

7

동물세포 배양 및 그 생산물

동물세포(animal cells)를 배양하는 목적은 크게 두 가지로 효소, 호르몬, 백신, 면역 조절인자, 항암제 등 여러 종류의 의료용 치료 단백질을 생산하는 것과 장기(organ)나 조직(tissue)을 만들어 내는 일이다. 치료용 단백질은 유전자 재조합된 미생물을 이용하여 생산할 수도 있다. 그러나 생성물이 대개 당그룹이 연결되어 있는 복잡한 단백질이기 때문에 단백질 합성뿐만 아니라 번역 후 수정(post-translational modification)을 수행할 수 있는 동물세포를 이용하는 것이 제품의 품질면에서 바람직하다.

동물세포 배양이란 체외(*in vitro*)에서 인공적으로 체내(*in vivo*)와 유사한 조건을 제공하여 세포를 대량 증식시키는 방법이다. 이때 동물세포는 현탁(suspension) 상태나 단층부착(monolayer attachment) 상태로 성장한다.

동물세포 배양은 미생물이나 식물세포의 배양에 비하여 더 까다롭다. 동물세포를 배양할 때 다음 사항을 고려해야 한다.

- 1) 대부분의 동물세포는 표면에 부착하여 성장한다.
- 2) 동물세포는 미생물보다 크고 복잡한 세포로서 성장속도가 미생물에 비하여 매우 느리기 때문에 생산성이 낮고 배양 도중 미생물에 의해 오염되기 쉽다.
- 3) 배양에 필요한 배지의 조성이 완전하게 알려져 있지 않고, 혈청(serum)과 같은 값비싼 성분을 요구한다.
- 4) 동물세포는 섬세한 플라즈마 막(plasma membrane)으로 둘러 쌓여 있어서 전단력(shear force)에 약하므로 산소 공급을 목적으로 한 심한 교반을 피해야 한다.

동물세포 배양 중에서 포유동물세포(mammalian cells) 배양이 주류를 이루고 있기 때문에 양자를 혼동해서 사용하는 경우가 있다. 그러나 동물세포 배양에는 포유동물세포 이

외에 곤충세포나 물고기세포의 배양도 포함되어 있다. 곤충세포는 강력한 프로모터를 갖고 있는 배큘로 바이러스(baculovirus)에 의해 감염시켜 유용한 단백질을 생성한다. 포유동물세포 배양으로 단백질을 생산하는 경우 숙주세포로는 대개 유전자 조작된 중국 햄스터 난소세포(Chinese hamster ovary cells, CHO cells)가 이용된다. 단가항체(monoclonal antibody)를 생산하는 경우에는 하이브리도마(hybridoma)세포를 이용한다. 포유동물세포에 유전자 재조합 처리를 하기 위해 사용되는 운반체(vector)는 보통 영장류(primates)의 바이러스이다.

7.1 세포 배양을 위한 동물세포의 처리

동물세포를 배양하기 위하여는 동물의 특정 장기 또는 조직에서 떼어 낸 조직들을 처리하여야 한다. 우선 무균상태에서 T-플라스크나 롤러 병(roller bottle)에서 성장시키는 데 이것을 1차 배양 또는 초대 배양이라 한다. 이때 얻어지는 세포는 1차 배양세포(primary cell line)라 하며 부착의존성 세포(anchorage-dependent cell)이다. 1차 배양은 배지에 의해 크게 영향을 받는다. 처리의 두 번째 단계는 EDTA, 트립신, 콜라게나아제(collagenase) 등이 포함된 용액을 사용하여 1차 배양세포를 플라스크 표면에서 분리하여 배양하는 것이다. 이때 얻어지는 2차 배양세포(secondary cell line)는 현탁액상에서 자라도록 적응되어진 비부착의존성(anchorage independent) 세포가 될 수 있다. 하이브리도마 같은 몇몇 동물세포는 부착의존성이 아니며 현탁배양(suspension culture)에서 성장한다.

