

## 다공성 콜라젠 미립담체를 이용한 부착성 동물세포 Vero-6의 배양

최연수·최태부\*·박정극

동국대학교 공과대학 화학공학과, 건국대학교 공과대학 미생물공학과\*

### The Cultivation of Anchorage-Dependent Animal Cell, Vero-6, on Macroporous Collagen Microcarrier

Yeon-Soo Choe, Tae-Boo Choe\* and Jung-Keug Park

Department of Chemical Engineering, College of Engineering,  
Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

\*Department of Microbial Engineering, College of Engineering,  
Konkuk University, Seoul 133-701, Korea

#### ABSTRACT

The comparison of the capabilities of cell growth of four different kinds of commercially available microcarriers was carried out by culturing anchorage-dependent animal cells, Vero-6, in a spinner flask. Using 3 g/l of Cytodex 3, the maximum final cell density was about  $1.4 \times 10^6$  cells/ml and increased up to  $2.0 \times 10^6$  cells/ml by increasing microcarrier concentration up to 5 g/l. The macroporous collagen microcarriers, VX-100, Informatrix, and Cultispher-G showed the final cell concentration of  $4.4 \times 10^6$  cells/ml,  $2.1 \times 10^6$  cells/ml, and  $3.2 \times 10^6$  cells/ml, respectively at the microcarrier concentration of 5 g/l. According to this result, VX-100 showed better cell growth than Informatrix and cultispher-G and also showed about 2 fold increase in final cell density comparing to Cytodex 3 solid bead. When the intermittent bead-to-bead transfer technique was introduced in the culture using Cytodex 3 bead and Cultispher-G, the result was very successful and the cells grew out very well. The recovered cells by dissolving collagen microcarrier using collagenase enzyme were mostly viable and grew out very well on the surface of the fresh microcarriers.

#### 서론

1980년대 중반부터 생물공학 분야에서 의약품 개발의 일환으로 동물 세포배양을 이용한 제품을 생산해내고 있다. 예를 들면 단일클론항체, 혈압강하제, 백신, 인터페론, TPA(Tissue Plasminogen Activator) 등과 같은 고부가가치의 의약품 등을 선진 각국에서 활발히 개발해 나가고 있다(1). 1970년대 후반부터 유전자 재조합에 의한 미생물의 개발로 생물공학은 첨단산업으로 각광을 받게 되었지만, 동물

세포에서 생합성되던 단백질들을 미생물을 통하여 생산하는 과정에서 미생물의 제한된 능력으로 활성을 지닌 완전한 구조를 갖는 단백질을 생산하는 데는 한계점이 있고 대부분의 단백질들의 세포 밖으로 분비가 안되기 때문에 세포를 파괴한 후 원하는 단백질만을 분리, 정제하는 과정이 복잡하고 값이 고가이기 때문에 동물세포에서 유래되는 각종 의약품들을 개발해 내고자 cell line 개발과 동물세포 대량 배양기술에 관심을 모으고 있는 실정이다(2, 3).

