



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년04월09일
(11) 등록번호 10-1847044
(24) 등록일자 2018년04월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/32 (2006.01) C12N 5/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12M 23/12 (2013.01)
C12N 5/0062 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0114829
(22) 출원일자 2017년09월07일
심사청구일자 2017년09월07일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020130120032 A*
Biotechnology and Bioengineering, Vol. 107,
pp. 1020-1028 (2012.06.05.)*
KR1020150121866 A
KR1020170074503 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한국기초과학지원연구원
대전광역시 유성구 과학로 169-148 (어은동)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
김정아
대전광역시 유성구 엑스포로 448 엑스포아파트
102-202
김영혜
충청북도 청주시 청원구 오창읍 오창중앙로 65 우
림필유2차아파트 608-601
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김주연

전체 청구항 수 : 총 9 항

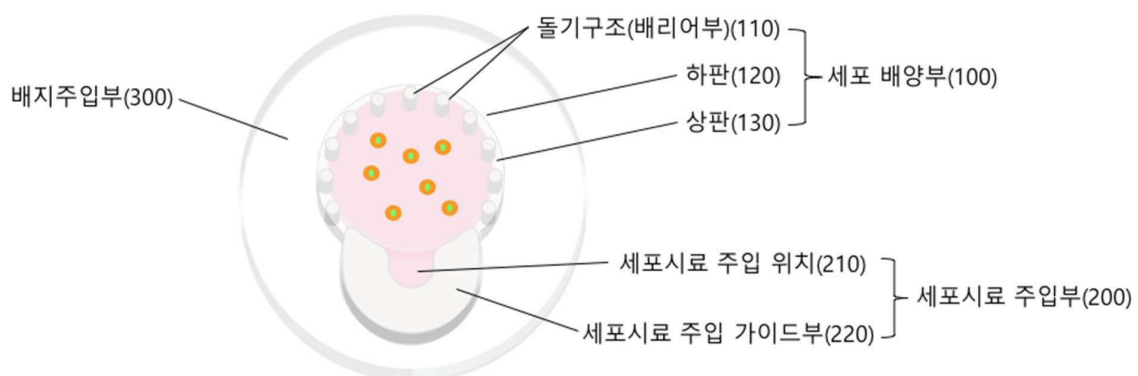
심사관 : 황상필

(54) 발명의 명칭 3차원 세포배양 용기

(57) 요약

본 발명은 3차원 세포배양 용기에 관한 것이다. 본 발명의 세포배양 용기는 하판(120); 상기 하판의 상측에 평행하게 위치한 상판(130); 상기 하판 또는 상판 중 어느 하나로부터 유래하여 상판과 하판 사이에 위치하는 둘 이상의 돌기구조(110)로 이루어진 배리어부; 상기 상판의 일측에 구비된 하나 이상의 세포시료 주입 가이드부(220);를 포함하여 구성될 수 있다. 이러한 구성에 의한 본 발명은 세포를 포함하는 시료를 가이드부에 의지하여 안정적으로 정확한 위치에 주입할 수 있으며, 상판과 다수개의 돌기구조가 적정량의 시료를 손쉽게 균일하게 주입할 수 있도록 돕는 역할을 함으로써 실험자의 작업을 용이하게 하는 한편, 일정 간격의 돌기구조가 젤 형태의 시료가 외부로 빠져나가지 못하도록 하는 배리어 역할을 하고 외부 셀에 있는 배지와 물질교환을 할 수 있도록 공간을 개방하는 역할을 함으로써 안정적인 세포배양을 할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 2513/00 (2013.01)

C12N 2535/00 (2013.01)

(72) 발명자

유영준

충청북도 청주시 청원구 오창읍 양청5길 76-22(베
가하우스) 206호

정석

서울특별시 마포구 월드컵로3길 14 마포한강2차푸
르지오아파트 202동 801호

양지훈

인천광역시 중구 축항대로86번길 47 라이프아파트
5동 909호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 P02017066
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 원천기술개발사업
 연구과제명 알츠하이머 치매 신경줄기세포 모델을 활용한 약물 탐색 플랫폼 개발
 기 여 율 70/100
 주관기관 한국생명공학연구원
 연구기간 2017.06.01 ~ 2018.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 T37416
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국기초과학지원연구원
 연구사업명 출연연구기관 주요사업
 연구과제명 알츠하이머 치매 기전 규명 및 표적발굴을 위한 3차원 융합분석 플랫폼 구축
 기 여 율 5/100
 주관기관 한국기초과학지원연구원
 연구기간 2017.01.01 ~ 2017.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 T37608
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국기초과학지원연구원
 연구사업명 출연연구기관 주요사업
 연구과제명 질량분석을 위한 시료 전처리 바이오 칩 가공 및 시작품 개발
 기 여 율 5/100
 주관기관 한국기초과학지원연구원
 연구기간 2017.06.01 ~ 2017.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PG2017062
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 이공분야기초연구사업
 연구과제명 알츠하이머 질환 모사 줄기세포모델의 베타아밀로이드로부터 유발되는 타우 병리기전 연구
 기 여 율 10/100
 주관기관 한국기초과학지원연구원
 연구기간 2017.06.01 ~ 2018.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PG2017039
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 이공분야기초연구사업
 연구과제명 미세유체소자 뇌혈관장벽 모델을 이용한 엑소좀 약물전달 및 효능평가
 기 여 율 10/100
 주관기관 한국기초과학지원연구원
 연구기간 2017.03.01 ~ 2018.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

