

Cytodex 1을 이용한 Microcarrier 배양법 에서의 세포의 증식성 조사

김재홍 · 이영옥 · 박봉균 · 남궁 선 · 최정옥*
가축위생연구소 · 전남대학교 농과대학*
(1986. 7. 30 接受)

Cultivation of Cells on Cytodex 1 Microcarrier Culture

Jai-hong Kim, Young-ok Ree, Bong-kyun Park, Sun Namgoong and Chung-ok Choi*
Institute of Veterinary Research
*Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture, Jeonnam National University**
(Received July 30th, 1986)

Abstract: Microcarrier culture technics are widely used for the massive production of the vertebrate animal cells. In this study, attempt was made to establish the microcarrier cell culture system using Cytodex. Various factors affecting the growth of cells on microcarrier culture were also discussed. In conclusion, the yield of cells in microcarrier culture was several times greater than those in roller bottle and flask culture methods, based on the volume of culture media.

서 론

동물세포배양기법은 각종 바이러스백신을 위시하여 효소, 홀몬 또는 기타 생물학적 활성물질의 생산을 위하여 널리 응용되고 있다.

척추동물유래 세포들은 anchorage-dependent이며 세포의 분열 및 증식은 반드시 배양용기의 표면에 부착되어야만 일어나기 때문에 세포의 대량배양을 위해서는 표면적이 큰 배양용기를 사용해야만 하는 단점을 지니고 있다.

van Wezel(1967)은 DEAE Sephadex A50을 세포배양액에 부유시키면 무수한 bead의 표면적 때문에 세포의 부착 및 증식을 위한 면적이 엄청나게 증가될 뿐만 아니라, 흡인용으로 부착된 동물세포의 부착은 더욱 강하게 일어나리라는 견해에 따라 DEAE Sephadex A50을 사용하여 세포배양을 시도하였던 바 배양된 세포들은 균질하였으며 세포의 수확량도 재래식 방법보다 더 많았다고 보고하였다. van Hemert 등(1969)은 DEAE Sephadex A50을 이용하여 배양한 세포는 바이러스의 증식에 응용할 수 있음을 시사하였다.

그러나 DEAE Sephadex A50은 양전하 부하용량이 너무 크기 때문에 세포의 종류에 따라 배양결과가 일정하지 않을 뿐만 아니라, 어떤 세포들에서는 오히려 독성효과가 나타남에 따라 세포의 대량배양에 이용될 수 없게 되었다(Levine 등, 1979).

최근에는 cross-linked dextran matrix에 N,N'-diethyl amino ethyl group을 대체시킴으로써 세포의 부착을 위한 양전하의 적당한 부하는 물론, bead의 표면적의 증가와 더불어 세포의 관찰이 용이하도록 bead를 투명하게한 제품들이 개발되어 세포의 대량배양에 이용되고 있다.

본 연구에서는 Cytodex(Pharmacia Fine Chemicals)를 이용, 계태아 섬유아(chicken embryo fibroblast, CEF) 세포 및 line cell의 배양을 시도하였으며, Cytodex를 이용한 microcarrier 배양에 영향을 주는 요인들을 논의하였다. 아울러 Cytodex microcarrier 배양에서의 세포수확량을 재래식 방법과 비교하였다.

재료 및 방법

배양용기의 silicon 도포 : Cytodex가 초자의 표면에

부착되는 것을 방지하기 위하여 배양용기나 피펫 등 모든 초자기구의 내면을 silicon으로 도포하였다. 즉 Sigmacote(Sigma Chemical Co.)로 초자기구의 내면을 적신 후, 건조시켰으며, 증류수로 2~3회 세척하여 고압멸균소독하였다.