배양에 사용되는 동물세포의 형태는 세 가지로 비부착의존성 세포인 림프구(lymphocyte), 부착의존성 세포인 상피세포(epithelial), 그리고 섬유아세포(fibroblast)가 있다.

정상적인 동물세포 계통(cell line)들은 사멸성(mortal)이어서 세포분열 횟수가 한정되어 있다. 예를 들어, 인간 섬유아세포(human fibroblast)인 MRC5는 약 30세대 분열 후 노화되어 더 이상 분열되지 않는다. MRC9 및 IMR90 등도 세포분열 횟수가 한정되어 있다. 그러나 동물세포를 형질 변경시키면 무한정 분열될 수 있는 세포가 만들어진다. 무한정 분열이 가능한 세포의 예로는 CHO-K1(Chinese hamster ovary 기원의 섬유아세포), HeLa(인간세포 기원의 상피세포), Vero(원숭이 신장에서 유래된 섬유아세포) 등이 있다.

동물세포에는 아포토시스(세포의 자살·자멸) 라는 기능이 있어 일정한 기간이 지나거나 생체 내에서의 역할이 끝나면 저절로 죽게 된다. 이 아포토시스의 움직임을 유전자 수준에서 억제하면 단백질을 만드는 동물세포의 수명을 연장시킬 수 있다.

7.2 배양 대상의 선택

배양 대상으로 선택된 원(原)조직이 배조직(embryonic tissue)인 경우에는 간세포(stem

cell)나 전구세포(precursor cell)의 복제가 활발하게 일어나기 때문에 특정 세포를 구별하기가 어렵다. 반면에 성숙한 조직(adult tissue)을 배양할 때에는 분화된 세포가 많기 때문에 특정 세포를 분리하여 배양하기에 유리하다. 그러나 세포의 성장속도가 느리고 생존기간이 짧다는 단점이 있다.

정상세포를 배양하는 경우에는 대부분 미분화 간세포(undifferentiated stem cell)나 전구세포의 상태로 성장하다가 분화가 시작되면서 증식이 정지한다. 반면에 종양조직에서 유래된 세포의 경우에는 성장과 분화가 섞여 있으므로 지속적으로 성장한다.

인공적인 배양이 가능한 세포는 골격을 이루는 골아조직(osteoblast), 연골아세포(chondroblast)나 결합조직(connective tissue)을 이루는 섬유아세포(fibroblast) 등이 있다. 또한 췌장(pancreas)의 랑거한 섬세포(Langerhans islet cell)나 간(liver)의 간세포(hepatocyte)와 같은 대사조절 기능을 갖는 물질을 분비하는 복잡한 세포의 배양도 가능하다. 최근에는 인간 배아의 간세포(stem cell)의 배양도 가능하다고 보고되었다.

7.3 배양세포의 균일성

같은 세포주(cell line)를 배양한다는 것만으로는 균일한 배양을 한다고 말할 수 없다. 계대(lineage) 및 배양세포의 분화단계도 확인하여야 한다. 예를 들어, 피부각질세포(epidermal keratinocyte)를 배양하면 간세포(stem cell), 전구세포(precursor cell), 그리고 전구세포의 증식과 성숙에 따른 최종 산물인 각화표피물(keratinized squame) 등이 섞여 있어 배양세포가 균일하지 않다.

또한 같은 종류의 세포라 하더라도 조직이 다르면 세포의 기능도 다르다. 예를 들어, 같은 섬유아세포(fibroblast)라 하더라도 피부에 위치한 것과 혈관 벽에 위치한 것은 서로 다른 생명 주기를 가지고 있기 때문에 배양세포의 균일성을 유지하기 위하여 그 세포의 기원(source)을 확인하여야 한다.