동물세포는 크게 부착성 동물세포(anchorage-de-

pendent cell)와 부유성 동물세포(anchorage-independent cell)로 나누어진다. 부착성 동물세포는 세포가 부착표면에 정착하여 자라는 세포이고, 부유성 세포는 부착표면이 필요하지 않고 스스로 비부착 상태로 자라는 세포를 말한다. 1975년 Kohler와 Milstein이 특정한 항체를 생산하는 세포와 종양세포의 일종인 myeloma 세포를 융합시켜 얻은 hybridoma가 비부착성 동물세포의 예인데 hybridoma로부터 단일클론항체(Monoclonal Antibody)를 반영구적으로 생산할 수 있었다(4). 그러나 동물세포에서 생산될 수 있는 제품 중 약 80~90% 이상이 부착성 동물세포의 배양에 의해서 이루어지고 있다. 부착성 동물세포의 배양은 전통적으로 roller bottle이나 Roux bottle을 이용하였고 1970년대에 들어 처음으로 표면전하량을 조절한 DEAE-Sephadex 미립담체(microcarrier)를 이용하여 세포증식을 약 10배 정도 증가시킬 수 있었다(5). 그러나 미립담체의 농도를 너무 높게 되면 세포성장이나 중독되는 toxic effect가 있고, 고농도 배양에서는 산소전달문제가 용이하지 않다는 점이 문제이다(6). 미립담체의 종류는 크게 표면에만 세포가 부착하여 증식하는 solid microcarrier와 세포가 담체의 구멍조직 내에서 증식하는 다공성 미립담체(macroporous microcarrier)로 나눌 수 있다. Solid microcarrier의 대표적인 예는 1967년 Van Wezel이 최초로 만든 이후 개발된 이온교환수지인 Cytodex계열이다(7, 8). 현재에는 여러 가지 재료가 개발되어 glass, cellulose, 순수한 collagen, 또는 collagen을 표면에 도포한 여러 가지의 제품이 생산되고 있다(10, 11). 그러나 최근 들어 이러한 solid microcarrier의 단점인 표면적의 제한, 담체간의 충돌 및 교반에 의한 eddy의 충격 등을 보완하기 위하여 담체 내부를 다공성으로 만든 담체가 국외에서 주로 생산되기 시작하였고 국내에서도 한국과학기술원에서 개발을 추진중에 있다(9). 최초의 다공성 미립담체는 미국의 Verax Co.에서 개발한 collagen을 원료로 한 스폰지와 유사한 구조의 담체였다(12). 그러나 collagen을 원료로 하여 상업화된 다공성 미립담체를 이용한 동물세포의 배양실험 자료는 그다지 많지가 않은 실정이다. 다공성 collagen 미립담체의 이점은 표면적이 크고 교반시 전단력에 의한 충격이 최소화된다는 것 외에도 collagenase에 녹임으로써 세포의 회수가 용이하다는 점이다. 또 미립담체 배양기술을 대량화할 경우에 필연적으로 수반되는 공정이 담체간의 세포전이(bead-to-bead transfer)이다. 배양 도중에 미립담

체를 계속 침가함으로써 최종 세포밀도를 올리고 제품의 생산성을 향상시키기 위하여 세포가 새로운 미립담체에 옮겨 자랄 수 있는 담체의 개발이 또한 중요하다. 현재 상품화된 solid microcarrier를 이용한 담체간의 세포 전이증식방법은 드물게 보고되고 있으나 다공성 담체를 이용한 실험결과는 별로 없는 실정이다. 최근들어 일본의 Toray회사는 수천 liter의 동물세포배양기에서 이 bead-to-bead transfer 기술을 이용하여 상업적으로 Human-Interferon Beta(HuIFN- $\beta$ )를 생산 시판하고 있다.

따라서 본 연구에서는 부착성 동물세포가 자랄 수 있는 표면적을 넓게 제공하여 대량 배양을 할 수 있는 여러 가지 다공성 collagen 미립담체를 이용해 각 미립담체들 간의 성능을 비교해 보았다. 실험에 사용한 미립담체는 모두 4종류로 Pharmacia Co.에서 개발한 Cytodex 3만 solid microcarrier이고 나머지 3종류는 모두 다공성 미립담체이다. 연구 목적은 이미 상품화되어 있는 미립담체를 이용하여 부착성 동물 세포를 배양한 후 미립담체에서 어느 정도까지 고농도 세포배양이 가능한지의 여부와 처음 세포를 접종하였을 때 세포가 미립담체에 붙는 부착속도 측정 및 bead-to-bead transfer를 통한 배양이 가능한지의 여부를 검토하고자 한다. 또한 젤라틴 미립담체는 collagenase 효소로 쉽게 녹임으로써 세포를 높은 viability를 유지하면서 회수하여 재사용할 수 있는지의 가능성을 판단하고자 한다.

## 재료 및 방법

### Cell line

본 실험에 사용한 동물세포는 Vero-6로서 과학기술원 생물공학과 김정희 박사님 Lab.에서 분양받아 실험하였다. Vero-6의 origin은 Africa Green Monkey Kidney cell로 배양시작 약 3일 전에 배양 flask(T-150)에 미리 세포를 키워서 배양용기 바닥에 완전히 confluent하게 자란 세포를 접종하였다.

