

細胞操作 및 融合을 위한 靜電氣 관련 技術의 現況과 展望

문 재 덕

(경북대 공대 전기공학과 부교수)

차례

1. 序論
2. 細胞操作 및 分離
 - 2.1 電氣泳動法
 - 2.2 誘電泳動法
 - 2.3 不平等 進行波 電界法
 - 2.4 高勾配磁氣 分離法
3. 電氣的 細胞接合 및 融合
 - 3.1 化學的 細胞融合法
 - 3.2 Zimmermann法
 - 3.3 細胞融合裝置의 最近의 研究
4. 將來에의 展望
參考文獻

1. 序 論

細胞 및 遺傳子를 操作하여 人間에게 有用한 生物體나 抗生體를 만들고자 하는 生物工學技術(bioengineering technology)은 最近 各國의 여러 學者나 研究者들에 의해 크게 研究되고 있는 實情이다.¹⁻⁶⁾ 즉, 異種細胞를 交雜시켜 병균의 항체등을 만들던가, 耐寒性, 耐鹽性, 耐病虫害性 等 새로운 性質을 갖는 植物體를 만들던가, 또 生物工學의 획기적 技術이 될 수 있는 核酸(DNA)이나 염색체를 세포내에 導入시키는 기술, 맛이 좋고 生産性이 큰 動物을 出生시킬 수 있는 등 여러 分野에 큰 功績이 있어 기대되는 分野이기 때문이다.³⁻⁴⁾

이와같은 研究들은 生物 관련 研究者들에 의해 주로 遂行되어 오고 있으나, 細胞를 操作하기 위한 手段이 되는 裝置에 있어서는 最近 靜電氣 應用 技術이 基本技術(key technology)로서 크게 各광을 받고 있으며, 또 이미 同種뿐만 아니라 異種의 細胞까지도 實驗室內에서 融合시켜 培養할수 있는 지점까지 와있는 實情이며,⁵⁻⁷⁾ 멀지않아 産業化(commercial scales)까지 갈것으로 예견되기 때문이다.

靜電氣應用技術의 細胞操作에의 適用은 다음 두가지로 크게 나눌수 있다.

(1) 細胞의 力學的 操作(dynamic noncontact handling and controlling)에 관한것, 즉 적정세포의 分離, 選別 및 수송, 空間의 位置制御, 기타.

(2) 細胞의 融合, 세포내의 핵산이나 염색체등의 物質의 導入, 세포의 質的變化를 주는 것, 기타.

이 둘중에서 細胞操作技術로서 基本的인 것은 細胞의 操作과 分離(handling and controlling, separating and sorting)과 接合 및 融合(contacting and bridging, fusing)이라고 할 수 있겠다.

이와같은 기술을 확립하기 위해서는 電界와 細胞間의 力學的 相互作用, 매질중에 놓여진 세포의 운동, 세포내의 導電 및 分極現象 등을 확실히 할 必要가 있다. 그러므로 이들 現象의 기본이 되는 제반 電氣的 現象과 要因, 즉 直流로 부터 高周波에 미치는 넓은 周波數범위에서의 細胞의 有效誘電率(effective dielectric constant)과 導電率(conductivity)의 變化, 세포막의 미시적성질과 이것에 의해 發生하는 細胞의 電位나 電位分布의 變化등 기초과정의 解明 및 이와 相關한 연구실적의 축적등에 관한 연구 및 結果가 크게 필요하게 될것으로 사료된다.

본 해설에서는 지금까지의 세포操作技術을 위한 靜電氣應用技術의 現況과 앞으로의 研究展望에 대하여 간추려 記述하고자 한다.

2. 細胞操作 및 分離

액체매질중에서의 세포를 電氣的으로 操作 및 分離하는 方法으로는 다음의 네 가지로 大別할 수 있다.

- (1) 電氣泳動(electrophoresis)法
- (2) 誘電泳動(dielectrophoresis)法
- (3) 進行波電界(travelling wave electric field)法
- (4) 高勾配磁氣分離法

즉 (1)의 方法은 세포의 直流電界中에서의 移動速度的 差에 의해 分離를 행하는 것이며, (2)의 경우는 (1)의 直流電界가 아닌 交流不平等電界에 의하여 誘電體인 細胞에 강한 表面電荷密度差를 形成시키고 이에 의한 作用力의 差에 의해 分離하는 方法이다. (3)의 경우는 進行波回轉電界가 帶電된 세포에 미치는 힘을 利用하는 方法이며, (4)의 方法은 透磁率이 틀리는 粒子(細胞)를 高勾配 磁界中에서 磁氣力로 分離하는 方法이다. 이들 方法들을 좀더 구체적으로 설명하면 다음과 같다.

2.1 電氣 泳動法

電氣泳動(electrophoresis)法¹³⁾은 細胞表面에 存在하는 아미노酸 등의 分解에 의해 生成하는 세포간의 表面電位差를 緩衝液인 전해질중에서 인가한 直流平等電界下에서의 靜電力에 의한 移動速度的 差를 만들어 이를 利用하여 分離하는 方法이다.

그림1은 電氣泳動法에 의한 細胞分離裝置의 개략도를 나타낸 것이다. 分離槽는 媒質에 對流에 의한 亂流形成을 最小限으로 억제하기 위해 좁은 간격을 갖는 두장의 유리판으로 形成하고, 兩側에 이온交換膜을 거처서 左右로 電極槽를 形成하여 緩衝液을 흘림으로서 電氣分解에 의한 독성침입과 發生가스의 分離槽속으로의 들어움을 방지하게 하였다.

分離槽에는 電極槽에 의해 形成的한 直流平等電界가 形成된 緩衝液이 一定速度로 흐름을 만들어 흘러가는 속도에 分離하고자 하는 細胞懸濁液을 注入하게 되고, 이 현탁 세포들은 완충액속의 直流平等電界中에서 각 세포자체가 갖는 세포표면의 電荷量差에 의해 電氣泳動速度的 差를 만들고, 이에 따른 靜電作用力에 의해 左右로 分離되어 흘러가서 下面에 놓여 있는 90個의 분리시험관에 분리되어 채집되게 된다.