7.4 동물세포 배양에 사용되는 배지

포유동물세포 배양을 위해 사용되는 배지는 미생물 배양용 배지보다 복잡하며 고가이다. 미생물 배지를 구성하는 탄소원과 에너지원, 질소원, 무기염류, 미량원소 외에도 비타민, 성장인자, 완충제(buffering agent) 등이 포함되어야 하며 특히 5~20%의 혈청(serum)이 추가되어야 한다.

혈청은 호르몬, 성장인자, 비타민을 공급해 줌으로써 동물세포의 성장과 활성을 촉진시킨다. 혈청은 또한 호르몬, 미네랄, 지방 등을 운반하는 수송 단백질을 제공해 주는 등

표 7.1 혈청의 주요 성분 및 세포 성장에서 하는 역할

성분	기능
단백질 알부민 Fetuin Fibronectin α ₂ -macroglobulin Transferrin	Osmoticum 및 완충제 세포부착 세포부착 트립신 억제제 철(Fe)을 결합함
Polypeptides 내피세포(Endothelial) 성장인자(EGF) 표피세포(Epidermal) 성장인자(EGF) 섬유아세포(Fibroblast) 성장인자(FGF) 인슐린형(Insulin-like) 성장인자(IGF) 혈소판유래(Platelet-derived) 성장인자(PDGF)	유사분열 촉진인자(Mitogen) Mitogen Mitogen Mitogen Mitogen 및 주요 성장인자
호르몬 Hydrocortisone 인슐린 성장 호르몬	세포 부착과 증식 촉진 포도당과 아미노산 흡수 촉진 태아의 혈청에 존재하는 Mitogen
대사산물 및 영양소 아미노산 포도당 케토산(예: 피루브산) 지질(예: 콜레스테롤)	세포 증식 세포 증식 세포 증식 생체막 합성
Minerals 철, 구리, 아연, 셀레늄	효소 및 기타 구성 성분
억제제 γ-globulin 사전 오염으로 인한 박테리아 독소	

필수적인 역할을 한다. 이외에도 단백질 분해효소(protease)의 활성을 억제하고, pH 조절 용 완충제 역할을 하는 등의 장점이 있다. 그러나 그 가격이 고가이며, 혈청 내에 포함되어 있는 단백질 및 펩티드 때문에 세포배양 후 얻어지는 제품의 분리정제 공정이 매우 복잡해진다. 또한 혈청을 멸균하기 위하여 가열법을 사용하지 못하고 여과(filtration)해야 하기 때문에 마이코플라즈마(mycoplasma) 또는 바이러스 등에 의한 오염의 가능성을 증가시킨다. 또한 혈청을 함유한 배지는 거품이 잘 생긴다. 그러나 혈청 사용의 가장 큰 문제점은 배치(batch) 마다 혈청의 조성이 달라지기 때문에 혈청을 사용한 실험은 재현성을 얻기 어렵다는 점이다. 동일한 세포를 같은 성분의 배지에서 배양한다 하더라도 그 배양의 결과가 항상 다르게 나타난다.

이러한 문제점을 극복하기 위해 무혈청(serum-free) 배지가 개발되어 왔다. 무혈청 배

지 내에는 포도당, 글루타민, 다른 아미노산, 염들 이외에도 혈청 대체 물질로서 인슐린, 트랜스페린(transferrin), 셀레늄(selenium)을 포함하기도 한다. 무혈청 배지는 그 구성 물질의 조성을 분명히 알 수 있어 배지 조성이 표준화되며 실험의 재현성을 높인다. 또한 멸균이 용이하고, 생성물의 정제가 쉽고, 가격이 비교적 저렴한 장점이 있다.