Microcarrier 제조 : 일정량의 Cytodex분말을 silicon으로 도포된 초자병에 넣고 Ca^{++} , Mg^{++} free PBS(pH 7.2)을 Cytodex g당 50~100ml 가하여 최소한 3시간 이상 실온에서 교반하면서 팽창(swelline)시킨 후 30분간 정치, 상층액을 제거하였으며 다시 상기 PBS로 2~3회 세척하였다. 세척된 Cytodex는 g당 30~50ml의 PBS를 가하여 고압멸균(115°C, 15Lb, 15min)하였다. 멸균된 Cytodex 부유액을 세포배양액(중식용)으로 2~3회 세척한 후 세포배양용 microcarrier로 사용하였다.

세포의 작성 : CEF세포는 Witter 등(1969)의 방법에 따라 작성하였다. primary CEF 세포는 10일령의 SPF 계태아를 사용하여 만들었으며 secondary CEF세포는 1~2일간 Roux병에서 배양한 primary CEF세포를 trypsin-versene 용액으로 소화시켜 만들었다. Line cell로는 가족위생연구소에 보관중인 BT세포 및 MDBK 세포를 공시하였다.

Microcarrier 배양장치 : 배양 장치로는 bar-stirred bottle 및 microcarrier stirrer(Techne)을 사용하였다.

Microcarrier를 이용한 세포배양 : 125ml의 bar-stirred bottle을 사용, 배양액은 100ml로 고정하였으며, 필요한 양의 Cytodex 및 세포들이 포함되도록 하였다. 즉 microcarrier에 대한 세포의 부착율을 높이기 위하여 세포를 microcarrier 배양기에 접종한 후 총용량이 40ml가 되도록 배양액을 가하여 microcarrier stirrer를 사용 37°C에서 5시간동안 10rpm의 속도로 세포와 microcarrier를 혼합하였다. 그 후에는 microcarrier가 침전되지 않는 정도까지 교반속도를 증가시켰으며 24시간 배양 후 배양액 60ml를 추가하였다.

세포배양액의 교체 : 세포배양 후 24시간마다 배양병을 30분간 정치, 상층액의 약 1/3을 신선한 배양액과 교체하였다.

세포수의 계산 : van Wezel(1973)의 유리핵염색법(released and stained nuclei)으로 microcarrier 표면에서 증식하고 있는 세포의 수를 측정하였다. 즉 균질하게 부유되어 있는 microcarrier 배양액 1ml을 시험관에 채취, 원심분리(200×g, 5min) 한 후, 상층액을 제거하였으며, 0.1% crystal violet(w/v)이 함유된 0.1M citric acid용액 1ml을 가하여 37°C에서 1시간

동안 진탕한 후 hemocytometer로 세포에서 유리되어 염색된 핵의 수를 계산하였다.

결과 및 고찰

배지의 종류에 따른 각종 세포의 microcarrier 부착 효과 : Microcarrier를 이용한 세포배양에서 가장 중요한 단계는 접종한 세포의 microcarrier 부착이다. 즉 접종한 세포가 가급적 많이 부착되어야 할 뿐만 아니라 각 microcarrier의 표면에 균일하게 부착되어야만 배양된 세포도 균질한 것이며, 세포의 수확율도 커지기 때문이다. 또한 각종 조건에서의 세포의 부착율을 알아야만 세포의 접종량이나 배양기간을 결정할 수 있기 때문이다.

본 시험에서는 배지의 종류에 따른 접종세포의 microcarrier 부착율을 조사하였다. 즉 secondary CEF 세포배양을 위해서는 Cytodex 1의 농도가 3mg/ml되도록 하여 5×10^5 개/ml의 세포를 접종하였으며, BT 및 MDBK 세포의 경우 Cytodex 1의 농도는 1mg/ml, 접종세포수는 10^5 개/ml로 조정하여, 각각 5시간 동안 세포와 microcarrier를 교반한 후, 유리핵염색법으로 microcarrier에 부착된 세포수를 계산하여 부착율을 조사하였다.