그림2는 이 電氣泳動法을 利用한 장치를 사용하여 사람의 血小板을 分離한 한 실험결과이다. 그림2에서 보

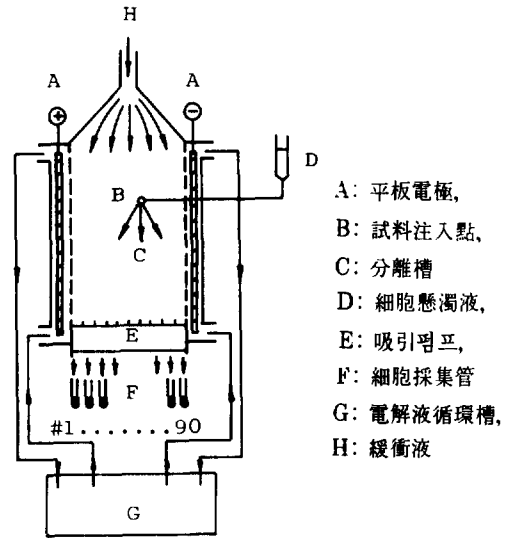


그림1. 電氣泳動法에 의한 細胞分離裝置圖

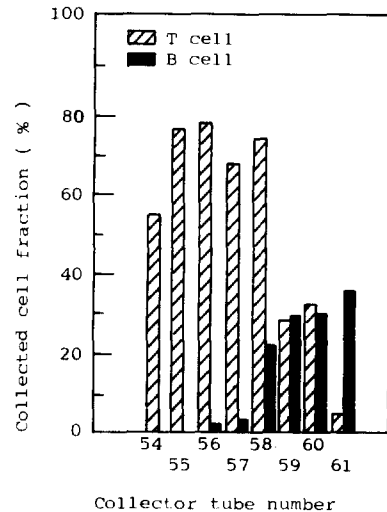


그림2. 電氣泳動法에 의한 人末梢血 血小板의 分離結果

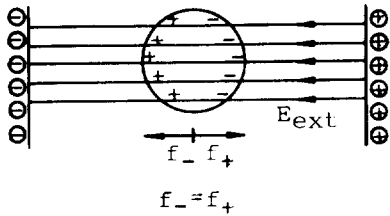
듯이 T 및 B 세포가 분리관번호 58부근에서 좌우로 잘 분리됨을 보여준다.

이 方法에 의해 細胞를 잘 분리하기 위해서는 分離하고자 하는 細胞間的 電荷量差가 어느 정도 存在하여 泳動速度差를 적어도 5% 이상 나게 해야 하며, 이를 위해서는 세포에 抗原抗體反應을 利用한 修飾을 행하여 表面電位를 變化시켜서 電氣泳動速度를 變化시키는 方法도 쓰이고 있다.

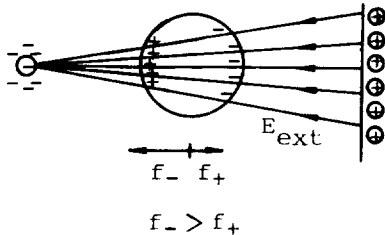
2.2 誘電 泳動法

電氣泳動法(electrophoresis)은 平等直流電界中에 놓여진 細胞들이 가진 電荷量의 差에 作用하는 靜電作用力의 差를 利用한 것임에 반해, 誘電泳動(dielectrophoresis)法¹⁾¹⁷⁾은 不平等交番電界와 細胞에 誘導된 電氣雙極子의 分極電荷密度差와의 相互作用에 의해 생기는 靜電力的 差에 의한 것이다. 이와같은 誘電泳動의 作用力은 以下에서 言及하듯이 電界의 方向에 의해서는 아무런 影響이 미치지 않음으로, 細胞의 有效誘電率(effective dielectric constant)을 높여서 細胞에 靜電作用力을 有效하게 作用시킬 수 있는 高周波電源이 一般적으로 使用되게 된다.⁴⁾

外部電界中에 놓여진 誘電體인 細胞는 誘導된 分極電荷에 의해 電氣雙極子로서 作用하지만, 만약 外部電界가 심한 不均等電界일 경우 그림3과 같이 雙極子兩面の



(a) uniform field



(b) nonuniform field

그림3. 誘電泳動의 原理圖 (f는 靜電作用力)

分極電荷密度差에 의해 電界가 作用하는 力의 큰 不平等이 생겨서 細胞에 作用하는 힘의 差가 생기게 되어, 電界가 密集한 쪽으로 힘이 作用하게 된다. 이때 생기는 靜電作用力 \vec{F} 는 式(1)과 같이 나타낼 수 있다.^{1) 10) 13)}

$$\vec{F} = (\vec{\mu} \cdot \nabla) \vec{E}_0 \quad (1)$$

단, 여기서 $\vec{\mu}$ 는 雙極子모멘트, \vec{E}_0 는 外部印加電界의 세기이다. 또 $\vec{\mu}$ 와 單位體積當의 分極 \vec{P} 와의 관계는 式(2)와 같이 나타낼 수 있으며, 또 \vec{P} 는 式(3)과 같이 나

타낼 수 있다.

$$\vec{\mu} = \alpha V \vec{E}_0 = V \vec{P} \quad (2)$$

$$\vec{P} = \epsilon_0 (k_2 - k_1) \vec{E}_1 \quad (3)$$

여기서 α 는 分極率, V 는 體積, ϵ_0 는 眞空中의 誘電率, k_1 및 k_2 는 媒質 및 細胞의 複素誘電率 그리고 \vec{E}_1 는 細胞 內部的 電界의 세기이다. 또 式(2) 및 (3)으로부터 半徑이 a 인 球形의 細胞에 대하여 解析的으로 α 를 구하면 式(4)와 같다.

$$\alpha = 3\epsilon_0 k_1^* \frac{(k_2 - k_1)}{(2k_1 + k_2)} \quad (4)$$

여기서 *表示는 복소공액을 나타낸다. 따라서 F 는 式(4)를 式(1)에 代入함으로써 式(5)와 같이 나타낼 수 있다.

$$\vec{F} = 2\pi a^3 R_e \left[\frac{\epsilon_0 k_1^* (k_2 - k_1)}{(2k_1 + k_2)} \right] \nabla |E_0|^2 \quad (5)$$

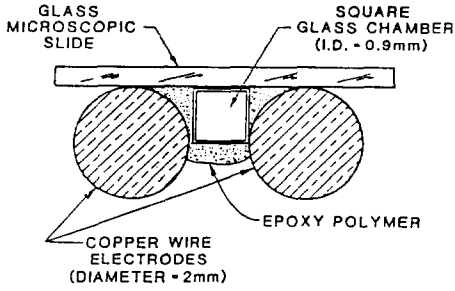
여기서 R_e 는 實數部를 나타낸다. 또 복소유전율 k 는 比誘電率 k' 과 導電率 a' , 電源의 角周波數 ω 를 使用하여 나타내면 式(6)과 같다.

