



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2007년12월06일  
 (11) 등록번호 10-0783228  
 (24) 등록일자 2007년11월30일

(51) Int. Cl.  
**A61F 2/02** (2006.01) **A61F 2/00** (2006.01)  
**C12N 5/08** (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2006-0082207  
 (22) 출원일자 2006년08월29일  
 심사청구일자 2006년08월29일  
 (56) 선행기술조사문헌  
 KR1020030060458 A  
 KR1020010096776 A  
 US6258870 B1  
 US6840962 B1

(73) 특허권자  
**가톨릭대학교 산학협력단**  
 서울 서초구 반포동 505번지 가톨릭대학교 산학협  
 력단  
 (72) 발명자  
**전홍재**  
 서울특별시 중구 황학동 1433  
 (74) 대리인  
**박희규**

전체 청구항 수 : 총 1 항

심사관 : 김건형

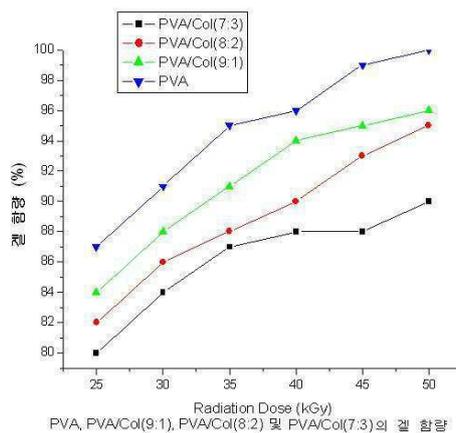
**(54) 세포배양용 폴리비닐알코올-콜라겐 하이드로젤 스캐폴드 및 그 제조방법**

**(57) 요약**

본 발명은 천연고분자 물질과 합성고분자 물질을 혼합하고 방사선가교함에 의해 세포의 증착 및 증식능력이 뛰어나고 날 뿐 아니라 물리적 성능이 우수하고 방사선가교를 사용함으로 제조공정이 진일보된 세포배양용 폴리비닐알코올-콜라겐 하이드로젤 스캐폴드 및 그 제조방법에 관한 것으로, 본 발명의 세포배양용 폴리비닐알코올-콜라겐 하이드로젤 스캐폴드는 주성분으로 폴리비닐알코올(Polyvinyl alcohol)과 콜라겐(Collagen) IV을 일정비율로 블렌드(blend)하여 하이드로젤로하고 방사선을 조사하여 얻어짐을 특징으로 한다.

상기와 같이 구성되는 본 발명의 세포배양용 스캐폴드는 세포의 증착 및 증식능력이 뛰어나면서도, 겔강도, 팽윤도 및 연신율과 같은 스캐폴드로서의 물리적 성능 또한 우수하여, 세포배양용기의 내벽에 용이하게 코팅될 수 있다. 또한 상기와 같이 본 발명의 스캐폴드는 상기 구성분을 방사선조사에 의하여 혼합가교체로 제조함으로, 종래의 하이드로젤 제조를 위하여 사용한 화학적 가교 방법에 따른 단점으로 지적된 인체에 유해한 가교제나 개시제를 사용하지 않기 때문에 가교 후의 정제 단계를 배제할 수 있는 등 그 제조 공정이 간단하다.

**대표도 - 도1**



**특허청구의 범위**

**청구항 1**

삭제

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

콜라겐 IV를 물중탕하여 콜라겐 IV 수용액을 제조하는 단계,

폴리비닐알코올(PVA)을 물중탕으로 PVA 수용액을 제조하는 단계,

상기 각 단계에서 제조된 PVA 수용액과 콜라겐 IV 수용액을 PVA : 콜라겐 IV의 비를 고형분의 무게 비로 하여 7:3 내지 9:1의 비율로 혼합하여 PVA/콜라겐 IV 수용액을 제조하는 단계, 및

상기 조성으로 만들어진 PVA/콜라겐 IV 수용액에 25 내지 50kGy의 방사선의 조사선량을 조사하는 단계로 구성됨을 특징으로 하는 세포배양용 하이드로젤 스캐폴드의 제조방법.

