

동물세포의 연속 대량생산에 관한 연구

이현용* · 강재구 · 박형환

강원대학교 식품공학과

Mass Production of Mammalian Cells under Chemostat Cultivation

Lee, Hyeon Y.*, Jae K. Kang and Hyung H. Park

Department of Food Engineering, Kangweon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Cell density was gradually decreased as the dilution rate was increased under chemostat cultivation of HeLa cells. Maximum cell density was maintained at the dilution rate of 0.020 (1/h) which was far less than the wash-out rate of 0.050 (1/h). Maximum cell productivity of 2 (mL of cells/L/h) was obtained at the dilution rate of 0.030 (1/h) by showing the culture also required maintenance period at low dilution rates, whose result meant the deviation of continuous culture therapy. Methods of indirectly measuring cell density have been introduced to represent mammalian cell growth, which are packed cell volume and oxygen uptake rate, and these values showed good linear relationship with actual cell density by having correlation factor of 0.90. Theoretical maximum oxygen yield, $Y_{O_2}^{max}$ and maintenance oxygen consumption rate, m_{O_2} were estimated as 4.1×10^5 (cells/mole O_2) and 10.71×10^{-9} (mmole O_2 /cells/h) by employing oxygen yield model.

최근 *in vitro* 에서 동물세포의 대량 배양 기술의 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 이들 연구의 대부분은 perfusion system, hollowfiber, encapsulation 및 ceramic design(1-5) 등과 같이 어떤 방법으로도 배양조내에 존재하는 생육 저해 요소(주로 암모니아와 lactic acid)의 효과적인 제거에 의해, 세포성장의 최적조건의 유지는 물론 세포 대사산물의 손쉬운 분리가 가능해, 생산단가의 절감효과도 볼 수 있는 장점이 있다(6, 7, 10-14). 일반적으로 이런 연속배양 system 들은 회분 배양방식(batch cultivation)보다 10 배 정도 유용 단백질의 생산성이 높은 것으로 보고되고 있다(8).

이런 perfusion system 들은 배양조내의 세포수를 최대로 유지시켜 유용물질의 생산에 중점을 두는 기법으로, 이와는 관점이 다른 대량의 생세포(viable cells)를 얻기 위해 전통적인 연속 배양방법인 chemostat cultivation 이 고려될 수 있을 것이다. 그 이유는 이 continuous system 에서는 세포가 연속적으로 harvest 되며(9), 이 harvest stream 에 생

육 저해 요소들도 유출되므로 배양조 안을 최적 상태로 유지시킬 수 있을 뿐만 아니라 일반 centrifuge 방식으로 세포만 농축시킬 수 있다. 따라서 본문에서는 이런 전통적인 chemostat 방식에 의한 세포 배양의 동력학적 연구를 수행하고자 한다.

재료 및 방법

세포주 및 배양방법

세포내 DNA 의 일종인 binding protein 의 대량 분리를 위해 HeLa 세포주의 변이군인 HeLa S3 (ATCC CCL 2.2)을 vial 에서 녹여 DMEM(GIBCO, USA)에 10% Fetal Bovine Serum(FBS) (GIBCO, USA)과 40 nM Glutamine (Sigma, USA) 및 $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 Streptomycin-Penicillin(1 : 1 w/w) 혼합 항생제를 첨가한 배지로 37°C CO₂ incubator 에서 75 T-flask 에 3일마다 배지를 갈아주면서 살아있는 세포수가 5×10^6 cells/ml 에 도달할 때까지 2주간 계대 배양시켰다. 이 300 ml 의 접종액을 37°C로 미리

Key words: HeLa cell, chemostat, oxygen yield, packed cell volume

*Corresponding author

데워진 1.5L의 배지를 포함한 2l 용량의 연속 배양조로 이동시켰다.