$$k = k' - \frac{j a'}{\omega \epsilon_0} \quad (6)$$

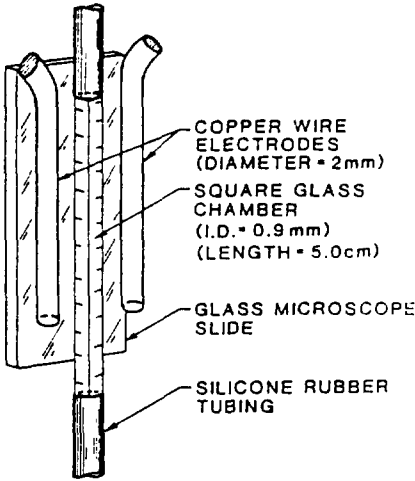
여기서 j 는 虛數單位이다. 式(5) 및 式(6)으로부터 靜電作用力 \vec{F} 는 媒質의 誘電率과 導電率, 使用電源의 周波數를 適當히 선택함으로써 式(5)의 $R_e[\epsilon_0 k_1^* (k_2 - k_1) / (2k_1 + k_2)]$ 部를 正의 값으로도, 또는 負의 값으로도 할 수 있음을 알 수 있다. 즉, 이 값이 正일때는 細胞는 電界의 강한 쪽으로 吸引되어 가게 되며, 負일때는 電界의 약한 쪽으로 끌려가게 되고, 만약 이 값이 零이 될 경우에는 細胞에의 靜電作用力은 없게 되어 静止狀態로 되게 된다. 그리고, 式(5)에서 보듯이 細胞에 作用하는 이 靜電作用力은 ∇E^2 에 比例하게 되므로 直流電界에 의한 電氣泳動法의 경우와는 달리 細胞가 갖는 電荷의 極性이나 外部電界의 方向에는 依存하지 않는 實用上의 매우 有用한 長點이 있다.

그런데 不平等電界를 만들어 細胞에 有效한 靜電作用力을 주기 위한 電極構造는 여러가지가 있을 수 있지만, 이것을 實際 細胞分離裝置로 쓰기 위해서는 細胞分離裝置內에서 細胞에 作用하는 靜電作用力이 裝置空間中에서 一定해야 함이 要望된다.(이와 같은 電界를 isomotive field라 한다.^{14) 15)} 이와 같은 조건을 만족시켜 주는 電極構造의 한 例가 그림4이다.¹⁾ 이 裝置는 슬라이드 유리판(slide glass)상에 固定된 두개의 直徑2mm의 백금을 도금한 구리선을 電界形成電極으로 使用하고, 이 電極間의 isomotive field에 놓여진 한변이 0.9mm의 단면이 사각형인 유리관속을 細胞分離空間으로 설정 사용한 것이다.

이 細胞分離空間內에서 ∇E^2 을 位置의 函數로 나타낸 것이 그림5이며, 分離에 이용되는 空間近邊에서 ∇E^2



(a) cross-sectional view



(b) dielectrophoretic fusion chamber

그림4. 誘電泳動에 의한 細胞分離裝置圖

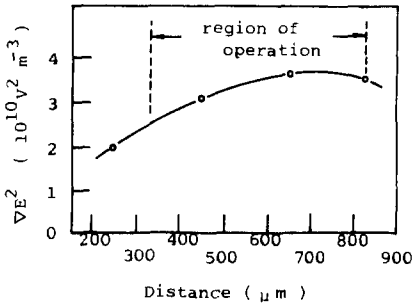


그림5. 細胞分離空間內에서의 ∇E^2 의 分布

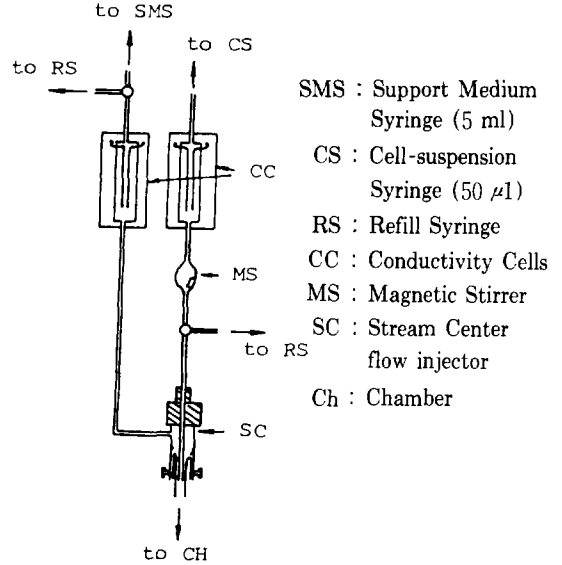


그림6. 誘電泳動法에 의한 細胞分離裝置의 細胞供給裝置

$=\text{const}$ 의 관계가 근사적으로 성립함을 보여준다. 그림6은 그림4의 細胞分離裝置에 세포를 공급하기 위한 장치 (cell feeder)이다.¹⁾ 이 세포공급장치는 세포를 分散시킨 懸濁液을 공급하는 系(그림의 右側)과 세포분리공간에 있어서 이 공간을 둘러싸듯이 흐르는 零圍氣流 (sheath flow)를 공급하는 系(그림의 左側)로 區分形成되어 있으며, 세포현탁액과 분리기류가 분리공간에서 同軸狀의 層流를 형성하도록 零圍氣流의 공급속도가 조절(대개 0.2mm/s정도) 되어 있다.

이와 같은 實驗의 한 結果를 소개하면 그림7, 8, 9를 들수 있다. 시험세포로서는 *Netrium digitus*와 *chlorella* (그림7참조)의 혼합물을 사용하였다. 이 두 종류의 세포는 實驗前에 充分히 水洗된 후 導電性 調節을 위해 一定量의 KCl 증류수용액중에 分散시킨후 다시 세포분리장치내의 분리공간에 공급되게 된다. 이 두세포는 장치내의 분리공간내를 통과함에 따라 각 세포의 誘電的 性質의 差에 의해 別個의 흐름(stream)을 形成하게 되어 分離되게 된다. 이 관계의 實驗結果를 나타낸 것이 그림8로서 細胞分離距離와 印加電界의 周波數關係를 나타낸 것이다. 그림8에서 보듯이 分離距離는 印加周波數의 變化에 따라 變하게 되어 어떤 最適값을 가지며, 본 實驗에서는 이 값이 100KHz부근임을 알수 있다. 이는 電界의 周波數變化에 따라 細胞의 實効比誘電率이 變하기 때문에 추측된다.⁴⁾ 또 分離距離를 印加電壓의 函數로 나타낸 것이 그림9로서, 分離距離는 印加電壓

