지를 제공한다.
- [0009] 본 발명자들은 체세포에서 전능성 줄기세포(induced pluripotent stem cell; iPS)로의 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 태반유래세포 조건화 배지를 이용하지 않은 경우에 비하여 체세포로부터 전능성 줄기세포로의 역분화 효율을 증가시킬 수 있음을 규명하였다.
- [0010] 상기 태반유래세포는 인간 용모막관에서 분리되어 배양된 태반유래 섬유세포-유사세포일 수 있다.
- [0011] 상기 체세포는 OCT4, SOX2, c-Myc 및 KLF4로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 단백질을 코딩하는 핵산 서열로 형질변환된 것일 수 있다.
- [0012] 상기 체세포는 내피세포, 상피세포 및 태반세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다.
- [0013] 상기 태반유래세포 조건화 배지는 세포 성장 배지에 배양한 인간 태반유래세포를 포함하는 것일 수 있다.
- [0014] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지의 제조방법을 제공한다:
- [0015] 인간 태반유래세포를 배양액이 첨가된 세포 성장 배지에서 배양하는 태반유래세포 배양 단계; 및
- [0016] 세포 성장 배지로부터 배양액을 수거하는 배양액 수거 단계.
- [0017] 상기 태반유래세포는 인간 용모막관에서 분리되어 배양된 태반유래 섬유세포-유사세포인 것일 수 있다.
- [0018] 상기 배양액은 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)/F-12일 수 있다.
- [0019] 상기 배양액은 혈청대체제를 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 체세포에서 전능성 줄기세포(induced pluripotent stem cell; iPS)로의 역분화 유도 방법을 제공한다:
- [0021] 체세포에 OCT4, SOX2, c-Myc 및 KLF4로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 형질도입하는 체세포 형질변환 단계; 및
- [0022] 형질변환된 체세포를 태반유래세포 조건화 배지에 배양하는 체세포 배양 단계.
- [0023] 상기 태반유래세포는 인간 용모막관에서 분리되어 배양된 태반유래 섬유세포-유사세포인 것일 수 있다.
- [0024] 상기 체세포는 내피세포, 상피세포 및 태반세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다.
- [0025] 상기 역분화 유도 방법은 체세포 배양 단계에서 형성된 콜로니로부터 줄기세포를 분리하는 줄기세포 분리 단계를 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.
- [0026] 상기 줄기세포 분리 단계는 줄기세포 표지 마커인 Tra-60을 염색하여 수행되는 것일 수 있다.
- [0027] 상기 역분화 유도 방법은 콜로니로부터 분리된 줄기세포에서 OCT-4, NANOG, SSEA-4 및 Tra-81로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 단백질의 활성을 확인하는 줄기세포 활성 검증 단계를 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.
- [0028] 상기 역분화 유도 방법은 콜로니로부터 분리된 줄기세포로 생체외에서 배아구를 형성하여 외배엽, 중배엽 또는 내배엽으로의 분화능을 확인하는 줄기세포 분화능 검증 단계를 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0029] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0030] (a) 본 발명은 체세포에서 전능성 줄기세포로의 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지를 제공한다.
- [0031] (b) 본 발명은 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지를 이용한 체세포에서 전능성 줄기세포로의 역분화 유도 방법을 제공한다.
- [0032] (c) 본 발명의 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지를 이용하는 경우, 개인 맞춤형 역분화 줄기세포를 오직 인간 유래 산물로 구성된 배지를 이용하여 안정적으로 확립할 수 있다.
- [0033] (d) 본 발명의 역분화 유도용 태반유래세포 조건화 배지를 이용하는 경우, 태반유래세포 조건화 배지를 이용하지 않은 경우에 비하여 체세포로부터 전능성 줄기세포로의 역분화 효율을 증가시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0034] 도 1은 체세포에서 전능성 줄기세포로의 역분화 유도 과정을 나타낸 모식도를 나타낸다.
- 도 2는 체세포에서 전능성 줄기세포로의 역분화 과정에 따른 형태학적 변화를 나타낸다.
- 도 3a는 역분화를 유도하여 제조한 전능성 줄기세포에 대하여 줄기세포 표지 마커인 Tra-60을 염색한 결과를 나타낸다.
- 도 3b는 일반 배지 대비 태반유래세포 조건화 배지에서 유도된 전능성 줄기세포로의 역분화 효율 비교 결과를 나타낸다.
- 도 4a는 역분화를 유도하여 제조한 전능성 줄기세포에 대하여 면역조직화학적 방법을 통해 줄기세포 특이적 유전자의 발현 여부를 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 4b는 역분화를 유도하여 제조한 전능성 줄기세포에 대하여 중합효소 연쇄 반응을 통해 줄기세포 특이적 유전자의 발현 여부를 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 5a는 혈관내피세포에서 역분화를 유도하여 제조한 전능성 줄기세포에 대하여 크로모솜 분석을 통해 핵형을 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 5b는 태반세포에서 역분화를 유도하여 제조한 전능성 줄기세포에 대하여 크로모솜 분석을 통해 핵형을 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 5c는 섬유아세포에서 역분화를 유도하여 제조한 전능성 줄기세포에 대하여 크로모솜 분석을 통해 핵형을 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 6a는 체세포에서 역분화를 유도하여 제조한 전능성 줄기세포로 생체외에서 배아구를 형성하여 외배엽, 중배엽 및 내배엽으로의 분화능을 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 6b는 체세포에서 역분화를 유도하여 제조한 전능성 줄기세포로 생체내에서 배아구를 형성하여 외배엽, 중배엽 및 내배엽으로의 분화능을 확인한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0035] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0037] 실시예