연속 배양조 및 방법

2l 규격의 배양조(NBS bioreactor, Celligen, USA)에 위에서 기술된 방법에 따라 세포를 이전한 후 37°C에서 40%의 공기가 포화된 용존 산소량과 45 rpm에서 현탁상태(suspension culture)로 4일간 회분배양했다. 배지의 pH는 배양조에 설치된 micro processor(NBS patent)에 의해 PID 조절방식으로 유입되는 이산화탄소 양을 조절함으로써, 7.1 ± 0.2 를 유지시켰다. 살아있는 세포수가 1×10^6 cells/ml에 도달했을 때 연속 배양을 시작했다. 배지의 희석율을 바꾼 후 매일 세포수 및 on-line으로 연결된 gas chromatograph (Applied Automation, Model KIL-1190, USA)에서 측정되는 산소량과 공기의 유입속도 및 용존산소량과의 물질 평형(mass balance)식에 의해 산소소비속도(oxygen uptake rate, OUR)를 측정해(11) system이 안정상태에 도달했을 때(매 6시간마다 생존 세포수를 측정해 변화가 없을 때를 안정상태로 정했음), 다른 희석율로 이동시켰다.

이 측정된 산소소비속도(OUR)로부터 비산소소비속도(Specific oxygen uptake rate), Q_{O_2} 를 계산해 다음식에 의해 세포 산소 수율, $Y_{O_2}^{max}$ 와 mainte-

nance 산소소비속도, m_{O_2} 를 산출했다(20).

$$Q_{O_2} = \frac{D}{Y_{O_2}^{max}} + m_{O_2} \quad (1)$$

여기서 Q_{O_2} 는 비산소소비속도(mmol O_2 /cell/h), D 는 희석율(1/h), $Y_{O_2}^{max}$ 최대 산소 수율(cells/mmol O_2)이며 m_{O_2} 는 maintenance 산소소비속도(mmol O_2 /cells/h)이다. 또한 각 희석율에서 system이 안정상태에 도달했을 때, 후술된 방법으로 세포수, 생존도 및 세포 부피(packed cell volume, PCV)를 측정했다.

세포수 및 부피 측정

세포수(cell density)와 생존율(viability)은 Trypan dye exclusion 방법(15)으로 매일 측정했다. 또한 상업적 규모의 대량 배양시 세포의 증식을 쉽게 측정할 수 있는 방법의 일환으로 세포의 부피(packed cell volume)를 측정해, 이것으로 번거로운 세포수의 측정을 피할 수 있음을 증명하고자한 결과가 Fig.1로서, 직접 측정한 세포수와 세포 부피와의 상관관계를 나타낸 것으로 상관계수, ρ 가 0.92로 상호 밀접한 직선관계가 있음이 입증됐다. 즉 세포 부피의 간접 측정만으로도 세포의 증식을 검증할 수 있음을 의미한다. 연속 배양시 비생육속도에 따른 약간의 세포 부피 변화가 있지만(21), 일반적으로 산업체에서 대량 배양시 이 PCV에 의한 세포증식을 관찰하고 있으므로 연속 배양시 이 PCV에 의한 생육 변수들을 비교하는 것이 의미가 있을 것이다. 이 세포 부피를 측정하는 방법은 이외 논문에 자세히 기술되어 있다(16). 간략히 기술하면, 한쪽 면을 막은 100 μ l micro-pipet tip에 이미 원심분리된 시료를 300g에서 2분간 원심분리시켜 세포가 가라앉은 높이를 측정해, 이미 만들어진 표준 도표로부터 세포의 부피를 계산한다(16).