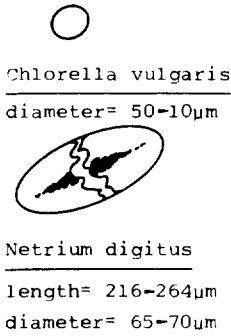


그림7. 實驗에 사용된 細胞

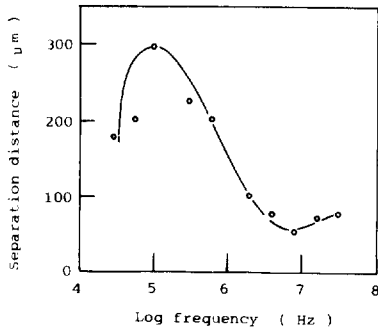


그림8. 印加電源周波數에 따른 分離距離

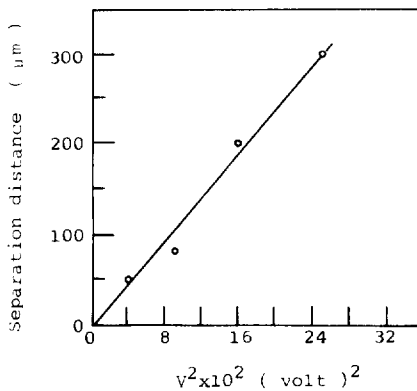


그림9. 印加電壓에 따른 分離距離

(\propto 印加電界)의 二乘에 비례해서 크짐을 알 수 있으며, 이는 이미 前述의 式(5)에서 言及한 바 있다.

2.3 不平等進行波 電界法

前述의 誘電泳動法에 의한 方法은 不平等電界에 의해 세포면에 生成된 誘電分極電荷에 作用하는 靜電作用力의 差를 이용한 것이나, 不平等進行波電界法(nonuniform

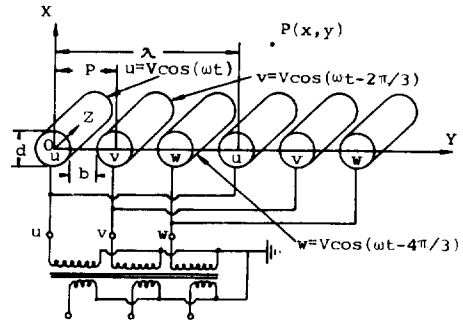


그림10. 不平等進行波電界 形成電極構造

travelling wave electric field method)¹⁴⁾⁻¹⁶⁾은 세포가 갖는 單極性的 電荷에 作用하는 靜電력을 이용한 것이다.

不平等電界는 그림10에서 보듯이 平面上에 나열된 棒狀의 電極系를 形成시키고 이것에 三相交流電壓을 공급함으로써 얻어진다. 이와 같은 電極構造로 얻어지는 電界는 式(7)및 式(8)로 나타내어 진다.¹⁴⁾

$$E_x(X, Y) = E_0 \left[\sum_{m=1,4,7,\dots}^{\infty} \exp(-mk|X|) \cos \psi_m \cos(\omega t - mkY) + \sum_{m=2,5,8,\dots}^{\infty} \exp(-mk|X|) \cos X_m \cos(\omega t + mkY) \right] \quad (7)$$

$$E_y(X, Y) = -E_0 \left[\sum_{m=1,4,7,\dots}^{\infty} \exp(-mk|X|) \cos \psi_m \sin(\omega t - mkY) - \sum_{m=2,5,8,\dots}^{\infty} \exp(-mk|X|) \cos X_m \sin(\omega t + mkY) \right] \quad (8)$$

여기서 $k=(1/3)P$, P 는 電極間의 間隔, E_0 , ψ_m , X_m 은 定數이다. 式(7)및(8)에서 電極板上의 電界 E_x 및 E_y 가 $m=1, 4, 7, \dots$ 의 前進波 및 $m=2, 5, 8, \dots$ 의 後進波의 合으로 나타나 짐을 알 수 있다.

이와 같은 電界中에 놓여진 帶電粒子(細胞)에는 四個의 힘이 作用하게 되며, 이 네개의 힘 즉, 靜電力, 重力, 浮力 및 粘性力의 和로서 各各 細胞에 作用하게 된다. 이 힘의 代表的인 모-드(mode)를 模式的으로 나타낸 것이 그림11이다.¹¹⁾ 여기서 靜電力은 印加電源의 周波數와 電極의 形狀에, 重力 및 浮力은 粒子 및 媒質의 比重이나 粒子의 體積에, 粘性力은 粒子의 形狀과 媒質의 粘性係數에 의해 各各 依存하기 때문에 이들간의 파라미터依存性的의 差를 적절히 이용하면 여러 종류의 粒子(細胞)들을 分離할 수 있게 된다.

그런데 세포가 分散되어 있는 매질은 보통 導電性을 갖기 때문에 그림10과 같은 導體電極을 細胞懸濁液속에 設定挿入함으로써 매질액의 電氣分解現象을 發生시켜서 細胞의 分離가 有效하게 얻어지지 않을 뿐만 아니라, 細胞를 死滅시켜 버리는 수도 있음을 豫想할 수 있게 된다. 이와 같은 事情은 誘電泳動法도 마찬가지이다. 그림

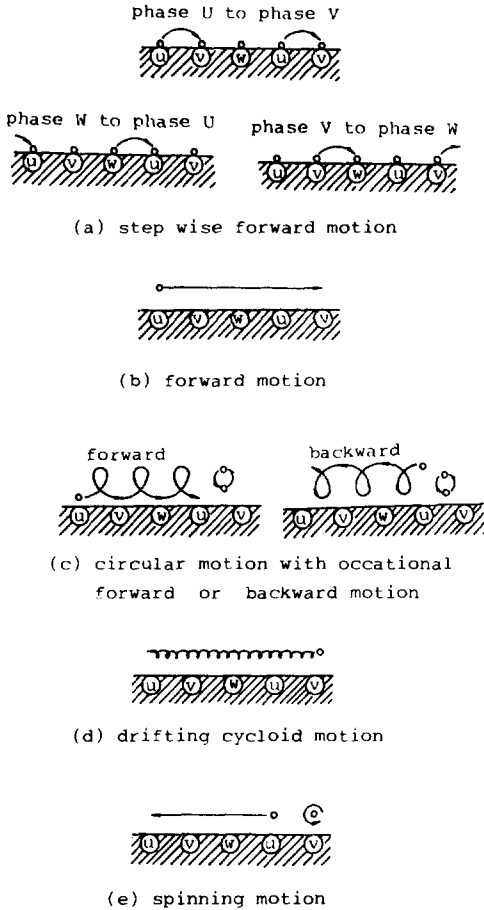


그림 11. 進行波電界中에 놓인 粒子의 運動

4에 나타낸 分離裝置에서 分離空間을 유리관으로 둘러싸서 電極과 媒質이 直接 接하는 것을 피한 것은 이와 같은 이유에서이다. 따라서, 이 絶緣物을 存在로 말미암아 낮은 周波數의 電界는 媒質中까지 도달하지 못하므로 周波數를 어느 정도(약 100KHz)로 올려서 유리관의 靜電容量을 통해서 매질중으로 전계를 공급하고 있다.

