



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0032009  
(43) 공개일자 2019년03월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 5/0775 (2010.01) C12N 5/077 (2010.01)  
(52) CPC특허분류  
C12N 5/0664 (2013.01)  
C12N 5/0654 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2017-0120405  
(22) 출원일자 2017년09월19일  
심사청구일자 2017년09월19일

(71) 출원인  
경희대학교 산학협력단  
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)  
(72) 발명자  
정세영  
서울특별시 동대문구 천장산로11길 17, 204동 1503호 (이문동, 이문삼성래미안아파트)  
(74) 대리인  
손민

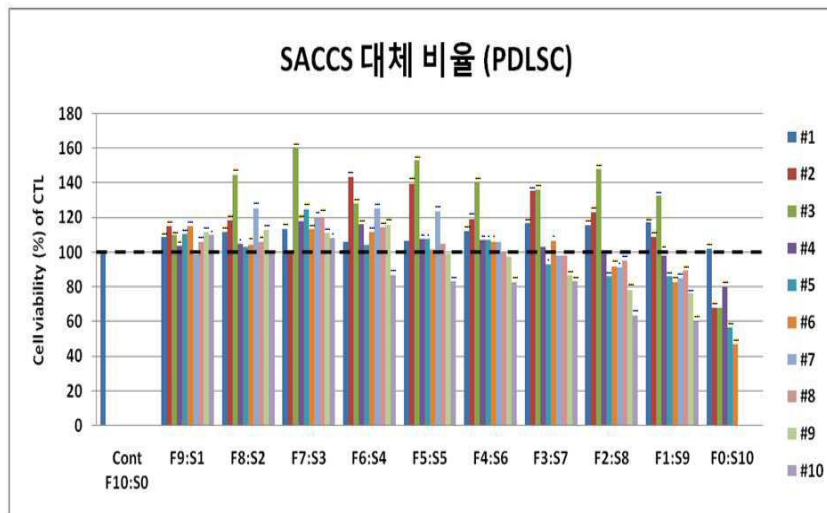
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 스피롤리나를 포함하는 줄기세포 배양 및 분화용 배지 조성물

**(57) 요약**

본 발명은 스피롤리나를 포함하는 줄기세포 배양 및 분화용 배지 조성물에 대한 것으로, 상기 조성물은 소태아혈청 대신 스피롤리나를 포함하면서도 줄기세포의 배양 및 분화 효과가 우수하여, 줄기세포의 배양 및 분화를 위한 무혈청 배지의 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

**대표도 - 도1**



(52) CPC특허분류

**C12N 5/0667** (2013.01)

C12N 2500/70 (2013.01)

C12N 2506/1361 (2013.01)

C12N 2506/1384 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711037889

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 해양극지기초원천기술개발

연구과제명 FBS 대체 SACCs 기반 줄기세포주 배양 및 줄기세포 분화 연구

기여율 1/1

주관기관 경희대학교

연구기간 2016.05.01 ~ 2016.12.31

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

스피롤리나를 포함하는 줄기세포 배양 및 분화용 배지 조성물.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 상기 줄기세포는 치주인대줄기세포(periodontal ligament stem cell, PDLSC), 치수유래줄기세포(dental pulp stec cell, DPSC), 골수유래줄기세포(bone marrow-derived stem cell, BMSC) 및 지방유래줄기세포(adipose-derived stem cell, ADSC)를 포함하는 군에서 선택된 어느 하나 이상인, 배지 조성물.

**청구항 3**

제1항에 있어서, 상기 줄기세포는 치주인대줄기세포(periodontal ligament stem cell, PDLSC) 및 지방유래줄기세포(adipose-derived stem cell, ADSC)인, 배지 조성물.

**청구항 4**

제1항에 있어서, 상기 배지 조성물은 줄기세포의 계대배양이 가능한, 배지 조성물.

**청구항 5**

제1항에 있어서, 상기 배지 조성물은 줄기세포의 분화능을 촉진하는, 배지 조성물.

**청구항 6**

제5항에 있어서, 상기 분화능은 골분화능인, 배지 조성물.

**청구항 7**

제6항에 있어서, 상기 배지 조성물은 알칼리포스파타제(alkaline phosphatase, ALP)의 활성을 촉진하는, 배지 조성물.

**청구항 8**

제1항에 있어서, 상기 배지 조성물은 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 추가로 포함하는, 배지 조성물.

**청구항 9**

제8항에 있어서, 상기 스피롤리나는 소태아혈청(FBS) 대비 9:1 내지 4:6 중량비(소태아혈청:스피롤리나)인, 배지 조성물.

**청구항 10**

제8항에 있어서, 상기 스피롤리나는 소태아혈청(FBS) 대비 9:1 중량비(소태아혈청:스피롤리나)인, 배지 조성물.

**발명의 설명**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 스피롤리나를 포함하는 줄기세포 배양 및 분화용 배지 조성물에 대한 것이다.

**배경기술**

[0002] 세포배양은 오늘날 분자생물학, 면역학을 비롯한 의학 분야의 연구에 가장 기본적이고 중요한 실험 기법이다. 현재까지 사용되고 있는 동물세포 배양법은 성장을 위하여 반드시 세포배양배지에 혈청을 공급해 주어야 하며, 가장 널리 사용되는 혈청으로 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)이 있다. 또한, 성체 줄기세포의 배양 및 분

화 유도시에도 소태아혈청을 함유하는 배지에 여러 종류의 분화 유도 인자들을 첨가하여 사용해왔다.

[0003] 그러나, 상기 배지를 이용한 줄기세포의 배양과정에서 소태아혈청을 포함한 동물유래 단백질원을 사용함으로써 임상적용을 위한 줄기세포 치료제의 개발시 중간 오염성 등의 안정성 문제를 배제하기가 어렵다. 또한, 소태아혈청의 제조과정은 임신한 어미 소의 자궁에서 소태아를 적출하여 혈청을 분리하므로 필연적으로 윤리적인 문제가 발생할 수밖에 없고, 미국 FDA 및 유럽연합의 EMEA(European Medicines Agency)를 비롯한 국제사회는 소태아혈청의 사용 자제와 대체제의 개발을 권고하고 있는 실정이다. 나아가, 소태아혈청에 의한 광우병 전파 위험성에 대한 논란 역시 여전히 해결되지 않은 상황이다.

[0004] 소태아혈청을 대체하는 세포배양배지의 연구가 활발히 이루어진 결과, 국내공개특허 제10-2013-0006123호에서는 양수줄기세포의 효과적인 증식이 가능한 무혈청 배지인 MesemCult-XF 배지를 개발하였고, 미국 뉴저지 대학교의 Arati A.Inamdar 교수팀은 세포치료제로 사용하기 위한 임상등급의 중간엽 줄기세포를 생산하기 위해 세포 성장 첨가제로 사용하는 혈장 및 혈소판 용해물(platelet lysate)을 개발하였다. (Inamdar et al. journal of regenerative medicine & tissue engineering 2013)

[0005] 그러나, 현재까지 개발된 무혈청배지의 경우 적용 가능한 세포주가 매우 한정적이고, 배양을 위한 세포주의 적응 과정이 어려우며 세포분열 및 성장속도가 느릴 뿐만 아니라, 소태아혈청 대신 세포배양에 필수적인 각종 호르몬 및 성장인자의 추가적인 첨가가 필요해 사용자의 번거로움을 초래하는 단점이 있다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 기존의 줄기세포 배양 배지를 대체할 수 있는 새로운 배지에 관하여 연구를 계속하던 중, 스피룰리나(spirulina)를 포함하는 배지에서 줄기세포의 배양 및 분화가 가능함을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

### 선행기술문헌

#### 특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 국내공개특허 제10-2013-0006123호

#### 비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Inamdar et al. journal of regenerative medicine & tissue engineering 2013

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 스피룰리나를 포함하는 줄기세포 배양 및 분화용 배지 조성물을 제공하는 것이다.

#### 과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 수행하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 스피룰리나를 포함하는 줄기세포 배양 및 분화용 배지 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명에서 용어, "스피룰리나(spirulina)"는 아프리카의 차드 호수 및 멕시코의 텍스코코 호수와 같은 열대지역 알칼리성 호수의 수면에서 왕성하게 자생하는 극히 작은 조류에 속하는 미생물이다. 스피룰리나의 세포는 다량의 클로로필과 피코시아닌의 색소를 포함하고 있어 청남색을 띠므로 남조류(blue-green algae)로 분류되기도 하였으나, 최근 남조류의 구조가 밝혀짐에 따라 스피룰리나를 청 남세 균류(blue-green bacteria)로 분류하고 있다.

[0012] 본 발명의 배지 조성물에 포함되는 스피룰리나는 분말 또는 추출물 형태로 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로, 스피룰리나의 건조분말을 효소, 초음파 및 고온고압 처리하여 파쇄한 뒤 원심분리된 액상의 추출물일 수 있다.

[0013] 최근 줄기세포의 배양에 사용되는 소태아혈청의 대체 배지에 대한 연구의 필요성이 지속적으로 대두됨에 따라 무혈청 배지에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 다만, 무혈청 배지의 경우 적용 세포주에 대한 제한성, 세

포배양의 어려움 및 고비용 등의 문제점이 해결되지 않아 연구에 적용하기 힘든 한계를 여전히 나타낸다. 본 발명자들은 연구가 전무한 해양 생물 소재를 활용해 무혈청 배지를 연구한 결과, 줄기세포 배양 및 분화 배지에 있어서 소태아혈청 대신 스피롤리나를 사용하였음에도 우수한 배양 및 분화 효과를 나타냄을 최초로 발견하고 본 발명을 완성하였다.