무혈청 배지의 문제점으로는 특정 호르몬이나 성장인자를 첨가해야 하는 경우 비용이 비싼 점, 상업화가 불가능하므로 용도에 따라 맞춤 생산이 되어야 하는 점, 세포의 성장 속도가 혈청이 함유된 배지보다 느린 점, 세포 계통마다 서로 다른 무혈청 배지 조성을 요구하는 점과 무혈청 배지에 적용되지 않는 세포 계통이 있다는 점이다. 대표적인 무혈청 배지에는 Eagle's MEM(Minimal essential medium), DME(Dulbecco's modified Eagle's medium), Ham's F 12, SF 12, RPMI 1640 등이 있다.

7.5 동물세포의 대사

동물세포의 주요 대사경로에는 포도당과 글루타민(glutamine)이 주요 탄소원 및 에너지원으로 사용된다. 동물세포에 의해 포도당이 대사되면 박테리아의 경우와 마찬가지로 해당과정을 거쳐 피루브산이 된다. 또한 인산오탄당 경로(pentose phosphate pathway)에 의해 오탄당을 만들어 핵산을 합성하는 것도 박테리아의 경우와 동일하다. 해당과정에서 만들어진 피루브산은 TCA회로에 의해 CO_2 와 H_2O 로 분해되기도 하고 젖산이 되기도 하며, 또한 지방산이 되기도 한다.

동물세포 대사에 사용되는 탄소원 중에서 특이한 것은 글루타민(glutamine)으로서 이 물질이 대사되면 일부는 글루타메이트(glutamate)가 되고, 글루타메이트는 TCA 회로로 들어가 다른 아미노산 합성을 위한 탄소골격(carbon skeleton)을 만든다.

동물세포 대사의 주요 배설물은 젖산과 암모니아이며 알라닌(alanine)의 배출 또한 중요하다. 젖산염(lactate)과 암모니아는 세포 내부와 리소좀의 pH를 변화시키기 때문에 세포에 유독하다. 따라서 이 물질을 효과적으로 제거하는 것이 고농도 동물세포 배양 시스템에서 중요한 문제이다.

7.6 포유동물세포의 배양 조건

포유동물세포는 그 크기가 $10\sim 30\mu\text{m}$ 로서 성장속도는 배가시간(doubling time)으로 표시하여 $10\sim 50$ 시간이며 전형적인 값은 20 시간이다. 세포농도는 현탁배양시 $0.1\sim 1\text{ g/L}$ ($0.5\times 10^6\text{ cells/mL} \sim 5\times 10^6\text{ cells/mL}$)에 도달한다. 포유동물세포 배양을 위한 최적 환경 조건으로 온도와 pH는 각각 37°C 와 7.3이다. pH를 7.3 부근에 유지하기 위하여 5%의

CO₂가 보강된 공기를 사용한다. 탄산염 완충용액(carbonate buffer, HCO₃²⁻/H₂CO₃⁻)이 pH를 7.3부근에 유지하는 데 사용된다. 반면 곤충세포 성장을 위한 최적 온도는 약 28 °C이며 pH는 6.2 부근이다. 물고기 세포 배양의 적정 온도는 동물세포보다 낮은 25~35 °C이지만 넓은 범위의 온도에서 잘 견디며, pH 7~7.5에서 잘 자란다.

동물세포 성장에 필요한 산소요구량(0.06~0.2 × 10⁻¹² mol O₂/h · cell)은 식물세포의 20% 수준으로 적은 편이지만 동물세포는 섬세한 플라즈마 막을 갖고 있어서 전단응력(shear stress)에 민감하게 손상되기 때문에 배양기 내에 미생물 배양 때 사용하는 형태의 교반기를 그대로 사용하는 것은 곤란하다. 또한 같은 종류의 세포를 같은 배지 내에서 배양한다 할지라도 전단응력에 따라 목적 생산물의 생산속도가 달라진다. 따라서 전단응력을 감소시킨 돛-형태 교반기(sail-type agitator)와 노-형태 교반기(scull-type agitator)가 개발되어 10~30 rpm의 교반속도를 사용하고 있다.