不平等進行波電界法은 印加電界의 周波數에 同期되어 作用하는 粒子의 運動이 本質이기 때문에 이와 같은 높은 주파수를 사용할 수는 없게 된다. 그러므로 電氣分解에 의한 妨害作用을 없애기 위해 비전계성의 매질을 사용하던가, 또는 電極의 크기를 매우 적게하던가 하는 방법을 일반적으로 사용한다. 왜냐하면 直徑이 매우 작은 電極을 使用함으로써 印加電壓을 電氣分解가 일어나지 않는 1V程度以下の 電壓으로 낮게 할수 있게 되며, 이와 같은 때는 電極間의 間隔을 매우 작게 함으로 매

질중의 電界의 세기는 細胞의 電氣力學的 運動을 충분히 일으킬 수 있게 할수 있게되기 때문이다.¹¹⁾

2. 4 高勾配 磁氣分離法

誘電泳動法은 不平等電界中에 놓여진 誘電體粒子(細胞)의 誘電分極을 이용하는 方法인데 반해, 高勾配磁氣法¹²⁾은 不平等磁界속에 놓여진 磁性體의 磁氣分極(magnetic dipole moment)를 이용한 것이다. 이 경우에는 誘電泳動法의 靜電作用力과 유사한 磁氣作用力이 發生하게 되고, 이 磁氣作用力 \vec{F} 는 式(1)과 같은 形式으로 式(9)와 같이 導出해 낼수 있다.

$$\vec{F} = (\vec{\mu}_m \cdot \nabla) \vec{H} \quad (9)$$

여기서 \vec{H} 는 磁界의 세기, $\vec{\mu}_m$ 은 磁氣雙極子모멘트이며, 이 값은 半徑이 a인 粒子에 대하여 적용하여 정리하면 式(10)과 같이 나타낼 수 있다.

$$\vec{\mu}_m = 4\pi a^3 \frac{\mu_2 - \mu_1}{\mu_2 + 2\mu_1} \mu_1 \vec{H} \quad (10)$$

여기서 μ_1 및 μ_2 는 매질 및 입자의 透磁率이다. 따라서 式(9), (10)에서 투자율이 틀리는 粒子(細胞)의 分離가 可能함을 알수 있다.

이와 같은 原理를 이용한 研究結果의 한 例로서 血液中の 赤血球의 分離를 行하며, 헤모글로빈(haemoglobin)의 磁化率(1-比透磁率)은 3.9×10^{-6} 이기 때문에 통상의 高勾配磁氣分離에서 쓰이는 전형적인 파라미터에 대해 式(9)의 磁氣作用力은 重力(=mg)에 비해 數白倍에 달하므로 용이하게 分離해 낼수 있게 된다. 또 이 高勾配磁氣分離法을 이용하면 常磁性인 酸素와 結合하지 않은 헤모글로빈과, 反磁性인 酸素와 결합한 헤모글로빈(oxyhaemoglobin)과의 分離도 가능한 것으로 알려져 있다.¹³⁾

3. 電氣的 細胞接合 및 融合

細胞의 操作 및 融合技術(cell-to-cell fusion technology)은 最近 病原體의 抗體生産의 手段, 特性이 좋은 雜種細胞의 形成, 核酸이나 蛋白質의 세포내에로의 導入의 手段¹⁴⁾등으로서 現在 매우 각광을 받고 있는 分野中の 하나이다. 즉 세포벽이 없는 原形質體(protoplast)는 세포간의 융합에 의해 多核細胞가 될수 있는 性質을 가지고 있으며,³⁰⁾ 이와 같은 性質을 이용하여 세포간의 융합을 일으켜 새로운 合成生物(somatic hybrid)을 얻을 수 있기 때문이다. 세포의 융합에는 裸出原形質體間같이 세포끼리 스스로 융합이 일어날수 있는 自發的 融合과 融合誘導劑(fusogen)로 처리 해야만 융합할수 있는 人爲的 融合이 있다. 本 解説에서는 주로 인위적 세포융합에 대하여 언급하기로 한다.

지금까지 쓰여온 인위적 세포융합방법으로는 HVJ virus나 高分子物質인 polyethylene glycol등을 이용한 시험관내의 세포융합을 행하는 방법¹⁸⁾⁻²⁰⁾이 주로 쓰여왔으나, 이 방법은 融合收率이 나쁘며, 융합시키고자 하는 세포간만의 순수한 한쌍의 융합체(즉 A+B)의 취득이 어렵고 잡종(A+A, B+B, A+B+A, ... 등)이 많이 생기며, 일단 생성된 융합세포의 후속처리도 매우 어려운 등의 결점이 있다. 이에 반해 전기적 세포융합²¹⁾⁻²⁴⁾은 이와 같은 결점을 극복할 수 있을 뿐만 아니라 polyethylene glycol이 세포에게 주는 독성등의 문제점이 없기 때문에 최근 매우 큰 注目을 받고 있어서 各國의 여러 學者 및 研究者들에 의해 많은 研究가 遂行되고 있는 實情이다.²⁶⁾⁻²⁹⁾

3.1 化學的 細胞融合法

高分子物質인 polyethylene glycol을 이용한 化學的 細胞融合法¹⁷⁾⁻¹⁹⁾은 誘電泳動法이 開發되기 이전까지는 가장 유력한 세포융합수단으로 크게 쓰여왔다. 이 polyethylene glycol을 써서 세포융합을 하는 구체적 段階와 過程으로 설명하면 다음과 같다.