- [0014] 본 발명에서 용어, "줄기세포(stem cell)"는 적합한 환경 및 자극을 통해 각종 세포로 분화할 수 있는 능력을 갖추고 있으며, 자가 증식 능력을 갖추고 있는 세포로서, 성체줄기세포, 만능줄기세포, 유도만능줄기세포 또는 배아줄기세포일 수 있다.
- [0015] 본 발명에 있어서, 상기 줄기세포는 성체줄기세포일 수 있고, 구체적으로 본 발명의 배지 조성물에 의해 배양 및 분화가 촉진되는 줄기세포의 종류로는 치주인대줄기세포(periodontal ligament stem cell, PDLSC), 치수유래줄기세포(dental pulp stec cell, DPSC), 골수유래줄기세포(bone marrow-derived stem cell, BMSC) 및 지방유래줄기세포(adipose-derived stem cell, ADSC)를 포함하는 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있다. 보다 구체적으로 치주인대줄기세포 또는 지방유래줄기세포일 수 있다.
- [0016] 본 발명에서 용어, "치주인대줄기세포(periodontal ligament stem cell, PDLSC)"는 치아와 잇몸뼈 사이의 인대 조직에 존재하는 줄기세포로서, 치과교정술 목적으로 발치되는 소구치 또는 매복된 제3대구치의 발치 동안에 얻을 수 있는 중간엽 줄기세포의 한 유형이다. 상기 치주인대줄기세포는 특이적 환경 하에서 골형성, 백악질 형성, 지방생성, 연골형성, 신경형성 및 콜라겐-형성 세포로 분화될 수 있는 고증식성 세포이다.
- [0017] 본 발명에서 용어, "치수유래줄기세포(dental pulp stec cell, DPSC)"는 치아 내부의 중심부에 있는 연조직성 고유조직인 치수에 존재하는 줄기세포로서, 인간의 발치한 치아의 치수로부터 유래된 것일 수 있다.
- [0018] 본 발명에서 용어, "골수유래줄기세포(bone marrow-derived stem cell, BMSC)"는 적혈구, 백혈구, 혈소판과 같은 혈액세포를 만드는 조직 또는 기관인 골수로부터 유래된 줄기세포를 의미한다.
- [0019] 본 발명에서 용어, "지방유래줄기세포(adipose-derived stem cell, ADSC)"는 지방세포, 골모세포, 연골모세포, 근섬유모세포 등 대부분의 중간엽 세포로 분화할 수 있는 지방조직으로부터 분리된 줄기세포로서, 지방전구세포, 기질세포, 다분화능 지방 유래 세포(multipotent adipose-derived cells) 또는 지방유래성체줄기세포(adipose derived adult stem cells)와 동일 또는 동등한 의미로 사용될 수 있다.
- [0020] 본 발명에서 용어, "배지"는 인 비트로(in vitro)에서 줄기세포의 성장, 생존 및 분화를 지지할 수 있게 하는 배지를 의미하고, 해당분야에서 사용되는 줄기세포의 배양 및 분화에 적절한 통상의 배지를 모두 포함한다. 세포의 종류에 따라 해당분야의 기술적 수준에서 배지의 종류와 배양 조건을 선택할 수 있다. 배양에 사용되는 배지는 구체적으로 세포 배양 최소 배지(cell culture minimum medium, CCMM)로, 일반적으로 탄소원, 질소원 및 미량원소 농분을 포함한다. 상기 세포 배양 최소 배지에는 예를 들어, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI1640, F-10, F-12,  $\alpha$ -MEM( $\alpha$ -Minimal essential Medium), GMEM(Glasgow's Minimal essential Medium), Iscove's Modified Dulbecco's Medium 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 배지는 페니실린(penicillin), 스트렙토마이신(streptomycin), 겐타마이신(gentamicin) 또는 이들의 2 이상의 혼합물 등의 항생제를 포함할 수 있다.
- [0021] 스피롤리나를 이용하여 줄기세포의 배양 및 분화를 가능하게 하고자 하는 본 발명의 목적상, 배지의 종류와 배양 방식에 특별히 제한 없이, 줄기세포 배지에 스피롤리나를 포함하여 사용할 수 있다. 이 때, 스피롤리나를 단독으로 사용하거나 기존에 알려진 하나 이상의 배양 및 분화 유도 물질과 함께 사용하는 등 다양한 응용이 가능하다.
- [0022] 본 발명에 있어서, 본 발명의 배지 조성물은 줄기세포의 계대배양이 가능하다.
- [0023] 본 발명에서 용어, "계대"는 세포, 구체적으로 줄기세포를 건강한 상태로 지속적으로 장기간 배양하기 위해 세포의 대를 계속 이어서 배양하는 방법에서, 배양용기를 교체하는 것 또는 세포군을 나누어 배양하는 것을 의미한다. 한 차례 배양용기 교체 또는 세포군을 나누어 배양하는 것을 1 계대라고 한다. 본 발명에서 상기 계대는 세대와 혼용되어 사용될 수 있다.
- [0024] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명의 배지 조성물을 사용시 치주인대줄기세포, 치수유래줄기세포, 골수유래줄기세포 및 지방유래줄기세포를 1세대부터 10세대, 즉 1계대부터 10계대까지 정상적인 배양 및 분화가 가능함을 확인하였다.

- [0025] 본 발명에 있어서, 본 발명의 배지 조성물은 줄기세포의 분화능을 촉진할 수 있다.
- [0026] 본 발명에서 용어, "분화능"은 줄기세포가 지방세포, 골모세포, 연골모세포, 근섬유모세포, 근육 세포 또는 신경 세포 등으로 세포의 구조나 기능이 특수화될 수 있는 능력으로서, 본 발명에서의 분화능은 줄기세포의 골분화능일 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 배지 조성물은 줄기세포의 알칼리포스파타제(alkaline phosphatase, ALP)의 활성을 촉진할 수 있다.
- [0027] 본 발명에서 용어, "알칼리포스파타제(alkaline phosphatase, ALP)"는 석회화의 지표로 사용되는 유기인산에스테르에서 무기인산을 방출하는 효소를 의미한다.
- [0028] 상기 골분화능을 촉진하기 위한 배지 조성물은  $\beta$ -글리세로포스페이트, 텍사메타손 및 아스코르브산을 포함하는 골형성 유도물질 군에서 선택된 어느 하나 이상을 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0029] 본 발명에 있어서, 상기 배지 조성물은 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 추가로 포함할 수 있다. 상기 배지 조성물에 포함되는 소태아혈청과 스피롤리나의 중량비(소태아혈청:스피롤리나)는 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9 또는 0:10 일 수 있다. 구체적으로, 소태아혈청과 스피롤리나의 중량비(소태아혈청:스피롤리나)는 9:1 내지 4:6일 수 있고, 보다 구체적으로 9:1일 수 있다.
- [0030] 일 예로, 치주인대줄기세포의 배양 및 분화를 위한 배지 조성물의 소태아혈청과 스피롤리나의 중량비(소태아혈청:스피롤리나)는 9:1 내지 3:7일 수 있고, 구체적으로 9:1 내지 7:3일 수 있다.
- [0031] 일 예로, 치수유래줄기세포의 배양 및 분화를 위한 배지 조성물의 소태아혈청과 스피롤리나의 중량비(소태아혈청:스피롤리나)는 9:1 내지 3:7일 수 있고, 구체적으로 9:1 내지 6:4일 수 있다.
- [0032] 일 예로, 골수유래줄기세포의 배양 및 분화를 위한 배지 조성물의 소태아혈청과 스피롤리나의 중량비(소태아혈청:스피롤리나)는 9:1 내지 2:8일 수 있고, 구체적으로 9:1일 수 있다.
- [0033] 일 예로, 지방유래줄기세포의 배양 및 분화를 위한 배지 조성물의 소태아혈청과 스피롤리나의 중량비(소태아혈청:스피롤리나)는 9:1 내지 4:6일 수 있고, 구체적으로 9:1 내지 7:3일 수 있다.

**발명의 효과**

- [0034] 본 발명의 스피롤리나를 포함하는 배지 조성물은 줄기세포 배양 및 분화가 가능하다. 따라서, 본 발명의 배지 조성물은 소태아혈청을 대신할 수 있는 줄기세포 배양 및 분화용 배지로 사용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0035] 도 1은 스피롤리나 동물 세포 배양액(SACCS)의 대체 비율에 따른 치주인대줄기세포(PDLSC)의 10세대까지의 세포 생존율을 측정한 그래프이다.
- 도 2는 스피롤리나 동물 세포 배양액(SACCS)의 대체 비율에 따른 치수유래줄기세포(DPSC)의 10세대까지의 세포 생존율을 측정한 그래프이다.
- 도 3은 스피롤리나 동물 세포 배양액(SACCS)의 대체 비율에 따른 골수유래줄기세포(BMSC)의 10세대까지의 세포 생존율을 측정한 그래프이다.
- 도 4는 스피롤리나 동물 세포 배양액(SACCS)의 대체 비율에 따른 지방유래줄기세포(ADSC)의 10세대까지의 세포 생존율을 측정한 그래프이다.
- 도 5는 스피롤리나 동물 세포 배양액(SACCS)의 대체 비율에 따른 치주인대줄기세포(PDLSC)의 10세대까지의 표현형을 나타낸 도이다.
- 도 6는 스피롤리나 동물 세포 배양액(SACCS)의 대체 비율에 따른 치수유래줄기세포(DPSC)의 10세대까지의 표현형을 나타낸 도이다.
- 도 7은 스피롤리나 동물 세포 배양액(SACCS)의 대체 비율에 따른 골수유래줄기세포(BMSC)의 10세대까지의 표현형을 나타낸 도이다.
- 도 8은 스피롤리나 동물 세포 배양액(SACCS)의 대체 비율에 따른 지방유래줄기세포(ADSC)의 10세대까지의 표현형을 나타낸 도이다.

도 9는 골 분화 유도 물질을 포함하는 스피롤리나 동물 세포 배양액(SACCS)의 대체 비율에 따른 치주인대줄기 세포(PDLSC)의 1세대, 5세대 및 10세대에서의 세포 생존율을 측정한 그래프이다.