[0038] 실시예 1: 체세포에서 전능성 줄기세포로의 역분화

- [0039] 도 1과 같이 3종의 인간 체세포인 내피세포(Primary Umbilical Vein Endothelial Cells, ATCC #PCS-100-010), 상피세포(Primary Dermal Fibroblasts, ATCC # PCS-201-012) 및 태반세포를 샌다이 바이러스 역분화 인자(OCT4, SOX2, c-Myc, KLF4)로 형질변환시킨 후 7일 동안 성장배지를 제공하여 배양하였다.

- [0040] 태반세포는 임신한 지 7주에 치료적인 유산을 받은 건강한 임산부로부터 서면 동의를 받은 후 제왕절개로의 외과적 수술에 의해 분리된 태반 조직으로부터 얻었다. 태반의 융모막 융모조직으로부터 세포를 분리하였고, 분리한 태반세포를 20% 소태아혈청(fetal bovine serum; FBS), 100 U/ml 페니실린(penicillin) 그리고 100 g/ml 스트렙토마이신(streptomycin)이 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)배지에 0.1% 젤라틴(gelatin)이 코팅된 플라스크에서 일주일동안 배양하였다.
- [0041] 형질변환은 키트(CytoTune™-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit, Life Technologies)를 구입하여 사용하였다.
- [0042] 형질변환된 체세포를 새로운 배양용기로 이식하고 8일 경과 시 태반유래세포 조건화 배지를 제공하여 배양하였으며 이로부터 24시간 이내에 콜로니가 형성되었다.
- [0043] 이 중 도 2와 같이 줄기세포 표지 마커인 Tra-60을 염색하여 확인된 역분화 줄기세포를 선택적으로 분리 배양하였다. 이때 대조군으로는 상용화된 배양액(define Essential 8 medium: E8)을 사용하였다.
- [0045] **실시예 2: 역분화 줄기세포의 확인**
- [0046] 체세포에서 유도된 역분화 줄기세포에서 전능성 줄기세포의 특성인 자가재생 능력이 있는지의 여부를 알칼라인 포스파테이즈 염색을 통해서 확인하였고, 그 효율을 대조군인 E8 배지에서 역분화를 유도한 대조군과 비교하였다. 알칼라인 포스파테이즈 염색은 키트(ES Cell Characterization kit, Chemicon International)를 사용하여 수행하였다.
- [0047] 도 3a에서 확인할 수 있듯이, 태반유래세포 조건화 배지에서 전능성 줄기세포의 특성을 나타내는 세포가 현저하게 많은 것을 육안으로도 관찰할 수 있었다.
- [0048] 도 3b에서 확인할 수 있듯이, 태반유래세포 조건화 배지에서 역분화 효율이 대조군에 비해 약 10배 높은 것으로 나타났다.
- [0050] **실시예 3: 역분화 줄기세포의 특이성 확인**
- [0051] 전능성 줄기세포 특이적 표지 인자인 OCT-4, NANOG, SSEA-4, Tra-81등의 발현량 확인을 통하여 줄기세포의 기능을 하는지 검증하였다.
- [0052] 구체적으로, 수립한 역분화 줄기세포에서 세포 내 전능성 줄기세포 특이적 단백질의 존재 여부를 확인하고, 역분화 줄기세포가 정상적인 핵형을 유지하는지를 크로모솜 분석을 통해서 측정하고 하여 안정성을 검증하였다.
- [0053] 크로모솜 분석을 위하여 역분화 줄기세포 1.5×10^6 cells에 0.1 g/ml 콜세미드(colcemid)를 3 내지 4시간 동안 처리하고 0.25% 트립신(Trypsin)-EDTA를 5분 동안 처리하여 배양디쉬로부터 분리한 후 37℃에서 20분 동안 0.075M KCl 용액에 배양하였다. 메탄올과 아세트산을 3:1 비율로 혼합하여 세포를 고정한 후 확립된 역분화 줄기세포의 핵형을 300 밴드 레벨의 해상도에서 측정하였다.
- [0054] 도 4a에서 확인할 수 있듯이, 역분화 줄기세포에서 줄기세포 특이적 표지 마커인 OCT4와 SSEA4가 강하게 발현되었다.
- [0055] 도 4b에서 확인할 수 있듯이, 역분화 줄기세포에서 세포 내 전능성 줄기세포 특이적 단백질의 함량이 대조군인 인간 배아줄기세포주 H1(WiCell, Wisconsin, USA)에 비해 높게 나타났다.
- [0056] 도 5a 내지 도 5c에서 확인할 수 있듯이, 크로모솜 분석을 통해 역분화 줄기세포가 정상적인 핵형을 유지하고 있는 것으로 나타났다.
- [0057] 태반유래조건화 배지를 사용하여 총 3가지의 다양한 체세포에서 고효율로 확립한 역분화 줄기세포에서 특이적 마커 등을 통해 특성 및 안정성을 검증하였다.
- [0059] **실시예 4: 역분화 줄기세포의 분화능 확인**
- [0060] 역분화된 전능성 줄기세포가 외배엽, 중배엽 및 내배엽으로 분화할 수 있는 능력이 있는지 생체 외에서 배아구를 형성하여 분화능을 확인하고 면역이 결핍된 생쥐에서 기형종을 형성하는지 검증하였다.