먼저 polyethylene glycol을 융합하고자 하는 세포A, B가懸濁되어 있는 용액중에 첨가하여 처리하면 그림12의 a, b와 같이 두개 또는 그 이상의 原形質體가 서로 가깝게 接近(10Å이내의 거리)하게 되고, 따라서 接合(contact)하게 되며, 이 접한된 부분에서 그림12의 c, d

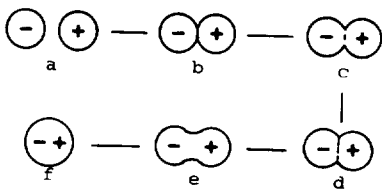


그림 12. 原形質體間的 融合過程

와 같이 原形質體間的 結合(bridge)이 일어나게 된다. 다음에 球狀의 homo 혹은 heterokaryon을 形成한 原形質體 結合部가 擴張되면서 그림12의 e, f와 같이 原形質體 融合이 이루어지게 된다. 다시 희석용액을 처리하면 原形質體 復歸現象이 일어나면서 原形體 流動을 시작해서 원형으로 되어가서 원형질은 3~10시간후에 완전히 융합하게 된다.³¹⁾⁻³⁷⁾

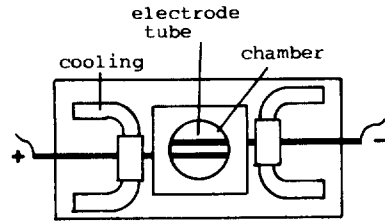


그림 13. 誘電泳動法을 이용한 細胞融合裝置

3.2 Zimmermann法

일반적을 매질내의 두 원형질을 융합시키기 위해서는 먼저 두 원형질을 급접시켜 접합시켜야만 한다. 그러나 電氣的으로 表面에 陰電荷를 띄고 있는 原形質體間的 接合은 어떤 化學的 處理(例 polyethylene glycol처리 등) 또는 電氣的 作用力을 주지 않고는 容易하게 接合시킬수 없게 된다. 獨逸의 Zimmermann은 그림13과 같이 白金鑢金을 한 가는 구리선(直徑 2mm)을 좁은 간격(약 0.2mm)을 두고 平行으로 설정하고, 또 이 電極間에 세포융합방을 설정하여 도전율이 낮은 무기염용매중에 융합하고자 하는 두 세포를 주입한 후에, 高周波電源으로부터 電界(isomotive field)를 인가함으로써 세포간을 近接시켜 接合을 유도시킨후, 순차적으로 단극성 펄스 전압을 인가함으로써 接合部의 原形質膜(phospho-lipid bilayer)의 국소적트짐(local break-down)을 유도하게 하여 그림14와 같이 두 原形質膜間的 結合(bridge)이 이루어지게 하며, 마침내 球形으로 融合(fusion)되게 하였다.^{3) 4) 10)}

實際 이 방법을 이용한 세포융합과정을 구체적으로 설명하면 다음과 같다.¹¹⁾ 먼저 융합해야 할 A, B의 세포를 증류수속에 현탁시켜 酸素 pronase에 의해 처리를 행한후, 水洗一遠心分離를 충분한 抵抗率(10kΩcm以上)이 얻어질 때까지 계속반복한다. 이것을 그림13과 같은 두개의 線電極間에 설정된 세포융합방내로 도입시킨후 電極間에 400V/cm, 1MHz정도의 高周波電界를 인가한다. 그러면 前述한 原理 즉 誘電泳動(dielectrophoresis) 現象에 의해 전극간에 細胞鎖가 그림12의 b 또는 그림14의 a와 같이 形成된다. 이때 전극상의 球細胞들은 그림15와 같은 珍珠列이형성력(珠玉列形成力, pearl-chain forming force)³⁸⁾이 생기게 되고, 이 珠玉列이 形成된 후에 인가전계를 700V/cm 정도로 상승시켜서 珠玉列細胞間的 接合力을 더욱 강하게 만든후, 7KV/cm, 50 μs 정도의 單極性的 強力한 펄스전계를 인가함으로써 接合部位(세포직경의 약 1/1000정도임)에의 集中電界를 形成시킴으로써 세포막의 국부트짐(local break-down,

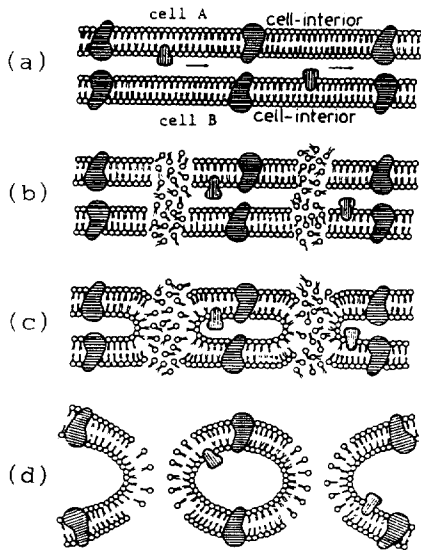


그림 14. 原形質體模間的 融合過程

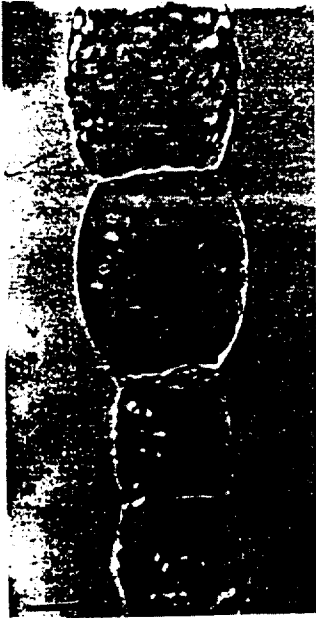


그림 15. 세포융합방에서의 4원형질체간의 融合

그림 14의 b)을 誘發시켜 두 세포간의 内部連結(internal bridging)을 일으켜서 내부결합(그림 12 및 14의 c)이 이루어지고, 마침내 최종적으로 세포융합(그림 12 및 14의 d)이 일어나서 완성되게 된다. 따라서 이 융합세포를 배양(culture)하여 새로운 잡종(somatic hybrid)을 만들어 내게 된다.

3.3 細胞融合裝置의 最近의 研究

Zimmermann에 의해 처음 개발된 세포융합장치^{3), 6), 10)}는 細線狀의 平行電極으로 만들어져 있어서 根源의으로 현미경하에서 手作業으로 장치를 조작할수 밖에 없어서, 비록 A+B의 순수한 한쌍의 세포(pure one-to-one hybrid cell)를 조작획득할수는 있게되나, 이를 얻기위해서는 비록 숙련가라 하더라도 많은 작업시간과 노력이 소모되게 되며(약 10² cell/day), 만들어진 융합체(somatic hybrid)를 처리하는 등의 작업(moving, picking-up and screening) 또한 지극히 어려운등의 단점이 있다.⁶⁾ 따라서 좀더 高融合收率을 가지며 信賴性和 量産性이 있는 장치의 개발이 크게 要望되고 있는 실정이다.