하판(120);

상기 하판의 상측에 평행하게 위치한 상판(130);

상기 하판 또는 상판 중 어느 하나로부터 유래하여 상판과 하판 사이에 위치하는 둘 이상의 돌기구조 (110)로 이루어진 배리어부;

상기 상판의 일측에 구비된 하나 이상의 세포시료 주입 가이드부(220);를 포함하되,

상기 상판의 크기는 상기 배리어부의 내측만을 폐쇄하는 크기여서, 배리어부의 외측 부분은 개방된 구조인 것을 특징으로 하는 세포배양용기.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 돌기구조는 상판과 하판을 연결하는 기둥 형상인 것을 특징으로 하는 세포 배양용기.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 돌기구조는 상판과 하판 사이에 방사상으로 배열되어 상기 배리어부는 원형으로 형성된 것을 특징으로 하는 세포 배양용기.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 배리어부의 돌기구조 사이의 간격은 $10\mu\text{m}$ 이상 $2,000\mu\text{m}$ 이하인 것을 특징으로 하는 세포배양용기.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 돌기구조의 내측 지름은 $20\mu\text{m}$ 이상 $2,000\mu\text{m}$ 이하 이하인 것을 특징으로 하는 세포배양용기.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 배리어부의 내측 지름은 0.1mm 이상 10mm 이하인 것을 특징으로 하는 세포배양용기.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 상판과 하판의 간격은 0.05mm 이상 5mm 이하인 것을 특징으로 하는 세포배양용기.

청구항 8

제1항의 세포배양용기 구조를 2개 이상 포함하는 것을 특징으로 하는 세포배양 어레이.

청구항 9

제1항의 세포배양용기를 이용한 세포 배양 방법으로서,

상기 세포배양용기의 세포시료 주입 가이드부에 따라 세포시료를 주입하는 단계; 상기 세포배양용기의 바닥면과 상판 및 배리어 내부에 세포시료를 채우는 단계; 및 상기 배리어 외부에 세포배양에 필요한 배지를 배치하는 단계를 포함하는 세포배양방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 3차원 세포배양 용기에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 3차원 세포배양을 용이하게 하기 위한 용기로서, 실험자가 일정량의 세포 시료를 일정한 높이로 정확하게 용기에 주입할 수 있으며, 용기에 주입된 세포가 배지와 물질교환을 적절하게 할 수 있고, 세포 배양 결과물의 관찰을 용이하게 할 수 있도록 하는 구조의 기기에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 살아있는 세포를 기반으로 하는 분석기술은 다양한 기초연구를 비롯해 신약 개발 및 약동력학 시험에서 주요하게 활용되고 있다. 세포 기반 분석 기술은 기존의 생화학적 분석이나 실험동물 모델을 이용한 분석방법과 대비하여 인간 생체모사 측면에서 뛰어나며, 시간과 비용 면에서 경제적이어서 관련 업계의 수요가 증대되는 추세이다. 또한 세포 기반 분석기술은 생체 외 분석임에도 불구하고 세포성 보조인자를 통한 약물 투과성 측정 등 인체 내 환경을 반영한 약물 특성 및 효능을 연구할 수 있어 약물반응과 관련한 전체적 분자 메커니즘의 연구가 가능한 장점이 있다.

[0003] 이러한 장점 때문에 세포 기반 분석기술은 날로 발전하고 있으며, 2차원 세포 기반 분석기술의 한계 극복을 위해 콜라겐, 세포외기질, 하이드로겔 등을 포함한 스캐폴드 구조를 사용해 배양한 3차원 세포를 기반으로 생체 내 환경 또는 질병 상태를 보다 정확히 모사하는 3차원 세포기반 분석기술의 개발이 활발히 이루어지고 있다. 특히, 생체 내에서 3차원접촉을 하고 있는 뉴런(neuron) 및 신경줄기세포(neural stem cell)를 가지는 뇌조직세포의 경우 상기 2차원세포배양모델의 한계로 인해서, 살아있는 조직의 공간적 구조와 생화학적 복잡성을 잘 모사하는 3차원세포배양모델에 대한 관심이 높아지고 있다. 3차원세포배양모델은 생체 내 상태를 잘 모방하므로 생체 외실험에서 방향적 성장과 세포-세포연결의 복잡성을 구현할 수 있고, 더불어 3차원세포배양모델은 2차원세포배양모델에 비하여 개선된 세포생존과 향상된 신경줄기세포분화를 보여준다. 따라서, 3차원세포배양모델은 분자 기반의 조직 기능을 연구하는데 있어서 2차원세포배양모델 대비 다양한 질병 상태의 신호기전과 약물 반응을 잘 포착하는데 유용하다.