Table 1에서와 같이 secondary CEF 세포의 경우 DME 배지에서의 부착율은 80%로서 $M_{199} + F_{10}$ 배지 보다 약간 우수하였다.

BT나 MDBK세포와 같은 line cell의 경우 부착율은 모두 우수하였으며 RPMI 1640배지에서의 MDBK 세포는 이미 세포가 증식되어 최초접종량의 150% 세포를 수확할 수 있었다.

Cytodex 1의 농도에 따른 세포의 증식성 : 세포의 분열 및 증식은 세포가 microcarrier에 부착되어 진행되기 때문에 최종 세포수확량은 Cytodex 1의 농도에 따라 좌우된다. 즉, Cytodex 1의량은 세포가 증식할 수 있는 표면적을 나타내기 때문이다.

Table 1. Attachment of Cells of Cytodex 1 Microcarrier in Various Culture Media

Cells	Seeding rate cells/ml	Attachment(%)			
		M199	DME	McCoy	RPMI 1640
CEF	5×10^5	68*	80	NT	NT
BT	10^5	84	83	77	93
MDBK	10^5	111	126	126	150

* Rate of attachment of cells on microcarrier at 5 hrs after cell inoculation.

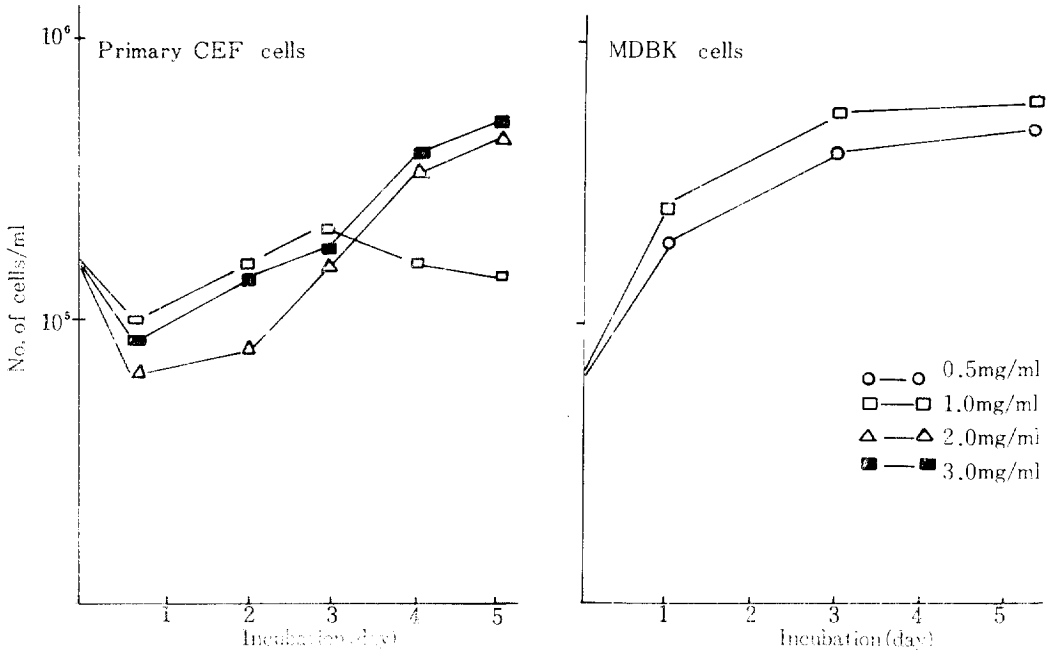


Fig. 1. Effects of Cytodex 1 concentration on the growth of primary CEF cells and MDBK cells in microcarrier culture.

그러나 Cytodex 1의 농도가 너무 높으면 세포부착단계에서 microcarrier가 가라앉아 균질하게 부유시키기가 힘들며, 세포가 부착하여 증식하더라도 단위용적당 세포농도가 너무 높아 많은 양의 lactic acid를 생성하기 때문에 쉽게 배지의 pH가 떨어지며 세포는 사멸한다.

