

부착성 동물세포의 대량배양을 위한 젤라틴 미립담체의 개발

박 정 극
동국대학교 공과대학 화공학과

Development of Solid-Gelatin Microcarrier for Large Scale Production of Anchorage-Dependent Animal Cell Lines

Jung-Keug Park
Dept. of Chem. Eng., College of Eng. Dongguk University

ABSTRACT

Solid gelatin microcarrier with the size distribution between $100\mu\text{m}$ and $400\mu\text{m}$ was prepared for the attachment and growth experiment for anchorage-dependent animal cell lines, i.e., L 929 and BHK 21. The growth and the maximum cell densities on this gelatin based and polyacrylamide (PAA) microcarriers were compared with those on the commercial dextran based Cytodex 3 microcarrier. Both cell lines showed good comparable attachment and growth patterns on the above three microcarriers. The mouse fibroblast, L 929 showed about the same maximum cell density on PAA, gelatin and Cytodex 3 MC'S BUT BHK 21, the baby hamster kidney cell line, showed the best result on Cytodex 3, which was about 4×10^5 cells/ml with the microcarrier concentration of 10 g/l.

서 론

자연 또는 유전자 재조합에 의해 변형된 동물세포의 배양을 통한 유용물질(백신, 호르몬제, 인터페론, TPA, 단일세포군 항체 등)의 생산기술이 발전함에 따라 부착성 동물세포의 정착 및 성장 면적을 제공하여주는 미립담체(microcarrier)의 개발이 최근들어 활발히 진행되어왔다. 1967년 Van Wezel(1)이 상업적인 ion-exchange resin인 DEAE-Sephadex A-50 bead를 이용하여 최초로 부착성세포의 배양을 성공한 이래 현재까지 수십종류의 상업적 또는 비상업적 microcarrier가 개발, 시판되어왔다. 그러나 그 판매가격이 너무 비싸고 제조기술이 보편화되지 못하여 대량세포 배양에 따르는 경제성 고려의 필요성과 아울러 성능이 우수하면서도 값싼 microcarrier의 국내개발이 요청되고 있다. 우수한 MC의 요건은 i) 표면성질(전기적 전하(+) 또는(-), 다공성 등) ii) 비중(1.03-1.05) iii) 크기($100-200\mu\text{m}$) iv) 광학적 투명도 v) 독성 여부 vi) 탄력성 vii) 살균 용이도 등으로서 가능하면 열거한 모든 각요건이 충족되어야 한다. MC의 Matrix로는 dextran(2), Polyacryl-amide(3), Gelatin(4),

Polystyrene(3), Cellulose (3), glass (5) 등이 사용되었다. 또한 크기는 MC의 표면에 전기적 전하를 띄는 ionic MC와 전하를 띄지 않는 nonionic MC로 구분할 수 있다. 그중에서 non-ionic MC의 대표적인 Collagen (혹은 Gelatin) MC는 다음의 몇가지 장점을 지니고 있음으로써 본실험에서 개발 및 사용되었다. i) Gelatin MC는 Collagenase 효소에 의해 쉽게 세포를 수확할 수 있고 이렇게 탈착을 시킨 세포는 ionic MC에서 탈착된 세포보다 높은 plating efficiency를 가진다. (6) ii) Collagen MC는 양전하를 띤 ionic MC에 비해 적용량의 Serum protein을 흡착한다. (8)

재료 및 방법

Gelatin미립담체의 제조

7.5%(W/V) gelatin 용액을 121°C 에서 약15분간 autoclaving하여 완전히 녹인 후 60°C 의 oven에 보관하여 사용하였다. 10%(V/V) SPAN 85(or SPAN 80)을 첨가한 toluene을 cold chamber에서 충분히 냉각시킨후 조금 빠르게 교반하면서 한방울씩 gelatin용액을 떨어뜨린다. 최종 toluene phase와 gelatin solution의 volume 비율이 10