그림 16은 이와 같은 기본요구를 만족시키기 위한 최근의 한 연구결과⁷⁾로서, 半導體製作技術을 이용하여 만든 小形의 세포융합장치이며, 그림 17은 본 세포융합장치의 製造過程을 나타낸 것이다. 그림 16의 양입구에 각각 세포 A 및 B가 현탁된 용액이 도입되면 壓電素子(piezoelectric transducer)를 이용한 소형펌프가 있어서 세포

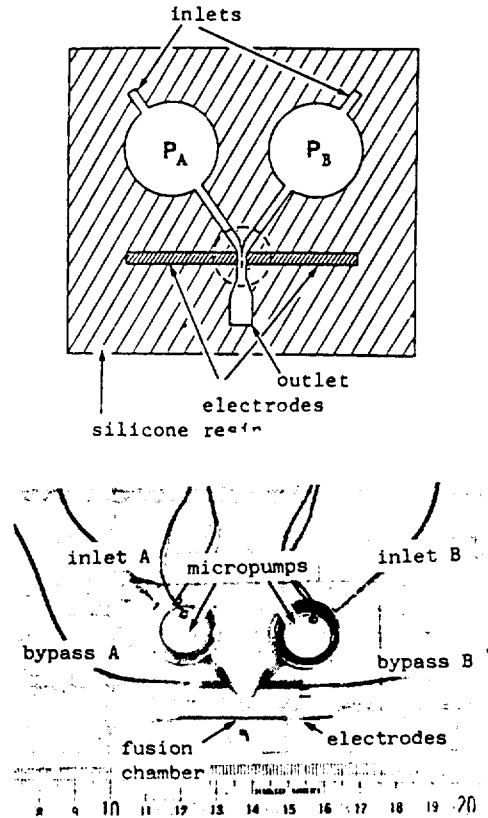


그림 16. 最近의 誘電泳動 細胞融合裝置

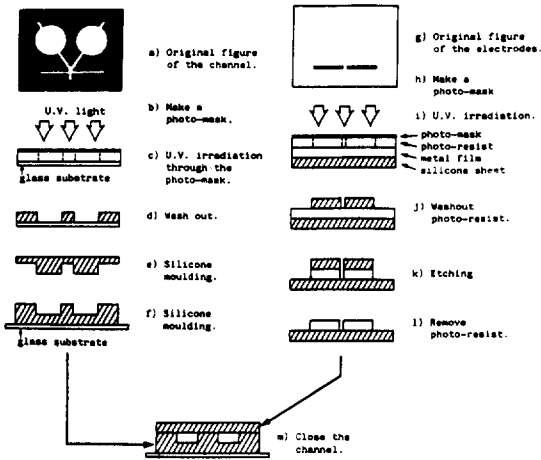


그림 17. 세포융합장치 製造方法

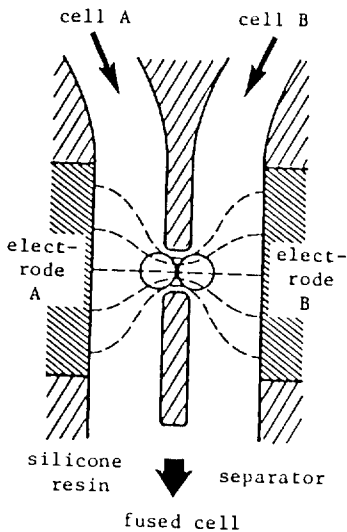


그림 18. 세포융합방의 擴大圖

A 및 B를 각각의 통로를 통해 세포융합방으로 수송하게 된다. 그림18은 그림16의 圓形點線部分을 크게 확대한 그림으로, 集中電界를 形成시켜 電界의 큰 편차를 만들게 하는 세포융합방(fusion chamber)의 확대 개략도이다. 그림18에서 보는 바와 같이 세포융합방은 한쌍의 電極間의 中心에 絶緣板이 삽입되어 있어서 A 및 B의 세포가 각각의 通路(약100 μ m)를 통하여 들어 올수 있게 되어 있으며, 兩電極間의 中心軸上을 연결하는 線上 中心部の 絶緣板에 작은 구멍(약 30 μ m 정도)이나 있으며, 兩通路를 통해 마이크로펌프에 의해 수송되어 온 세포가 인가전계(0~30V/cm, 2MGZ)의 集中에 의한 전

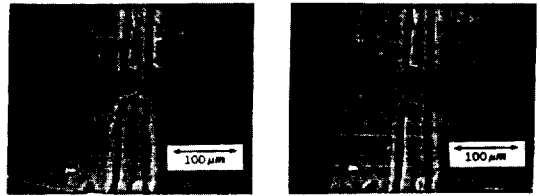


그림 19. 實際細胞融合 寫眞

계편차에 의해 그림에서와 같이 융합방의 中心에서 세포가 接合하게 하는 곳이다. 이 세포융합방에 세포가 들어와서 인가고주파전계에 의해 세포가접합하게 되면, 곧 펄스전원(0~30V, 20~100 μ s)으로부터 강력한 單極性펄스가 인가되어 접합된 세포벽부분에 큰 집중전계를 걸게 되어서 국소적트짐을 만들게 되고 이곳을 통해 양 세포가 융합하게 된다. 그림19는 세포융합방에서의 집중전계인가로 접합된 후의 사진(그림의 (a))과 단극성 펄스電界印加後의 융합된 세포사진(그림의 (b))이다.

4. 將來에의 展望

이상 言及했듯이 電氣의 細胞操作및 融合方法은 지금까지의 高分子物質인 polyethylene glycol을 쓰는 化學的方法에 비해 독성이 없으며, 융합세포의 收率이 높으며, 操作이 有效한 點등의 長點이 많기때문에 그 應用可能性이 인정되어 앞으로의 研究結果가 크게 기대되는 실정이다. 그러나 現在 이 方面의 研究는 1980年 生物學者인 Zimmermann에 의해 시작되었으나, 電氣工學分野의 見地에서는 이제 막 시작된 단계에 불과하며 細胞의 電氣의 性質, 細胞의 分離및 分類(separating and sorting), 操作(handling and controlling), 나아가 融合(fusion) 및 뒷처리(after handling for culture)등을 행하기 위해서는 印加電界의 세기, 電源의 周波數, 電極의 物理的 形狀등은 물론, 溶媒의 電氣의 物性, 細胞膜內外의 電氣의 性質등 수많은 研究가 수행되어야 하겠다. 이때 반드시 염두에 두어야 할 것은 電氣의 最適條件이 반드시 微生物學的 見地에서 본 細胞自體에게도 最適條件이 되지 않는 點이며, 또 逆으로도 말할 수 있는 點이다.

이와 같은 두 分野의 相互 學問的 境界面에 있는 研究分野는 원래 兩分野의 專門家가 協力해서 總合的인 見地에서 출발하여 相互有機的 研究시스템을 形成하여 研究해 나감이 매우 바람직한 것으로 사료된다.

