



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0036861
(43) 공개일자 2019년04월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 1/02 (2006.01) A61F 2/10 (2006.01)
A61K 35/36 (2015.01) A61L 27/36 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01N 1/0221 (2013.01)
A61F 2/105 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0126279
(22) 출원일자 2017년09월28일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
사회복지법인 삼성생명공익재단
서울특별시 용산구 이태원로55길 48 (한남동)
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
최규성
서울특별시 송파구 송파대로32길 33, 105동 1401호(가락동, 가락동부센트레빌)
이교원
경기도 하남시 위례광장로 285, 6204동 1304호(학암동, 위례신도시신안인스빌아스트로)
(74) 대리인
김순웅

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 무세포 진피 기질 동결보존용 조성물 및 이의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 무세포 진피 기질 동결보존용 조성물, 동결 보존 무세포 진피 기질의 제조 방법 및 상기 방법으로 제조된 동결 보존 무세포 진피 기질에 관한 것이다. 본 발명의 동결보존용 조성물은 동결 후 해동과정에서 진피 피부의 손상 없이 신선한 상태를 유지할 수 있어 오랜 기간 동안 동결 보존에도 우수한 보존효과를 나타낸다. 또한 본 발명의 방법에 따라 제조된 동결보존 무세포진피 기질은 조직의 안전성이 높고 세포외 기질(extracellular matrix) 구조 및 기저막(basement membrane)이 손상 없이 유지되어 자가이식의 대체물로서 효과적으로 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



A 신선한 피부

B 글리세롤 보존 피부

C 개발된 동결보존용액 보존 피부

(52) CPC특허분류

A61K 35/36 (2013.01)

A61L 27/3687 (2013.01)

A61L 27/3691 (2013.01)

A61L 27/3804 (2013.01)

(72) 발명자

전욱

서울특별시 노원구 덕릉로71길 30, 102동 803호(중계동, 양지대림아파트)

윤도건

서울특별시 송파구 양재대로 1218, 239동 302호(방이동, 올림픽선수기자촌아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ012265

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21

연구과제명 영장류모델을 이용한 형질전환돼지 무세포이종진피 이식의 전임상 검증

기 여 율 1/1

주관기관 삼성생명공익재단 삼성서울병원

연구기간 2017.01.01 ~ 2017.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

수크로오스를 20 내지 40 중량 %로 포함하는, 무세포 진피 기질 동결보존용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 글리세롤, 인산완충용액 및 동물 세포 배양 배지를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 무세포 진피 기질 동결 보존용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 동결보존제는 글리세롤 및 동물세포 배양배지 용액을 첨가한 완충용액으로 이루어진 기본 용액의 혼합비가 중량 기준 0.5 : 8 내지 3.5 : 10인 것을 특징으로 하는 무세포 진피 기질 동결 보존용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 무세포 진피는 동종 진피 또는 이종 진피인 것을 특징으로 하는 무세포 진피 기질 동결 보존용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 동종 진피 또는 이종 진피는 돼지 또는 원숭이인 것을 특징으로 하는 무세포 진피 기질 동결 보존용 조성물.

청구항 6

- (i) 피부 조직에서 표피층을 제거하는 단계;
- (ii) 상기 표피층이 제거된 피부조직에서 진피층의 세포를 제거하여 무세포 진피를 제조하는 단계;
- (iii) 상기 무세포 진피에 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 동결 보존용 조성물을 처리하는 단계; 및
- (iv) 상기 무세포 진피를 동결건조하는 단계; 를 포함하는 동결 보존 무세포 진피 기질의 제조 방법.

청구항 7

제6항의 방법으로 제조된 동결 보존 무세포 진피 기질.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 동결 보존 무세포 진피 기질은 생체 이식 또는 삽입용인 것을 특징으로 하는, 동결 보존 무세포 진피 기질.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 무세포 진피 기질 동결보존용 조성물, 동결 보존 무세포 진피 기질의 제조 방법 및 상기 방법으로 제조된 동결 보존 무세포 진피 기질에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 피부는 인체 표면 전체를 덮고 있는 가장 큰 장기로서 체액의 유실 및 외부로부터 유해물질과 미생물의 유입을 막고, 물리적, 화학적 자극 등으로부터 우리 몸을 보호하는 기능을 수행하고 있다. 심한 화상, 외상, 상피암 절제 및 피부 질환 등으로 피부가 심각하게 손실된 환자의 경우, 손실 부위의 감염 및 체액의 손실을 막아주는 보

