

부착성 HeLa 세포의 탈리 유도에 의한 다공성 미립담체의 담체간 전이 배양

이 두 훈 · † 박 정 극

동국대학교 공과대학 화학공학과
(접속 : 1997. 10. 6., 게재승인 : 1997. 12. 1.)

Bead-to-Bead Cell Transfer by Induction of Detachment of Anchorage Dependent HeLa Cells Grown on Macroporous Microcarriers

Doo Hoon Lee and Jung Keug Park†

Department of Chemical Engineering, College of Engineering,
Dongguk University, Seoul 100-715, Korea
(Received : 1997. 10. 6., Accepted : 1997. 12. 1.)

Using a cellulose macroporous microcarrier, HeLa cells were cultivated in 100mL spinner flask(Bellco Co., USA), and confluent cell laden microcarriers were subcultured by bead-to-bead cell transfer method. In macroporous microcarrier-HeLa system viable suspended cells played an important role in bead-to-bead cell transfer and that could be increased by use of RPMI-1640, a calcium-ion-reduced-media and high speed agitation. Successful bead-to-bead cell transfers were performed continuously three times in spinner flask. We applied this technique to produce recombinant Vaccinia virus which express β -galactosidase. Recombinant protein yield of bead-to-bead transferred culture was comparable to conventional microcarrier cultures that were inoculated by cells detached from T-flask. Although trypsinization is a useful method for subculturing microcarriers in some cases, that process adds quality control problem and handling steps to large scale cell production. Therefore, bead-to-bead cell transfer technique offers another convenient and efficient scale-up method for continuous microcarrier cultures.

Key Words : macroporous microcarrier, bead-to-bead cell transfer, vaccinia virus

서 론

미립담체 배양은 현재 동물세포를 이용한 백신이나 단백질 생산에 널리 쓰이고 있다. 특히, 최근에는 비다공성 미립담체보다는 다공성 미립담체에 대한 관심이 높아지고 있다(1). 그 이유로는 첫째, 단위 부피당 높은 세포 농도를 얻을 수 있으며 둘째, 세포가 정체기에 목적 물질을 생산 분비할 경우 장기 배양에 유리하며 셋째, 교반에 따른 전단력으로 부터 세포를 보호하기 때문에 교반 속도를 높일 수 있으며 따라서 반응 규모를 훨씬 증대할 수 있게 하고 넷째, 비부착성 세포도 배양 가능하다는 등의 장점을 가지고 있기 때문이다(2). 그러나, 대규모 배양의 경우에는 초기 집종을 위한 많은 양의 세포를 준비하는 것이 문제가 되었다. 수백, 수천 개의 roller bottle 또는 T-flask를 모두 하나씩 손으로 처리해야 하므로 handling step이 매우 많으며 그에 따른 높은 비용과 오염의 가능성이 매우 커지게 마련이다. 따라서, 편리한 scale-up을

위하여 미립담체에 완전히 자란 세포를 계대배양하려는 노력이 기울여지게 되었다. 현재까지 동물 세포를 성장표면에서 떼어내는 가장 좋은 방법은 trypsin 처리인 것으로 알려져 있다. 이러한 trypsin 처리로 Sephadex (dextran, Sigma Chem. Co)와 Cytodex-3(collagen coating, Pharmacia Co.) 미립담체에서 계대배양을 수행하였다(3, 4). T-flask의 경우와는 달리 전자에서는 trypsin의 활성을 높이기 위하여 높은 pH를 사용하였으며, 후자에서는 chelating agent인 EDTA(ethylene diamine tetraacetic acid)가 포함된 PBS (phosphate buffered saline)로 세포가 자란 미립담체를 미리 처리하여 세포 탈리를 촉진하였다. 그러나, 이러한 trypsin 처리 또한 실제 생산 공정에서는 대형 반응기 내에서 수행되어야 하므로 공정이 복잡해지고 세심한 주의를 요하는 단점을 가지게 된다. 이러한 trypsin 처리의 단점으로 인하여 좀더 바람직한 미립담체 계대배양 방법을 찾게 되었고 그 대안으로 "bead-to-bead cell transfer method(담체간 전이 배양)"가 1981년 Crespi와 Thilly에 의하여 처음 시도되었다(5). 이 방법은 이미 세포가 크고 있는 미립담체에 새로운 미립담체를 새로운 배지와 함께 단순히 그냥 첨가해 줌으로서 배양 scale을 늘리는 것으로 비용이나 공정 단계가 추가되지 않는 이상적인 방법이다. 그들은 낮은 calcium 농도를 가지고 있는 RPMI-1640 배지와 약하

† Corresponding Author : 3-26, Pil-dong, Choong-ku, Seoul 100-715, Korea
Tel. : 02-260-3365, Fax : 02-271-3489
E-mail : jkpark@cakra.dongguk.ac.kr

게 대전된 미립담체를 이용하여 CHO-K1(hamster ovary cell line) cell을 연속 배양하였으며, Vesicular stomatitis virus를 감염하여 그 수율을 비교하였다. 세포당 virus의 수율은 T-flask 보다 떨어지지만 최종 생산비용은 더 저렴하다고 보고하였다. 그 후 세포 부착성이 우수한 Cytodex-3에서도 BHK-21 cell을 이용하여 담체간 전이 배양을 시도하였고(6), 최근에는 collagen 다공성 미립담체인 Cultispher(Hyclon Lab.)에서도 간헐적인 교반을 이용하여 담체간 전이 배양이 시도되었다(7).