[0004] 3차원 세포배양과 이를 기반으로 하는 분석에서 신뢰성 높은 결과물을 얻기 위해서는 다양한 변수로부터 실험 대상 세포를 정확하게 제어하는 것이 필요하다. 특히 배양하고자 하는 세포시료를 배양장치 내 주입하는 과정에서 실험자의 능숙도에 따라 그 주입량 및 주입 형태 조절이 어려워 실험 결과물의 신뢰성에 영향을 미칠 수 있다. 예컨대, 겔 제형의 세포 시료를 배양용기의 내에 주입할 때 용기와 시료, 주변 기체와의 계면 에너지에 의해 세포가 평탄하게 주입되지 못하거나 주입된 세포 시료의 높이 차이로 인하여 배양 결과물의 현미경 관찰 및 정량적인 결과분석에 어려움이 있을 수 있다. 일정한 높이로 주입을 하는 장치가 있다 하더라도, 배양환경, 배지량의 제약, 주입방법의 복잡성과 같은 문제가 존재한다. 따라서 이러한 실험상의 곤란성을 해결할 수 있는 장치의 개발이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 종래 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 실험자의 실험 능숙도를 보완하여 세포배양 용기에 일정량의 세포를 안전하게 주입하고, 세포시료가 주변 배지와 물질 교환을 용이하고 적절하게 할 수 있도록 세포시료를 지지하며, 세포배양 결과물의 현미경 관찰이 용이하도록 세포시료의 높이를 일정하게 유지하도록 하는 세포배양 용기를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 실시예에 따른 세포배양 용기는 하판(120); 상기 하판의 상측에 평행

하게 위치한 상판(130); 상기 하판 또는 상판 중 어느 하나로부터 유래하여 상판과 하판 사이에 위치하는 둘 이상의 돌기구조(110)로 이루어진 배리어부; 상기 상판의 일측에 구비된 하나 이상의 세포시료 주입 가이드부(220);를 포함하여 구성될 수 있다.

- [0007] 상기 세포배양용기는 마이크로플레이트형태, 배양기의 연결형태를 포함하여 복수 개의 용기가 수평으로 어레이된 형태나 수직으로 배열된 형태로 제작될 수 있다.
- [0008] 상기 세포시료 주입 가이드부는 적어도 한 개 이상 상기 세포배양용기 일 측면에 위치할 수 있으며, 세포시료를 주입하는 도구인 파이펫 등의 실험기구가 의지할 수 있도록 도출된 홈 구조를 가질 수 있다.
- [0009] 상기 다수개의 돌기구조는 바람직하게는 둘 이상의 돌기구조로 구성되며, 돌기구조의 내측지름은 20 μ m 이상 2,000 μ m 이하이고, 돌기구조 간의 간격은 바람직하게는 10 μ m 이상 2,000 μ m 이하이고, 세포시료와 배지의 원활한 물질교환을 위하여 바람직하게는 원형으로 배치될 수 있다.
- [0010] 상기 돌기구조는 상판과 하판에 모두 연결된 기둥형상일 수 있다.
- [0011] 상기 다수개의 돌기구조로 둘러싸인 세포배양부의 지름은 0.1mm 이상 10mm 이하인 것이 적절하다.
- [0012] 상기 상판부는 하판과 평행하게 위치할 수 있으며, 하판과의 간격은 0.05mm 이상 5mm 이하인 것이 적절하다.

발명의 효과

- [0013] 이러한 구성에 의한 본 발명은 세포를 포함하는 시료를 주입구의 가이드부에 의지하여 안정적으로 정확한 위치에 주입할 수 있으며, 또한 주입구의 가이드는 시료의 흐름이 배양 용기 쪽을 향하고, 외부로 빠져 나가지 못하도록 배리어역할을 할 수 있다. 상판과 다수개의 돌기구조가 적정량의 시료를 손쉽게 균일하게 주입할 수 있도록 돕는 역할을 함으로써 실험자의 작업을 용이하게 하는 한편, 일정 간격의 돌기구조가 젤 형태의 시료가 외부로 빠져나가지 못하도록 하는 배리어 역할을 하고 외부 셀에 있는 배지와 물질교환을 할 수 있도록 공간을 개방하는 역할을 함으로써 안정적인 세포배양을 할 수 있다. 바닥면과 평행한 상판은 시료의 높이를 결정함으로써 3차원 세포배양물이 높이를 일정하게 유지하도록 한다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 3차원 세포배양 용기의 구조를 보여주는 사시도이다.
 도 2는 본 발명의 실시예에 따른 3차원 세포배양용기의 구성이 어레이 형태 혹은 플레이트 형태로 제작될 수 있음을 보여주는 사시도이다.
 도 3는 본 발명의 실시 예를 구현하기 위한 용기의 제작 방법의 예시와 3차원 세포배양 과정을 묘사하는 모식도이다.
 도 4은 세포시료를 주입 시 표면장력을 고려하여 세포배양 용기 돌기구조부의 적절한 간격을 도출하기 위한 실험의 결과를 보여주는 도이다.
 도 5는 세포 배양부내에 세포시료액의 주입 형태를 확인한 실험으로, 용기의 표면성질의 변화에 따라 배양부의 지름, 돌기구조의 간격이 시료액의 로딩 성공률에 미치는 영향에 관한 결과를 보여주는 도이다.
 도 6는 실제 세포배양 및 분화실험을 통하여 세포 배양부의 지름에 따라 배지와 물질교환이 이루어지는 정도를 확인한 실험의 결과를 보여주는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 후술하는 본 발명에 대한 상세한 설명은, 본 발명이 실시될 수 있는 특정 실시 예를 예시로서 도시하는 첨부 도면을 참조한다. 이들 실시 예는 당업자가 본 발명을 실시할 수 있기에 충분하도록 상세히 설명된다. 본 발명의 다양한 실시 예는 서로 다르지만 상호 배타적일 필요는 없음이 이해되어야 한다. 예를 들어, 여기에 기재되어 있는 특정 형상, 구조 및 특성은 일 실시예에 관련하여 본 발명의 요지 및 범위를 벗어나지 않으면서 다른 실시예로 구현될 수 있다. 또한, 각각의 개시된 실시예 내의 개별 구성요소의 위치 또는 배치는 본 발명의 요지 및 범위를 벗어나지 않으면서 변경될 수 있음이 이해되어야 한다. 따라서, 후술하는 상세한 설명은 한정적인 의미로서 취하려는 것이 아니며, 본 발명의 범위는, 적절하게 설명된다면, 그 청구항들이 주장하는 것과 균등한 모든 범위와 더불어 첨부된 청구항에 의해서만 한정된다. 도면에서 유사한 참조부호는 여러 측면에 걸쳐서 동일하