:1이 되도록 한다. 형성된 droplets가 충분히 gellation이 되도록 cold chamber내에서 서서히 교반하며 overnight시킨다. 이때 혼합된 solution은 탁한 우유빛을 띄게 된다. Gellation이 완전히 끝난 후 bead를 깔아 앉히고 상등액을 덜어내고 Cold Methanol을 2차례 첨가하여 toluene을 세척하고 다시 Methanol을 제거하기 위하여 냉각 증류수로 2차례 세척한다. Gelatin bead volume의 약 3배가 되는 냉각 증류수에 bead를 resuspend하여 25% glutaraldehyde를 첨가하여 cross linking 반응을 진행시킨다. 이때 최종 glutaraldehyde의 농도는 0.3~0.5%를 유지하여 교반을 중지시킨채 실온에서 약3시간 정도 방치시키면 gelatin bead는 서서히 노란색을 띄게 된다. 반응이 끝난 후 상등액을 덜어내고 증류수로 glutaraldehyde를 충분히 세척한다. 0.15M NaCl 용액에 bead를 resuspend시키고 121℃에서 약 15분간 autoclaving한후 50~60℃의 건조 oven에서 건조시킨후 필요한 size의 screen mesh로 100-400μm size의 bead를 회수한다.

세포부착 및 성장실험

세포배양배지로는 Glutamine이 첨가된 DMEM에 5% EBS(L929) 또는 10% FBS(BHK·21)를 첨가하여 사용하였다. 세포배양 장치로는 250 ml spinner flask에 media volume은 100 ml를 사용하였다. 미립담체들을 10 g/l가 되게 각각 준비하여 autoclave한후 혈청이 첨가되지 않은 배지로 충분히 씻어낸후 사용하였다. 접종후 처음 15시간 동안은 매시간마다 2분동안만 30 rpm으로 간헐적인 교반을 하였고 세포가 완전히 부착한 후에는 30 rpm으로 연속교반을 하였다. Cell counting 방법으로는 van Weqel에 의해 수정된 Sanford et al.의 nucleicounting method를 사용하였다. (9, 10). 72시간 배양후에는 매일 40%의 배지를 새배지로 교환하여 줌으로서 nutrient의 고갈이 없게 하였다.

결과 및 고찰

그림(1-a)는 Solid Gelatin 미립담체의 Size 분포를 보여주는데 대부분 100-400μm의 범위에 속한다. 그림(1-b)에서 보듯이 배양후 5일 후에는 거의 L 929 세포주가 젤라틴 microcarrier의 표면에 confluent하게 부착된 것을 볼 수 있다. 그림2에서는 BHK 21 세포주의 각각의 다른 종류의 미립담체에서의 성장정도를 비교 하였다. 이 경우는 초기접종농도가 2×10^5 cells/ml였으며 미립담체의 농도는 10g/l였다. 최대세포농도는 PAA와 젤라틴 미립담체의 경우 약 1.4×10^6 cells/ml로 거의 비슷하였으며 Cytodex 3에서는 4×10^6 cells/ml로서 3배 정도의 높은 세포성장을 보였다. 그림3에서는 L929 세포주의 성장곡선을 비교하였는데 PAA와 젤라틴에서는 약 5×

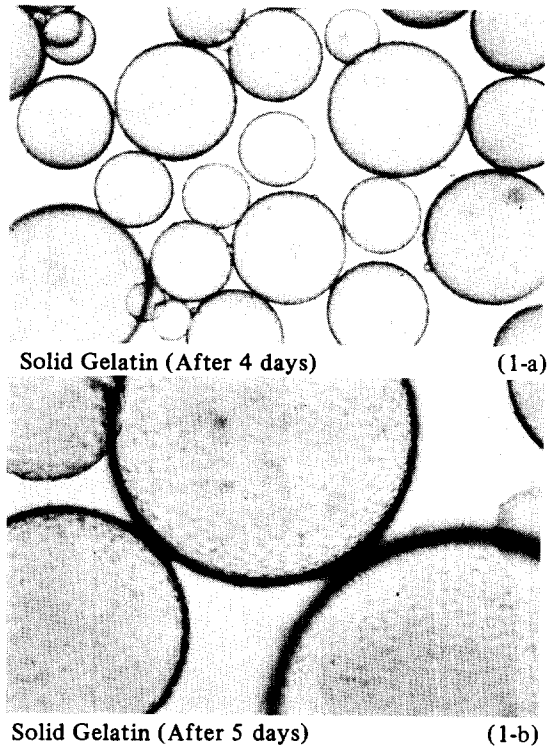


Fig. 1. Solid Gelatin Microcarrier bead (1-a), The growth of L929 on the solid gelatin microcarrier.