결과 및 고찰

Table 1이 HeLa 세포주를 희석율(dilution rate)을 바꿔주면서 연속 배양시킨 결과다. 매 희석율을 바꾼 후 매일 세포수 및 산소소비속도를 측정해 이 값들의 변화가 없는 것으로 안정상태에 도달한 것을 확인했다. 낮은 희석율($D=0.0041$ 1/h)의 경우 세포수의 변화가 거의 없는 안정상태에 도달하는데 약 20일 정도 걸렸으며, 빠른 희석율($D=0.043$ 1/h)의 경우 약 5일이 소요되었다. 각 희석율마다 세포수와 더불어 생존도 및 산소소비속도를 측정해, 이 수치

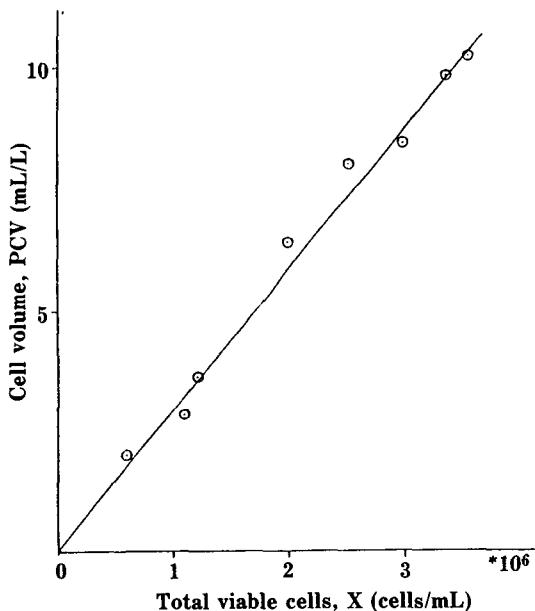


Fig. 1. Correlation between cell density and packed cell volume. Solid line is the result of linear regression analysis.

Table 1. Results of cultivation HeLa S3 cells under chemostat operation.

Dilution rate, D (1/h)	Cell density, X ($\times 10^6$ cells/mL)	Viability (%)	Specific oxygen uptake rate ($\times 10^9$ mmole/cell/h)
0.0042	1.10	90	15.38
0.0083	3.71	92	13.91
0.0161	3.60	89	13.41
0.0200	3.04	90	14.29
0.0250	2.47	86	15.72
0.0331	2.06	85	15.74
0.0382	1.20	84	16.77
0.0430	0.60	80	24.82

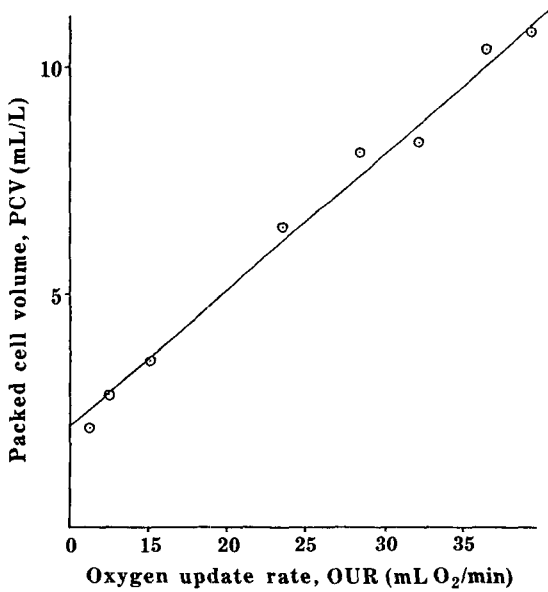


Fig. 2. Growth of HeLa cells as a function of rates of consuming oxygen. Solid line is the result of linear regression analysis.

들이 연속 배양시 생육조절인자로서의 가능성을 검진했다. 전반적으로 약 80% 이상의 생존율을 유지하고 있는데, 희석율이 증가함에 따라 생존도가 감소함을 보이고 있다. 이는 일반적인 연속 배양이론과 상반되는 결과로 빠른 희석율에서는 세포의 유출이 빠른 뿐만 아니라 system에의 적응시간이 길기 때문이다. Fig.1에서 나타났듯이 세포 부피가 실제 세포수와 밀접한 관계를 나타내고 있어, PCV의 측정으로 세포증식을 간접 확인할 수 있을 것이다. 또한 산소의 물질 평형에 근거를 둔 산소소비속도의