거나 유사한 기능을 지칭하며, 길이 및 면적, 두께 등과 그 형태는 편의를 위하여 과장되어 표현될 수도 있다.

[0016] 이하에서는, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 본 발명을 용이하게 실시할 수 있도록 하기 위하여, 본 발명의 바람직한 실시 예들에 관하여 첨부된 도면을 참조하여 상세히 설명하기로 한다.

[0017] 본 발명에 따르는 세포배양용기는 하판(120); 상기 하판의 상측에 평행하게 위치한 상판(130); 상기 하판 또는 상판 중 어느 하나로부터 유래하여 상판과 하판 사이에 위치하는 둘 이상의 돌기구조(110)로 이루어진 배리어부; 상기 상판의 일측에 구비된 세포시료 주입 가이드부(220);를 포함한다.

[0018] 본 발명의 세포배양용기는 유리(glass)를 포함하는 투명 세라믹류, 폴리디메틸실록세인(PolyDiMethylSiloxane; PDMS)과 에코플렉스(ecoflex) 중 적어도 하나를 포함하는 실리콘고무류, 폴리스티렌(polystyrene), 폴리메틸메타크릴레이트(polymethylmethacrylate), 폴리프로필렌(polypropylene), 폴리카보네이트(polycarbonate)와 폴리우레탄(polyurethane), 중 적어도 하나를 포함하는 엔지니어링 플라스틱류, 투명 세라믹류, 실리콘고무류와 엔지니어링 플라스틱류 중 적어도 두 개를 포함하는 혼합물, 투명 세라믹류의 화학적 변형체, 실리콘고무류의 화학적 변형체, 엔지니어링 플라스틱류의 화학적 변형체, 또는 투명 세라믹류의 화학적 변형체, 실리콘고무류의 화학적 변형체와 엔지니어링 플라스틱류의 화학적 변형체 중 하나 또는 적어도 두 개를 포함하는 혼합물을 포함할 수 있다. 또한, 광경화형 플라스틱류, 필름, 열가소성 플라스틱 및 금속 등 3D 프린터 소재로 이용될 수 있는 소재를 하나 이상 포함하거나 이의 화학적 변형체를 모두 포함할 수 있다.

[0019] 본 발명에 따르는 세포배양용기의 세포 시료 주입부는 세포배양용기 구성의 일 측면에 위치할 수 있다. 세포 시료 주입부는 세포 시료를 주입하는 파이프, 주사기 니들 등의 토출구를 가이드 할 수 있도록 바람직하게는 원형의 홈 구조를 갖는다. 또한 시료 주입구 주위로 시료가 돌기구조 밖으로 빠져 나가지 않고, 배양부 내부로 향하여 채워지도록 액체의 흐름을 가이드 하는 배리어 구조체가 포함될 수 있다.

[0020] 본 발명에 따르는 세포배양용기의 다수개의 돌기구조부는 젤 형태의 세포시료가 그 표면장력에 의하여 돌기구조부 내부에 안착하는데 적절할 정도의 간격을 갖으며, 돌기구조의 간격은 10 μ m 에서 2,000 μ m, 돌기구조의 내측지름은 20 μ m 에서 2,000 μ m 정도로 가능하다. 배리어 역할을 하는 돌기구조부는 돌기구조의 내측지름이 작을수록 돌기구조간의 간격도 작아지는 경향이 있다. 하지만 너무 좁은 간격은 세포와 배양액 사이의 물질 교환을 하는데 제약이 생기거나, 기포가 틈 사이에 형성될 가능성이 높아 질 수 있고, 너무 큰 간격은 돌기구조와 시료 간 표면에너지와 장력 간 균형이 깨지면서 시료가 돌기구조 밖으로 빠져 나갈 가능성이 높아진다. 실시 예에서처럼, 돌기구조의 내측지름이 300 μ m일 때, 각 돌기구조간의 간격이 약 200 μ m에서 400 μ m 사이가 적절하며, 세포시료가 내부에 안착하는데 적절하다. 또한 돌기구조의 개수는 세포시료를 내부에 안착시킬 수 있는 공간을 구성하기에 적절한 숫자로 구성되며 1개 이상 100개 이하가 적절하다. 돌기구조의 단면은 원형 외에 다각형 등 계면 장력을 조절할 수 있는 다양한 형태로 존재할 수 있다.