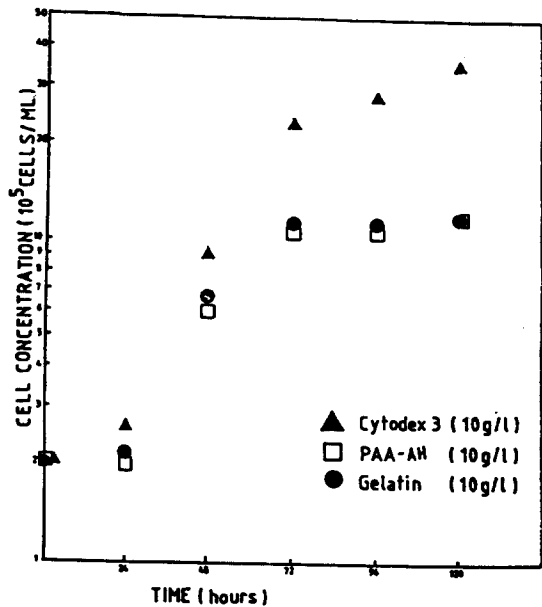


Fig. 2. Growth of BHK 21 in microcarrier culture.

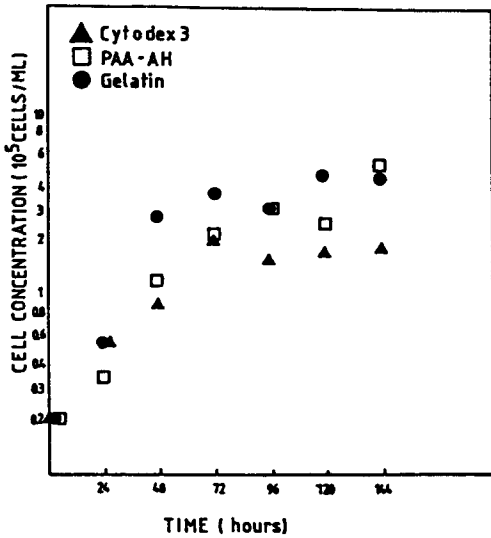


Fig. 3. Cell growth curve for L929 in micro-carrier culture.

10⁵ cells/ml로서 거의 같은 정도의 세포농도를 보였으나 Cytodex 3에서는 오히려 이보다 낮은 2×10⁵ cells/ml였다.

요 약

젤라틴을 이용하여 직경이 100-400μm의 분포를 가진 구형 미립담체를 만들어 부착성 동물세포들의 부착 및 성장 정도를 측정하였다. 또 상염화된 Cytodex III와 실험실에서 제조된 Polyacrylamide 미립담체들을 가지고 세포 성장 정도를 비교검토하였다. DMEM 배지에서 L929 (mouse fibroblast)와 BHK 21(Baby Hamster Kidney)부착성 세포를 배양한 결과 L 929는 PAA, Cytodex III에서 가장 좋은 성장을 보였다. 10g/L의 Cytodex 농도에서 최대세포농도는 약 4×10⁶ cells/ML 이었다.

사 사

본 실험을 위한 모든 협조 및 조언을 하여주신 건국대학교의 최태부 박사님과 U.C.Davis의 박선호 연구원에게 진심으로 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Van Wezel A.L. (1967) *Nature* **216**, 64
2. D.W. Levine et.al (1979) *Biotech. & Bioeng.* **21**, 821-845
3. S. Reuveny et. al., (1985) *Develop. Stand.* **60**, p243-253
4. K. Mosbach et. al., (1980) *FEBS Letters*, **118**, 145-150
5. J. Varani et. al., (1983) *Biotech & Bioeng.* **25**, 1359-1372
6. C. Gebb et. al., (1984) *Develop. Biol. Stand.* **55**, 57-65
7. K. Mosbach et. al., (1986) *BIO/TECHNOLOGY*, **4**, 989-990
8. C. Gebb et. al., (1982) *Develop. Biol. Stand.* **50**, 93-102
9. Sanford, K.K. Earle, W.R., Evans V.J., Waltz H.K. and Shannon, J.E., (1951) *J. Nat. Cancer Inst.*, **11**, 773
10. A.L. Van Wezel, (1973) "Microcarrier culture of animal cells," in *Tissue Culture: Methods and Applications*, P.F. Kruse and M.K. Patterson, Eds. Academic Press, New York, p.372

(Received January 4, 1989)