**명세서**

**발명의 상세한 설명**

**발명의 목적**

**발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술**

- <9> 본 발명은 세포배양용 폴리비닐알코올-콜라겐 하이드로젤 스캐폴드 및 그 제조방법에 관한 것으로, 보다 자세하게는 천연고분자인 콜라겐과 합성고분자인 폴리비닐알코올을 일정비율로 혼합하고 방사선가교함에 의해 세포의 증착 및 증식능력이 뛰어날 뿐 아니라 물리적 성능이 우수하고 방사선가교를 이용함으로 제조공정이 진일보된 방사선가교에 의한 세포배양용 폴리비닐알코올-콜라겐 하이드로젤 스캐폴드 및 그 제조방법에 관한 것이다.
- <10> 스캐폴드(Scaffold)는 조직 세포의 체외 배양과 체내 이식이 가능하도록 만들어진 물리적 지지체 및 점착 기질을 칭하는 것으로, 이러한 스캐폴드는 인체조직 재생을 위한 세포 이식에 사용되고 있으며, 또한 세포의 대량배양 및 증식에 있어서 그 중요성은 매우 높다. 왜냐하면 세포와 기질 간의 접촉부분에서 세포의 점착 및 이에 수반되는 상피세포의 이동과 증식에 기인하기 때문이다. 즉, 생물학적으로 활성을 지니고 있는 대부분의 세포는 체내 혹은 체외의 물질과 접촉 시 생존하기 위하여 반드시 거쳐야 되는 기본단계가 있으며, 그 첫 단계는 세포의 점착이다. 특히, 섬유아세포 및 조직세포의 생존단계를 살펴보면, 세포는 우선적으로 기질에 점착을 하며 점착 후 세포질에서의 세포기관(organelle)의 대사가 활발해지고, 증식 및 양분의 공급을 원활히 하기 위하여 새로운 부위로 이동하게 된다. 따라서, 세포의 증착을 활성화시키는 표면은 세포의 증식을 배가하는데 가장 기본이 되는 수단이다. 이러한 세포의 기질에 대한 점착 능력은 기질의 성분에 의하여 인위적으로 조절될 수 있다. 스캐폴드는 세포의 재생과 이들이 성장할 때 지지체가 되어주는 담체, 즉 인공기질의 근간이 되는 물질로서, 최근 세포의 대량배양 및 증식용기 혹은 플라스크에 코팅되어 사용된다.
- <11> 한편, 이러한 기질에 대해, 종래의 대한민국 특허출원 제1991-0005802호의 "세포배양용 반투막 겔과 그의 제조방법"은 세포 배양용 반투막 겔과 그의 제조 방법에 관한 것으로, 종래 미국특허 제4352883호의 칼슘알기네이트 겔을 이용한 것보다 세포 고정화 및 고밀도 배양을 효율적으로 하기 위해, "매트릭스 내에서 세포를 고정화하여 고밀도로 배양할 수 있도록 된 반투막 겔에 있어서, 다당류 또는 그 유도체와 분자량 10,000 이상의 수용성 관능기를 갖는 고분자가 1 : 4 내지 4 : 1 부피비율로 혼합된 상태의 매트릭스로 제조된 세포배양용 반투막겔"을 개시하고 있으며, 대한민국 특허출원 제2004-7000487호의 "세포·조직 배양용 담체 및 배양방법"은 섬유아세포의 과잉증식을 억제하면서, 목적으로 하는 조직이나 장기를 효과적으로 재생할 수 있는 세포·조직배양용 담체, 및 세포·조직배양 방법을 제공하기 위한 것으로, "그 수용액이 저온에서 졸상태, 고온에서 겔상태가 되는 열가역적인 졸-겔 전이를 나타내는 하이드로겔 형성성 고분자를 적어도 포함하는 세포·조직배양용 담체로서, 상기 하이드로겔 형성성 고분자에 근거한 겔내에서 섬유아세포가 실질적으로 증식하지 않는 것을 특징으로 하는 세포

· 조직배양용 담체"를 개시하고 있다.

- <12> 그러나, 상기한 특허 및 종래에 공지된 스캐폴드는 세포의 대량배양에 적합할 만큼 기질에 대한 점착 능력과 물리적 특성이 우수하지 않을 뿐 아니라, 제조공정 또한 바람직하지 않은 점이 많다는 문제점이 있었다.
- <13> 따라서, 본 발명자 등은 상기한 종래의 문제점을 해결하여 세포가 용이하게 점착할 수 있고, 겔 강도, 팽윤도 및 연신율과 같은 물리적 특성이 우수하여 세포의 대량배양에 적합하고, 더욱이 정제 및 멸균 공정이 필요하지 않아 제조가 용이한 스캐폴드 및 그 제조방법에 대해 예의 연구하여 본 발명을 완성하게 되었다.

**발명이 이루고자 하는 기술적 과제**

- <14> 따라서, 본 발명의 목적은 세포의 대량배양 및 증식이 가능하도록 세포가 용이하게 점착할 수 있고, 겔 강도, 팽윤도 및 연신율과 같은 물리적 특성이 우수한 세포배양용 스캐폴드를 제공하기 위한 것이다.
- <15> 본 발명의 다른 목적은 상기의 특성을 갖는 스캐폴드를 정제 및 멸균 공정을 요하지 않으면서 보다 용이하게 제조할 수 있는 방법을 제공하기 위한 것이다.
- <16> 상기한 본 발명의 목적은 특정의 천연 고분자와 합성 고분자 물질을 사용하여 방사선가교 방식에 의해 하이드로겔 형태로 제공함으로써 달성되었다.