[0021] 본 발명에 따르는 세포배양용기의 형태는 바람직하게는 원형 혹은 원형외에 다른 형태도 무방하다. 배양부의 폭은 물질교환이 충분히 일어나 내부의 세포에 전달하는 산소와 영양분이 공급이 원활하게 일어날 수 있는 크기여야 하며, 세포 배양부가 원형일 때 그 지름을 기준으로 0.1mm에서 10mm 정도로 가능하다. 크기가 너무 작으면 충분한 양의 세포시료를 공급하기 어려우며, 너무 큰 지름(배양부가 다각형일 때 내접원의 지름)은 측면으로의 물질전달에 제약이 있어 세포배양기로서 적합하지 않다.

[0022] 본 발명에 따르는 세포배양용기의 상판은 하판과 평행을 이루는 형태일 수 있다. 또한 하판과 연결된 기둥형상의 돌기구조부에 직각으로 연결되어 바닥면과 평행을 이루는 형태일 수 있다. 상판과 하판과의 높이는 세포 배양 결과물을 현미경으로 관찰하기에 적절한 간격을 갖도록 하며, 0.05mm에서 5mm 사이가 적절하다. 0.05mm 이하일 경우 관찰범위 내에 관찰 대상 세포 수의 충분한 확보가 어려우며, 5mm 이상일 경우 관찰 대상이 되는 세포의 중첩 등의 문제로 현미경으로 세포 배양 결과를 관찰하기에 부적절하다.

[0023] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명하고자 한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐, 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0024] 실시예1. 바람직한 돌기구조부 간격 도출

[0025] 일반적으로 사용되는 젤 형상의 세포시료와 용기 표면과의 표면에너지를 고려하여 세포시료가 용출되지 않고 다수개의 돌기구조로 이루어진 배리어 내에 고정되기에 적절한 돌기구조 간 간격 도출을 위하여 돌기구조간의 간격을 200 μ m에서 400 μ m까지 100 μ m 간격으로 두고 세포시료 로딩 실험을 수행하였다. 주입 시료는 콜라겐 2mg/ml를 이용하였고, 이때 돌기구조의 내측지름은 300 μ m로 하였다. 상판과 바닥면의 두께 (시료의 두께)는 250 μ m

로 고정되었다.

[0026] 실험결과, 도4에서 확인할 수 있는 바와 같이 200 μ m에서 400 μ m로 돌기구조 간의 간격이 커질수록 젤 시료의 계면이 돌기구조 바깥쪽으로 돌출되는 경향이 보인다. 즉 더 큰 간격에서는 시료가 돌기구조 밖으로 썰 수 있으므로 돌기구조의 지름 및 배양부의 지름에 따라 최적의 간격이 필요하다. 본 실험에서는 돌기구조 내측지름을 300 μ m으로 고정하였을 때 200 μ m에서 400 μ m 사이의 돌기구조 간 간격에서는 젤 형태의 세포시료가 돌기구조 밖으로 용출되지 않고, 그 장력에 의하여 돌기구조로 이루어진 배리어 내부에 적절하게 위치하고 있음을 확인할 수 있었다.

[0027] 실시예 2. 용기 표면의 친수성 정도에 따른 시료주입의 성공률

[0028] 본 실험에서는 세포배양기와 돌기구조 표면을 친수성으로 처리 (플라즈마 처리)한 후, 용기내로 주입되는 시료가 내부로 잘 안착되는 지 성공률을 조사하였다. 플라즈마 처리한 직후는 용기의 표면에너지가 높은 친수성이며, 시간이 지날수록 점차 소수성을 회복한다, 돌기구조 표면이 친수성일 때 시료의 젖음성이 좋아져서 시료가 돌기구조 밖으로 흘러나오기 쉽고, 시료 로딩 실패율이 높아지며, 소수성을 회복할수록 액체의 표면장력에 의해 시료 로딩의 성공률이 높아지게 된다. 본 실험에서는 돌기구조의 간격, 주입부 지름이 로딩에 미치는 효과를 극대화하기 위하여, 돌기구조 표면을 친수성으로 처리한 지 8시간 이내에 로딩에 얼마나 성공하는지를 확인하였다. 이 실험에서, 시료가 하나 이상의 돌기구조 밖으로 빠져나가면 실패, 돌기구조 안으로 성공적으로 안착하면 성공으로 정의하였다. 도 5(a)는 친수성 표면에서 시간의 변화에 따라 시료의 로딩에 성공하는 확률을 나타낸다. 그림에서와 같이 시간이 지남에 따라 친수성에서 소수성으로 변해가면서 시료의 로딩 성공률은 점차 높아져 8시간 이후에는 100%에 가까움을 보여준다. 이는 돌기구조가 시료 로딩의 성공이 가능함을 보여준다. 도 5(b)에서는 세포배양부의 지름의 크기가 로딩성공률에 미치는 영향을 알아보았다. 매우 친수성인 표면 (1h, time after plasma treatment)에서 배양부의 지름이 클수록 시료가 배양부 내에 최종 채워지기 전에 주변 돌기구조 밖으로 용액이 새는 확률이 높아짐을 관찰하였다. 이는 소수성을 회복하는 시간에 따라 점차 줄어들어, 8시간 이후에는 지름크기에 상관없이 로딩 성공률이 100%에 달했다. 또한 도 5(c) 배양부 주변 돌기구조부의 간격에 따른 시료 로딩확률을 측정하였다. 마찬가지로, 매우 친수성인 표면에서 (1h, time after plasma treatment)에서 돌기구조 간 간격이 클수록 시료가 돌기구조 밖으로 새는 확률이 높음을 확인할 수 있었으며, 이는 시간이 지날수록 줄어들어 소수성이 회복되는 8h 이후에서는 간격에 상관없이 실패율이 거의 없었다. 이를 통해, 돌기구조부의 간격과 배양부의 지름이 세포 로딩 성공률에 미치는 효과를 확인할 수 있었으며, 표면에너지가 높지 않은 표면에서 세포 로딩의 확률이 거의 100%에 달해 매우 효과적으로 세포 시료를 채울 수 있음을 증명하였다.