본 시험에서는 세포의 계속적 증식을 피하며 상대적으로 세포수확량을 최대로 할 수 있는 Cytodex 1의 농도를 정하고자 하였다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이 primary CEF 세포의 경우 Cytodex 1의 농도 3.0mg/ml까지는 세포의 최종수확량이 Cytodex 1의 농도와 비례하였다.

그러나 배양초기단계에서는 Cytodex 1의 양이 적을수록 세포수확량이 상대적으로 높았다. 그 이유는 Cytodex 1의 양이 적으면 쉽게 부유되어 세포와 접촉할 기회가 많은 반면, 농도가 높을 경우는 같은 회전속도로 부유시켰을 때 가라앉은 microcarrier가 많기 때문에 일부분의 것은 세포와 접촉할 기회가 적어 microcarrier간의 세포부착율이 일정치 않은 데서 기인한다고 생각된다.

MDBK cell은 부착율 및 증식율이 너무 높아 2.0mg/ml 이상의 Cytodex 1의 농도로 배양했을 경우 배지의

pH유지가 어려웠으며 따라서 1.0mg/ml의 농도가 가장 적당하였다.

Microcarrier 배양에 있어 cell type에 따른 세포의 증식성 : Microcarrier 배양에 있어 primary CEF 세포 및 secondary CEF 세포의 증식성을 비교하였다. Cyto-

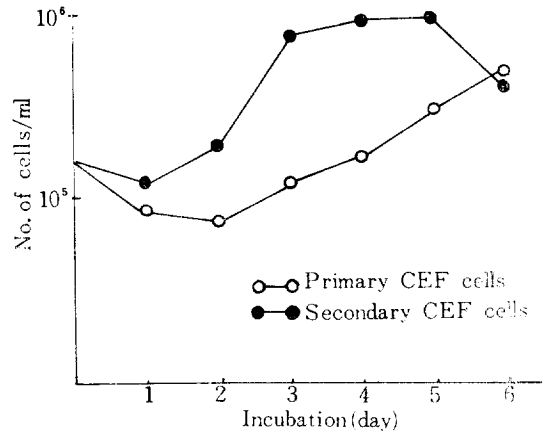


Fig. 2. Growth of primary and secondary CEF cells in microcarrier culture.

dex 1의 농도는 3.0mg/ml로 하였으며 세포는 2×10^5 /ml를 접종하였다.

Fig. 2에서와 같이 secondary CEF 세포의 경우 배양 4일에 단층세포가 형성된 반면, primary CEF 세포의 경우 배양 6일까지도 단층세포의 형성이 완전하지 못하였으며 세포의 탈락이 관찰되었다. secondary 세포는 primary 세포에 비하여 세포의 상태가 균질하기 때문에 세포의 microcarrier 부착 및 증식이 우수하였던 것으로 생각된다.

Cytodex 종류에 따른 세포의 증식효과: Cytodex는 Cytodex 1, 2, 3의 세종류가 시판되고 있으며 Cytodex 3은 denatured collagen으로 처리되어 있으며 세포의 부착율을 증가시킨다(Anonymous, 1981).

본 시험에서는 Cytodex 1과 Cytodex 3에서의 secondary CEF 세포의 부착 및 증식성을 비교하였다. 즉 Cytodex의 농도를 3.0mg/ml으로, 접종세포의 수를 2×10^5 /ml로 하였다.

Fig. 3에서와 같이 배양초기(접종후 1일)에는 Cytodex 3에서의 세포부착율이 높았으나 접종 3일후 세포의 수확량은 오히려 Cytodex 1이 높았다. Cytodex 3은 Cytodex 1에 비해 고가인 점을 감안하면 CEF세포나 line cell의 배양에 Cytodex 1의 이용이 바람직하였다.