호막의 기능과 함께 환자의 상처 부위에 흉터가 남지 않고, 자연치유과정에서 발생할 수 있는 심각한 수축을 막아 주어야 한다. 손상된 피부 조직을 재생시키기 위한 방법으로는 환자 자신의 피부를 이식하는 자가 이식 (autograft), 다른 사람의 피부를 이식하는 동종이식(allograft), 동물의 피부를 이식하는 이종이식(xenograft)의 세가지 방법이 있다. 이들 방법 중 자가이식이 가장 이상적이지만, 화상부위가 광범위한 경우 조직을 확보할 수 있는 부위에 제한이 따르며, 채취 부위가 새로운 상처 부위로 남게 되는 어려움이 있다. 동종이식은 영구적인 생착 보다는 상처 주변부의 세포의 이동과 치유를 돕는 역할을 한다.

[0003] 특히 표피층, 진피층 및 피하층까지 손상되는 3도 화상의 경우에는 피부이식 치료가 필수적으로 요구된다. 현재 주로 사용되고 있는 피부이식 치료는 자가이식 방법을 이용하는데, 피부를 떼어낸 건강한 부위에 새로운 외상이 발생되어 환자의 고통이 증가하고, 완치되는데 시간이 많이 소요되며, 경제적 부담 또한 크다. 또한 심한 화상 환자와 같이 건강한 신체부위가 충분히 남아있지 않는 경우에는 자가 이식방법을 적용할 수 없거나 또는 여러 차례에 걸쳐 이식수술을 시행하여야 한다는 문제점이 있다. 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여, 다른 사람의 피부를 이용하는 동종이식, 돼지 등과 같은 다른 동물의 피부를 이용하는 이종이식 등이 시도되고 있으나, 면역거부 반응뿐만 아니라 다른 부작용을 종종 초래하고 있다.

[0004] 한편 면역거부반응을 없애기 위해 기증된 사체의 피부에서 표피를 제거한 후 진피 내 세포들을 제거한 무세포 진피 기질은 보관의 편의성을 위해 동결 후 주로 많이 사용되는데 동결 중 무세포 진피 내 콜라겐 조직들이 파괴되어 이식 후 빨리 분해되는 문제점이 있어 구조적 안정성을 가진 동결보존 무세포 진피기질 및 이에 대한 동결보존용 조성물에 대한 필요성이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 이에 본 발명자들은 동결보존 무세포 진피기질에 대해 연구하던 중 수크로오스를 20 내지 40 중량 %로 포함하는 무세포 진피 기질 동결보존용 조성물로 처리하면 무세포 진피 기질이 해동과정에서 진피의 손상없이 신선한 상태를 유지할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0006] 따라서, 본 발명의 목적은 수크로오스를 20 내지 40 중량 %로 포함하는 무세포 진피 기질 동결보존용 조성물, 동결 보존 무세포 진피 기질의 제조 방법 및 상기 방법으로 제조된 동결 보존 무세포 진피 기질을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 수크로오스 20 내지 40 중량 %를 포함하는 무세포 진피 기질 동결보존용 조성물을 제공한다.

[0008] 또한 본 발명은 피부 조직에서 표피층을 제거하는 단계; 상기 표피층이 제거된 피부조직에서 진피층의 세포를 제거하여 무세포 진피를 제조하는 단계; 상기 무세포 진피에 상기 동결 보존용 조성물을 처리하는 단계; 및 상기 무세포 진피를 동결건조하는 단계; 를 포함하는 동결 보존 무세포 진피 기질의 제조 방법을 제공한다.