도 10은 골 분화 유도 물질을 포함하는 스피롤리나 동물 세포 배양액(SACCS)의 대체 비율에 따른 치수유래줄기 세포(DPSC)의 1세대, 5세대 및 10세대에서의 세포 생존율을 측정한 그래프이다.

도 11은 골 분화 유도 물질을 포함하는 스피롤리나 동물 세포 배양액(SACCS)의 대체 비율에 따른 골수유래줄기 세포(BMSC)의 1세대, 5세대 및 10세대에서의 세포 생존율을 측정한 그래프이다.

도 12는 골 분화 유도 물질을 포함하는 스피롤리나 동물 세포 배양액(SACCS)의 대체 비율에 따른 지방유래줄기 세포(ADSC)의 1세대, 5세대 및 10세대에서의 세포 생존율을 측정한 그래프이다.

도 13은 골 분화 유도 물질을 포함하는 스피롤리나 동물 세포 배양액(SACCS)의 대체 비율에 따른 치주인대줄기 세포(PDLSC)의 1세대, 5세대 및 10세대에서의 알칼리포스파타제(alkaline phosphatase, ALP)의 활성을 측정한 그래프이다.

도 14는 골 분화 유도 물질을 포함하는 스피롤리나 동물 세포 배양액(SACCS)의 대체 비율에 따른 치수유래줄기 세포(DPSC)의 1세대, 5세대 및 10세대에서의 알칼리포스파타제(alkaline phosphatase, ALP)의 활성을 측정한 그래프이다.

도 15는 골 분화 유도 물질을 포함하는 스피롤리나 동물 세포 배양액(SACCS)의 대체 비율에 따른 골수유래줄기 세포(BMSC)의 1세대, 5세대 및 10세대에서의 알칼리포스파타제(alkaline phosphatase, ALP)의 활성을 측정한 그래프이다.

도 16은 골 분화 유도 물질을 포함하는 스피롤리나 동물 세포 배양액(SACCS)의 대체 비율에 따른 지방유래줄기 세포(ADSC)의 1세대, 5세대 및 10세대에서의 알칼리포스파타제(alkaline phosphatase, ALP)의 활성을 측정한 그래프이다.

도 17은 골 분화 유도 물질을 포함하는 스피롤리나 동물 세포 배양액(SACCS)의 대체 비율에 따른 치주인대줄기 세포(PDLSC)의 1세대, 5세대 및 10세대에서의 석회화 정도를 비교한 그래프이다.

도 18은 골 분화 유도 물질을 포함하는 스피롤리나 동물 세포 배양액(SACCS)의 대체 비율에 따른 치주인대줄기 세포(PDLSC)의 1세대, 5세대 및 10세대에서의 석회화가 일어난 줄기세포를 표시한 도이다.

도 19는 골 분화 유도 물질을 포함하는 스피롤리나 동물 세포 배양액(SACCS)의 대체 비율에 따른 치수유래줄기 세포(DPSC)의 1세대, 5세대 및 10세대에서의 석회화 정도를 비교한 그래프이다.

도 20은 골 분화 유도 물질을 포함하는 스피롤리나 동물 세포 배양액(SACCS)의 대체 비율에 따른 치수유래줄기 세포(DPSC)의 1세대, 5세대 및 10세대에서의 석회화가 일어난 줄기세포를 표시한 도이다.

도 21은 골 분화 유도 물질을 포함하는 스피롤리나 동물 세포 배양액(SACCS)의 대체 비율에 따른 골수유래줄기 세포(BMSC)의 1세대, 5세대 및 10세대에서의 석회화 정도를 비교한 그래프이다.

도 22는 골 분화 유도 물질을 포함하는 스피롤리나 동물 세포 배양액(SACCS)의 대체 비율에 따른 골수유래줄기 세포(BMSC)의 1세대, 5세대 및 10세대에서의 석회화가 일어난 줄기세포를 표시한 도이다.

도 23은 골 분화 유도 물질을 포함하는 스피롤리나 동물 세포 배양액(SACCS)의 대체 비율에 따른 지방유래줄기 세포(ADSC)의 1세대, 5세대 및 10세대에서의 석회화 정도를 비교한 그래프이다.

도 24는 골 분화 유도 물질을 포함하는 스피롤리나 동물 세포 배양액(SACCS)의 대체 비율에 따른 지방유래줄기 세포(ADSC)의 1세대, 5세대 및 10세대에서의 석회화가 일어난 줄기세포를 표시한 도이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0036] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 이에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0037] **실시예 1: 줄기세포 생존율**

[0038] 줄기세포 배양배지에 있어서 대표적인 배지 조성인 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)의 대체 가능 여부를 확인하기 위하여, 스피롤리나를 포함하는 스피롤리나 동물 세포 배양액(spirulina animal cell culture

solution, SACCs)이 포함된 배지에 줄기세포를 배양하여 세대별 세포생존율을 측정하였다. 상기 스피롤리나 동물 세포 배양액은 한국해양과학기술원으로부터 공급받았다. 상기 SACCs에 포함된 스피롤리나 추출물은 스피롤리나의 건조분말을 효소, 초음파 및 고농고압 처리하여 파쇄한 뒤, 원심분리하여 제조하였다.

[0039] 세포생존율 실험에는 주식회사 세포바이오에서 구입한 치주인대줄기세포(periodontal ligament stem cell, PDLSC) 및 론자(Lonza)에서 구입한 치수유래줄기세포(dental pulp stec cell, DPSC), 골수유래줄기세포(bone marrow-derived stem cell, BMSC) 및 지방유래줄기세포(adipose-derived stem cell, ADSC)를 사용하였다.

[0040] FBS 배지에 SACCs의 대체 비율을 달리하여 줄기세포 배양 배지를 제조하였다. 구체적으로, α-MEM 배양액(10%의 FBS:SACCs, 1% 페니실린 및 스트렙토마이신)에 FBS:SACCs의 비율을 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9 및 0:10으로 달린 배지를 준비하였다. 상기 4종의 줄기세포를 96-웰에 웰당 3X10<sup>3</sup> 세포/웰씩 분취하였다. 48시간 후 배양액을 완전히 제거한 다음 10% cell counting kit-8(CCK-8) 시약을 포함한 α-MEM 배양액을 처리하여 1시간 동안 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기에서 배양하였다. 그 후, 450 nm에서 세포 생존율을 측정하였다. 측정 결과는 다음과 같다:

[0041] <치주인대줄기세포(PDLSC)>

[0042] 치주인대줄기세포의 세대별 세포 생존율 측정 결과, 대조군(FBS:SACCs=10:0, F10:S0) 대비 1세대(#1)에서는 모든 비율에서 대체가 가능하고, 2 내지 4세대까지는 F1:S9의 비율, 5세대에서는 F4:S6의 비율, 6세대에서는 F3:S7의 비율, 7 내지 9세대에서는 F6:S4의 비율 및 10세대에서는 F7:S3의 비율까지 대체가 가능한 것을 확인하였다(도 1 및 표 1).

표 1

[0043]

PDLSC	F10:S0	F9:S1	F8:S2	F7:S3	F6:S4	F5:S5	F4:S6	F3:S7	F2:S8	F1:S9	F0:S10
#1	100	108.6	111.7	113.5	105.8	106.2	111.8	116.6	115.5	117.0	101.7
#2		115.1	118.2	100.4	143.3	139.3	119.1	135.3	123.0	108.4	68.2
#3		110.0	144.6	159.7	127.7	153.1	139.9	136.0	147.9	132.4	68.1
#4		103.4	104.8	117.9	116.3	107.5	107.1	102.9	99.2	97.7	79.7
#5		110.3	102.9	124.8	104.1	107.5	106.7	92.9	85.8	85.8	56.3
#6		114.7	104.4	113.0	111.6	101.5	106.0	106.7	91.8	82.5	47.3
#7		98.3	124.8	119.3	125.3	123.5	105.7	98.0	91.2	84.7	X
#8		106.1	106.0	119.5	114.1	104.6	99.5	97.9	94.9	89.4	X
#9		111.5	112.5	111.0	115.7	99.2	97.6	86.5	78.4	76.7	X
#10		109.6	100.2	108.0	86.4	83.1	82.6	83.2	63.5	60.2	X

[0044] <치수유래줄기세포(DPSC)>

[0045] 치수유래줄기세포의 세대별 세포 생존율 측정 결과, 대조군(FBS:SACCs=10:0, F10:S0) 대비 1세대(#1)에서는 F2:S8의 비율까지 대체가 가능하고, 2세대에서는 F5:S5의 비율, 3 내지 8세대에서는 F4:S6의 비율 및 9 내지 10세대에서는 F6:S4의 비율까지 대체가 가능한 것을 확인하였다(도 2 및 표 2).

표 2

[0046]

DPSC	F10:S0	F9:S1	F8:S2	F7:S3	F6:S4	F5:S5	F4:S6	F3:S7	F2:S8	F1:S9	F0:S10
#1	100	96.8	99.6	104.1	97.8	101.9	103.1	100.8	101.5	96.7	83.9
#2		103.0	115.1	106.9	115.8	107.7	89.2	82.2	81.8	89.4	83.9
#3		109.8	93.7	90.2	107.0	88.5	112.3	89.4	86.5	89.2	74.3
#4		102.7	117.7	98.7	97.2	117.5	113.6	84.4	79.0	76.0	68.7
#5		112.6	102.4	104.1	104.7	106.0	105.7	92.4	89.0	87.0	74.0
#6		107.4	112.4	113.4	108.7	111.0	122.0	90.3	83.0	67.7	60.3
#7		104.8	103.5	104.2	100.5	96.7	98.4	93.2	88.9	65.2	X
#8		104.4	113.2	114.4	103.7	102.0	100.6	96.6	84.2	X	X
#9		107.0	101.0	104.0	98.7	94.0	89.4	75.7	69.4	X	X
#10		118.2	110.1	107.1	105.2	95.5	88.5	84.0	62.3	X	X

[0047] <골수유래줄기세포(BMSC)>

[0048] 골수유래줄기세포의 세대별 세포 생존율 측정 결과, 대조군(FBS:SACCS=10:0, F10:S0) 대비 1세대(#1) 내지 3세대에서는 F2:S8의 비율까지 대체가 가능하고, 4 내지 7세대에서는 F7:S3의 비율, 8세대에서는 F8:S2의 비율 및 9 내지 10세대에서는 F9:S1의 비율까지 대체가 가능한 것을 확인하였다(도 3 및 표 3).