**발명의 구성 및 작용**

- <17> 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 세포배양용 폴리비닐알코올-콜라겐 하이드로겔 스캐폴드는;
- <18> 주성분으로 폴리비닐알코올(Polyvinyl alcohol)과 콜라겐(Collagen) IV을 일정비율로 블렌드(blend)하여 하이드로겔로하고 방사선을 조사하여 얻어짐을 특징으로 한다.
- <19> 본 발명의 다른 구성에 따르면, 상기 폴리비닐알코올과 콜라겐 IV의 혼합 비율은 90~70중량% : 10~30중량%로 됨을 특징으로 한다.
- <20> 상기 폴리비닐알코올의 함량이 90중량%를 넘고 콜라겐 IV의 함량이 10중량% 이하로 되면, 겔화율 및 겔강도는 우수하나 팽윤도 및 연신율이 낮아 물리적 물성이 바람직하지 못하며, 더욱이 세포의 점착도가 떨어져 세포의 대량배양 및 증식에 바람직하지 않으며, 반대로 폴리비닐알코올의 함량이 70중량% 이하로 되고 콜라겐 IV의 함량이 30중량%를 넘으면, 세포의 점착도 및 성장도는 우수하지만 겔화율 및 겔강도가 저하되어 물리적 물성이 바람직하지 못하다.
- <21> 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위한 스캐폴드의 제조방법은;
- <22> 콜라겐 IV를 물중탕하여 콜라겐 IV 수용액을 제조하는 단계,
- <23> 폴리비닐알코올(PVA)을 물중탕으로 PVA 수용액을 제조하는 단계,
- <24> 상기 각 단계에서 제조된 PVA 수용액과 콜라겐 IV 수용액을 PVA : 콜라겐 IV의 비를 고휘분의 무게비로 하여 7:3 내지 9:1의 비율로 혼합하여 PVA/콜라겐 IV 수용액을 제조하는 단계, 및
- <25> 상기 조성으로 만들어진 PVA/콜라겐 IV 수용액에 방사선을 조사하는 단계로 구성됨을 특징으로 한다.
- <26> 상기와 같이 구성되는 본 발명의 세포배양용 스캐폴드는 천연고분자로 생체내 기질의 주요소인 콜라겐 IV를 사용함으로써 세포의 증착 및 증식능력이 뛰어나며, 또한 합성고분자인 폴리비닐알코올을 사용하여 겔강도, 팽윤도 및 연신율과 같은 스캐폴드로서의 물리적 성능이 보완되었으며, 세포배양용기의 내벽에 용이하게 코팅될 수 있다. 또한 상기와 같이 본 발명의 스캐폴드는 상기 구성분을 방사선조사에 의하여 혼합가교체로 제조함으로써, 종래의 하이드로겔 제조를 위하여 사용한 화학적 가교 방법에 따른 단점으로 지적된 인체에 유해한 가교제나 개시제를 사용하지 않기 때문에 가교 후의 정제 단계를 배제할 수 있으며, 또한 본 발명의 방법에 따른 방사선 가교는 세포를 배양할 때 필수인 멸균 공정이 가교와 동시에 이루어짐으로, 종래의 화학적 가교와 달리 별도의 멸균을 수행할 필요가 없으며, 더욱이 본 발명의 방사선 가교는 열을 가하지 않아도 되고, 냉각상태에서도 가교가 가능한 특성이 있으며, 방사선 조사선량의 조절에 따라 조성물의 물성변화 없이 물리적 특성을 자유롭게 조절할 수 있는 장점이 있다.
- <27> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 보다 자세하게 설명하지만 본 발명이 여기에 한정되는 것은 아니다.
- <28> 실시예 1

- <29> 콜라겐 IV를 60℃에서 물중탕으로 1시간 정도 흔들면서 물에 녹여 15wt%의 콜라겐 IV 수용액을 제조하였다. 그리고 폴리비닐알코올(PVA)을 90℃에서 물중탕으로 3-4시간 정도 흔들면서 용해시켜 PVA 수용액을 만들었다. 이렇게 준비된 PVA 수용액과 콜라겐 IV 용액을 PVA : 콜라겐 IV의 비를 고형분의 무게비로 하여 7:3의 비율로 혼합하여 15wt% PVA/콜라겐 IV 수용액을 제조하였다. 상기 조성으로 만들어진 PVA/콜라겐 IV 용액을 24 웰 플레이트(well plate)의 바닥에 150 μl에 의하여 도포하고 용액 내의 기포제거 및 물리적 겔화를 위하여 4℃하에서 보관 후 용액을 <sup>60</sup>Co 감마선(gamma rays)에 의하여 25 kGy의 조사선량으로 조사하여 PVA/콜라겐 IV 하이드로겔이 코팅된 배양 플레이트(culture plate)를 얻었다.
- <30> 실시예 2
- <31> 상기 실시예 1에서 준비된 PVA 수용액과 콜라겐 IV 용액을 PVA : 콜라겐 IV의 비를 고형분의 무게비로 하여 8:2의 비율로 혼합하는 외에는 실시예 1과 동일하게 하여 PVA/콜라겐 IV 하이드로겔이 코팅된 배양 플레이트를 얻었다.
- <32> 실시예 3
- <33> 상기 실시예 1에서 준비된 PVA 수용액과 콜라겐 IV 용액을 PVA : 콜라겐 IV의 비를 고형분의 무게비로 하여 9:1의 비율로 혼합하는 외에는 실시예 1과 동일하게 하여 PVA/콜라겐 IV 하이드로겔이 코팅된 배양 플레이트를 얻었다.
- <34> 실시예 4
- <35> 용액을 <sup>60</sup>Co 감마선(gamma rays)에 의하여 30 kGy의 조사선량으로 조사하는 외에는 실시예 1과 동일하게 하여 PVA/콜라겐 IV 하이드로겔이 코팅된 배양 플레이트를 얻었다.
- <36> 실시예 5
- <37> 용액을 <sup>60</sup>Co 감마선(gamma rays)에 의하여 30 kGy의 조사선량으로 조사하는 외에는 실시예 2와 동일하게 하여 PVA/콜라겐 IV 하이드로겔이 코팅된 배양 플레이트를 얻었다.
- <38> 실시예 6
- <39> 용액을 <sup>60</sup>Co 감마선(gamma rays)에 의하여 30 kGy의 조사선량으로 조사하는 외에는 실시예 3과 동일하게 하여 PVA/콜라겐 IV 하이드로겔이 코팅된 배양 플레이트를 얻었다.
- <40> 실시예 7
- <41> 용액을 <sup>60</sup>Co 감마선(gamma rays)에 의하여 35 kGy의 조사선량으로 조사하는 외에는 실시예 1과 동일하게 하여 PVA/콜라겐 IV 하이드로겔이 코팅된 배양 플레이트를 얻었다.
- <42> 실시예 8
- <43> 용액을 <sup>60</sup>Co 감마선(gamma rays)에 의하여 35 kGy의 조사선량으로 조사하는 외에는 실시예 2와 동일하게 하여 PVA/콜라겐 IV 하이드로겔이 코팅된 배양 플레이트를 얻었다.
- <44> 실시예 9
- <45> 용액을 <sup>60</sup>Co 감마선(gamma rays)에 의하여 35 kGy의 조사선량으로 조사하는 외에는 실시예 3과 동일하게 하여 PVA/콜라겐 IV 하이드로겔이 코팅된 배양 플레이트를 얻었다.
- <46> 실시예 10
- <47> 용액을 <sup>60</sup>Co 감마선(gamma rays)에 의하여 40 kGy의 조사선량으로 조사하는 외에는 실시예 1과 동일하게 하여 PVA/콜라겐 IV 하이드로겔이 코팅된 배양 플레이트를 얻었다.
- <48> 실시예 11
- <49> 용액을 <sup>60</sup>Co 감마선(gamma rays)에 의하여 40 kGy의 조사선량으로 조사하는 외에는 실시예 2와 동일하게 하여