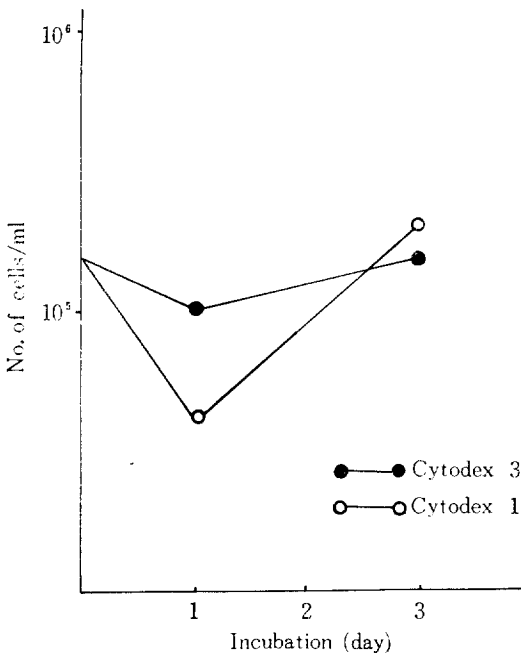


Fig. 3. The Growth of secondary CEF cells in Cytodex 1 and Cytodex 3 microcarrier culture.

세포접종량이 세포의 증식에 미치는 영향: 본 시험에서는 secondary CEF 세포를 사용하여 seeding rate에 따른 세포의 증식성을 비교하였다. 즉 Cytodex 1의 농도는 3mg/ml로 하였으며 세포의 접종량은 각각 2×10^5 /ml, 10^5 /ml, 5×10^4 /ml하여 세포의 증식성을 경시적으로 조사하였다.

Fig. 4에서와 같이 접종세포의 수가 2×10^5 /ml일때는 배양 7일만에 최고치에 도달했으며 초기 접종량의 10배 이상의 증식율을 보였다.

또한 5×10^4 /ml, 10^5 /ml의 세포를 접종한 경우, 세포의 수확율은 기대치에 미치지 못하였다.

이러한 성적들은 microcarrier를 이용한 세포배양에 있어, 조속한 시일내에 단층세포를 형성시키고자 한다면 접종세포수를 늘려야하겠지만 세포의 높은 증식율을 목적으로 한다면 접종세포수를 낮추어 장시간 배양 하더라도 함을 시사한다.

Microcarrier 배양법과 일반관행 배양법과의 세포증식성 비교: 일련의 실험을 통하여 적합한 배지, 세포의 성장, 세포접종량, Cytodex의 종류 및 농도 등 세포의 증식에 관여하는 제반요인들의 영향을 규명하였다.

본 시험에서는 secondary CEF 세포를 사용하여 microcarrier 배양을 시도하였으며 관행방법인 roller bottle 또는 flask 배양에서의 세포증식성을 비교하였다. 최종세포수확시기는 단층세포가 완전히 형성된 시기를 기준으로 하였다.

Table 2에서와 같이 최초세포접종량에 대한 최종세포수확량은 microcarrier 배양의 경우 9배에 달하였으

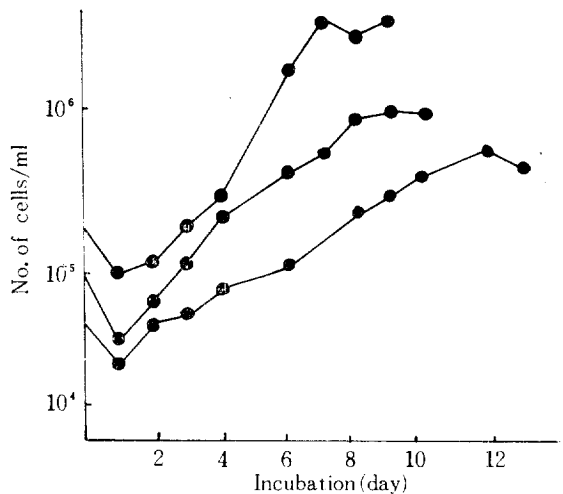


Fig. 4. Effects of seeding rate on the growth of secondary CEF cells in microcarrier culture