그러나, 아직 담체간 전이 배양 방법이 바이러스 백신이나 기타 동물세포를 이용한 유용물질 생산에 상업적으로 적용된 예는 매우 적은 것으로 보아 그 효율성이 아직은 완전히 증명되지는 않은 것으로 생각된다. 그 이유는 세포가 크고 있는 담체에서 새로운 담체로의 세포 전이가 충분히 일어나지 않으며, 또 세포가 크고 있던 담체에서는 더이상 증식이 일어나기 어렵기 때문에 전체적인 성장 속도가 떨어지고 배지의 이용 효율도 떨어지게 되는 것이다.

본 연구에서는 다공성 미립담체(Asahikasei microcarrier)와 부착성 HeLa cell을 이용하여 담체간에 일어나는 세포전이의 주된 경로를 찾고 효과적인 담체간 전이배양을 수행하기 위한 여러가지 영향을 조사하였다. 다공성 미립담체-HeLa 시스템에서는 탈리된 부유세포의 농도가 담체간 전이 배양의 효율에 영향을 미치는 중요한 인자로 판단되어 세포활성을 유지하고 있는 부유세포의 수를 늘리려는 노력을 하였다. Ca^{2+} 이온이 적게 포함된 배지와 세포가 손상을 입지 않을 정도의 빠른 교반속도를 사용하여 부유세포의 농도를 증가시켰으며, 새로운 미립담체에 부착하여 성장하는 것을 관찰하였다. 최종적으로 재조합 Vaccinia virus를 감염하여 그 수율을 T-flask에서 떼어내어 집중한 경우와 비교함으로써 유용 단백질 및 바이러스 생산을 위한 동물세포 배양의 scale-up 방법으로서, 담체간 전이 배양의 적용 가능성을 알아보았다.

재료 및 방법

미립담체 배양

실험에 사용된 세포는 HeLa(ATCC No. CCL 2, Epitheloid carcinoma, cervix, Human)로서 고려대학교 생명공학원 김익환 박사님으로부터 분양 받아 사용하였다. 세포배양 배지는 powder 상태인 DMEM(Dulbecco's modified eagle's medium, 4.5 g/L glucose; Gibco Co., U.S.A.) 배지에 sodium bicarbonate (2.0g/L), HEPES(2.38g/L), 항생제(penicillin+streptomycin, 1000Unit/L)를 첨가하여 사용하였다. 혈청(serum)은 calf serum(CS, Gibco Co.)을 사용하였는데 55°C에서 30분 처리하여 성장억제물질을 inactivation 시킨 후 10 (v/v) % 농도로 배지에 첨가하여 사용하였다. 미립담체 배양에는 working volume 100mL의 spinner flask(Belco Co.)를 사용하였고 접종세포는 80cm² T-flask(Nunc, Denmark)에서 키워서 사용하였으며, 모두 37°C, 5% CO₂가 유지되는 humidified incubator에서 배양하였다. 본 실험에 사용한 Asahikasei microcarrier는 cellulose로 만들어진 다공성 미립담체로서 일본의 Asahi Chemical Co.에서 만든 것으로 1g/L의 양으로 사용하였으며 대조군으로 쓰인 Cytodex-3는 3g/L로 사용하였다. 표면이 silicon 용액(Sigmacote, Sigma Co.)으로 코팅된 용기에 미립담체를 넣고 PBS(phosphate buffered saline) 용액 (300mL/g-bead)을

넣어 1~2 시간 정도 충분히 swelling 한다. 상등액을 제거한 후 다시 PBS 용액을 넣고 swelling 하는 절차를 2~3 번 반복한 후 가압멸균(121°C, 25 min.) 하여 사용하였다. 멸균된 미립담체는 배지로 다시 한번 세척한 후 spinner flask에 넣어 놓은 후 T-flask에서 성장한 세포를 trypsin처리로 떼어내고 초기 세포 농도 1.0×10^5 cells/mL로 접종하였다. 배양시작 이틀째에 배지의 50%를, 그 후로는 매일 70~80%의 배지를 갈아주었다. 8일 정도 배양하면 3.0×10^6 cells/mL 정도의 최고세포농도에 도달하며 이때 계대 배양 실험을 진행하였다.

세포 농도 측정 및 세포 염색

부유세포나 trypsin처리 후의 세포는 trypan blue 염색후 hemocytometer로 세포농도를 측정하였다. Cytodex-3와 같은 비다공성 미립담체에서 자란 세포의 농도는 0.1% crystal violet in 0.1M citric acid 용액의 처리로 모든 세포가 완전히 떨어져 세포질이 파괴된 후 세포핵을 세지만 다공성 미립담체의 내부에서 성장한 세포의 경우는 1시간 이상을 citric acid 용액으로 처리하여도 많은 양의 세포는 미립담체 내에 남아 있게 된다. 이러한 세포를 측정하기 위하여 1.5mL sample tube(Eppendorf Co.)에 미립담체 sample 1mL를 채취하고 0.1% crystal violet in 0.1M citric acid 용액으로 37°C에서 1시간 이상 incubation 시킨 후 직경 4mm의 glass bead 5~6개를 넣고 vortex mixer로 20~30초 mixing한 후 핵을 hemocytometer로 세었다. 현미경으로 관찰한 결과 모든 세포가 미립담체에서 떨어진 것을 확인하였으며, 1분 정도의 강한 mixing으로도 세포핵은 거의 파괴되지 않았다.