PVA/콜라겐 IV 하이드로겔이 코팅된 배양 플레이트를 얻었다.

- <50> 실시예 12
- <51> 용액을 <sup>60</sup>Co 감마선(gamma rays)에 의하여 40 kGy의 조사선량으로 조사하는 외에는 실시예 3과 동일하게 하여 PVA/콜라겐 IV 하이드로겔이 코팅된 배양 플레이트를 얻었다.
- <52> 실시예 13
- <53> 용액을 <sup>60</sup>Co 감마선(gamma rays)에 의하여 45 kGy의 조사선량으로 조사하는 외에는 실시예 1과 동일하게 하여 PVA/콜라겐 IV 하이드로겔이 코팅된 배양 플레이트를 얻었다.
- <54> 실시예 14
- <55> 용액을 <sup>60</sup>Co 감마선(gamma rays)에 의하여 45 kGy의 조사선량으로 조사하는 외에는 실시예 2와 동일하게 하여 PVA/콜라겐 IV 하이드로겔이 코팅된 배양 플레이트를 얻었다.
- <56> 실시예 15
- <57> 용액을 <sup>60</sup>Co 감마선(gamma rays)에 의하여 45 kGy의 조사선량으로 조사하는 외에는 실시예 3과 동일하게 하여 PVA/콜라겐 IV 하이드로겔이 코팅된 배양 플레이트를 얻었다.
- <58> 실시예 16
- <59> 용액을 <sup>60</sup>Co 감마선(gamma rays)에 의하여 50 kGy의 조사선량으로 조사하는 외에는 실시예 1과 동일하게 하여 PVA/콜라겐 IV 하이드로겔이 코팅된 배양 플레이트를 얻었다.
- <60> 실시예 17
- <61> 용액을 <sup>60</sup>Co 감마선(gamma rays)에 의하여 50 kGy의 조사선량으로 조사하는 외에는 실시예 2와 동일하게 하여 PVA/콜라겐 IV 하이드로겔이 코팅된 배양 플레이트를 얻었다.
- <62> 실시예 18
- <63> 용액을 <sup>60</sup>Co 감마선(gamma rays)에 의하여 50 kGy의 조사선량으로 조사하는 외에는 실시예 3과 동일하게 하여 PVA/콜라겐 IV 하이드로겔이 코팅된 배양 플레이트를 얻었다.
- <64> 비교예 1
- <65> 콜라겐을 사용하지 않고 PVA만을 사용하는 외에는 실시예 1과 동일하게 하여 하이드로겔이 코팅된 배양 플레이트를 얻었다.
- <66> 비교예 2
- <67> 용액을 <sup>60</sup>Co 감마선(gamma rays)에 의하여 30 kGy의 조사선량으로 조사하는 외에는 비교예 1과 동일하게 하여 하이드로겔이 코팅된 배양 플레이트를 얻었다.
- <68> 비교예 3
- <69> 용액을 <sup>60</sup>Co 감마선(gamma rays)에 의하여 35 kGy의 조사선량으로 조사하는 외에는 비교예 1과 동일하게 하여 하이드로겔이 코팅된 배양 플레이트를 얻었다.
- <70> 비교예 4
- <71> 용액을 <sup>60</sup>Co 감마선(gamma rays)에 의하여 40 kGy의 조사선량으로 조사하는 외에는 비교예 1과 동일하게 하여 하이드로겔이 코팅된 배양 플레이트를 얻었다.
- <72> 비교예 5
- <73> 용액을 <sup>60</sup>Co 감마선(gamma rays)에 의하여 45 kGy의 조사선량으로 조사하는 외에는 비교예 1과 동일하게 하여 하

이드로젤이 코팅된 배양 플레이트를 얻었다.

<74> 비교예 6

<75> 용액을 <sup>60</sup>Co 감마선(gamma rays)에 의하여 50 kGy의 조사선량으로 조사하는 외에는 비교예 1과 동일하게 하여 하이드로젤이 코팅된 배양 플레이트를 얻었다.

<76> 실험예

<77> 제조된 하이드로젤의 물성 검사

<78> 겔화율

<79> 상기 각 실험예에 의해 얻어진 하이드로젤에서 가교 반응에 참여하지 않은 고분자를 제거하기 위해 제조된 하이드로젤을 37℃의 물에 48시간 이상 충분히 침지시킨다. 충분히 침지된 하이드로젤을 꺼내어 겔 표면의 물을 닦아낸다. 그리고 진공 오븐에 넣어 60℃에서 48시간 건조하여 무게를 잰다. 이 때의 무게가 가교된 겔의 무게이다. 건조된 겔의 무게를 W<sub>0</sub>로, 처음 사용한 고분자 무게를 W<sub>i</sub>로 나타낸다.