동물세포의 배양에 사용되는 배양조건은 세포의 증식을 목적으로 하는 경우와 분화를 목적으로 하는 경우에 따라 각각 다르다. 세포 증식의 최적 조건은 세포 농도가 낮고, 칼슘 농도가 낮으며(100~600 μM), 상피세포 성장인자, 섬유아세포 성장인자 및 혈소판 유래 성장인자가 존재할 때이다. 세포 분화의 최적 조건은 세포 증식이 정지된 상태이며 세포 농도가 높고(1 × 10⁵ cells/cm²), 칼슘 농도가 높으며(300~1500 μM), 분화 유발인자, 신경교 성숙인자, 신경 성장인자 등이 존재할 때이다.

동물세포의 성장곡선은 보통 3일 정도의 지연기(lag phase)를 가지며 미생물의 성장곡선에 비하여 보통 정지기가 짧고 글루타민 대사산물인 암모늄과 포도당 대사산물인 젖산의 축적으로 인하여 정지기 말기부터 살아 있는 세포(viable cell)의 농도가 급격히 감소한다.

포유동물세포에 의한 치료용 단백질 등의 생산은 성장기간뿐만 아니라 성장을 멈춘 기간 동안에도 생성물을 만들어 내는 혼합형 성장연관형태(mixed growth associated type)이며 다음과 같이 수식으로 표현된다.

$$\frac{1}{X} \cdot \frac{dP}{dt} = q_p = \alpha\mu + \beta$$

이 식에서 제일 우변의 첫째 항($\alpha\mu$)은 성장과 관련된 생산을 나타내는 항(growth-associated production term)이며, 둘째 항(β)은 성장과 관련이 없는 생산을 나타내는 항(nongrowth-associated production term)이다. 또한 X 는 세포의 농도, P 는 생성물의 농도, t 는 시간, q_p 는 비생산속도(specific production rate), μ 는 비성장속도(specific growth rate)이고, α 와 β 는 특정 세포에 대해 실험으로 결정되는 상수이다.

7.7 포유동물세포의 배양 도구

실험실에서 사용되는 동물세포 배양 용기로는 T-플라스크(100 mL~1 L), 패들형태의 자석 교반기가 있는 스피너 플라스크(100 mL~1 L), 약 1~5 rpm으로 회전하는 롤러 병(roller bottle) (50 mL~5 L) 등이 있다. 그러나 동물세포는 대부분 부착의존성 세포이므로 이러한 배양 용기보다 단위부피당 표면적을 더 크게 할 필요가 있으므로 미세담체(microcarrier), 실관(hollow fiber), 세라믹 매트릭스(ceramic matrix) 등을 이용한 시스템이 개발되었다.

미세담체를 사용하면 1 L당 70,000 m² 정도의 표면적이 제공되며 세포농도도 10⁷ cells/mL 까지 증가된다. 가장 흔히 사용되는 미세담체는 덱스트란(dextran)을 기본으로 한 것과 DEAE를 기본으로 한 것(DEAE-sephadex, DEAE-poly acrylamide)이 있다. 실관반응기, 겔(gel) 비드, 미세캡슐화(microencapsulation) 등이 하이브리도마 세포로부터 단가 항체(monoclonal antibody)를 생산하기 위하여 실험실 규모로 사용되었으나 물질전달 속도가 느려지고 미세환경 조건의 제어가 어렵기 때문에 대규모화나 대량 생산을 위해 사용하는 데 문제가 있다.

포유동물세포의 성장곡선에서 정지기는 미생물에 비해 짧고 젖산염과 암모늄 같은 유독성 대사산물이 축적되어 살아 있는 세포의 농도가 급격히 감소한다. 유독성 대사물질을 제거하면서 배양하기 위하여 막(membrane)이나 미세캡슐(micro capsule)에 세포를 가두어 두고 배지를 필요에 따라 첨가하고 간헐적으로 사용된 배지를 제거하는 관류반응기(perfusion reactor)가 사용된다.