[0009] 또한 본 발명은 피부 조직에서 표피층을 제거하는 단계; 상기 표피층이 제거된 피부조직에서 진피층의 세포를 제거하여 무세포 진피를 제조하는 단계; 상기 무세포 진피에 상기 동결 보존용 조성물을 처리하는 단계; 및 상기 무세포 진피를 동결건조하는 단계; 를 포함하는 동결 보존 무세포 진피 기질의 제조 방법으로 제조된 동결 보존 무세포 진피 기질을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명의 동결보존용 조성물은 동결 후 해동과정에서 진피 피부의 손상 없이 신선한 상태를 유지할 수 있어 오랜 기간 동안 동결 보존에도 우수한 보존효과를 나타낸다. 또한 본 발명의 방법에 따라 제조된 동결보존 무세포 진피 기질은 조직의 안전성이 높고 세포외 기질(extracellular matrix) 구조 및 기저막(basement membrane)이 손상 없이 유지되어 자가이식의 대체물로서 효과적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 무세포 돼지 및 원숭이 진피기질을 H&E 염색 후 광학 현미경으로 100 배 및 200배 확대한 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 수크로오스를 최종농도 10 내지 40 중량 % 농도로 처리하여 수크로오스 농도 차이에 따른 콜라겐 분해효소에 대한 저항성을 나타낸 도이다.

도 3은 본원 발명의 동결 보존제를 이용해 제조된 무세포 돼지 또는 원숭이 진피조직과 글리세롤을 사용해 동결 보존한 피부의 해동 후 진피조직을 방금 채취된 피부와 비교한 실험 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 발명은 수크로오스 20 내지 40 중량 %를 포함하는 무세포 진피 기질 동결보존용 조성물을 제공한다.
- [0013] 이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0015] 본 발명에서 사용되는 용어 "무세포 진피"란, 피부 조직에서 분리된 진피층에 화학적 처리를 하여 면역거부반응을 일으킬 수 있는 세포들을 제거한 진피층을 의미하며, 콜라겐과 엘라스틴이 주성분을 이루고 있다.
- [0016] 본 발명에서 사용하는 수크로오스는 D-글루코피라노오스와 D-프루토프라노오스 각 1분자씩으로 이루어진 이당류이며, 상기 수크로오스에 글리세롤, 인산완충용액 및 동물 세포 배양 배지를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 동결 보존제를 더 처리하면 세포막과 세포막 단백질을 동결 시 나타나는 얼음결정으로부터 보호하고 안정화시키는 역할을 한다. 따라서 본 발명에 따라 제조된 동결보존 무세포 진피 기질의 조직의 안전성이 향상될 수 있다.
- [0017] 본 발명에서 동결보존용 조성물은 수크로오스(sucrose)들의 최종 농도가 20내지 40 중량%가 되도록 동결 보존제를 혼합된 용액으로 제조되는 것일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 동결보존용 조성물은 글리세롤, 기본용액 및 수크로오스의 이상적인 혼합비를 사용하여 진피조직의 안전성을 향상시키고 세포의 기질의 구조가 손상 없이 유지시킬 수 있다. 본 발명에서 동결 보존제에 수크로오스가 20 중량 % 미만으로 포함되면 동결 시 얼음 결정으로 인해 조직의 안전성 등이 미약해질 수 있고, 40 중량 %를 초과하여 포함되면 고농도의 당 성분으로 인하여 동결건조 후 조직에 당 결정이 생성되어 조직의 안전성에 영향을 미칠 수 있다. 본 발명에서 동결 보존제는 바람직하게는 상기 기본 성분이 혼합된 용액에 수크로오스를 최종 농도가 25 내지 35 중량 %, 더욱 바람직하게는 30 중량 %가 되도록 용해함으로써 제조될 수 있다.
- [0019] 본 발명에서 "동결 보존제"의 기본 성분으로는 글리세롤 및 기본용액이 사용된다. 본 발명에서 기본용액은 동결보존제를 제조 시 기본(base)이 되는 용액을 의미하고, 동물세포 처리시 사용되는 완충용액 또는 동물세포 배양배지가 사용될 수 있다. 본 발명에서 완충용액은 당업계에서 동물세포의 처리 시 사용되는 것인 한 특별한 제한 없이 사용될 수 있다. 본 발명에서 사용될 수 있는 완충용액은 예를 들면 인산완충용액(phosphate buffered saline, PBS), TBS(Tris-buffered saline), 시트르산 완충용액(citric acid buffer) 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서 동물세포배양배지는 당업계에 공지된 임의의 배지가 사용될 수 있다. 본 발명에서 사용될 수 있는 동물세포배양배지는, 예를 들면 MEM(Minimum Essential Media), DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Media), RPMI 1640, IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Media), Defined Keratinocyte-SFM(without BPE), Keratinocyte-SFN(with BPE), KnockOut D-MEM, AmnioMAX-II Complete Medium, AmnioMAX-C100 Complete Medium 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 본 발명에서 글리세롤 및 기본용액은 중량 기준으로 0.5 ~ 3.5 : 9, 바람직하게는 0.8 ~ 2 : 9, 보다 바람직하게는 1 : 9의 혼합비로 사용된다. 본 발명에서 글리세롤 혼합비가 0.5 미만이면 동결 시 냉해로 인한 문제가 있을 수 있고, 3.5를 초과하면 동결 후 조직의 변성이 유도될 수 있다.
- [0021] 본 발명의 동결 보존용 조성물은 글리세롤, 동물세포 배양배지 용액을 첨가한 완충용액으로 이루어진 기본 용액의 혼합비가 중량 기준 0.5 : 8 내지 3.5 : 10인 것을 특징으로 하는 무세포 진피 기질 동결 보존용 조성물일 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 사용되는 용어, '진피'는 피부를 이루는 세 층 중 하나로서, 피부의 대부분을 차지하며, 표피와 피하조직 사이에 위치하고 있다. 진피는 주로 콜라겐 섬유, 탄력 섬유 등의 기질 단백질로 구성되어 있으며, 상기 기질 단백질은 섬유아세포에 의해 생성되는 것으로 알려져 있다. 또한, 신경, 혈관, 및 표피에서 기원한 표피부속기 등을 포함하고 있는바, 창상 치유 과정에서 중요한 역할을 한다.
- [0023] 본 발명에서 무세포 진피기질은 면역거부반응을 없애기 위하여 표피가 제거된 후 진피 내 세포가 제거된 기질을 의미한다. 표피 및 진피 내 세포의 제거는 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 수행될 수 있고 이에 특별한 제