Asahikasei microcarrier는 다공성 미립담체이기 때문에, 초기 접종 세포가 부착한 상태, 성장 상태 및 계대배양 후의 세포 전이 정도는 염색처리 없이는 현미경으로 관찰되지 않는다. Crystal violet 0.1% 용액으로는 Asahikasei microcarrier가 염색되지 않으나 세포는 염색이 된다. 따라서, 세포 농도 측정시 쓰인 0.1% crystal violet in 0.1M citric acid 용액으로 약 2~3분 정도만 처리하여 세포가 떨어지거나 파괴되지 않고 세포질만 염색이 되었을 때 현미경으로 관찰하였다.

담체간 전이 배양

세포가 완전히 자란 미립담체 용액 20mL(1g microcarrier/L)와 새로운 미립담체 80mL(1g microcarrier/L)를 100mL spinner flask에 넣어 교반하였다. 매일 상등배지와 미립담체를 sampling하여 세포의 전이 정도나 부유세포 농도 및 전체 세포농도를 측정하였다. Ca^{2+} 이온 농도가 적은 배지로는 RPMI-1640(Ca^{2+} 0.32mM)을 사용하였으며 이때 혈청은 horse serum 10%를 사용하여 세포성장온 비슷하게 유지하면서 calf serum 사용시 보다 되도록 낮은 Ca^{2+} 이온 농도를 유지하였다.

Vaccinia virus 감염 및 재조합 단백질(β -galactosidase) 분석

Virus주로는 *Escherichia coli*의 β -galactosidase 유전자가 삽입된 재조합 Vaccinia virus(vSC8)를 고려대 안병운 교수님으로부터 분양 받아서 사용하였다. T-flask에서는 세포가 대수 증식에 이르는 배양 4일째 감염비(MOI, multiplicity of infection) 5

로 감염하였으며 virus 감염후 60시간 경과후 세포를 회수하였다. 바이러스 감염, 세포 회수 및 파쇄, 바이러스 회수와 plaque assay 등에 대한 자세한 실험 방법은 참고문헌 (8)의 방법을 그대로 사용하였다. 재조합 Vaccinia virus에 의하여 발현되는 β -galactosidase의 활성은 합성기질인 ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside(ONPG)를 분해하여 생성되는 o-nitrophenol을 420nm에서의 흡광도를 측정하여 정량하였다. 미립담체 배양에서는 배지를 완전히 제거한 후 virus solution을 첨가하여 T-flask와 마찬가지로 30분마다 흔들어 주면서 2시간 정도 정치하였다. Virus 감염 후에는 혈청의 농도를 4% 정도로 낮추었으며, 매일 미립담체가 포함된 배지를 sampling하여 β -galactosidase를 정량하였다.

결과 및 고찰

HeLa cell의 미립담체 배양

미립담체의 계대배양에 관한 연구를 수행하는데 필요한 세포 부착능, growth kinetics, 적정 담체 농도 등에 관한 정보를 얻기 위하여 일반적으로 많이 사용하는 비다공성 담체인 Cytodex-3와 본 연구에 주로 사용한 Asahikasei macroporous microcarrier를 이용하여 미립담체 배양을 실시하였다.

세포 부착 속도는 배양 개시에 있어서 중요한 인자로서 Vero cell과 HeLa cell을 사용하여 두 담체간의 세포 부착 속도를 관찰하였으며 그 결과를 Figure 1에 나타내었다. 최종 부피의 반만 혈청을 포함하지 않은 배지를 채우고 세포를 접종하고, 30분마다 2분씩 교반하여 주면서 상등 배지만을 sampling하여 세포 농도를 측정하였다. Fibroblastic cell line인 Vero가 epithelial cell line인 HeLa 보다 부착능이 우수한 것으로 나타났으나 다공성 미립담체로의 부착 속도는 차이가 나지 않았으며, Cytodex-3로의 부착 보다 훨씬 부착 속도가 빨랐다. 이것은 다

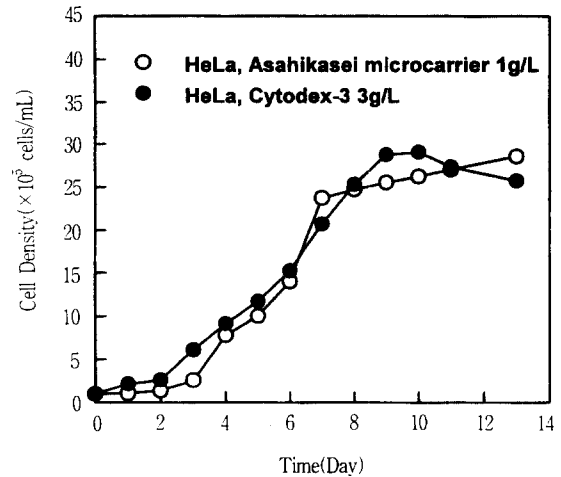


Figure 2. Growth curve of HeLa cells in spinner flask. HeLa cells showed good growth both on Cytodex-3 and Asahikasei microcarrier.