표 3

[0049]

BMSC	F10:S0	F9:S1	F8:S2	F7:S3	F6:S4	F5:S5	F4:S6	F3:S7	F2:S8	F1:S9	F0:S10
#1	100	98.6	101.0	100.4	99.9	97.8	96.1	94.3	92.3	85.1	75.7
#2		113.7	111.6	108.2	105.0	112.9	111.7	113.8	108.1	94.7	81.8
#3		105.3	101.0	101.4	88.8	80.7	101.3	102.0	97.3	80.9	X
#4		93.1	87.7	87.3	71.5	63.2	76.7	76.7	67.2	59.3	X
#5		105.5	102.8	105.2	88.6	89.2	81.3	75.4	71.0	65.5	X
#6		95.8	101.5	97.8	64.7	53.7	57.1	52.0	47.7	47.9	X
#7		104.3	107.4	98.9	65.7	52.0	55.4	50.7	49.2	47.2	X
#8		117.7	105.0	92.5	X	X	X	X	X	X	X
#9		99.6	76.7	68.5	X	X	X	X	X	X	X
#10		100.3	79.9	83.0	X	X	X	X	X	X	X

[0050] <지방유래줄기세포(ADSC)>

[0051] 지방유래줄기세포의 세대별 세포 생존율 측정 결과, 대조군(FBS:SACCS=10:0, F10:S0) 대비 1세대(#1)에서는 F4:S6의 비율까지 대체가 가능하고, 2 내지 3세대에서는 F3:S7의 비율, 4세대에서는 F4:S6의 비율, 5세대에서는 F8:S2의 비율, 6세대에서는 F5:S5의 비율 및 7 내지 10세대에서는 F7:S3의 비율까지 대체가 가능한 것을 확인하였다(도 4 및 표 4).

표 4

[0052]

ADSC	F10:S0	F9:S1	F8:S2	F7:S3	F6:S4	F5:S5	F4:S6	F3:S7	F2:S8	F1:S9	F0:S10
#1	100	96.3	95.7	99.1	96.4	95.0	95.0	92.9	89.1	84.6	74.1
#2		87.7	84.3	81.9	74.2	73.3	83.5	87.1	78.4	67.2	62.7
#3		102.6	126.0	100.5	97.9	98.5	109.4	100.5	97.6	88.6	79.2
#4		94.5	97.2	97.4	84.6	82.6	94.2	83.2	83.0	79.2	72.4
#5		99.9	105.3	73.0	61.6	60.3	59.3	58.8	55.7	49.1	X
#6		107.1	113.6	102.7	98.3	98.3	80.5	81.2	86.6	59.5	X
#7		101.4	111.7	110.6	96.4	91.8	94.9	85.3	63.9	55.9	X
#8		107.5	104.9	97.9	90.0	90.8	90.9	84.6	X	X	X
#9		101.3	102.8	96.3	95.2	94.3	92.6	93.9	X	X	X
#10		103.9	102.9	104.5	103.4	96.4	95.1	92.2	X	X	X

[0053] 실시예 2: 줄기세포의 형태학적 표현형 관찰

[0054] 상기 실시예 1의 줄기세포 생존율 측정 전 현미경을 이용하여 형태학적 표현형을 관찰 및 촬영(original magnification X100) 하였으며, 그 결과는 다음과 같다:

[0055] <치주인대줄기세포(PDLSC)>

[0056] 치주인대줄기세포의 세대별 형태학적 표현형을 관찰한 결과, 1세대(#1)에서는 모든 비율에서 방추체 모양의 세포형태가 나타나 모든 비율에서 대체가 가능하고, 2 내지 4세대에서는 F1:S9의 비율, 5세대에서는 F4:S6의 비율, 6세대에서는 F3:S7의 비율, 7 내지 9세대에서는 F6:S4의 비율 및 10세대에서는 F7:S3의 비율까지 대체가 가능한 것을 확인하였다(도 5). 한편, F0:S10의 경우 5세대부터 모든 치주인대줄기세포가 방추체 모양의 세포형태에서 원형으로 변화되어 대체가 불가능한 것으로 보였다. 결과적으로, 치주인대줄기세포는 세포 생존율과 동일하게 대조군 대비 30%까지 SACCS로 대체 가능함을 확인하였다.

[0057] <치수유래줄기세포(DPSC)>

[0058] 치수유래줄기세포의 세대별 형태학적 표현형을 관찰한 결과, 1세대(#1)에서는 F10:S10 내지 F2:S8 비율에서 방

추체 모양의 세포형태가 나타나 F2:S8의 비율까지 대체가 가능하고, 2세대에서는 F5:S5의 비율, 3 내지 5세대에서는 F4:S6의 비율, 6 내지 8세대에서는 F4:S6의 비율 및 9 내지 10세대에서는 F6:S4의 비율까지 대체가 가능한 것을 확인하였다(도 6). 한편, F0:S10의 경우 6세대부터 모든 치주인대줄기세포가 방추체 모양의 세포형태에서 원형으로 변화되어 대체가 불가능한 것으로 보였다. 결과적으로, 치주인대줄기세포는 세포 생존율과 동일하게 대조군 대비 40%까지 SACCs로 대체 가능함을 확인하였다.

[0059] <골수유래줄기세포(BMSC)>

[0060] 골수유래줄기세포의 세대별 형태학적 표현형을 관찰한 결과, 1세대(#1) 내지 3세대에서는 F10:S10 내지 F2:S8 비율에서 방추체 모양의 세포형태가 나타나 F2:S8의 비율까지 대체가 가능하고, 4 내지 7세대에서는 F7:S3의 비율, 8세대에서는 F8:S2의 비율 및 9 내지 10세대에서는 F9:S1의 비율까지 대체가 가능한 것을 확인하였다(도 7). 한편, F0:S10의 경우 2세대부터 모든 치주인대줄기세포가 방추체 모양의 세포형태에서 원형으로 변화되어 대체가 불가능한 것으로 보였다. 결과적으로, 골수유래줄기세포는 세포 생존율과 동일하게 대조군 대비 10%까지 SACCs로 대체 가능함을 확인하였다.

[0061] <지방유래줄기세포(ADSC)>

[0062] 지방유래줄기세포의 세대별 형태학적 표현형을 관찰한 결과, 1세대(#1)에서는 F10:S10 내지 F4:S6 비율에서 방추체 모양의 세포형태가 나타나 F4:S6의 비율까지 대체가 가능하고, 2 내지 3세대에서는 F3:S7의 비율, 4세대에서는 F4:S6의 비율, 5세대에서는 F8:S2의 비율, 6세대에서는 F5:S5의 비율 및 7 내지 10세대에서는 F7:S3의 비율까지 대체가 가능한 것을 확인하였다(도 8). 한편, F0:S10의 경우 3세대부터 모든 치주인대줄기세포가 방추체 모양의 세포형태에서 원형으로 변화되어 대체가 불가능한 것으로 보였다. 결과적으로, 지방수유래줄기세포는 세포 생존율과 동일하게 대조군 대비 30%까지 SACCs로 대체 가능함을 확인하였다.

[0063] 실시예 3: 줄기세포의 골분화능 유지

[0064] 실시예 3-1: 분화 배지에서의 줄기세포 생존율

[0065] 줄기세포의 분화를 위한 분화배지에 있어서, 대표적인 배지 조성인 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)의 대체 가능 여부를 확인하기 위하여, 줄기세포의 배양 후 분화배지를 처리하여 각 세대별로 세포 생존율을 측정하였다.

[0066] 구체적으로,  $\alpha$ -MEM 배양액(10%의 FBS:SACCs, 1% 페니실린 및 스트렙토마이신)에 FBS:SACCs의 비율을 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9 및 0:10으로 달리한 배지를 준비하였다. 치주인대줄기세포(periodontal ligament stem cell, PDLSC), 치수유래줄기세포(dental pulp stem cell, DPSC), 골수유래줄기세포(bone marrow-derived stem cell, BMSC) 및 지방유래줄기세포(adipose-derived stem cell, ADSC)의 줄기세포를 96-웰에 웰당  $3 \times 10^3$  세포/웰씩 분주하였다. 48시간 후 세포의 부착을 확인하고,  $\alpha$ -MEM 배양액(5%의 FBS:SACCs, 1% 페니실린 및 스트렙토마이신, 골 분화 유도 물질: 50  $\mu$ g/ml 아스코르브산, 1  $\mu$ M 텍사메타손, 및 3 mM  $\beta$ -글리세로포스페이트)을 포함하는 분화 배지를 처리하였다. 48시간 후 분화 배지를 완전히 제거한 다음 10% cell counting kit-8(CCK-8) 시약을 포함한  $\alpha$ -MEM 배양액을 처리하여 1시간 동안 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기에서 배양하였다. 그 후, 450 nm에서 세포 생존율을 측정하였다. 측정 결과는 다음과 같다:

[0067] <치주인대줄기세포(PDLSC)>

[0068] 분화 배지 처리시 치주인대줄기세포의 세대별 세포 생존율 측정 결과, 대조군(FBS:SACCs=10:0, F10:S0) 대비 1세대(#1)에서는 F3:S7의 비율까지 대체가 가능하고, 10세대에서는 F7:S3의 비율까지 대체가 가능한 것을 확인하였다(도 9). 결과적으로 대조군 대비 30%까지 SACCs로 대체 가능함을 확인하였다.