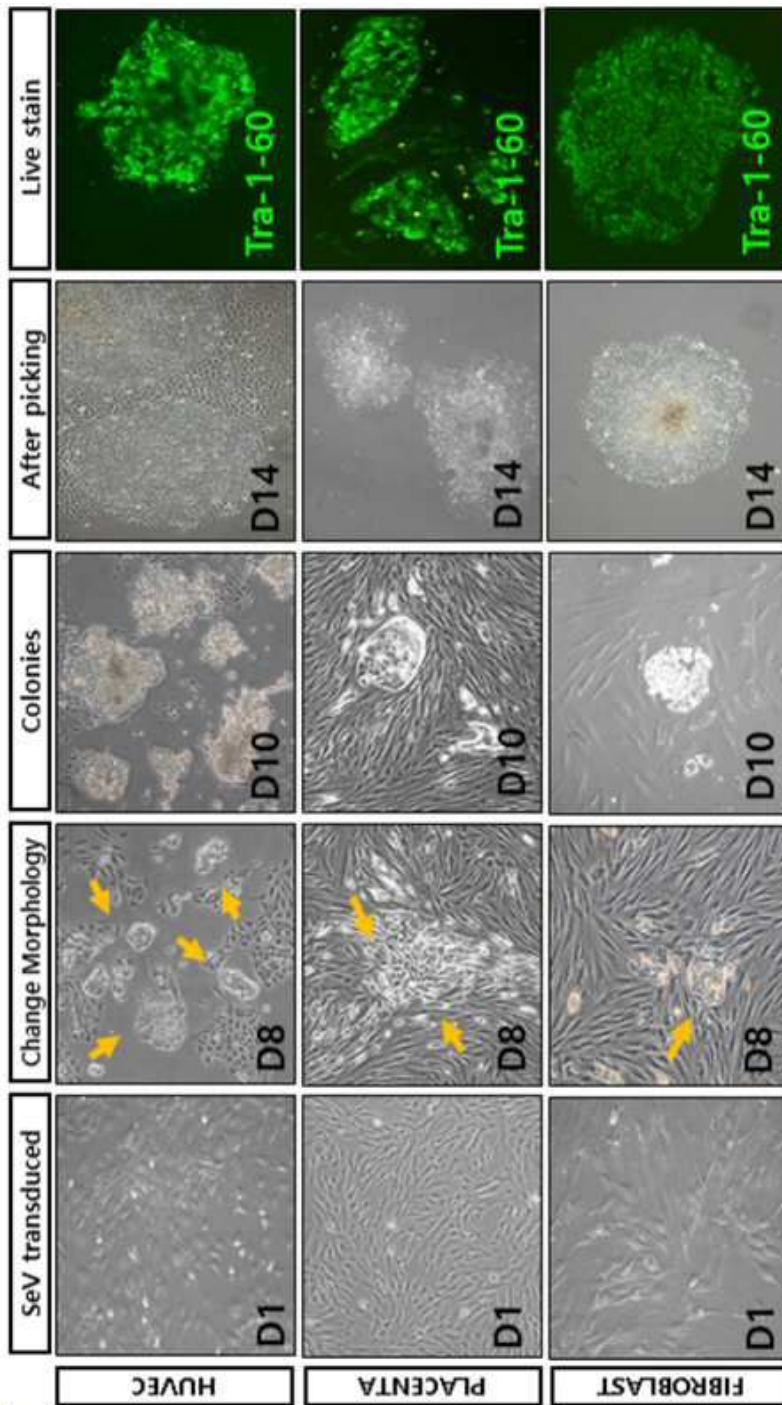
- [0061] 생체 외에서의 분화능을 확인하기 위하여 부착이 되지 않는 배양용기에 배아구를 2주동안 형성하고 각각 외배엽, 중배엽 및 내배엽으로 분화할 수 있는지 확인하기 위해 면역형광법을 수행하였다.
- [0062] 또한 생체 내의 분화능을 확인하기 위하여 면역이 결핍된 생쥐의 피하조직에 역분화된 전능성 줄기세포를 1.0×10^6 cells 주입하여 12주 경과 후 형성된 기형종에 대하여 면역조직화학 기법을 수행하여 검증하였다. 면역이 결핍된 생쥐에 역분화 줄기세포를 1.0×10^6 cells 주입하고 확인하였다.
- [0063] 구체적으로, 10분 동안 4% 파라포름알데히드로 세포를 고정시킨 후 15분 동안 0.1% 트라이톤 X100를 세포에 침투시킨 후 1시간 동안 3% 말 혈청(horse serum)이 포함된 PBS로 블로킹하였다. 1차 항체인 TUJ1(COVANCE #MRB-435P), Nestin(Abcam #ab22035), Desmin(Santacruz #sc-14026), AFP(Santacruz #sc-166335)를 1:1000으로 희석하여 처리하고 4℃에서 하룻밤 동안 배양하였다. 