공성 미립담체의 pore 속도로의 세포부착이 매우 쉽고 빠르게 일어나기 때문인 것으로 생각된다. 실험결과를 나타내지는 않았지만 다공성 미립담체의 경우 세포 부착 능력이 우수하기 때문에 초기 부착 기간동안 정치기간을 두지 않고 연속 교반을 하면 오히려 세포 부착이 빠르고 고르게 일어나는 것을 알 수 있었다. 따라서, 이후의 실험에서는 초기 부착시에도 세포 부착을 위한 간헐적 교반은 하지않았다. 30분 정도 경과후 세포가 완전히 부착된 것이 확인되면 혈청이 포함된 배지로 최종부피로 만든 후 배양하였다. 배양 이틀째는 배지의 50%를 그 후로는 매일 70~80%의 배지를 교환해 주었다. 세포 성장 곡선을 Figure 2에 나타내었다. 배양 8일 경과 후 약 3.0×10^6 cells/mL의 최고 세포 농도를 나타냈으며 더이상 세포 농도가 증가하지 않았다. 이러한 성장 억제가 성장 표면 제한에 기인한 것인지 배지나 산소 고갈에 기인한 것인지 알아보기 위하여 미립담체 농도를 달리하여 배양한 결과 모두 비슷한 최고 세포농도를 나타내었다. 따라서, 3.0×10^6 cells/mL은 주어진 배지 교환량 및 산소 공급량에 의한 제한 농도로 생각된다.

담체간 세포 전이 배양

담체간 세포 전이 배양 방법에서 세포는 다음의 두 가지 전이 경로를 가지는 것으로 생각된다. 하나는 여러 가지 이유로 이미 크고있던 미립담체에서 떨어진 세포가 새로운 미립담체에 부착함으로써 전이되는 것이고 다른 하나는 미립담체의 세포 부착성이 우수하여 떨어져 나오는 세포의 수가 매우 적을 경우에 교반을 하지 않는 정치기간을 두어 세포가 미립담체간에 직접 전이되는 것이다. 따라서, 효과적인 담체간 전이 배양을 위해서는 사용하는 세포와 미립담체의 부착성을 잘 파악하여 떨어져 나오는 세포(부유세포)의 농도를 확인할 필요가 있으며, 교반속도와 배지성분과 같이 부유세포의 농도에 영향을 미치는 인자를 최적화해야 한다.

세포 부착에 영향을 미치는 배지의 성분으로는 Ca^{2+} 이온이 있다. Ca^{2+} 이온에 의존하여 세포간의 부착을 매개하는 세포-세포 adhesion 분자로서 cadherin이 많이 알려져 있으며 Ca^{2+} 부

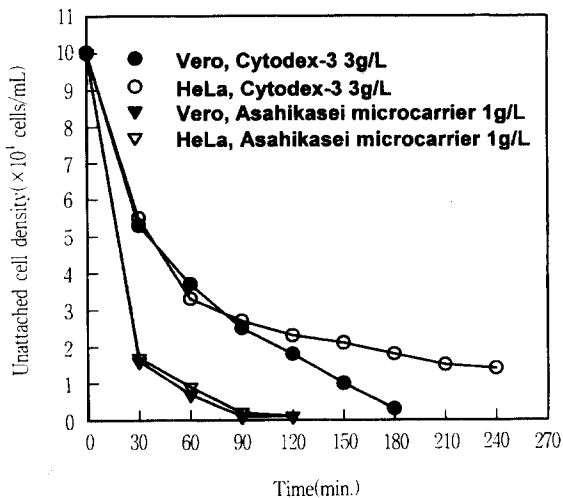


Figure 1. Attachment rates of Vero and HeLa cells on Cytodex-3 and Asahikasei microcarriers. During attachment period, each cultures are stirred for 2 min. at 30 min. intervals. Cell attachment property of Asahikasei microcarrier was much better than that of Cytodex-3 and Vero cells attached faster than HeLa cells.