[0029] 실시예 3. 세포의 배지와의 물질교환 확인을 통한 세포 주입부 크기 도출

[0030] 다수개의 돌기구조로 이루어진 배리어 내부에 있는 세포시료와 배지의 물질교환이 적절하게 이루어질 수 있는 수준의 세포 주입부 크기 도출을 위하여 세포 로딩부의 지름을 2mm에서 5mm까지 1mm 간격으로 두고 물질교환 실험을 수행하였다. 상판과 바닥면의 두께 (시료의 두께)는 250 μ m으로 고정되었다.

[0031] 세포는 ReN-VM(Neural stem cell)을 이용하였으며, 세포 배양조건 및 관찰 기준은 아래와 같다.

[0032] Name of cell: ReN-VM (Neural stem cell)

[0033] Matrigel concentration. : 5.7 mg/ml

[0034] Cell concentration. : 1.0×10^7 cells/ml

[0035] Culture period : 1 week

[0036] Staining method : FITC-phalloidin, 50 min

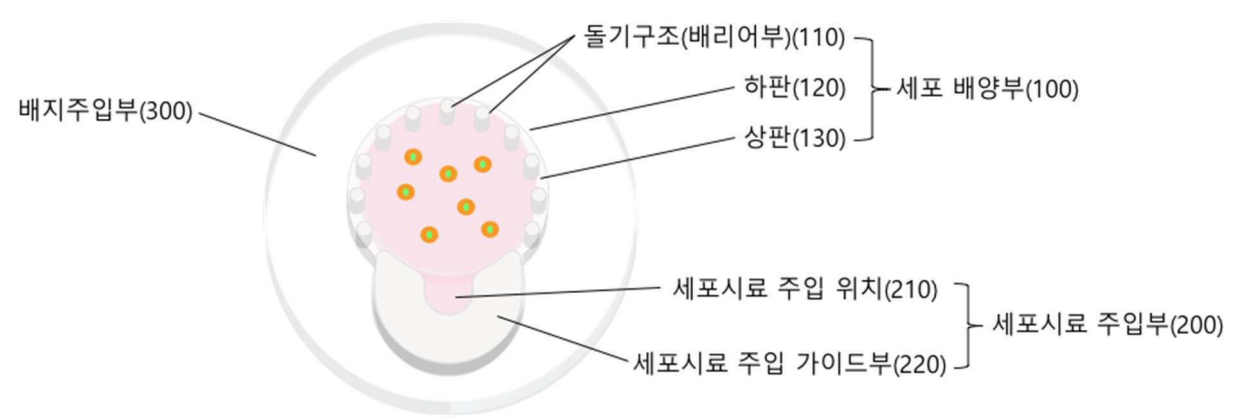
[0037] 실험결과, 도6에서 확인할 수 있는 바와 같이 세포배양부의 지름이 2mm에서 4mm까지는 세포 배양부 전체에서 신경줄기세포가 주입된 젤 환경과 배양액에 의해서 분화가 잘 일어나고 있음을 확인할 수 있었다. 이는 곧 시료 전체 범위에서 배지와 물질교환이 원활하게 이루어지고 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 50분간 염색한 제한된 시간에서 살펴보면, 염색액이 퍼지는 정도는 5mm 세포배양부에서 가장 불균일하게 보인다. 이는 곧 세포배양부의 지름이 무한정 커지는 데 제약이 있을 수 있음을 의미한다.

[0038] 비록 본 발명이 상기에 언급된 바람직한 실시예로서 설명되었으나, 발명의 요지와 범위로부터 벗어남이 없이 다양한 수정이나 변형을 하는 것이 가능하다. 또한 첨부된 청구 범위는 본 발명의 요지에 속하는 이러한 수정이나

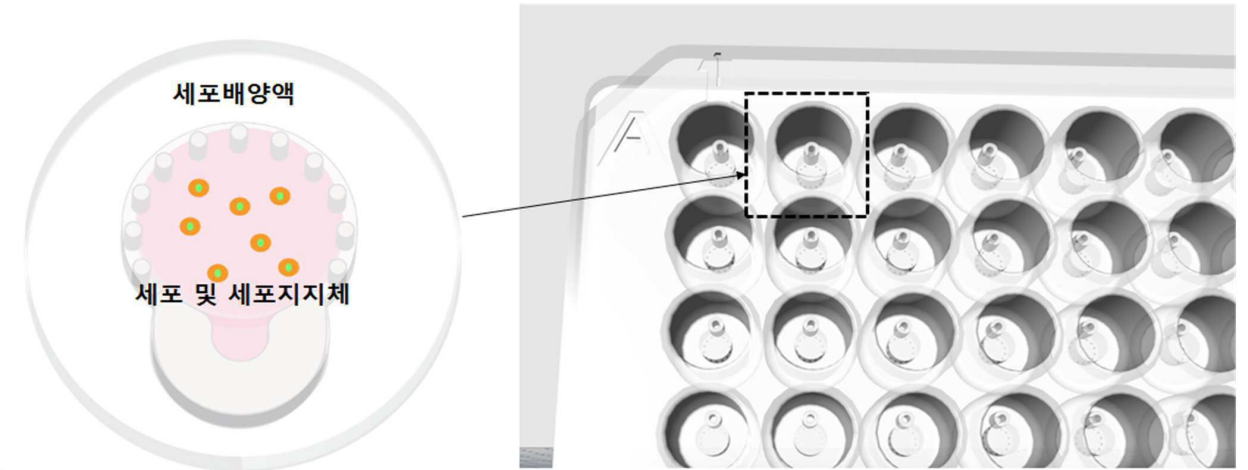
변형을 포함한다.