다음날 2차 항체를 처리하여 1시간 동안 상온에서 배양하고 4',6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI)을 암조건에서 5분 동안 방치한 후 형광 현미경으로 관찰하였다.
- [0064] 도 6a에서 확인할 수 있듯이, 외배엽으로 분화된 신경 상피(Neuroepithelium)를 TUJ1과 Nestin 마커를 통해 확인하였고, 중배엽으로 분화된 연골(Cartilage)을 중배엽 마커인 Desmin으로 확인하였으며, 그리고 내배엽으로 분화된 장표피(Intestinal epithelium)을 면역조직화학법을 수행하여 검증하고 생체 외 배아구가 형성된 것에서 외배엽으로 분화가 되었는지 중배엽 마커인 Desmin 및 내배엽 마커인 AFP가 발현되는 것을 면역형광법을 통해 검증하였다.
- [0065] 도 6b에서 확인할 수 있듯이, 면역이 결핍된 생쥐의 피하조직에서 기형종이 생성된 것을 관찰하였다.
- [0066] 결과적으로 생체 내·외에서의 역분화된 전능성 줄기세포의 분화능을 확인함으로써, 인간 태반유래 조건화배지를 이용하여 역분화된 줄기세포를 원하는 세포로 분화할 수 있는 능력을 검증하였다.