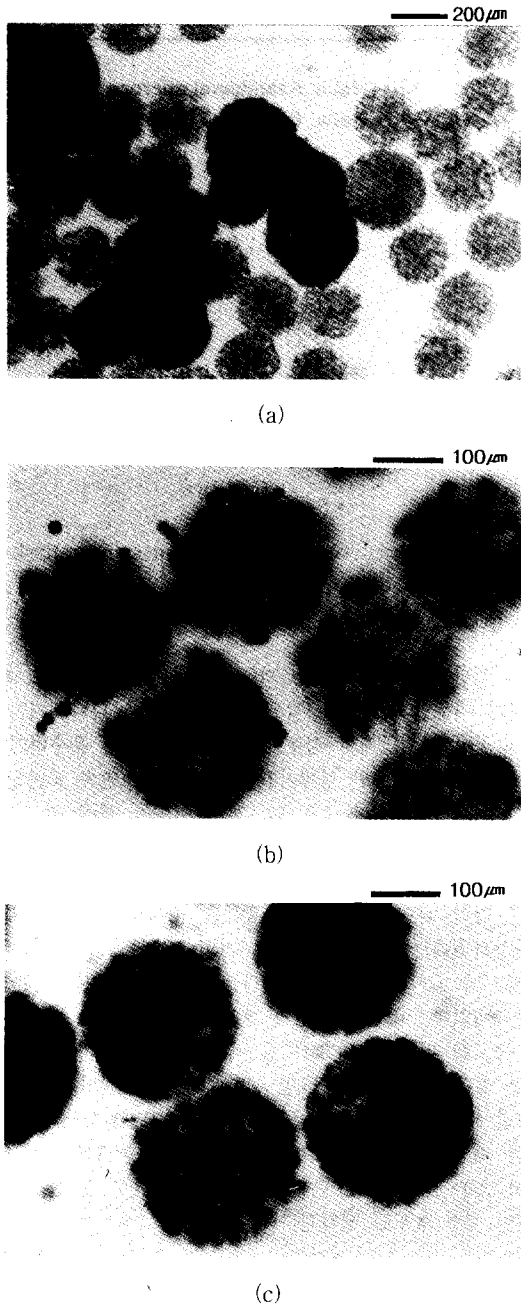


Figure 3. Light microscopic pictures of HeLa cells growing on Asahikasei microcarriers. HeLa cells stained with 0.1% crystal violet solution. Dark areas indicate HeLa cells. (A) HeLa cells cultured with DMEM supplemented with 10% calf serum, 6 days after addition of fresh microcarriers. HeLa cells cultured with DMEM didn't transfer to fresh microcarriers. (B) HeLa cells reattached to fresh microcarriers. One hour after addition of fresh microcarriers. When HeLa cells cultured with RPMI-1640 supplemented with 10% horse serum many cells were detached from 'old' cell laden microcarriers and that reattached to newly added fresh microcarriers within 30min.. (C) HeLa cells grown on fresh microcarriers, 4 days after addition of fresh microcarriers. HeLa cells transferred from 'old' to fresh microcarriers showed good growth.

착 부위가 있어서 Ca^{2+} 에 의하여 안정화되는 것으로 생각되고 있으나 Ca^{2+} 의존적인 cadherin 기능의 생물학적인 명확한 기능이나 중요성은 아직 불확실하다. 또한, Ca^{2+} 이온은 정체기에 있는 3T3 cell의 DNA 복제를 유도하여 정체기 세포의 성장을 유도하고 세포 형태에 변화를 주는 것으로 알려져 있으며(9), recombinant human kidney 293 cell의 응집을 조절하는 데도 Ca^{2+} 이온을 이용한 것으로 볼 때(10), Ca^{2+} 이온은 세포-세포 또는 세포-표면간의 부착능에 깊이 관여하는 것으로 생각된다. 따라서, Ca^{2+} 의 농도가 부유세포의 농도에 어떠한 영향을 주며 그것이 담체간 전이 배양에 어떠한 영향을 미치는 지를 조사할 필요가 있다. DMEM은 Ca^{2+} 농도가 2.0 mM로서 비교적 높은 농도의 배지이며 부착성 동물세포 배양에 널리 쓰이는 배지이다. Figure 3의 A는 DMEM을 사용하여 담체간 전이 배양을 시도한 결과이다. 진한 파란색으로 염색된 것이 세포가 자라고 있는 미립담체이고 밝은 것은 세포가 자라고 있지 않은 미립담체이다. Figure 3의 (A)에서 보는 바와 같이 새로운 미립담체를 첨가한지 6일이 경과하여도 세포가 거의 전이되지 않는 것을 볼 수 있었다. 따라서, DMEM(10% calf serum)을 사용할 경우에는 정체기간을 두어 미립담체가 가라앉아 세포가 직접 전이되도록 하지 않고서는 담체간 세포 전이가 불가능하다는 것을 알 수 있었다. 그러나 정체기간을 두어 세포가 직접 전이되도록 하여도 전이 속도가 더디고 불균일 하기 때문에 효과적인 계대배양 방법이 되지 않는 것으로 생각된다.

부유세포를 통한 담체간 전이 배양을 수행하기 위해서는 충분한 양의 세포가 활성을 유지한 채로 미립담체로부터 배지로 떨어져 나와야 할 것이다. 그러기 위해서는 Ca^{2+} 이온 농도가 높은 DMEM 보다는 RPMI-1640(Ca^{2+} 0.32mM)과 같은 낮은 Ca^{2+} 농도의 배지를 사용하는 것이 보다 유리할 것으로 생각된다. 또한 미립담체 배양시의 교반속도는 세포에 직접, 간접적인 영향을 미치는 중요한 인자의 하나로서 세포에 손상을 주지 않는 범위 내에서의 교반속도의 증가는 미립담체에 약하게 부착하