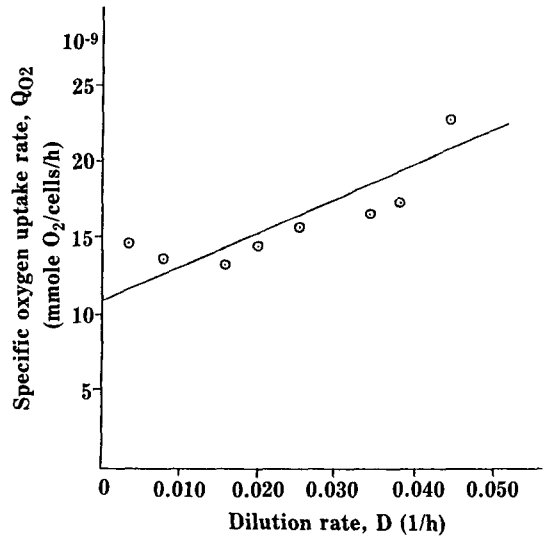


Fig. 3. Relationship between respiration rate and dilution rate for the growth of HeLa cells

값들 역시 세포증식과 밀접한 관계가 있음을 알 수 있다(11, 14). Fig.2가 이 관계를 잘 나타내고 있다. 즉 상관계수, ρ 가 0.89로서 세포의 증식(packed cell volume)에 따라 산소소비속도(oxygen uptake rate)가 직선적으로 증가함을 의미한다. 이 결과로서 산소소비속도의 측정으로 세포의 간접 측정이 가능할 것이다(11, 17, 20).

Fig.2의 결과에 근거를 둔 식 (1)을 이용해 세포 성장과 산소소비속도와와의 관계에서 산소 수율을 구할 수 있는 것이 Fig.3이다. 이 그림에서 기울기의 역수가 최대 산소 수율로 4.1×10^5 (cells/mmol O_2)로서 chinese hamster ovary의 경우인 1.26×10^4 (cells/mmol O_2) (14)보다 많으며, 세포가 성장하지 않을 때 산소소비속도인 m_{O_2} 는 절편 값으로 10.7×10^{-9} (mmol O_2 /cells/h)로 측정됐다. 또한 Fig.3의 직선 상관도 값이 0.83으로 식 (1)의 타당성을 입증하고 있다.

Fig.4는 희석율의 변화와 세포수와의 관계를 나타낸 것으로 희석율이 증가함에 따라 세포수가 감소함을 나타내고 있다. 이는 한가지 요소만이 성장 제한 요소로 작용하는 연속 배양에서 나타나는 현상과 (18) 다를 것을 알 수 있다. 그 이유는 세포의 성장속도변화에 따라 동물세포 배양배지내의 알려지지 않은 인자(주로 혈청에 존재하는 단백질)들 역시 성장 조절인자(growth limiting factor)로 작용하기 때문이다(17). 이 결과들로서 동물세포의 연속 배양시 한계 희석율(critical dilution rate)에 의한 최대 비생육

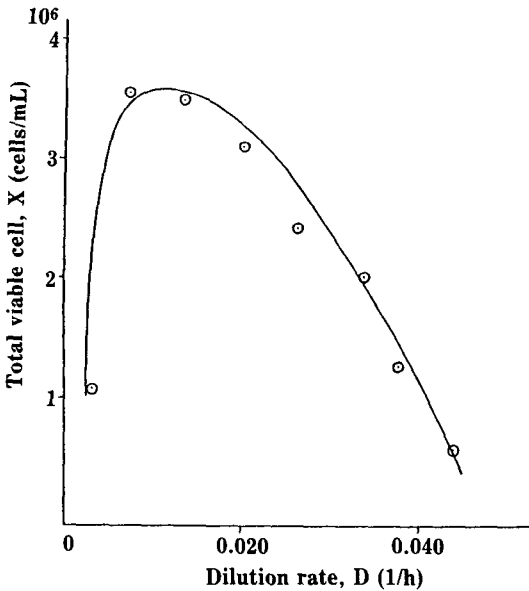


Fig. 4. Growth phenomena of HeLa cells under chemostat operations according to the change of dilution rate. Solid curve is the result of non linear regression analysis.