도면

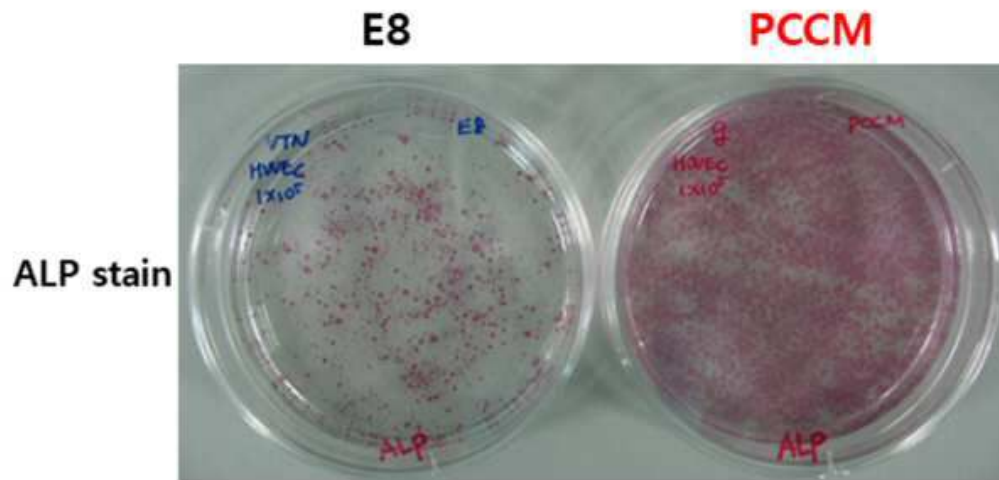
도면1



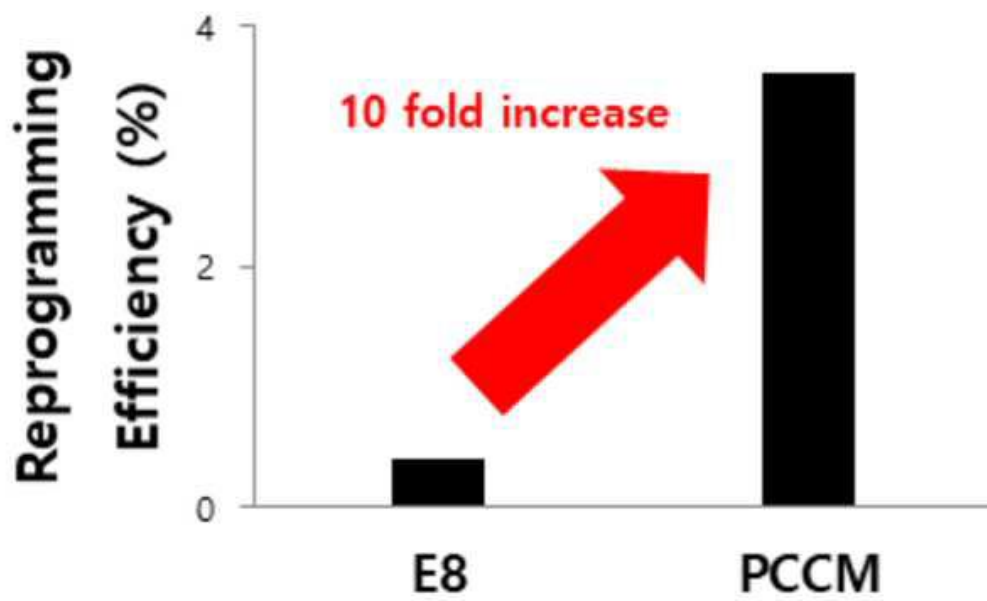
도면2