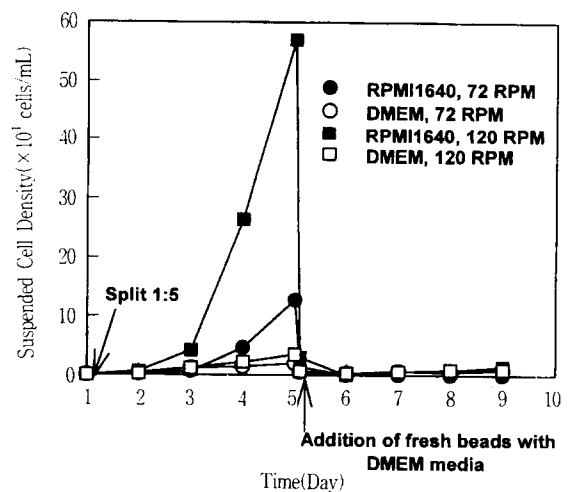


Figure 4. Effect of agitation speed and media type on suspended cell density. In case of DMEM used culture, suspended cells were scarcely shown all through the time course of culture. Sufficient number of cells detached on the condition of RPMI-1640 media and 120RPM.

고 있는 세포의 탈리를 유도하여 부유세포의 농도를 증가시킬 것으로 생각된다. Figure 4는 배지 및 혈청과 교반속도에 따른 부유세포 농도의 변화를 나타낸 것이다. 본 실험에서 calf serum과 house serum의 영향은 상대적으로 미미한 것으로 나타났으며 DMEM(10% calf serum) 배지로 배양한 경우는 부유세포가 거의 관찰되지 않았지만 RPMI1640(10% horse serum) 배지를 사용한 경우는 초기 접종으로 사용하기에 충분한 양의 부유세포가 관찰되었으며, 높은 교반속도에서는 훨씬 더 많은 부유세포가 관찰되었다. 그러나, 만일 이러한 부유세포의 대부분이 활성을 잃은 세포라면 새로운 미립담체에 부착하여도 증식이 일어나지 않을 것이므로 이에 대한 확인을 해보았다. Figure 5는 배지로 떨어져 나온 부유세포를 6-well plate에 plating하여 세포 성장을 관찰한 결과이다. T-flask에서 떼어낸 세포와 거의 비슷하게 성장하는 것으로 보아, 새로운 미립담체에 부착하여서도 증식할 수 있을 것이라 생각되었다. 또한, RPMI-1640(10% horse serum) 배지를 사용하여 HeLa cell을 배양하여도 세포 성장에 거의 차이가 없음을 확인하였다. 부유세포는 새로운 미립담체를 첨가하였더니 30분 이내에 거의 모든 세포가 새로운 미립담체에 고르게 부착하였으며 Figure 3의 (B)에 그 모습을 나타내었다. Figure 3의 (C)는 새로운 미립담체 첨가후 5일이 경과한 후의 사진으로서 많은 양의 세포가 전이되어 성장하였음을 알 수 있었다.

Figure 6는 부유세포를 통하여 세포전이가 일어나는 RPMI-1640을 이용하여 연속배양을 실시한 결과이다. 계대배양시에는 미립담체를 20%만 남겨놓고 나머지 80%는 새로운 미립담체를 첨가하였다(split 1:5). 4번의 계대배양 까지도 원만한 세포 성장을 나타낸 것으로 보아 담체간 전이 배양을 이용한 미립담체 계대배양이 가능하다는 것을 알 수 있었다. 그러나, 배양 기간이 길어질 수록 세포의 활성이 조금씩 떨어지는 경향을 나타내었다. 이것은 pH나 용존산소 등이 제대로 조절이 되지 않는 spinner flask 환경에서의 오랜 배양 기간으로 인하여 세포가 손상을 입은 것으로 생각된다. 최적 성장 조건이 유지되는 보다 scale-up된 배양기에서 실시한다면 보다 많은 횟수의 계대 배양이 가능하리라 생각된다.

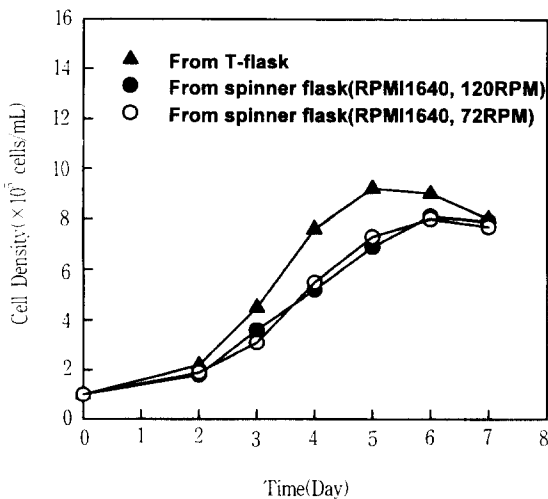


Figure 5. Growth curves of HeLa cells that detached from confluent microcarriers in 6-well plate. Suspended cells showed similar growth to normally recovered cells from T-flask.