도면

도면1

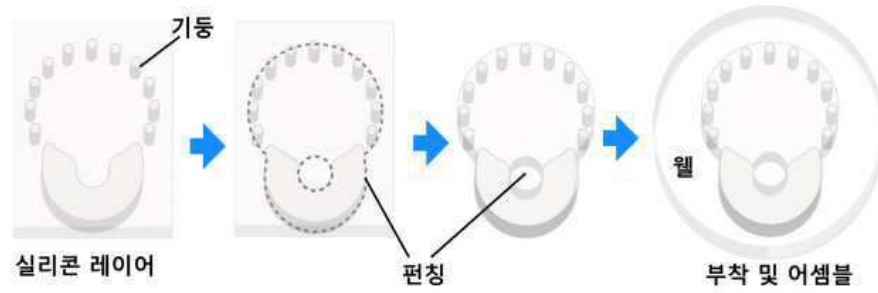


도면2

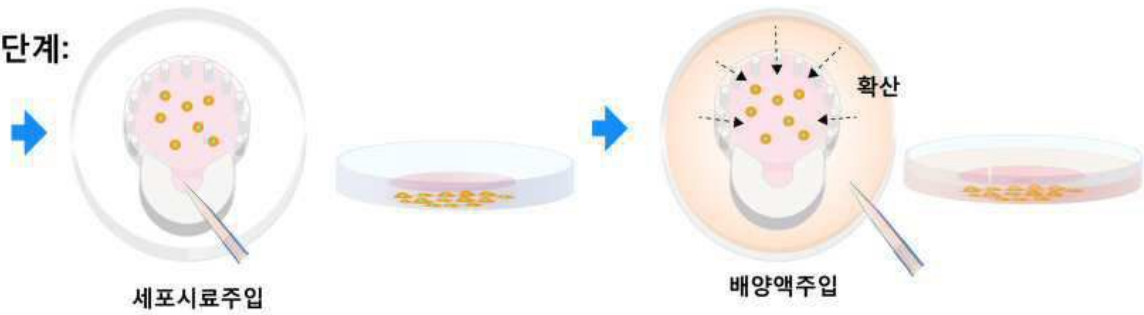


도면3

제작 예:



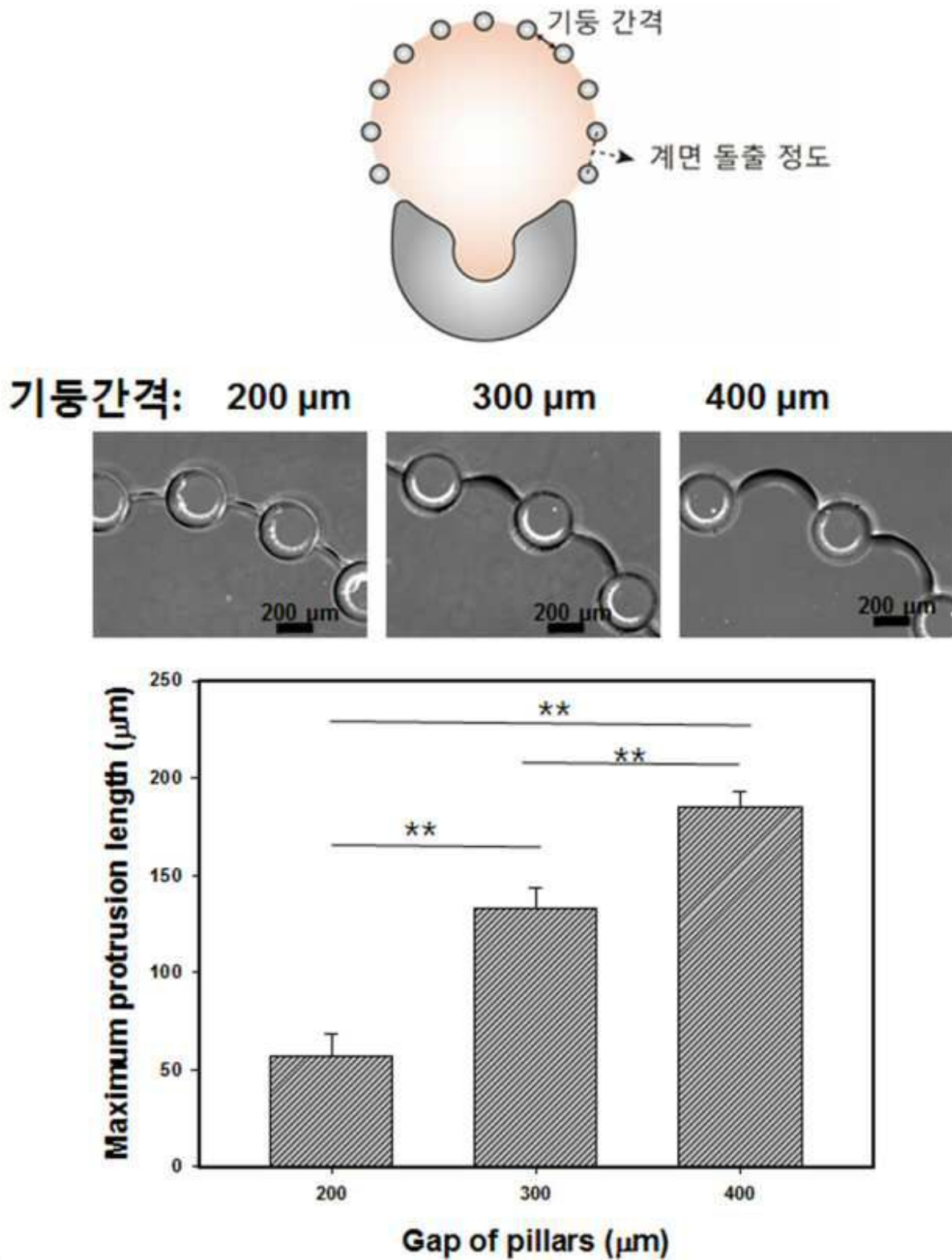
배양단계:



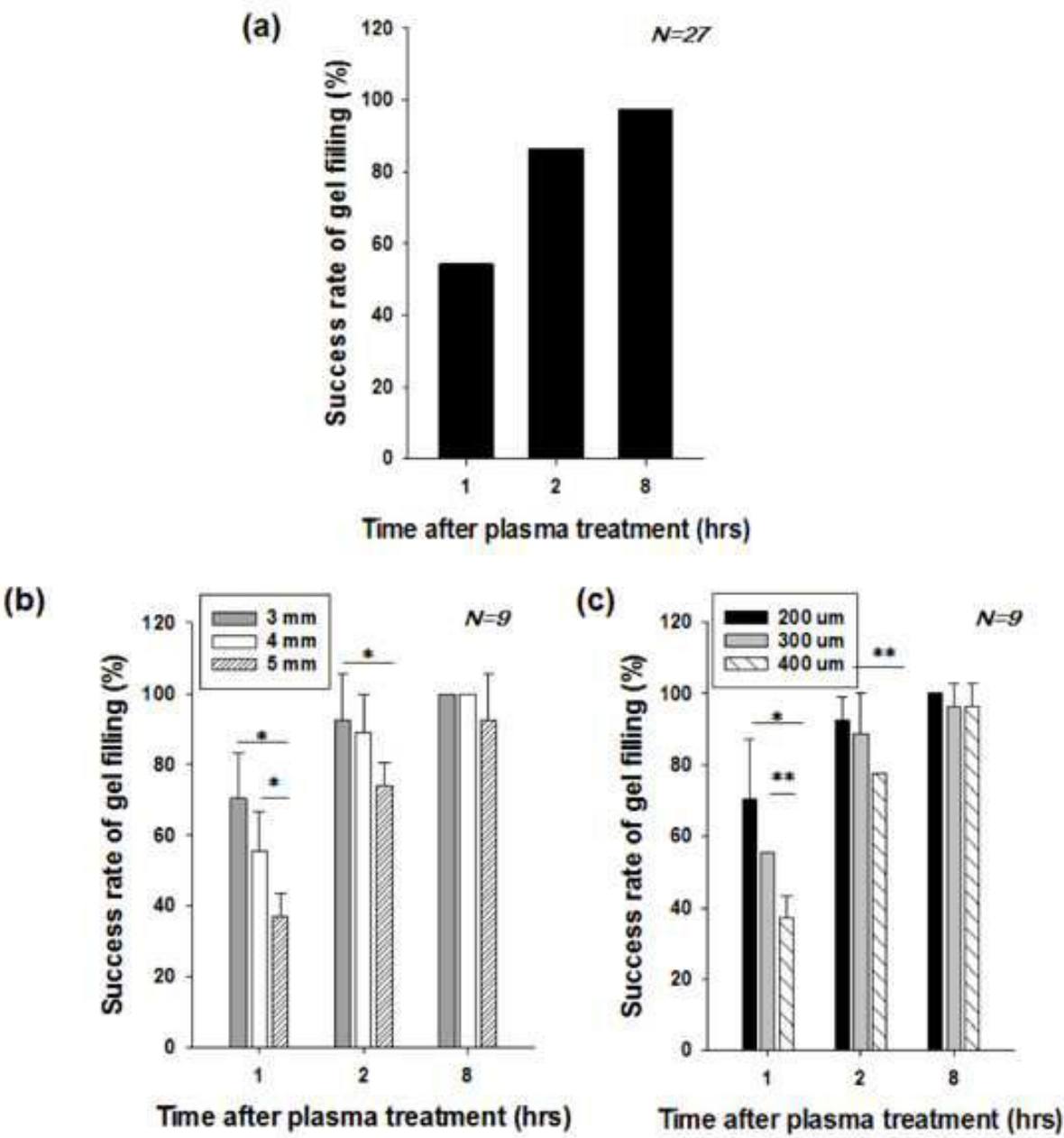
Side view



도면4



도면5



도면6