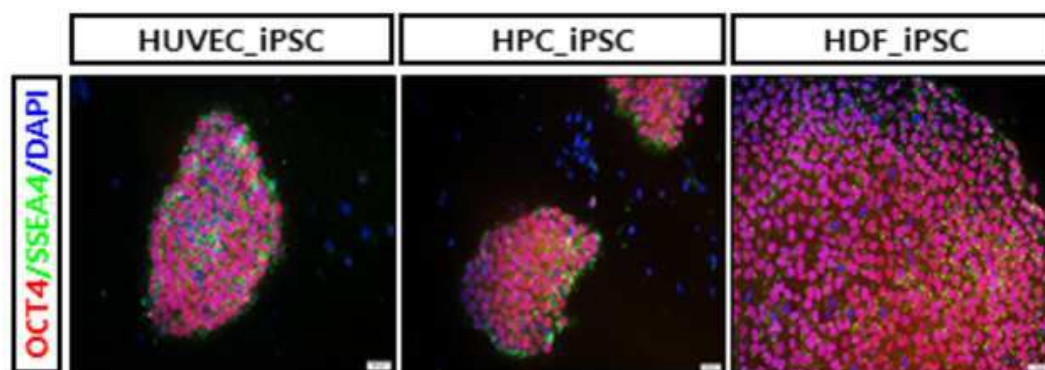
도면3a



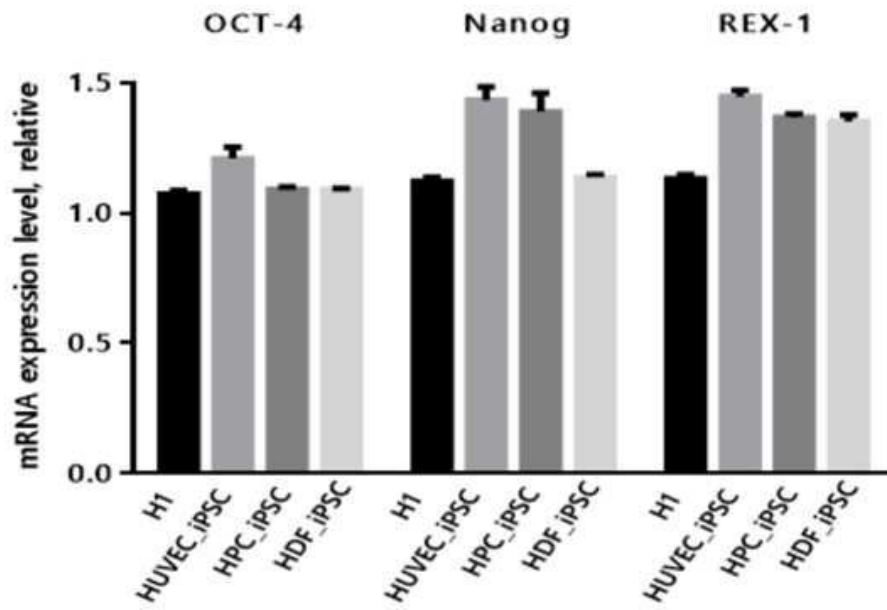
도면3b



도면4a