속도 (maximum specific growth rate)의 설정은 무의미할 것이다. 또한 낮은 배지 이동속도에서(이 경우는 희석율이 0.006 1/h 이하), 희석율이 감소함에 따라 세포수도 감소함을 알 수 있다. 이는 세포성장을 위한 maintenance 기간이 필요하기 때문이다. 이때 세포들이 외부조건에 적응이 되어, 균형된 성장상태 (balanced growth)로 전이된다(9). 따라서 생육조절인자에 따른 세포성장곡과 희석율과의 수율 model에 의해 maintenance 상수값을 구할 수 있다(9, 14, 19).

본 실험은 최대 세포의 생산에 목적을 둔 것이므로, 생육조절 변수인 희석율에 따른 세포 생산성 (cell productivity)과의 관계가 중요한 관건으로, Fig.5가 그 결과를 나타낸 것이다. 세포 생산성은 정의에 의해(9) 세포수와 배지 이동속도의 곱으로, 배지 이동속도가 0.030(1/h)일 때 세포의 부피가 6.67 ml/l로 세포생산성이 0.2(ml of cells/l/h)의 최대 생산속도를 나타냈다. 전반적으로 종 모양의 형태를 나타내며, 빠른 배지 이동속도에서 급격한 감소를 보이고 있다.

결 론

세포의 최대 생산을 위한 연속 배양시 배양배지의 특이성 때문에, 일반 연속 배양에서와 같이 빠른 이

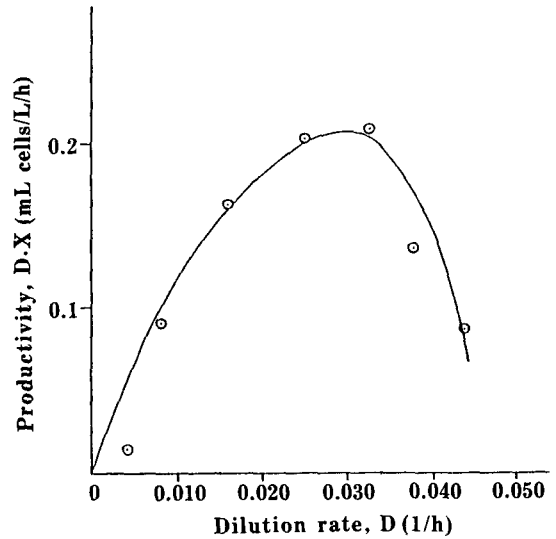


Fig. 5. Rates of cell output as a function of dilution rate under continuous cultivation for the growth of HeLa cells. Solid line is the result of non linear regression analysis.

동속도에서 최대 생육속도를 유지하지 못하고, 희석율의 증가에 따라 세포수의 감소현상이 나타났다. 이로써 동물세포의 연속 배양시 희석율에 의한 세포수의 조절에 주의를 기울여야 하며, 세포생산성이 희석율을 결정지을 수 있는 좋은 변수임이 확인되었다. 또한 동물세포의 초기 성장시 많은 maintenance를 필요로 하고 있었다. 실제 세포의 증식을 나타낼 수 있는 간접 생육 측정방법으로, 세포 부피 (packed cell volume)와 산소소비속도 (oxygen uptake rate)가 비교적 정확한 상관관계를 나타냈다. 이 상관관계에 의해 산출된 최대 산소 수율, $Y_{O_2}^{max}$ 과 maintenance 산소소비속도, m_{O_2} 가 각각 4.1×10^5 (cells/mmol O_2)와 10.7×10^{-9} (mmol O_2 /cells/h)로서 CHO 세포보다 높은 산소 수율을 나타냈다. 이 같은 연속 배양의 동력학적 자료들을 바탕으로 공정의 최적화를 통해 최대 세포 생산을 꾀할 수 있을 것이다.