<80> 겔화율(%) =  $W_0/W_i \times 100$  --- (1)

<81> 상기 식 (1)을 이용하여 건조된 겔의 무게(W<sub>0</sub>)와 처음 사용한 고분자 무게(W<sub>i</sub>)로부터 겔화율을 계산하여 그 결과를 도 1에 나타냈다.

<82> 도 2는 각 실시예 및 비교예에 의해 제조된 하이드로젤의 팽윤도의 변화를 나타낸 그래프이다. 모든 하이드로젤은 전체 고형분의 농도가 15 wt%이다. 팽윤도는 방사선 조사선량이 클수록 감소하였으며, 도 1에서는 가장 낮은 겔화율을 보였던 실시예 1, 4, 7, 10, 13, 16에 따라 제조된 하이드로젤이 도 2에서는 가장 높은 팽윤도 값으로 200%를 보였다. 그 이유는 겔 내부에 3차원 망상구조가 많아지면 물을 함유할 수 있는 체적이 감소하기 때문이다. 따라서 가교가 많이 진행되어 겔화율이 높은 경우에 팽윤도는 겔화율과 반비례적으로 감소하였다.

<83> 겔강도와 연신율

<84> 상기 각 실시예에서 제조된 하이드로젤의 기계적 물성을 알아보기 위해 겔강도를 측정하였다. 조사선량 (25, 30, 35, 40, 45, 50 kGy)이 하이드로젤의 강도에 미치는 영향에 대하여 알아보았다. 겔강도는 TA-XT2 Texture-Analyzer(SMS Co Ltd., England)를 이용하여 측정되었다. 겔강도 측정에 이용된 시편의 두께는 3.0~3.5mm, 넓이는 20cm<sup>2</sup>로 제조하였다. F<sub>B</sub>은 하이드로젤이 파괴될 때의 힘, ΔD는 하이드로젤이 파괴될 때에 겔이 인장된 길이를 나타낸다.

<85> 겔강도 (g · cm) = F<sub>B</sub> × ΔD --- (2)

<86> 도 3과 4는 각 실시예 및 비교예에 따라 제조된 하이드로젤의 겔강도와 연신율을 보여준다. 상기 식 (2)에 의해 얻어진 겔강도는 조사선량이 증가할수록 커졌다. 그리고 비교예 1 내지 6에 따른 순수 PVA만을 사용한 하이드로젤이 150~240g · cm로 가장 높은 겔강도를 보였으며, 실시예 1, 4, 7, 10, 13, 16의 하이드로젤은 가장 낮은 겔강도를 보였다. 이것은 그래프에서 높은 겔화율을 보였던 경우의 하이드로젤이 겔강도 역시 높은 값을 갖는 것을 알 수 있었다. 그러나 연신율의 경우에는 겔강도나 겔화율과는 반대로 조사선량이 증가할수록 감소하였고, 비교예 1 내지 6에 따른 순수 PVA 하이드로젤의 연신율은 80~92%로 가장 낮은 값을 나타냈다. 이유는 가교가 진행될수록 고분자 사슬들이 겔 내부에 더 강한 망상구조를 형성하게 되기 때문이다. 따라서 겔강도는 겔화율과 비례적으로 증가하였고, 연신율은 반비례적으로 감소하였다.

<87> 세포점착도 시험

<88> 실험 방법은 각 실시예 1, 2, 3 및 비교예 1에 따라 하이드로젤이 코팅되어 있는 24 웰 플레이트에 1×10<sup>5</sup> cell/ml로 L929 및 HepG2를 각각 시딩(seeding)하여, 1 내지 4 일 간 CO<sub>2</sub> 인큐베이터(incubator)에서 배양한 후 배지(media)를 모두 제거하고 0.9% 생리식염수로 10분씩 2번 세척하였다. 마지막 세척 후 생리식염수를 완전히 제거한 후 2.5% 글루타르알데하이드(glutaraldehyde)를 넣고 상온에서 30분간 방치하여 고정되도록 하였다. 30분경과 후 다시 생리식염수로 10분씩 3번 세척하였다. 식염수를 완전히 제거 한 후 Giemsa's azur-eosin-methylene blue를 각 웰에 500μl 씩 가한 후 15분간 상온에 방치하였다. Giemsa's azur-eosin-methylene blue를 제거하고 생리식염수로 세척한 후 현미경으로 세포의 점착 모양과 양을 관찰하였다.

<89> 그 결과를 도 5 내지 8에 나타냈다. 상기 각 도면으로부터 L-929와 HepG2의 세포 모양들이 다 다를 수 있고, 1 내지 4일까지의 세포 증식률이 세포 종류에 따라 많이 차이가 남을 관찰 할 수 있다. 배양 후 4일에 이르러 세포들은 빠른 증식률에 의하여, 스캐폴드를 뒤덮는 모습을 보이고 있는데, 여러 스캐폴드들 중에서도 실시예 1의 스캐폴드에서 가장 안정한 세포 형태와 증식률을 보였는데, 그 이유는, 콜라겐 IV는 세포표면의 단백질과 서로 결속하고 있는 수많은 종류의 리간드(ligand)를 제공하여 세포가 잘 정착될 수 있도록 해 주어서 가장 높은 정착률을 보이는 것으로 사료된다. 콜라겐 IV의 높은 함유율이 세포 정착률이나 세포 모양 그리고 세포 증식률에 있어서 훌륭한 지지체 역할을 할 것이라는 결과를 얻을 수 있었다.