7.8 동물세포 배양의 종류

동물세포 배양은 초대배양과 계대배양(subculture)이 있다. 초대배양이란 조직편(片)에서 세포를 분리하여 배양하는 과정이다. 계대배양이란 초대배양을 통해 얻은 세포를 지속적으로 유지하기 위해 배양하는 방법이다.

7.8.1 초대배양

초대배양은 두 가지로 구분되며 그 하나는 조직편을 1~2 mm² 정도로 작게 나눈 다음 조직편을 그대로 배양하는 조직배양(tissue culture)과 조직편으로부터 필요로 하는 세포만을 분리하여 배양하는 분리 세포배양(explant-out growth culture)이 있다.

세포를 분리하는 방법에는 밀도균형 원심분리법과 세포관류법이 있다. 밀도균형 원심분리법은 조직편과 세포의 비중이 다른 점을 이용하여 세포를 분리하는 방법으로서 대

표적인 예는 혈액으로부터 임파구를 분리하는 경우이다. 즉, 임파구보다 비중이 큰 표준액을 사용하여 1,500 rpm에서 30분간 혈액을 원심분리하면 혈장, 임파구(비중 1.075), 표준액(비중 1.077)이 상층을 이루고 적혈구(비중 1.079) 등은 침전물이 된다.

세포관류법이란 분화한 세포막 표면에 존재하는 특이한 항원을 이용하는 것으로서 이 항원과 결합하는 형광색소(fluorescent dye) 표식항체가 첨가된 세포부유액을 관류시키면서 레이저 광을 조사시켜 형광을 발하는 특정 세포만을 분리하는 방법이다.

7.8.2 계대배양

동물로부터 분리한 세포를 반복하여 배양하면 세포의 수명이 다하여 사멸하는 경우가 대부분이지만 일부 세포는 계속하여 증식하며 그 세포 본래의 특성을 유지한다. 이러한 세포는 세포주(cell line)를 형성하며 이 세포주는 무한대로 증식이 가능하고 균일한 세포 성질을 가지므로 고유 번호를 부여받아 세포 은행에 동결 보존되어 그 세포주를 필요로 하는 사용자에게 공급한다.

동결보존을 위해서는 20% 혈청 배지에 동결 보호제인 디메틸설폭사이드(dimethylsulfoxide, DMSO)가 첨가된 배지와 2×10^6 cells/mL 농도의 세포를 혼합하여 -80°C 냉동기에서 24시간 동결한다. 동결된 세포는 액체 질소용기에 넣어 장기간 보존한다.

7.9 동물세포 배양용 장치

동물세포 배양에 필요한 장치로는 무균실험대(clean bench), 이산화탄소 배양기(CO_2 incubator), 원심분리기, 도립현미경(inverted lens microscope)이 있다.

무균실험대는 동물세포 배양용 배지가 박테리아나 곰팡이 등에 의해 오염되는 것을 방지하기 위해 꼭 필요한 장비이다. 무균실험대는 사용 후후에 70% 에탄올로 내부를 소독하고, 사용하지 않는 동안에는 자외선 살균등(UV lamp)을 켜서 무균상태를 유지해야 한다.

이산화탄소 배양기는 공기에 5%의 이산화탄소가 추가된 기체조성이 유지되도록 고안한 장치로서 대개 100%의 습도와 37°C 를 유지한다. 이산화탄소를 공급하는 이유는 배지 내에 있는 탄산 완충용액에 의한 수소이온 농도(pH) 조절을 돕기 위해서이다.

원심분리기는 배지 중에 부유하는 동물세포를 분리하기 위해 사용되며 분당 3,000 rpm (1,500 g)이내의 범위에서 작동하여 세포가 파괴되지 않도록 한다.

도립현미경은 대물렌즈(objective lens)가 시료판 아래에 장착되어 있어 배양기 바닥에 부착되어 있는 동물세포의 상태를 관찰하기 위해 사용된다.