요 약

HeLa 세포주의 연속 배양시 세포수가 배지의 이동속도가 증가함에 따라 감소하는 현상을 나타냈으며, 최대 세포수를 유지할 때의 dilution rate은 0.012(1/h)로 wash-out인 0.050(1/h)보다 극히 낮 으며, dilution rate이 0.030(1/h)일 때 2.0(ml cells/l/h)의 최대 세포 생산속도를 보였다. 또한 낮

은 배지 이동속도에서 세포수의 감소에 따른 maintenance term의 존재를 확인했다. 더불어 packed cell volume 과 산소소비속도의 측정값이 실제 세포증식과 밀접한 관계가 있음이 입증되어 간접 방법에 의한 생육도의 측정이 가능하게 되었다. 또한 산소 yield model에 의해 최대 산소 수율, $Y_{O_2}^{max}$ 과 maintenance 산소소비속도, m_{O_2} 가 각각 4.1×10^5 (cells/mmol O_2)와 10.71×10^{-9} (mmol O_2 /cells/h)로 측정되었다.

참고문헌

1. Boag, A.H. and M.V. Sefton.: *Biotech. Bioeng.*, **30**, 954 (1987).
2. Wieman, M.C., E.D. Ball, M.W. Fanger, G. Bernier. and P. Calabresi : *Clin. Res.*, **31**, 511 (1983).
3. Marcipar, A., P. Henno, E. Lentowitz, A. Reseto. and G. Broun : *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **413**, 416 (1983).
4. Bulter, M., T. Imamura, J. Thomas and W. Thilly : *J. Cell Sci.*, **61**, 351 (1983).
5. Griffiths, B. and B. Thornton : *J. Chem. Tech. Biotech.*, **32**, 324 (1982).
6. Lee, H.Y : *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **16**, 246 (1988).
7. Lee, H.Y : *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **16**, 246 (1988).
8. Tolbert, W.R. and W.R. Srigley : *Biopharm*, **4**, 249 (1987).
9. Pirt, S.J. (ed.): *Principles of Microbe and Cell Cultivation*, John Wiley Sons, N.Y. (1975).
10. Lee, H.Y : *Tenth Symposium on KSEA*, **10**, 127 (1987).
11. Lee, H.Y. and J.H. Lee : *Kor. J. Chemical Eng.*, **26**, 659 (1988).
12. Lee, H.Y. and G.S. Kim : *Kor. J. Appl. Microbiol Bioeng.*, **16**, 522 (1988).
13. Tolbert, W.R. and J. Feber : *Ann. Rep. Ferment. Process*, **6**, 35 (1983).
14. Lee, H.Y : *Kor. J. Biochem. Eng.*, **4**, 36 (1989).
15. Kalenbach, J.P., M.H. Kalenbach and W.B. Lyons : *Exp. Cell Res.*, **15**, 112 (1958).
16. Tolbert, W.R., M.M. Hitt and J. Feder : *Ann. Biochem.*, **106**, 109 (1980).
17. Calcott, P.H. (ed.): *Continuous Culture of Cells*, CRC Press, Florida (1981).
18. Bailey, J.E. and D.F. Ollis (eds.): *Biochemical Engineering Fundamentals* (2nd ed.), McGraw-Hill Co., N.Y. (1986).
19. Lee, H.Y., L.E. Erickson and S.S. Yang : *Biotech. Bioeng.*, **26**, 926 (1984).
20. Harrison, D.E. and J.E. Loveless : *J. Gen. Microbiol.*, **68**, 35 (1971).
21. Tovey and Brouty-Boye : *Exp. Cell Res.*, **101**, 146 (1976).

(Received February 22, 1989)