**발명의 효과**

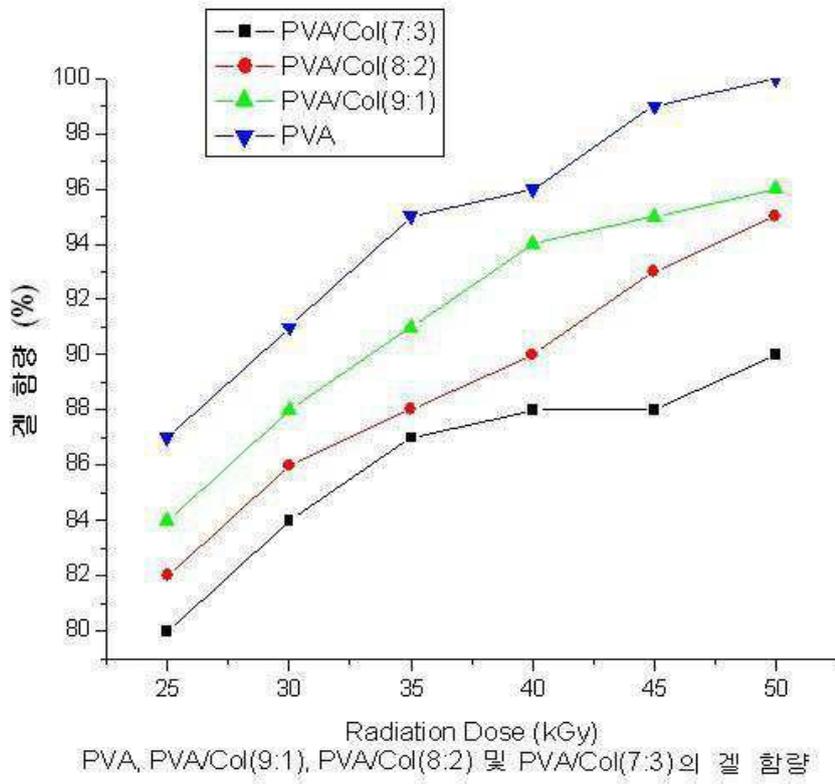
<90> 상기와 같이 구성되는 본 발명의 세포배양용 스캐폴드는 천연고분자로 생체내 기질의 주요소인 콜라겐 IV를 사용함으로 세포의 증착 및 증식능력이 뛰어나며, 또한 합성고분자인 폴리비닐알코올을 사용하여 겔강도, 팽윤도 및 연신율과 같은 스캐폴드로서의 물리적 성능이 보완되었으며, 세포배양용기의 내벽에 용이하게 코팅될 수 있다. 또한 상기와 같이 본 발명의 스캐폴드는 상기 구성분을 방사선조사에 의하여 혼합가교체로 제조함으로, 종래의 하이드로겔 제조를 위하여 사용한 화학적 가교 방법에 따른 단점으로 지적된 인체에 유해한 가교제나 개시제를 사용하지 않기 때문에 가교 후의 정제 단계를 배제할 수 있으며, 또한 본 발명의 방법에 따른 방사선 가교는 세포를 배양할 때 필수인 멸균 공정이 가교와 동시에 이루어짐으로, 종래의 화학적 가교와 달리 별도의 멸균을 수행할 필요가 없으며, 더욱이 본 발명의 방사선 가교는 열을 가하지 않아도 되고, 냉각상태에서도 가교가 가능한 특성이 있으며, 방사선 조사선량의 조절에 따라 조성물의 물성변화 없이 물리적 특성을 자유롭게 조절할 수 있는 장점이 있다.

**도면의 간단한 설명**

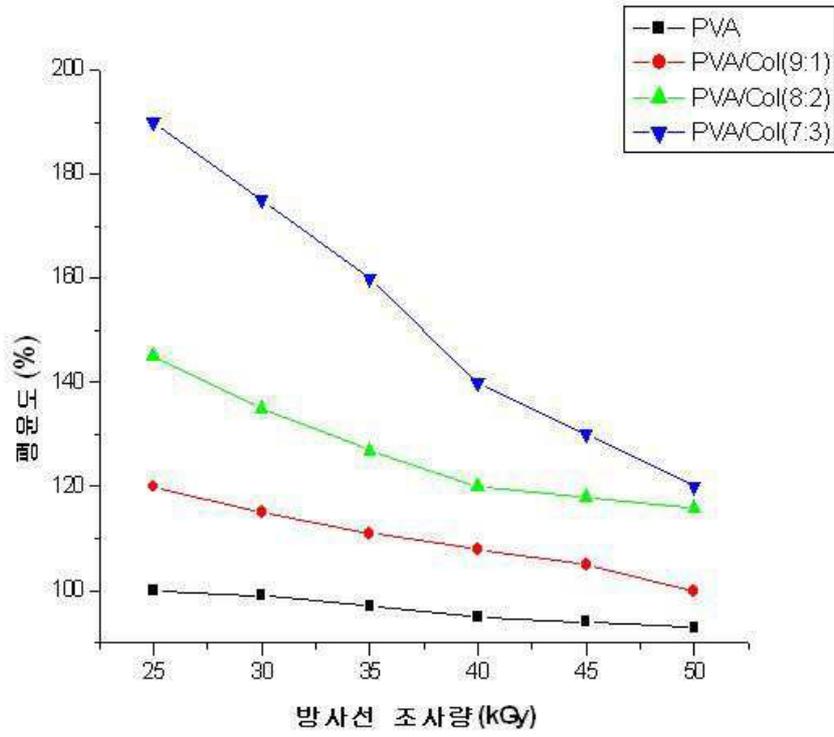
- <1> 도 1은 폴리비닐알코올과 콜라겐의 조성비 및 조사선량의 변화에 의한 겔화율을 나타내는 그래프이고,
- <2> 도 2는 방사선조사선량의 변화에 의한 하이드로겔의 팽윤도 변화를 나타내는 그래프이고,
- <3> 도 3은 방사선조사선량의 변화에 의한 하이드로겔의 겔강도의 변화를 나타내는 그래프이고,
- <4> 도 4는 방사선조사선량의 변화에 의한 하이드로겔의 연신율 변화를 나타내는 그래프이고,
- <5> 도 5는 하이드로겔 표면에 정착된 세포군(L-929)의 1일 배양의 결과를 나타내는 사진이고,
- <6> 도 6은 하이드로겔 표면에 정착된 세포군(HepG2)의 1일 배양의 결과를 나타내는 사진이고 ,
- <7> 도 7은 하이드로겔 표면에 정착된 세포군(L-929)의 4일 배양의 결과를 나타내는 사진이고,
- <8> 도 8은 하이드로겔 표면에 정착된 세포군(HepG2)의 4일 배양의 결과를 나타내는 사진이다.