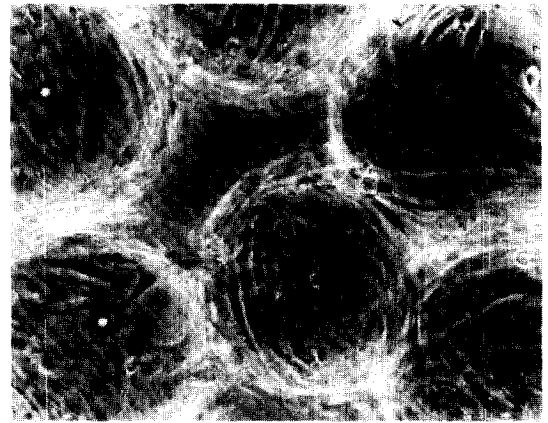
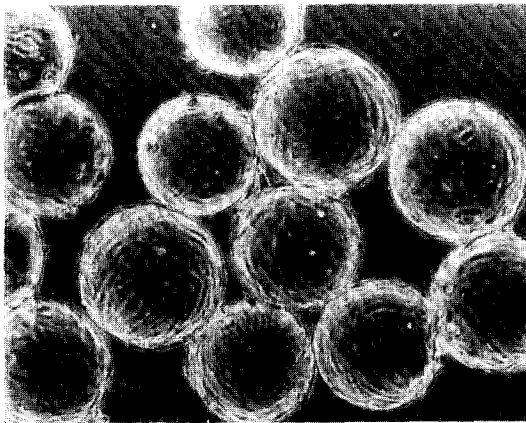
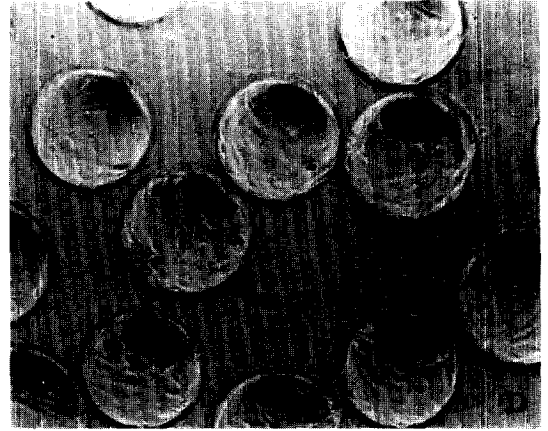
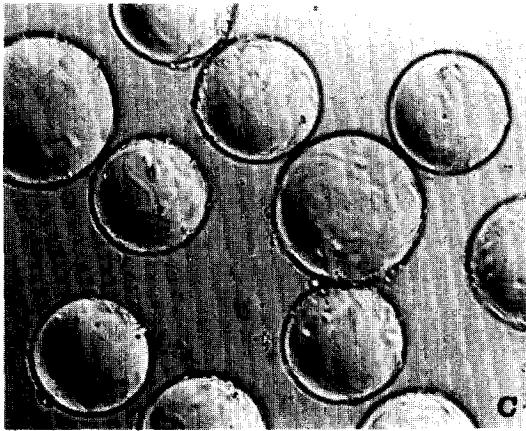
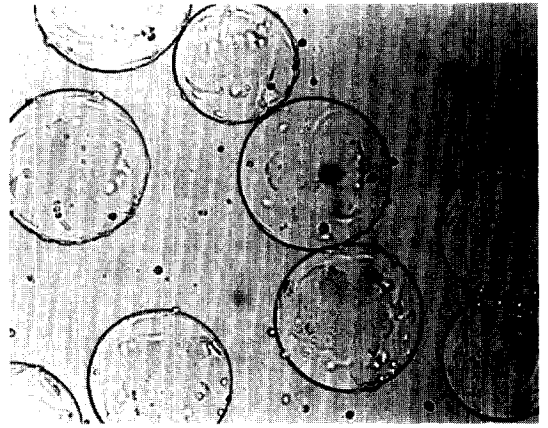
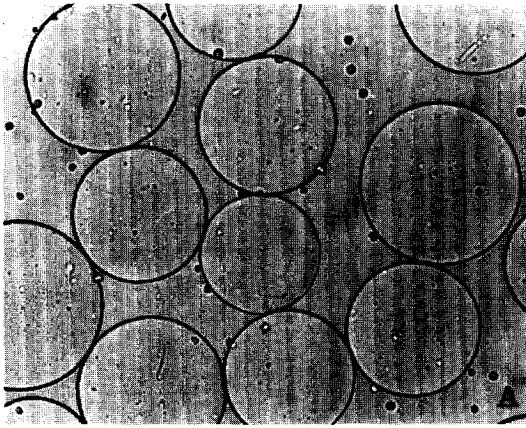