한은 없다. 표피를 제거하는 것은, 예를 들면 트립신(trypsin), 콜라게나제(collagenase) 또는 디스파제(dispace) 등의 효소나 NaCl용액으로 처리함으로써 수행될 수 있다. 진피 내 세포를 제거하는 것은, 예를 들면 Triton X100, Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 또는 SDS(sodium dodecylsulfate) 등으로 처리함으로써 수행될 수 있다. 본 발명에서 무세포 진피는 동종 또는 이종 진피일 수 있으며, 상기 진피는 돼지 또는 원숭이 유래일 수 있다.

[0025] 또한 본 발명은 피부 조직에서 표피층을 제거하는 단계; 상기 표피층이 제거된 피부조직에서 진피층의 세포를 제거하여 무세포 진피를 제조하는 단계; 상기 무세포 진피에 동결 보존용 조성물을 처리하는 단계; 및 상기 무세포 진피를 동결건조하는 단계;를 포함하는 동결 보존 무세포 진피 기질의 제조 방법을 제공한다.

[0026] 본 발명에서 피부 조직에 동결 보존용 조성물을 처리하는 것은 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 이루어질 수 있고, 바람직하게는 저온 반응기에서 피부에 동결 보존용 조성물을 침투시킨다. 침투에 걸리는 시간은 피부 조직의 크기 등에 따라 다양할 수 있고, 예를 들면 4℃의 저온 반응기에서 약 6 시간 내지 24 시간 동안 침투시킬 수 있다.

[0027] 본 발명에서 동결 보존용 조성물이 침투된 피부는 온도 조절이 가능한 controlled rate freezer를 사용하여 동결할 수 있다.

[0028] 무세포 진피 기질의 제조 방법에서, 동결 시 온도 조절이 가능한 동결건조기를 사용하면 원하는 속도로 피부를 동결할 수 있다. 본 발명에서 온도 조절이 가능한 controlled rate freezer를 사용하여 피부를 동결하는 속도는 바람직하게는 분당 0.1℃ 내지 -7℃, 더 바람직하게는 -0.5℃ 내지 -5℃, 더 바람직하게는 -0.8℃ 내지 -3℃, 가장 바람직하게는 분당 1℃이다. 본 발명에서 동결을 시킬 경우 동결속도가 분당 -0.1℃ 미만이어서 너무 천천히 동결이 될 경우 조직 내의 용질이 조직 외보다 많기 때문에 동결속도가 낮아져 냉동 온도가 천천히 내려가 조직 바깥에 먼저 큰 얼음결정들이 생기면서 조직을 파괴시키는 문제가 있을 수 있다, 또한 동결 보존용 조성물이 침투된 피부의 온도와 controlled rate freezer 챔버의 온도는 같을 수가 없기 때문에 냉동 시 잠재 용융열이 발생하는 구간에서부터 물분자의 움직임 없는 온도인 -80℃까지 급속한 동결로 속도가 분당 -7℃를 초과하여 잠재용융열을 조절하지 못하면 얼음결정현상으로 인한 조직의 파괴 문제가 있을 수 있다.