따라서 將來의 展望 또한 今後의 研究에 기대되는 것도 크지만 아직 未開發分野로서 laser, electron beam, x-ray 등의 細胞操作에의 應用이나 핵산 그 자체의 조작등도 새로운 연구과제로 대두 될 것으로 豫想된다. 또 工學的인 立場에서 보면 현재까지 거의 대부분 手作業

으로만 행해지고 있는 세포의 조작, 선별, 분리, 융합, 세포내에로의 핵산이나 단백질의 도입, 핵산의 처리등에 前述이 전기역학적 방법이나 펄스인식, 자동제어, robot 등의 手法 및 技法을 도입적용함으로써 생산성을 비약적으로 올리면서도 정확하고 정밀한 세포의 조작 및 융합 등의 기본기술을 확립할 수 있게 될 수 있을 것으로 예측된다.

끝으로 이 분야의 무한한 발전을 빌며, 젊고 참신한 아이디어를 가진 後學들의 끊임없는 참여와 도전을 바라마지 않으며, 본 해설이 이와 같은 뜻으로 조금이라도 기여할 수 있기를 간원하는 바이다.

참 고 문 헌

- 1) H.Pohl and K. Kaler: Cell Biophysics, 1. (1979) 15
- 2) H.Pohl, K. Pollock and H. Rivera: Int.J. of Quantum Chem, Quantum Biology Symposium, 11 (1984) 327
- 3) U. Zimmermann, P. Scheurich, G. Pilwat and R. Benz: Agnew. Chem. Int. Ed. Engl. 20 (1981) 325.
- 4) H. A. Pohl and J. K. Pollock: Dielectrophoretic Cell Sorting, 細胞操作のための 静電技術, 1985년 第二회 シンポ ジウム, 東京 (1985년 10월 14-15일), 1-18
- 5) 勝本元地: 哺乳動物의 頭微操作, 静電氣學會誌, 10, 3 (1986) 164
- 6) U. Zimmermann and J. Vienken: Electric Field - Induced Cell-to-cell Fusion, J. of membrane Biology, 67 (1982) 165
- 7) S. Masuda, M. Washizu and T. Nanba: Novel method of Cell Fusion in Field Constriction Area in Fluid Integrated Circuit, Record of IEEE IAS Meeting 1987. (1987) 1549
- 8) B. Naton, W. Mehrle, R. Hampp and U. Zimmermann: Mass Electrofusion and Mass selection of Functional Hybrids from Vacuolate X Evacuolate Protoplasts, Plant Cell Reports, 5 (1986) 419
- 9) G. Bates, J. Gaynor and N. Shekhawat: Fusion of Plant Protoplasts by Electric Fields, Plant Physiol, 72 (1983) 419
- 10) U. Zimmermann and P. Scheurich: High Frequency Fusion of Plant Protoplasts by Electric Fields, Planta 151 (1981) 1110
- 11) 静電機シンポジウム 実行委: 細胞操作のための 静電技術, 1985년 第一회 シンポ ウム, 労働産業安全 研, 東京 (1985년 4월 19일)
- 12) ibid, 1985년 第二회 シンポ ジウム, 學士會館, 東京, (1985년 10월 14-15일)
- 13) 鷺津正夫: 静電氣應用技術의 最新動向 - 바이오操作への 應用例, OHM (1984/4) 49
- 14) S. Masuda and T. Kamimura: Approximate methods for Calculating a Nonuniform Travelling Field, J. of Electrostatics 1 (1975) 351
- 15) 増田閃一, 岩垂正宏: 進行波カーテンによる 細胞分離, 静電氣學會講演論文集, 28p c2 (1984) 264
- 16) 増田閃一, 鷺津正夫: 電界カーテンによる 細胞分離의 理論, ibid, 19p A7 (1985) 128
- 17) 輕部征夫, 民谷榮一: 電壓パルスによる 細胞操作, ibid (1986) 157-163
- 18) M. Ito: Studies on the Behavior of Moiotic Protoplasts II, Plant Cell Physiol 14 (1973) 863
- 19) K. Kao: A Method for Fusion of Plant Protoplasts with Polyethylene Glycol, Cell Genetics in Higher Plants, (1976) 233 (Akademiai Kiado, Budapest)
- 20) D. Evans, O. Gambory, J. Shyluk and L. Wetter: Somatic Hybrid Plants from Protoplasts of Nicotiana tabacum and Nicotiana glauca and with Lycopersicon, Int. Assoc. Plant Tissue (Abstract) (1978) 70
- 21) 鷺津正夫: 電界による 細胞操作技術, 静電氣學會誌, 10, 3 (1986) 150
- 22) J. Vienken, U. Zimmermann, R. Ganser and R. Hampp: Vesicle formation during Electro-fusion of mesophyll Protoplasts of Kalanchoe daigremontiana, Planta 157 (1983) 331
- 23) M. Tempelear and M. Jones: Fusion Characteristics of Plant Protoplasts in Electric Fields, Planta 165 (1985) 205
- 24) G. Bates: Electrical Fusion for Optimal Formation of Protoplast Hetero-karyons in Nicotiana, Planta 165 (1985) 217
- 25) 정재동, 이하정: 가지와 식물의 원형질체 배양에 의한 식물체 분화 농사시험연구논문집 (산학협동편) (1986) 47
- 26) 増田閃一: 静電氣의 未來를 見つめて, 静電氣學會誌, 10, 6 (1986) 363
- 27) 鷺津正夫: 바이오 關連分野における 静電技術의 役割と「細胞操作の ための 静電技術」特別研究委員會의 活動, ibid (1986) 507
- 28) 水野彰: 細胞における 電界技術의 適用, ibid (1986)

511

- 29) 勝木元地: 細胞操作技術の 現状, *ibid* (1986) 147-149
- 30) 鄭載東: 高等植物의 原形質體 遊離, 融合 및 培養, 慶北大學校 40周年紀念 Symposium 特集號 (1986) 45-71
- 31) E.C. Cocking: *Microbial and Plant Protooplasts*, J.F. Peberdy et al(Editors), Academic Press, London, (1976) 189-200
- 32) L.C. Fowke, P.J. Rennie, J.W. Kirkpatrick and F. Constabel, *Can. J. Bot.* 53 (1975) 272-278
- 33) G. Gosch and J. Reinert, *Protoplasma*, 96, (1978) 23-38
- 34) B.W.W. Grout, J.M.M. Willison and E.C. Cocking: *J. Bioenerg.*, 4 (1972) 311-328
- 35) G. Melchers: *International Cell Biology*, 1976-1977, B.R. Brinkley and K.R. Porter(Editors), The Rockefeller University Press, Boston, MA (1977) 207-215
- 36) T. Nagata and G. Melchers: *Planta*, 142 (1978) 235-238
- 37) 慇谷: 電氣細胞融合法, *Medical Immunology*, 9, 2 (1985) 271-275
- 38) 静電氣學會編: 静電氣ハンドブック, オーム社 (1981) 259-265