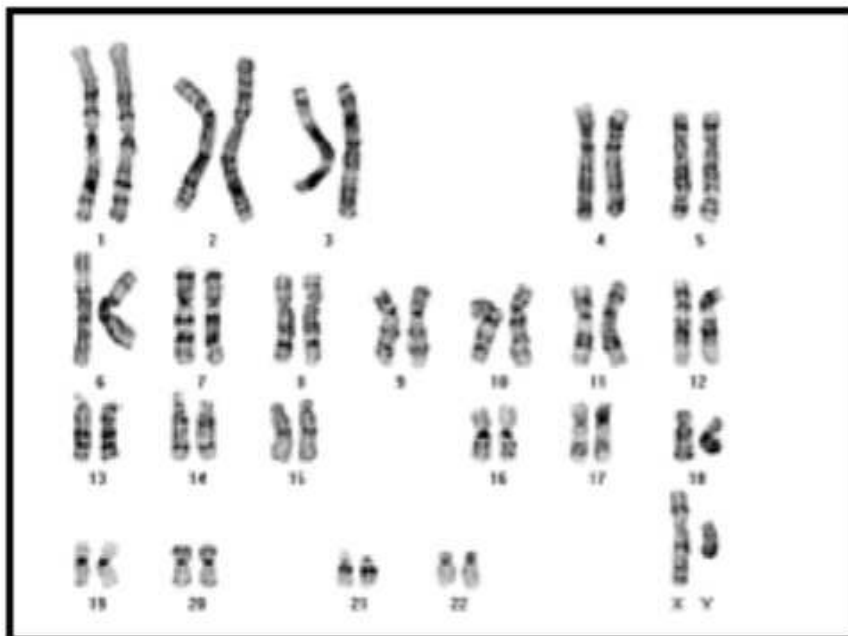


도면4b

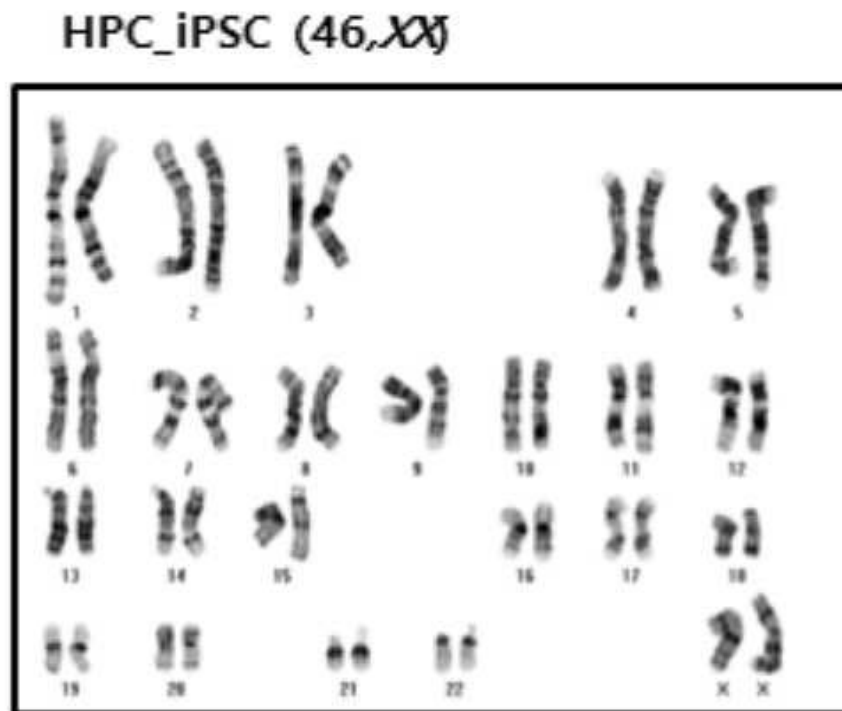


도면5a

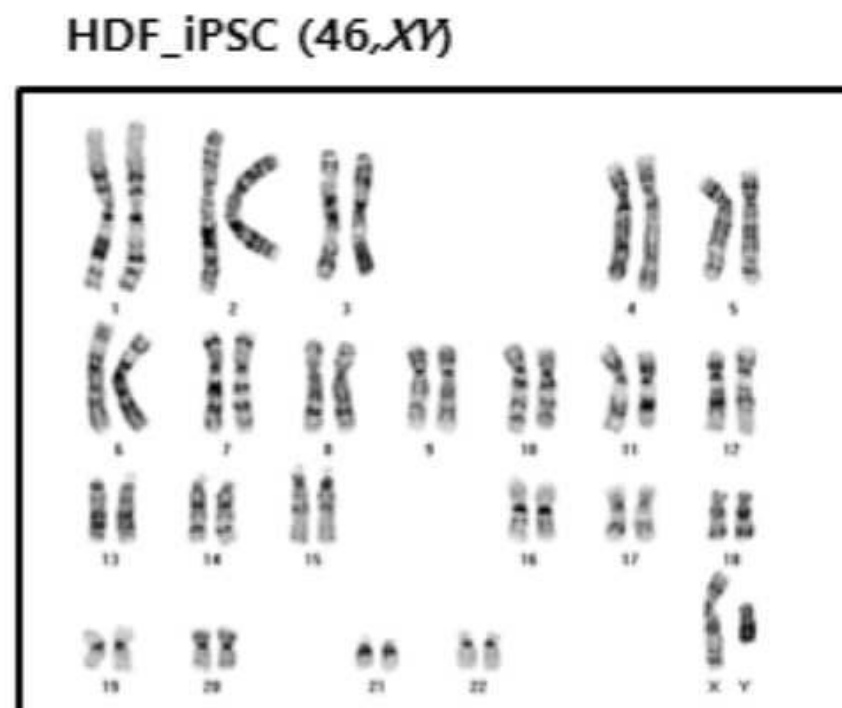