[0069] <치수유래줄기세포(DPSC)>

[0070] 분화 배지 처리시 치수유래줄기세포의 세대별 세포 생존율 측정 결과, 대조군(FBS:SACCs=10:0, F10:S0) 대비 1세대(#1)에서는 F4:S6의 비율까지 대체가 가능하고, 10세대에서는 F7:S3의 비율까지 대체가 가능한 것을 확인하였다(도 10). 결과적으로 대조군 대비 30%까지 SACCs로 대체 가능함을 확인하였다.

[0071] <골수유래줄기세포(BMSC)>

[0072] 분화 배지 처리시 골수유래줄기세포의 세대별 세포 생존율 측정 결과, 대조군(FBS:SACCs=10:0, F10:S0) 대비 1세대(#1)에서는 F8:S2의 비율까지 대체가 가능하고, 10세대에서는 F9:S1의 비율까지 대체가 가능한 것을 확인하

였다(도 11). 결과적으로 대조군 대비 10%까지 SACCs로 대체 가능함을 확인하였다.

[0073] <지방유래줄기세포(ADSC)>

[0074] 분화 배지 처리시 지방유래줄기세포의 세대별 세포 생존율 측정 결과, 대조군(FBS:SACCs=10:0, F10:S0) 대비 1세대(#1)에서는 F5:S5의 비율까지 대체가 가능하고, 10세대에서는 F7:S3의 비율까지 대체가 가능한 것을 확인하였다(도 12). 결과적으로 대조군 대비 10%까지 SACCs로 대체 가능함을 확인하였다.

[0075] 실시예 3-2: 골분화 관련 효소 활성

[0076] 알칼리성 인산가수분해효소, 즉 알칼리포스파타제(alkaline phosphatase, ALP)는 유기인산에스테르에서 무기인산을 방출하는 효소로 석회화의 지표로 알려져 있다. 따라서, 치주인대줄기세포(periodontal ligament stem cell, PDLSC), 치수유래줄기세포(dental pulp stem cell, DPSC), 골수유래줄기세포(bone marrow-derived stem cell, BMSC) 및 지방유래줄기세포(adipose-derived stem cell, ADSC)에서의 골분화 및 석회화 유도 효과를 확인하기 위해 알칼리성 인산가수분해효소의 활성 수준을 확인하였다.

[0077] 구체적으로,  $\alpha$ -MEM 배양액(10%의 FBS:SACCs, 1% 페니실린 및 스트렙토마이신)에 FBS:SACCs의 비율을 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9 및 0:10으로 달리한 배지를 준비하였다. 상기 4종의 줄기세포를 96-웰에 웰당  $3 \times 10^3$  세포/웰씩 분취하였다. 48시간 후 80%의 세포밀도에 도달하였을 때,  $\alpha$ -MEM 배양액(5%의 FBS:SACCs, 1% 페니실린 및 스트렙토마이신, 골 분화 유도 물질: 50  $\mu$ g/ml 아스코르브산, 1  $\mu$ M 텍사메타손, 및 3 mM  $\beta$ -글리세로포스페이트)으로 배지를 교환하였다. 7일 동안 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기에서 배양한 뒤, 1X RIPA 버퍼를 이용하여 세포를 파쇄시켰다. 13,000 rpm으로 10분간 원심분리기(centrifuge)로 돌려 단백질 상등액을 취하였다. 50  $\mu$ L의 상등액에 200  $\mu$ L의 pNP 용액(Sigma)을 넣어 30분간 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기에서 반응시킨 후 450 nm에서 알칼리성 인산가수분해효소의 활성 수준을 측정하였다. 측정 결과는 다음과 같다:

[0078] <치주인대줄기세포(PDLSC)>

[0079] 치주인대줄기세포의 세대별 최종 골분화 효소의 활성을 측정한 결과, 1세대(#1)에서는 대조군(FBS:SACCs=10:0, F10:S0) 대비 F3:S7의 비율까지 33% 이상의 활성 증가를 나타내고, 10세대에서는 F7:S3의 비율까지 12% 이상의 활성 증가를 나타냄을 확인하였다(도 13). 결과적으로 대조군 대비 30%까지 SACCs로 대체가 가능함을 확인하였다.

[0080] <치수유래줄기세포(DPSC)>

[0081] 치수유래줄기세포의 세대별 최종 골분화 효소의 활성을 측정한 결과, 1세대(#1)에서는 대조군(FBS:SACCs=10:0, F10:S0) 대비 F7:S3의 비율까지 11% 이상의 활성 증가를 나타내고, 10세대에서는 F8:S2의 비율까지 13% 이상의 활성 증가를 나타냄을 확인하였다(도 14). 결과적으로 대조군 대비 20%까지 SACCs로 대체가 가능함을 확인하였다.

[0082] <골수유래줄기세포(BMSC)>

[0083] 골수유래줄기세포의 세대별 최종 골분화 효소의 활성을 측정한 결과, 1세대(#1)에서는 대조군(FBS:SACCs=10:0, F10:S0) 대비 F8:S2의 비율까지 18% 이상의 활성 증가를 나타내고, 10세대에서는 F9:S1의 비율까지 40% 이상의 활성 증가를 나타냄을 확인하였다(도 15). 결과적으로 대조군 대비 10%까지 SACCs로 대체가 가능함을 확인하였다.

[0084] <지방유래줄기세포(ADSC)>

[0085] 지방유래줄기세포의 세대별 최종 골분화 효소의 활성을 측정한 결과, 1세대(#1)와 10세대에서 모두 대조군(FBS:SACCs=10:0, F10:S0) 대비 F7:S3의 비율까지 18% 이상의 활성 증가를 나타냄을 확인하였다(도 16). 결과적으로 대조군 대비 30%까지 SACCs로 대체가 가능함을 확인하였다.

[0086] 실시예 3-3: 칼슘 결절(calcium nodule) 형성 확인

[0087] 줄기세포의 증식 후 골세포로의 분화가 이루어지면 칼슘 결절(calcium module)이 형성되는 것으로 알려져 있다. 따라서, SACCs 배양액으로 배양시 치주인대줄기세포(periodontal ligament stem cell, PDLSC), 치수유래줄기세포(dental pulp stem cell, DPSC), 골수유래줄기세포(bone marrow-derived stem cell, BMSC) 및 지방유래줄기

세포(adipose-derived stem cell, ADSC)의 골분화능을 확인하기 위해 칼슘 결절의 수준을 확인하였다.

[0088] 구체적으로, α-MEM 배양액(10%의 FBS:SACCS, 1% 페니실린 및 스트렙토마이신)에 FBS:SACCS의 비율을 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9 및 0:10으로 달리한 배지를 준비하였다. 치주인대줄기세포(periodontal ligament stem cell, PDLSC), 치수유래줄기세포(dental pulp stec cell, DPSC), 골수유래줄기세포(bone marrow-derived stem cell, BMSC) 및 지방유래줄기세포(adipose-derived stem cell, ADSC)의 줄기세포를 6-웰에 웰당 2.5X10<sup>4</sup> 세포/웰씩 분취하였다. 48시간 후 60%의 세포밀도에 도달하였을 때, α-MEM 배양액(5%의 FBS:SACCS, 1% 페니실린 및 스트렙토마이신, 골 분화 유도 물질: 50 μg/ml 아스코르브산, 1 μM 텍사메타손, 및 3 mM β-글리세로포스페이트)으로 배지를 교환하였다. 14일 동안 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기에서 배양한 뒤, 알리자린 레드 용액(Alizarin red solution)으로 염색하여 현미경으로 석회화(calcificatio n)을 확인하였다. 측정 결과는 다음과 같다:

[0089] <치주인대줄기세포(PDLSC)>

[0090] 치주인대줄기세포의 세대별 석회화를 측정한 결과, 1세대(#1)에서는 대조군(FBS:SACCS=10:0, F10:S0) 대비 F5:S5의 비율까지 35% 이상의 석회화 증가를 나타냄을 확인하였고, 10세대에서는 F7:S3의 비율까지 18% 이상의 석회화 증가를 나타냄을 확인하였다(도 17 및 18).

[0091] <치수유래줄기세포(DPSC)>

[0092] 치수유래줄기세포의 세대별 석회화를 측정한 결과, 1세대(#1)에서는 대조군(FBS:SACCS=10:0, F10:S0) 대비 F7:S3의 비율까지 15% 이상의 석회화 증가를 나타냄을 확인하였고, 10세대에서는 F8:S2의 비율까지 7% 이상의 활성 석회화 나타냄을 확인하였다(도 19 및 20).

[0093] <골수유래줄기세포(BMSC)>

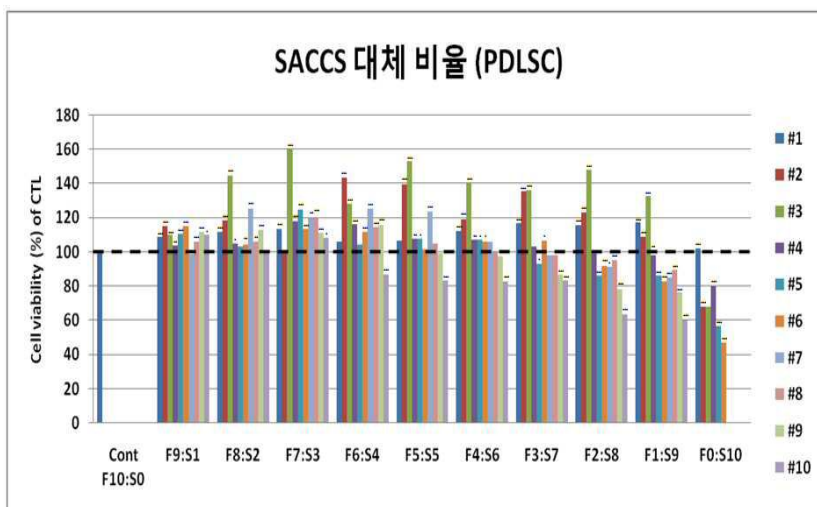
[0094] 골수유래줄기세포의 세대별 석회화를 측정한 결과, 1세대(#1)에서는 대조군(FBS:SACCS=10:0, F10:S0) 대비 F8:S2의 비율까지 4% 이상의 석회화 증가를 나타냄을 확인하였고, 10세대에서는 F9:S1의 비율까지 24% 이상의 석회화 증가를 나타냄을 확인하였다(도 21 및 22).