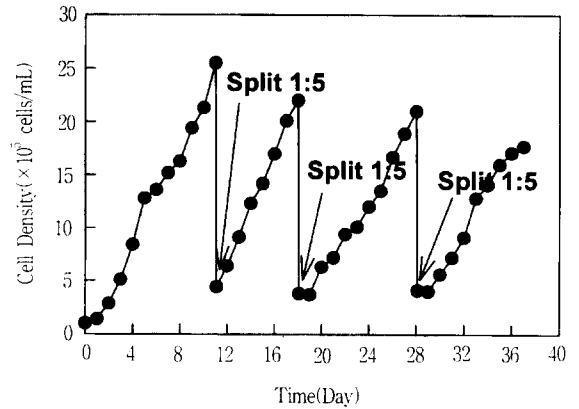


Figure 6. Continuous culture of HeLa cells using bead-to-bead cell transfer method. (RPMI-1640, 10%Horse serum, Asahikasei microcarrier 1g/L).

Vaccinia virus 감염 및 재조합 단백질 수율

동물세포 배양을 통해서만 얻을 수 있는 유용 단백질로는 조혈인자(EPO), 혈전용해제(TPA) 등이 있으며 국내의 경우에는 동물세포 배양 산물 중 백신이 차지하는 비율이 가장 크다. 따라서 본 연구에서는 담체간 전이 배양에 의한 미립담체 배양의 scale-up을 실제 바이러스 백신 및 재조합 단백질 생산 공정에 적용할 수 있는지를 확인하기 위하여 재조합 vaccinia virus를 사용하였다. 다공성 미립담체에서 세포를 성장시켜 담체간 전이 배양을 이용한 계대배양을 수행한 후 재조합 Vaccinia virus를 감염하여 β -galactosidase 수율 변화를 조사하였으며 그 결과를 Figure 7에 나타내었다. 최대의 수율을 나타내는 시간은 세포주와 배양 시스템에 따라 차이를 보인다. Vaccinia-HeLa 시스템의 경우 T-flask에서는 바이러스 감염 후 60시간 경과 후 가장 높은 재조합 단백질 수율을 보였다(8). 그러나 미립담체의 경우는 T-flask의 경우 보다 약 10시간 가량 더 걸렸다. 이것은 Figure 8에서 보이는 것처럼 바이러스가 T-flask 바닥의 세포에 부착하는 속도보다는 미립담체에 크고 있는 세포에 부착하는 시간이 더 오래 걸리고 미립담체 속에서 크고 있는 세포까지 바이러스가 감염되는데 시간이 더 오래 걸리기 때문이라고 생각된다. 또한, 감염 후 60-70시간까지도 세포는 미립담체로부터 거의 떨어져 나오지 않았으며 대부분의 재조합 효소의 활성은 담체내의 세포에 의한 것이었다. 시간이 더 경과하면 많은 세포들이 담체에서 떨어지기 시작하고 따라서 배지와 떨어져 나온 세포에 의한 효소 활성이 높아지게 된다.

T-flask 및 DMEM으로 배양한 첫 번째 미립담체 배양, 담체간 전이배양으로 계대배양한 두 번째 배양 및 세 번째 배양에서의 β -galactosidase 수율을 조사하였으며 Table 1에 그 결과를 비교하였다. T-flask에서의 경우보다 미립담체 배양이 세포당 수율이 다소 떨어지는 것을 볼 수 있었다. 그러나, 담체간 전이 배양을 통하여 계대배양한 경우는 최초 T-flask로부터 접종세포를 준비하여 배양한 첫 번째 배양과 비슷한 세포당 수율을 나타내 이 방법을 통한 미립담체 계대배양이 virus 생산이나 단백질 생산을 위한 동물세포 배양 규모 증대에 적용 가능하다는 것을 보여주고 있다.

동물세포를 사용하여 유용물질을 생산하고자 하는 경우에는

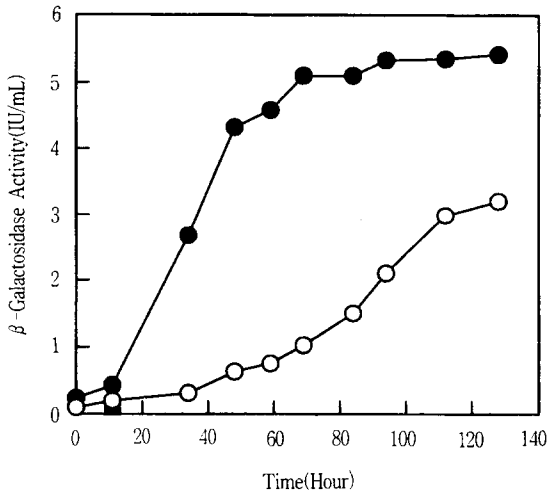


Figure 7. β -Galactosidase activity yield of bead-to-bead cell transferred second culture. (● : 72 RPM, total activity, ○ : 72 RPM, activity of medium and suspended cells-except cells in microcarriers)

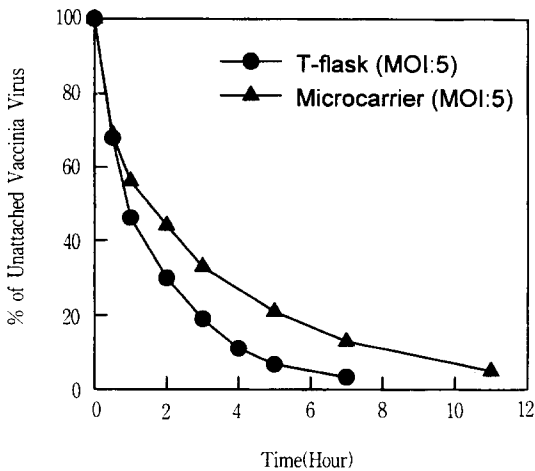


Figure 8. Vaccinia virus attachment rate to HeLa cells cultivated on tissue culture flask and macroporous microcarriers. Unattachment virus particles were titered by plaque assay method and 5 multiplicity of infection(MOI) was used in both case.