[0030] 또한 본 발명은 피부 조직에서 표피층을 제거하는 단계; 상기 표피층이 제거된 피부조직에서 진피층의 세포를 제거하여 무세포 진피를 제조하는 단계; 상기 무세포 진피에 동결 보존용 조성물을 처리하는 단계; 및 상기 무세포 진피를 동결건조하는 단계;를 포함하는 동결 보존 무세포 진피 기질의 제조 방법으로 제조된 동결 보존 무세포 진피 기질을 제공한다.

[0031] 본 발명을 이하 실시예를 통하여 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 오로지 발명을 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0033] 실시예 1. 무세포 진피조직의 제조

[0034] 1.1 무세포 돼지 진피조직의 제조

[0035] 돼지 피부를 생리 식염수로 깨끗이 세척한 후, 세척된 돼지 피부를 각각 $5 \times 10 \text{ cm}^2$ 의 크기로 절단하였다. 돼지피부에 1M NaCl(Sigma, 미국) 용액에 처리한 후, 38℃ 반응기(P-039, 코아테크)에서 교반하여 약 6시간 내지 24시간 동안 반응시켰다. 이후, 포셉을 이용해 표피를 제거하였다. 표피를 제거한 돼지 피부를 인산완충용액(pH 7.2, GIBCO, 미국)을 이용해 세척하였고, 세척된 진피를 0.1% SDS에 넣고 상온에서 1시간 동안 교반하여 진피 내 세포를 제거하였다.

[0037] 1.2 무세포 원숭이 진피조직의 제조

[0038] 원숭이 피부를 생리 식염수로 깨끗이 세척한 후, 세척된 원숭이 피부를 각각 $5 \times 10 \text{ cm}^2$ 의 크기로 절단하였다. 원숭이 피부에 1M NaCl(Sigma, 미국) 용액에 처리한 후, 38℃ 반응기(P-039, 코아테크)에서 교반하여 약 6시간 내지 24시간 동안 반응시켰다. 이후, 포셉을 이용해 표피를 제거하였다. 표피를 제거한 원숭이 피부를 인산완충

용액(pH 7.2, GIBCO, 미국)을 이용해 세척하였고, 세척된 진피를 0.1% SDS에 넣고 상온에서 1시간 동안 교반하여 진피 내 세포를 제거하였다.

실시예 2. 동결보존제를 이용한 생체 이식 또는 삽입용 무세포 진피 조직의 제조

2.1 동결보존제의 제조

글리세롤(sigma, 미국) 및 동물세포 배양배지 용액을 첨가한 인산완충용액을 1 : 9의 중량비로 혼합하여 동결보존제의 기본 용액을 제조하였다. 제조된 기본 용액에 최종 농도가 30%가 되도록 수크로오스(sigma, 미국)을 넣고 용해시켜 동결보존제를 제조하였다.

2.2 생체 이식 또는 삽입용 무세포 돼지 진피 조직의 제조

실시예 1.1에서 제조된 무세포 돼지 진피조직을 인산완충용액으로 세척하였다. 이후, 4℃ 저온 반응기(P-039, 코아테크)에 상기 무세포 진피조직을 넣은 다음, 실시예 2.1에서 제조된 동결보존제를 첨가하여 12시간 동안 진피조직에 침투시켰다. 침투가 완료된 무세포 돼지 진피조직을 폴리아마이드 백(CryoBag, Origen, 미국)에 넣은 후, Controlled rate freezer(14S-A, SY Lab, 미국)를 이용하여 분당 -1℃의 속도로 150℃까지 동결하여 최종적인 생체 이식 또는 삽입용 무세포 돼지 진피 조직을 제조하였다.