[0095] <지방유래줄기세포(ADSC)>

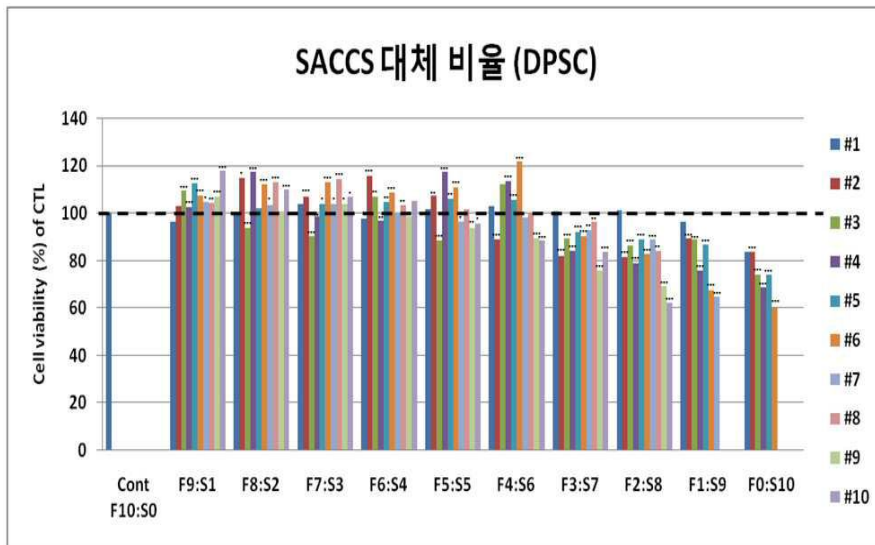
[0096] 지방유래줄기세포의 세대별 석회화를 측정한 결과, 1세대(#1)에서는 대조군(FBS:SACCS=10:0, F10:S0) 대비 F7:S3의 비율까지 20% 이상의 석회화 증가를 나타냄을 확인하였고, 10세대에서는 F7:S3의 비율까지 15% 이상의 석회화 증가를 나타냄을 확인하였다(도 23 및 24).