도면

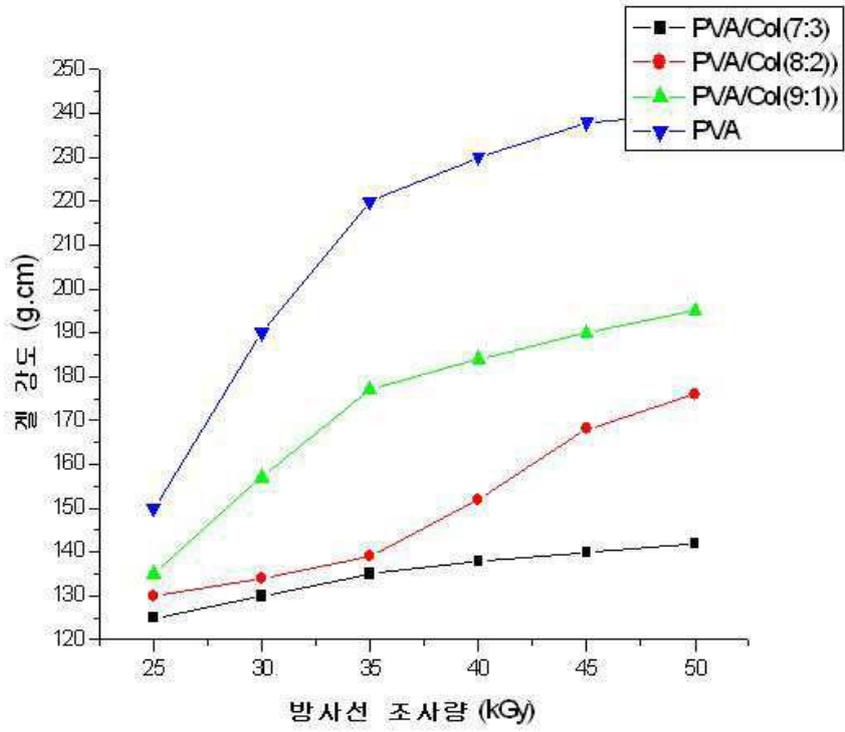
도면1



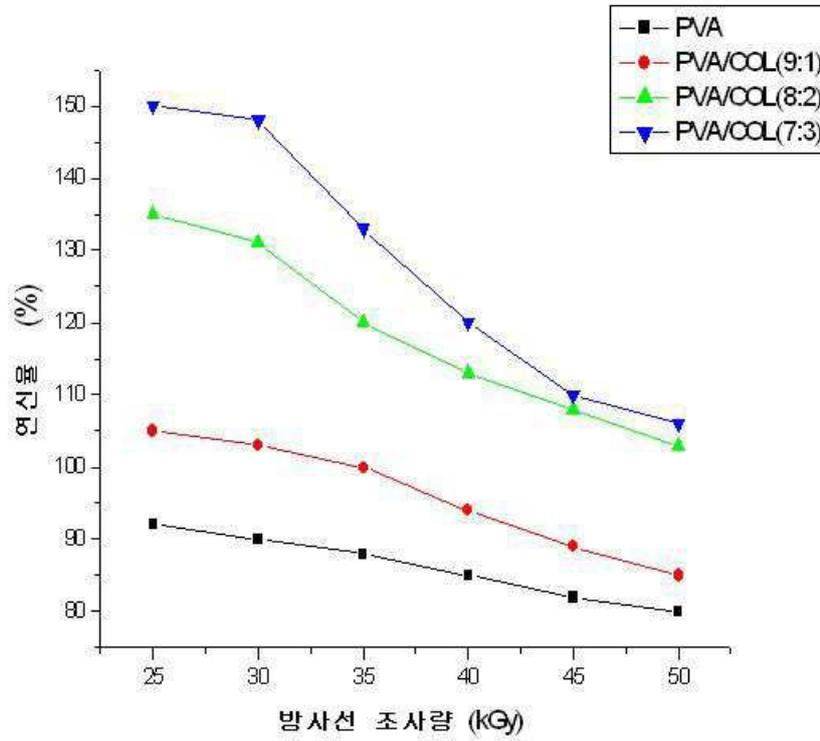
도면2



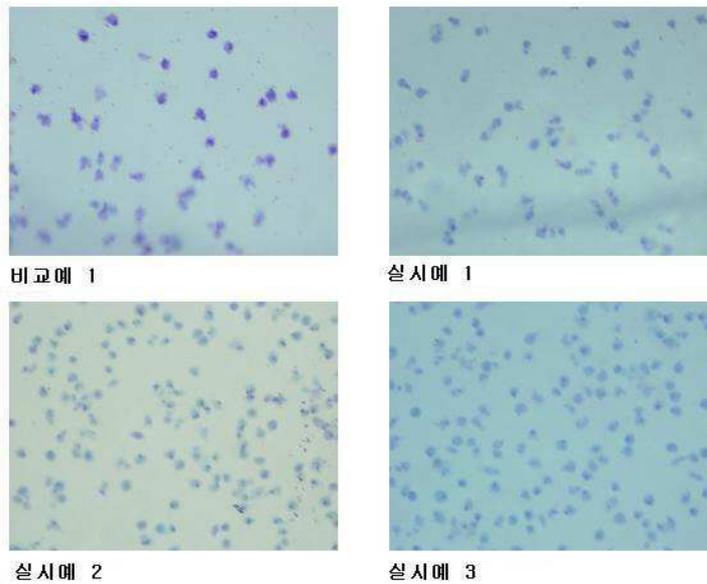
도면3



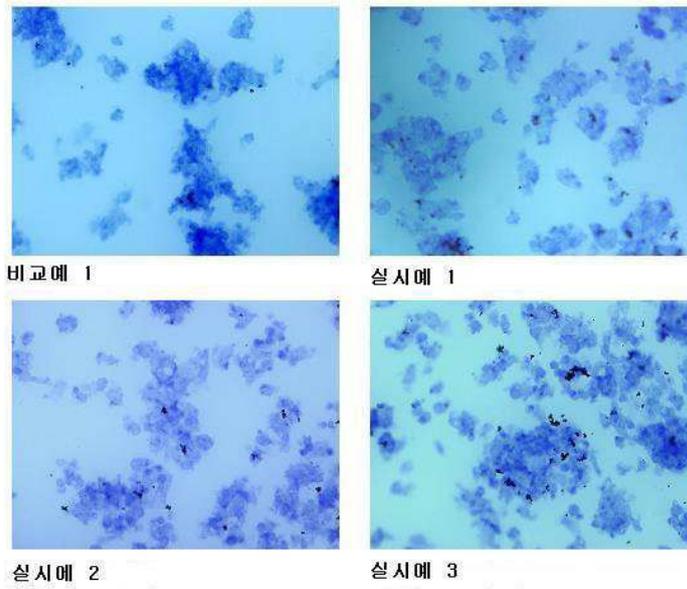
도면4



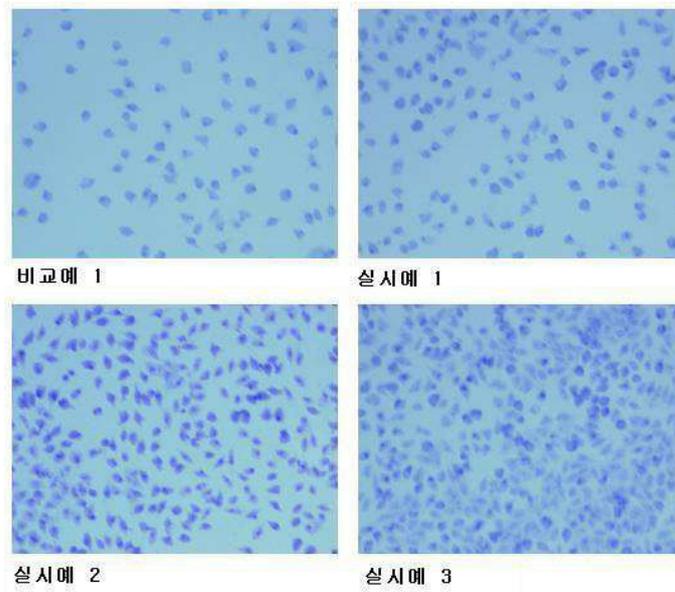
도면5



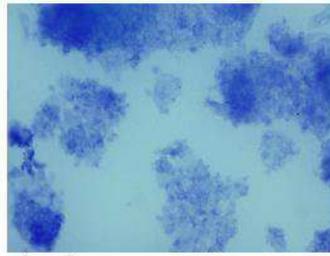
도면6



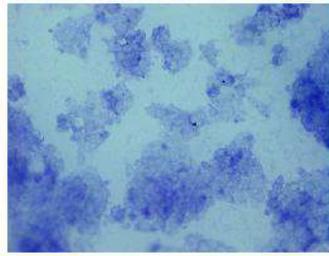
도면7



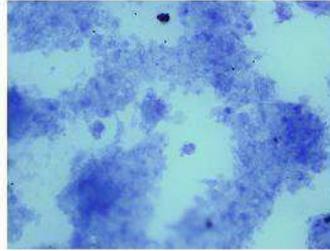
도면8



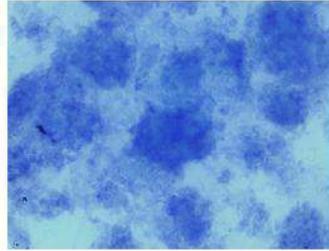
비교예 1



실시예 1



실시예 2



실시예 3