Table 1. Comparison of β -galactosidase yield of HeLa cells cultivated on T-flasks, macroporous microcarriers and bead-to-bead cell transferred microcarriers.

β -galactosidase activity	T-flask	Microcarrier culture (First culture)	Bead-to-bead cell transferred cultures	
			Second culture	Third culture
IU/mL	2.5	6.3	5.4	4.7
IU/ 10^6 cells	3.1	2.2	2.1	1.8

세포의 종류, 생산하고자 하는 물질의 종류, 생산 규모에 따라 미립담체의 사용 여부 및 종류를 선정하여야 하며 비용면에서 scale-up을 위한 미립담체 계대배양의 필요 여부를 결정하여야 한다. 이때 담체간 전이 배양 방법은 그 간편성으로 인하여 하나의 좋은 선택이 될 수 있을 것이다.

요 약

Cellulose로 만들어진 다공성 미립담체를 이용하여 HeLa cell 을 working volume 100mL의 spinner flask에서 배양하였으며, 세포가 완전히 자란 미립담체를 계대배양하기 위하여 담체간 세포 전이 배양 방법을 시도하였다. 부유세포의 농도는 다공성 미립담체-HeLa 시스템의 경우에 담체간 세포 전이 배양에 영향을 미치는 중요한 인자로 작용하였으며, 낮은 칼슘농도의 배지인 RPMI-1640과 빠른 교반 속도를 이용하여 활성을 유지한 많은 세포가 떨어지도록 유도하였으며, 담체간 세포 전이 배양을 효과적으로 3회 이상 실시할 수 있었다. 이렇게 배양한 세포에 재조합 Vaccinia virus를 감염하여 그 수율을 비교한 결과 T-flask에서 떼어낸 세포로 접종한 미립담체 배양과 거의 비슷한 재조합 단백질(β -galactosidase) 수율을 나타내었다. Trypsin 처리 방법에 의한 미립담체 계대 배양도 경우에 따라서는 유용한 미립담체 계대 배양 방법이 될 수 있지만 실제 생산 규모에 의 적용에는 공정이 복잡해지고 정확한 제어가 필요하다는 등의 문제가 있다. 따라서, 추가적인 비용이나 공정이 필요 없는 간편한 방법인 담체간 세포 전이 배양은 동물세포 배양을 이용한 유용 단백질 및 바이러스 생산 공정의 규모 증대에 매우 유용한 수단이다.

감 사

세포주와 바이러스주를 분양해 주신 고려대 안병윤 교수님과 김익환 박사님께 깊이 감사드리며 또한, 연구비를 지원하여 주신 동국대학교에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Looby, D. and B. Griffiths (1990), Immobilization of Animal Cells in Porous Carrier Culture, *TIBTECH*, 8, August, 204-209.
- Cahn, F. (1990), Biomaterials Aspects of Porous Microcarriers for Animal Cell Culture, *TIBTECH*, 8, May, 131-136.
- Giard, D.J., D.I.C. Wang, and W.S. Hu (1985), Serial Propagation of Mammalian Cells on Microcarriers, *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 1466-1476.
- Tao, T.Y., G.Y. Ji, and W.S. Hu (1988), Serial Propagation of Mammalian Cells on Gelatin-Coated Microcarriers, *Biotechnol. Bioeng.*, 32, 1037-1052.
- Crespi, C.L. and W.G. Thilly (1981), Continuous Cell Propagation Using Low-Charge Microcarriers, *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 983-993.
- Shevitz, J.S., T.L. Laporte, and T.E. Stinnett (1990), Production of Viral Vaccines in Stirred Bioreactors, *Advan-*

- ces in Biotechnological Processes*, **14**, 1-35.
7. Ohlson, S., J. Branscomb, and K. Nilsson (1994), Bead-to-bead transfer of Chinese hamster ovary cells using macroporous microcarriers, *Cytotechnology*, **14**, 67-80.
 8. 이두훈, 박정국 (1996), 재조합 백시니아 바이러스를 이용한 단백질 생산을 위한 숙주 동물세포의 배양 조건 최적화, *한국생물공학회지*, **11**, 438-444.
 9. Dulbecco, R., and J. Elkington (1975), Induction of Growth in Resting Fibroblastic Cell Cultures by Ca^{++} , *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 1584-1588.
 10. Peshwa, M.V., Y.S. Kyung, D.B. McClure, and W. S. Hu (1993), Cultivation of Mammalian Cells as Aggregates in Bioreactors : Effect of Calcium Concentration Spatial Distribution of Viability", *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 179-187.