도면

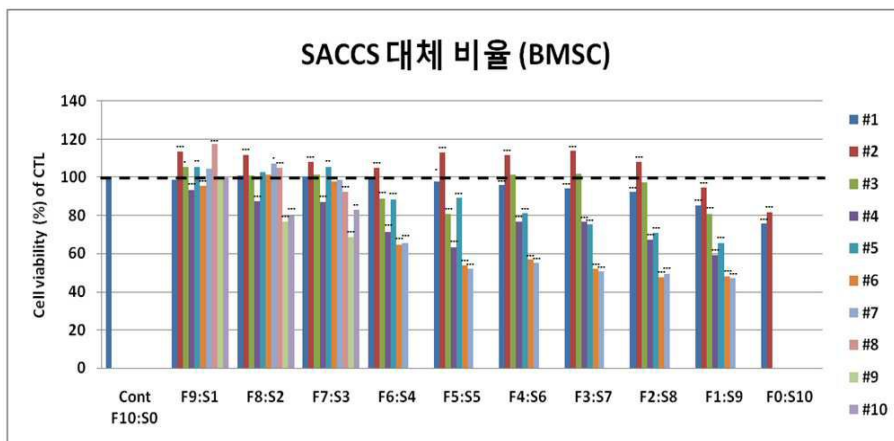
도면1



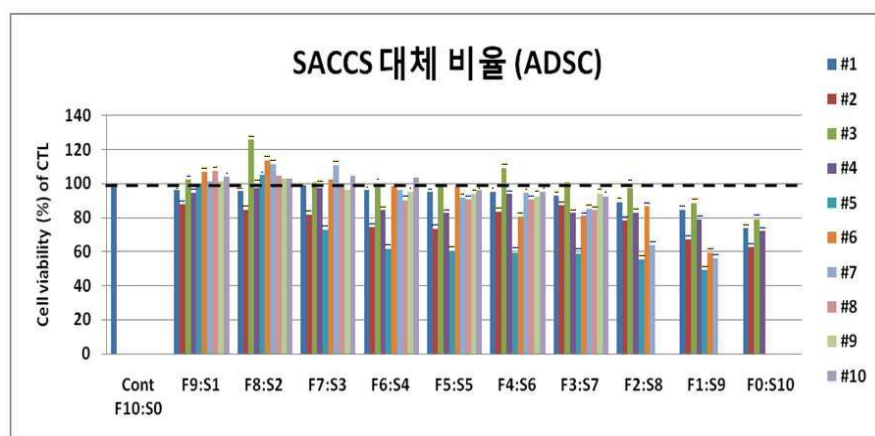
도면2



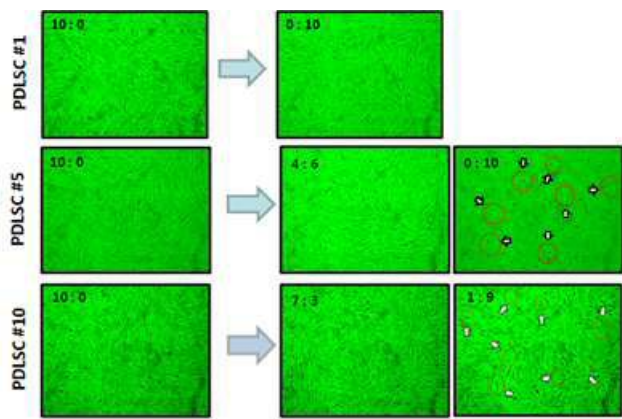
도면3



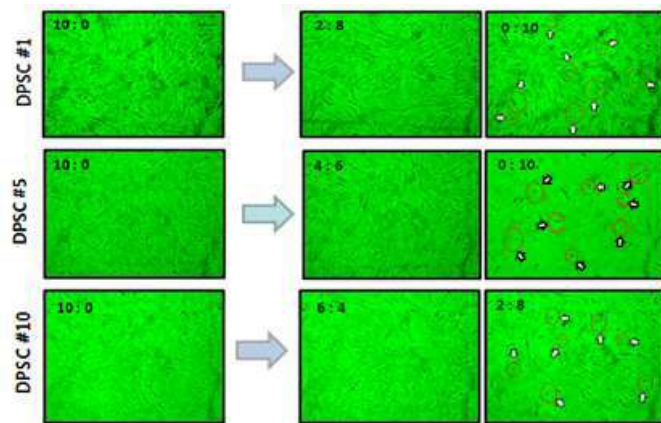
도면4



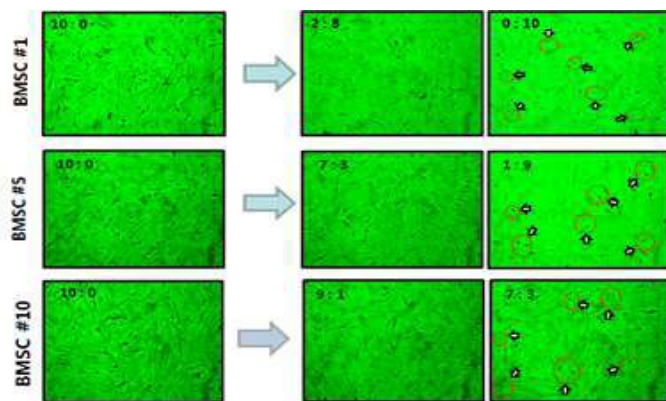
도면5



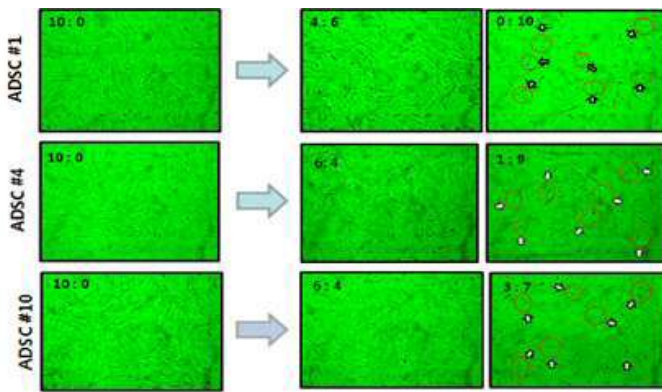
도면6



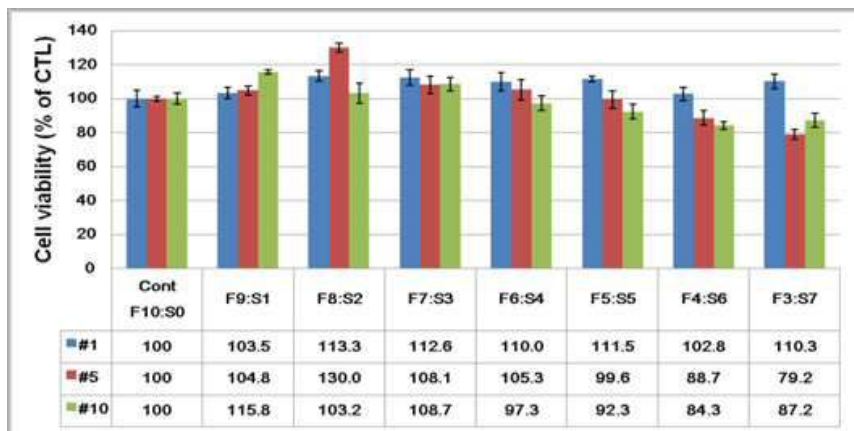
도면7



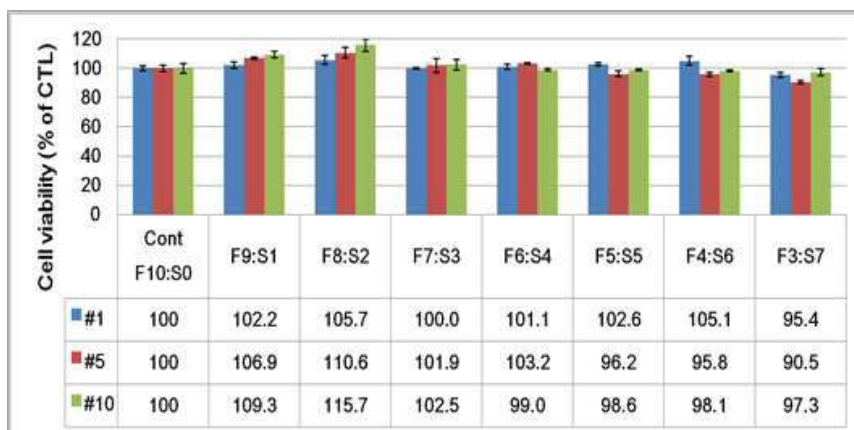
도면8



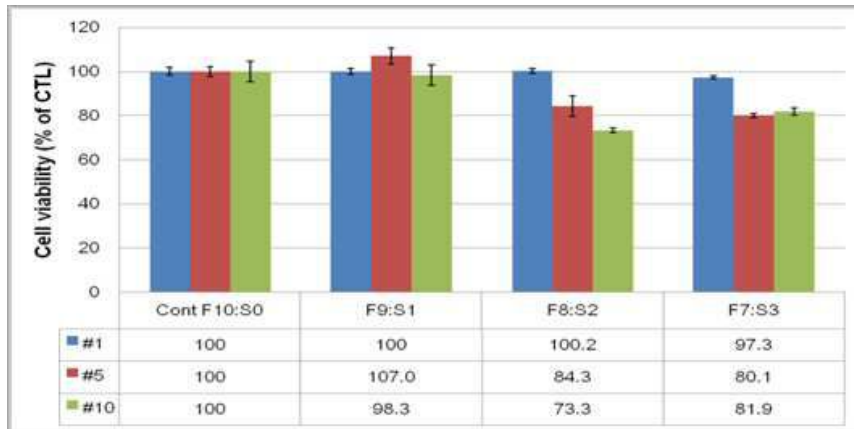
도면9



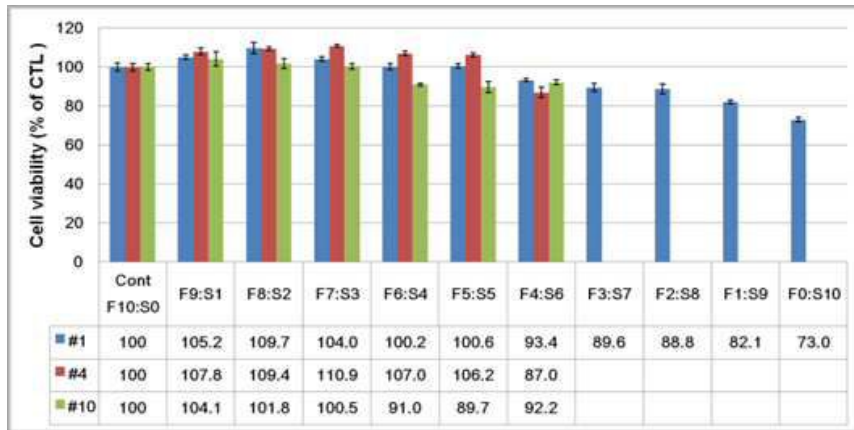
도면10



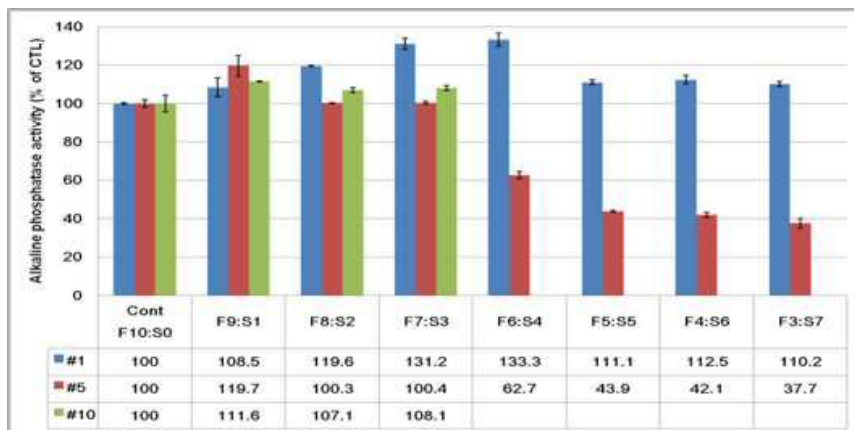