HUVEC_iPSC (46,XY)



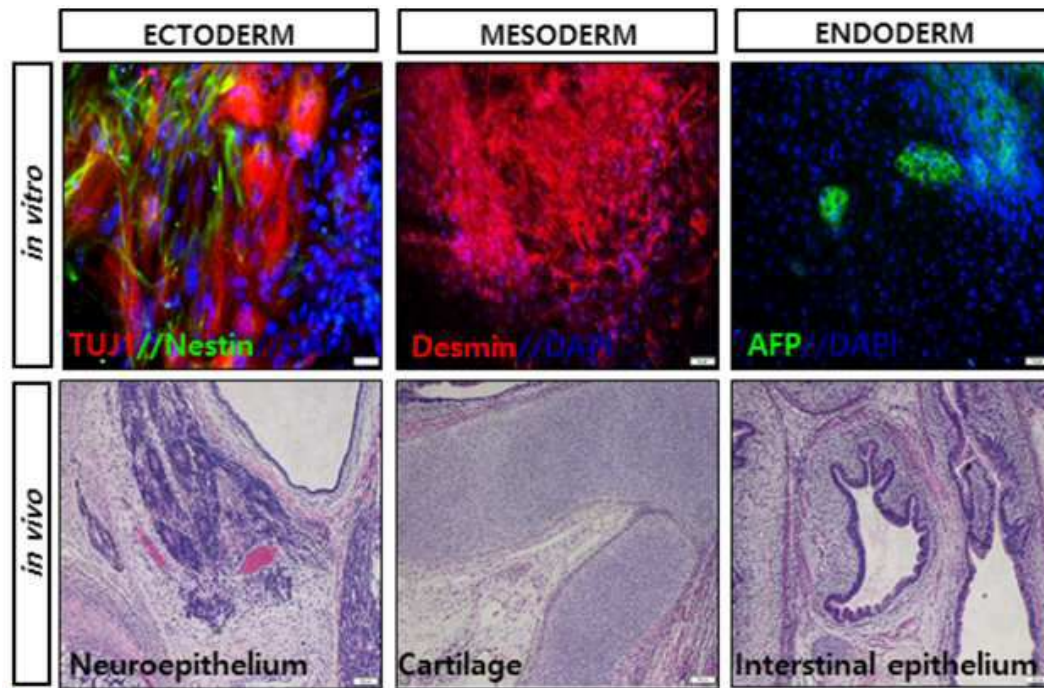
도면5b



도면5c



도면6a



도면6b



20