2.3 생체 이식 또는 삽입용 무세포 원숭이 진피 조직의 제조

실시예 1.2에서 제조된 무세포 원숭이 진피조직을 인산완충용액으로 세척하였다. 이후, 4℃ 저온 반응기(P-039, 코아테크)에 상기 무세포 진피조직을 넣은 다음, 실시예 2.1에서 제조된 동결보존제를 첨가하여 12시간 동안 진피조직에 침투시켰다. 침투가 완료된 무세포 원숭이 진피조직을 폴리아마이드 백(CryoBag, Origen, 미국)에 넣은 후, Controlled rate freezer(14S-A, SY Lab, 미국)를 이용하여 분당 -1℃의 속도로 150℃까지 동결하여 최종적인 생체 이식 또는 삽입용 무세포 원숭이 진피 조직을 제조하였다.

실험예 1. 제조된 진피세포의 구조적 안정성

무세포 돼지 또는 원숭이 진피조직의 진피 구조적 안정성을 파악하기 위하여 상기 실시예에 따라 준비된 돼지 또는 원숭이 진피 조직을 H&E 염색법을 이용해 조직학적 검사를 수행하였다.

파라핀 블록을 4μm 두께로 박절한 후 건조시켜 파라핀 절편을 제작하였다. 이후, 탈파라핀 과정을 위해 자일렌에서 5분간 3번, 100% 에탄올에서 2분간 3번, 90% 에탄올에서 1분간 1번, 80% 에탄올에서 1분간 1번, 70% 에탄올에서 1분간 1번 반응시킨 후, 흐르는 물에 10분간 세척하였다. 헤마토자일린(Hematoxylin) 염색액에 10분간 반응시킨 후 흐르는 물에 3분간 세척하고, 에오신(Eosin) 염색액에 10분간 반응시킨 후 흐르는 물에 에오신 염색액이 나오지 않을 때까지 세척하였다. 70% 에탄올에 1초간 10번, 80% 에탄올에 1초간 10번, 90% 에탄올에 1초간 10번, 100% 에탄올에 1분간 2번, 자일렌에 3분간 3번 반응시킨 후, 마운팅 용액으로 마운팅하였고, 실시예의 피부를 광학 현미경(Olympus BX51, H&E staining) 및 주사 전자현미경(Hitachi S-4700, 일본)으로 촬영하여 도 1에 나타내었다.

도 1에서 나타난 바와 같이, 실시예의 제조방법으로 제조된 진피조직의 경우에 조직 내의 진피를 구성하는 콜라겐 구조의 구조적 안정성이 훨씬 뛰어나며, 동결과정 중에 일어나는 조직의 파괴가 확연히 적은 것을 확인하였다.

실험예 2. 수크로오스 농도별 처리에 의한 콜라겐 분해효소 저항성

수크로오스 농도 차이에 따른 무세포 진피 조직의 안정성을 살펴보기 위하여 수크로오스를 10 내지 40% 농도로 처리하고, 이에 따른 콜라겐 분해효소에 대한 저항성 실험을 수행하였다. 25mg의 시료를 5ml의 0.36mM 염화칼슘(calcium chloride)이 첨가된 5mM TES buffer에 넣고 혼합하였다. 0.1mg/ml의 콜라겐 분해효소(collagenase) 0.1ml을 시료에 넣고 잘 섞어 주면서 37℃에서 하루 동안 반응시켰다. 4.0mM의 L-leucine standard solution을

연속적으로 희석(serial dilution)한 후, ninhydrin color reagent를 처리하여 570nm에서 흡광도(VERSA max, Molecular Device, 미국)를 측정하여 표준곡선을 작성하였다. 상기 L-leucine의 표준곡선을 이용하여 각각 시료의 방출된 L-leucine의 양을 계산하였으며, 계산된 L-leucine 방출량을 도 2에 나타내었다. 양성 대조군으로는 콜라겐 분말에 콜라겐 분해효소를 처리한 군, 음성 대조군으로는 콜라겐 분해 효소를 처리하지 않은 군을 이용하였다.