도면11



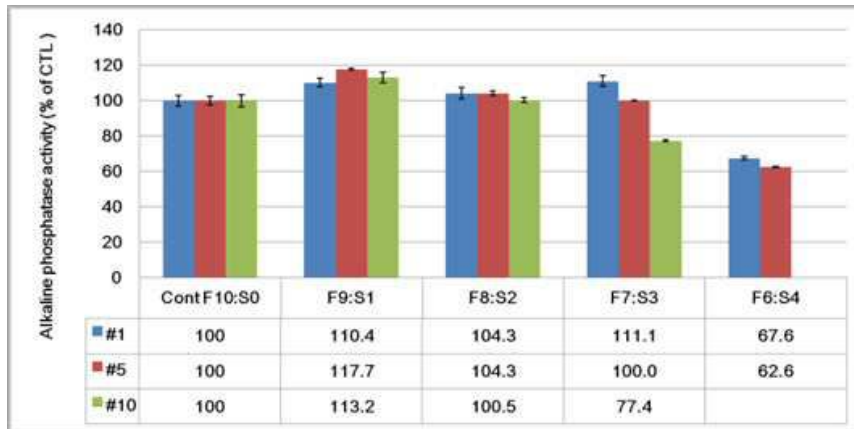
도면12



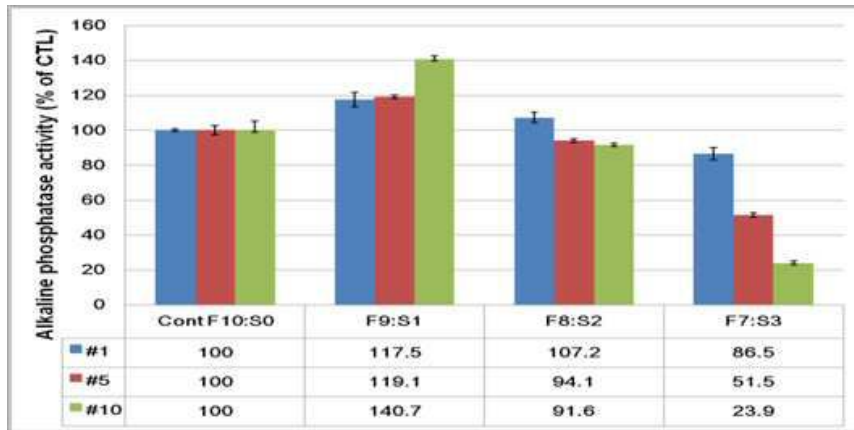
도면13



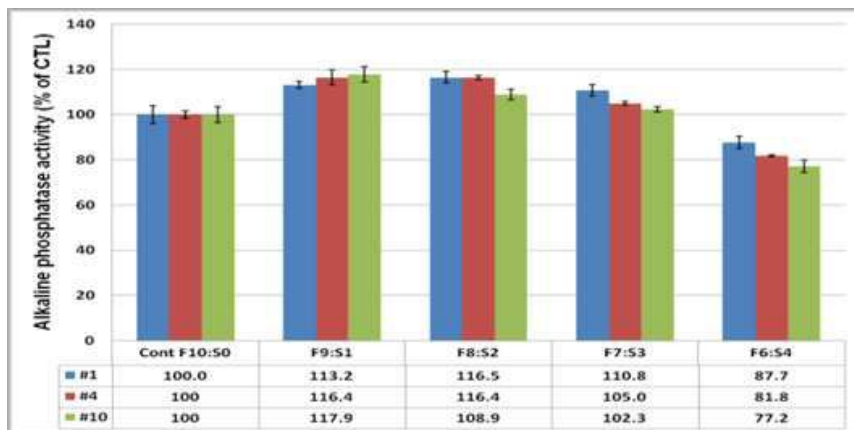
도면14



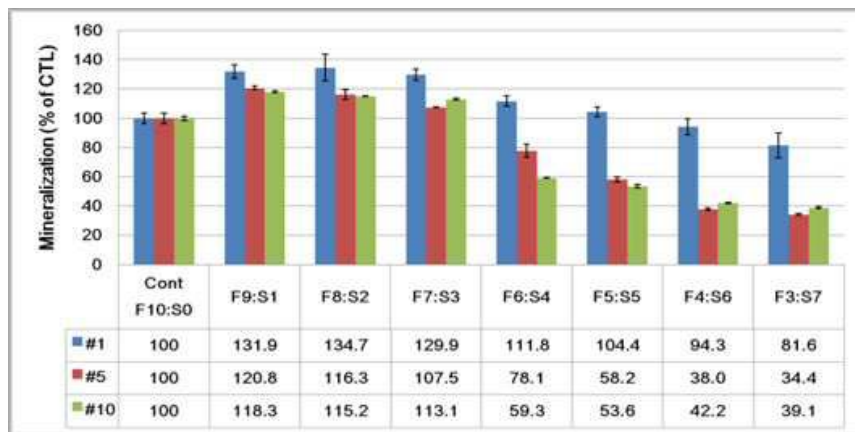
도면15



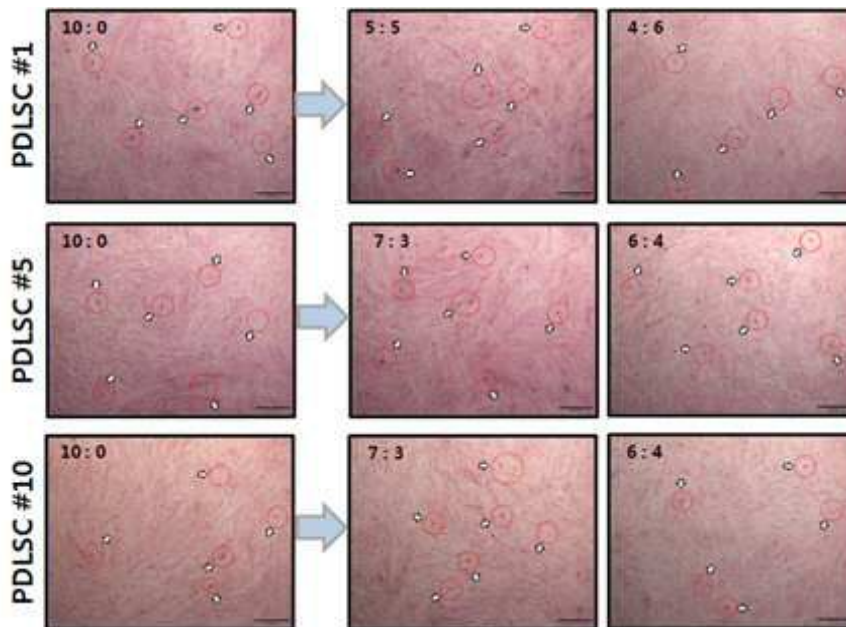
도면16



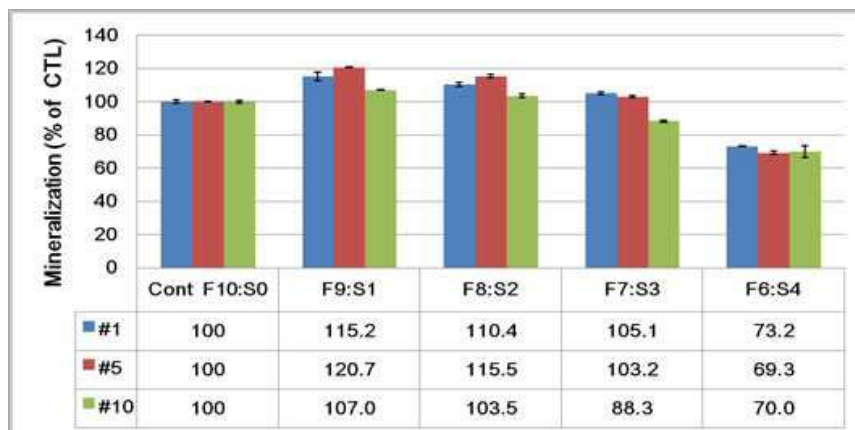
도면17



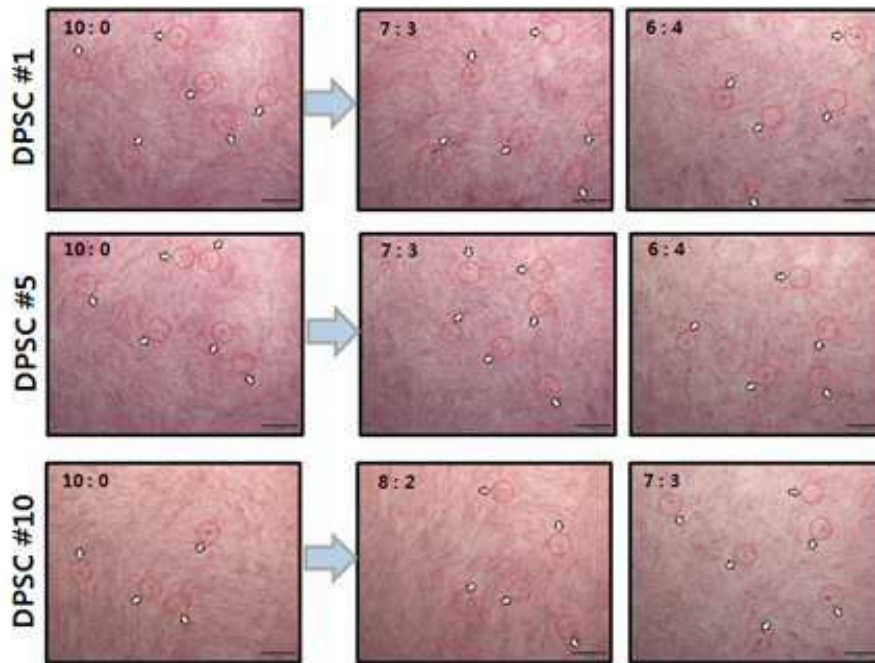
도면18



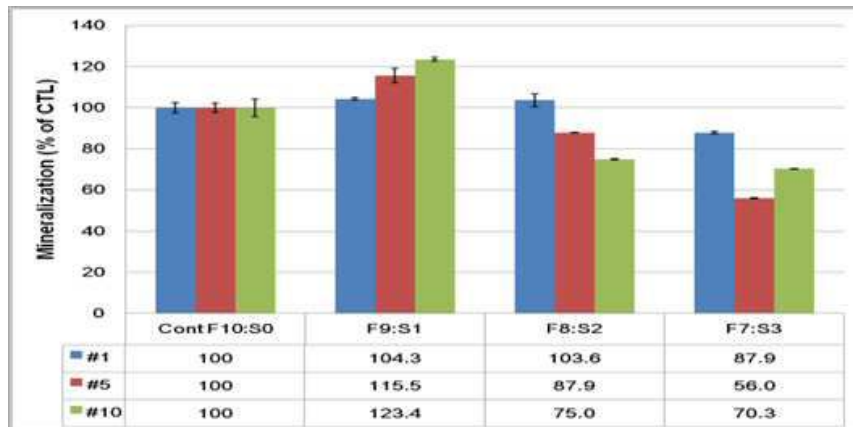
도면19



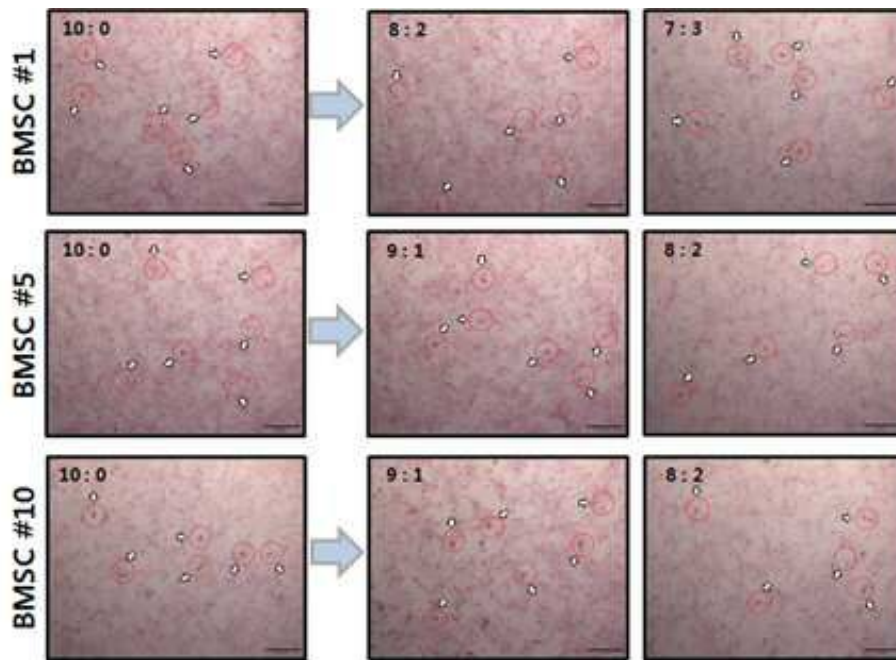
도면20



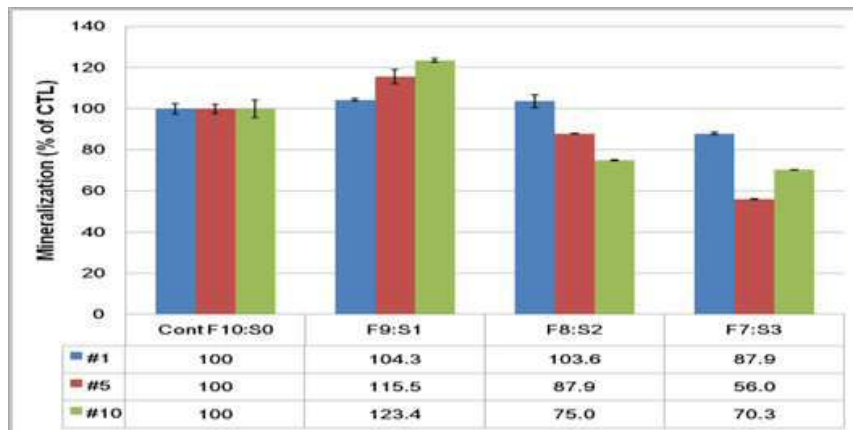
도면21



도면22



도면23



도면24