Fig. 5. The growth of secondary CEF cells on Cytodex 1 microcarrier culture; A. 0 hour, B. 5 hours, C. 1 day, D. 2 days and E. 3 days of incubation. D. further magnification of photo E.

Table 2. Growth of Secondary CEF Cells on Cytodex 1 Microcarrier, Roller Bottle and Flask

Cell	Culture vessel	Volume of culture vessel (cm ³)	Total surface area for cells (cm ²)	Total no. cells for seeding	Volume of medium (ml)	Total cell yield
CEF	Bar-stirred bottle	520	1,800*	2×10 ⁷	100	1.8×10 ⁸
	Roller bottle (10×20)	2,160	630	10 ⁸	100	8.8×10 ⁷
	Flask	750	150	10 ⁸	80	0.7×10 ⁷

* Calculated value of 0.3g of Cytodex 1 microcarrier.

나 roller bottle이나 flask 배양의 경우 0.88, 0.7로 오히려 낮았다.

최적조건의 microcarrier 배양인 경우, 배지의 양을 기준으로 한다면, 관행방법인 roller bottle이나 flask 배양법에 비하여 약 10배정도의 세포를 더 증식시킬 수 있었다.

결 론

Microcarrier 배양법은 척추동물유래 세포의 대량배양을 위하여 개발된 기법이다. 본 연구에서는 Cytodex를 이용한 microcarrier 배양기법을 확립하고자 하였으며, 세포의 증식에 영향을 미치는 요인들을 논의하였다.

결론적으로 최적 조건의 microcarrier 배양의 경우, 배지의 양을 기준으로 한다면 관행방법인 roller bottle이나 flask 배양법보다 약 10배정도의 세포를 수확할 수 있었다.

참 고 문 헌

Anonymous (1981) Microcarrier cell culture. pub. Pharmacia Fine Chemicals, A.B., printed by Almqvist and Wiksell Tryckeri, Upsala, Swe-

den, pp.372~377.

Levine, D.W., Wang, D.I.C. and Thilly, W.G. (1979) Optimization of growth surface parameters in microcarrier cell cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, 21:821~845.

van Hemert, P., Kilburn, D.G. and van Wezel, A.L. (1969) Homogeneous cultivation of animal cells for the production of virus and virus product. *Biotecnol. Bioeng.*, 11:875~885.

van Wezel, A.L. (1967) Growth of cell strains in homogenous culture. *Nature*, 216:64~65.

van Wezel, A.L. (1973) Microcarrier culture of animal cells. In *Tissue culture: Methods and Application*, (edit. by P.F. Kruse and M.K. Patterson) Academic Press, New York, pp.372~377.

Witter, R.L., Solomon, J.J. and Burgoyne, G.H. (1969) Cell culture technics for primary isolation Marek's disease-associated herpesvirus. *Avian Dis.*, 13:101~118.