[0057] 도 2에서 확인한 바와 같이, 수크로오스의 최종농도를 20 내지 40 중량 %를 처리한 군들은 L-leucine 방출량이 양성대조군보다 최대 1/10 수준으로 감소하였으며, 특히 최적의 농도인 30 중량 %를 처리한 군은 콜라겐 분해효소를 처리하지 않은 음성대조군보다도 L-leucine의 방출량이 적은 것을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 수크로오스를 최종 농도 20 내지 40 중량%로 포함하는 동결 보존제로 처리한 동결보존 무세포 돼지 및 원숭이의 진피 조직은 조직의 안정성이 높아서 콜라겐 분해 효소에 의한 분해 속도가 현저하게 감소하고 그 분해량 또한 현저하게 감소함을 확인하였다.

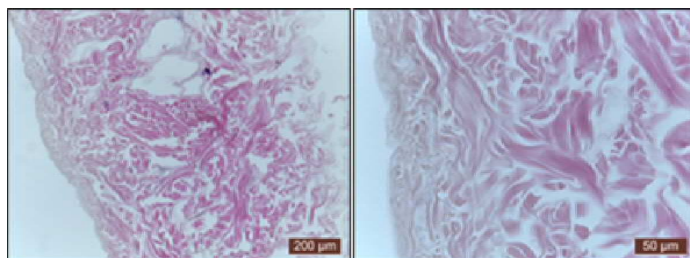
[0059] 실험예 3. 동결보존제를 이용해 제조된 진피세포의 구조적 안정성

[0060] 본원 발명의 동결 보존제를 이용해 제조된 무세포 돼지 또는 원숭이 진피조직의 동결 보존 후의 구조적 안정성을 파악하기 위하여 상기 실시예에 따라 준비된 돼지 또는 원숭이 진피 조직과 그 대조군으로 동결보존제의 하나인 글리세롤로 보존한 피부를 동결 보존 후에 H&E 염색법을 이용해 조직학적 검사를 수행하였다. 상기 실시예에 의해서 제조된 피부, 대조군과 방금 채취한 피부를 광학 현미경(Olympus BX51, H&E staining) 및 주사 전자현미경(Hitachi S-4700, 일본)으로 촬영하여 도 3에 나타내었다.

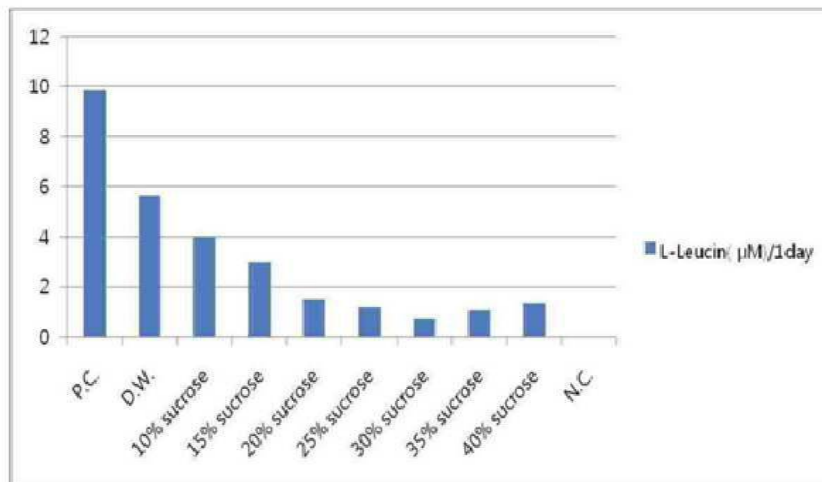
[0061] 도 3에서 나타난 바와 같이, 도 3A의 신선한 피부와 비교할 때, 종래의 동결보존제인 글리세롤 보존 피부는 동결 과정 후 해동에 의해서 진피 피부층이 손상된 것이 확인되었다. 반면, 본원 발명의 동결보존제를 사용한 경우 도 3C에서 확인한 바와 같이, 신선한 피부와 동일한 정도의 진피 상태를 확인하였다. 따라서, 기존의 동결보존제보다 본원 발명의 동결보존제를 이용하면 동결 후 해동과정에서 진피 피부의 손상 없이 신선한 상태를 유지할 수 있어 오랜 기간 동안 동결 보존에도 우수한 보존효과를 나타내어 향후 유용하게 사용할 수 있음을 확인하였다.

도면

도면1



도면2



도면3



A 신선한 피부

B 글리세롤 보존 피부

C 개발된 동결보존용액 보존 피부