### 미립담체 (Microcarrier)

실험에 사용한 미립담체는 4종류로 모두 상품화되어있는 것이다. 다음의 Table 1에는 실험에 사용된 4가지 미립담체의 특성을 나타내었다. 4가지의 미립담체 중 Cytodex 3와 Cultispher-G는 powder 상태이므로 PBS(Phosphate Buffered Saline) solution에 충분히 swelling시킨 다음, autoclave에서 멸균(121°C, 15min)하여 사용하였고, 나머지 Infor-

**Table 1. Composition of 4 types of microcarriers used for the experiment.**

	Cytodex3	Informatrix	VX-100	Cultispher-G
Manufacturer	Pharmacia Corp.(sweden)	Biomat Corp.(USA)	Verax Corp.(USA)	Percell Biolytica
Material	Dextran	Collagen	Collagen	Gelatin
	Coated with Collagen			
Shape	Spherical	Spherical	Spherical	Spherical
Size(dia, $\mu$ m)	130-210	500	500-600	220
Density(g/l)	1.04	-	1.6-1.8	1.04
Formulation	Dry	Dry	Solution	Dry
	Non-sterile	Sterile	Sterile	Non-sterile
Porosity	Non-porous	Macroporous	Macroporous	Macroporous
Surf. charge	Nonionic	Nonionic	Nonionic	Nonionic

matrix와 Verax bead는 멸균되어 있는 상태이므로 바로 사용하였다.

#### 배지(Medium)와 혈청(Serum)

배지는 powder상태인 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium; Sigma Co.)을 초순수(18.3 MegaOhm)에 완전히 녹인 다음, 오염을 방지하기 위해 antibiotics(mixture of penicillin 100unit/ml, streptomycin 100 $\mu$ /ml; Sigma Co.)를 첨가한 후 미리 완전히 밀폐하여 멸균시킨 여과장치(0.22 $\mu$ m의 porosity를 갖는 membrane을 끼움)을 이용하여 clean bench 상에서 무균조작하에 진공 filtration을 하였다.

혈청은 horse serum(Gibco Co.)을 사용하였고 배지에 10% 첨가하여 세포를 배양하였다.

본 실험에 사용한 spinner flask(Bellco Co.)는 total volume이 250ml인 것을 사용하였다. 부착성 동물세포를 배양하기 위해서 세포가 배양용기 안쪽 벽에 붙어 자라는 것을 방지하기 위하여 coating solution(Sigma Cote; Sigma Co.)을 사용하여 안쪽벽을 끈고루 coating한 후 약 24시간 건조한 후 멸균하여 사용하였다.

#### Cell Inoculation

미립담체를 각각 3g/l, 5g/l로 정량하여 PBS solution에 충분히 swelling시킨 후 autoclave에서 멸균하여 미리 준비한 spinner flask와 함께 clean bench에 옮긴 후 incubator에서 confluent하게 자란 세포를 꺼낸다. 배양 flask 안의 배지를 제거한 후 용기 안의 단백질 성분을 제거하기 위하여 PBS solution으로 두 번 washing하고, trypsin(0.25%;

Gibco Co.) 처리를 하여 약 3~4분 정도 incubator 안에 넣어 incubation을 시킨 후 꺼내어 trypsin을 제거한 후 새로운 배지로 여러 번 shearing하여 세포를 배양용기로부터 떼어내고 세포농도를 측정한다. 다음 10% 혈청이 들어 있는 배지와 함께 spinner flask에 넣어 준비한 미립담체를 첨가한다. 이때 최종배지의 volume은 100ml로 하였다.

세포 접종 후 바로 1ml sampling하여 hemacytometer에서 초기 접종농도를 측정하였고, 접종한 spinner flask를 incubator 안의 magnetic stirrer에 넣어 세포와 미립담체를 끈고루 suspension시키기 위해 약 1~2분간 교반시켰다. 초기 교반 후, 매 30분 간격으로 1ml씩 sampling하여 세포의 성장을 확인하였고, 배지 내의 필수 영양분 고갈을 막기 위하여 매일 약 80%의 배지를 새로운 배지로 교환해주었다. Cytodex 3와 Cultispher-G, Informatrix bead는 sampling한 미립담체에 붙어 있는 세포를 count하기 위하여 미립담체로부터 세포를 떼어낸 후 핵을 염색하여 세포수를 확인할 수 있는 nuclei counting method를 사용하였고, 나머지 Verax bead는 enzyme으로 처리해 bead를 녹인 후 핵을 염색하여 cell count하였다.

#### Nuclei counting method

Cell Counting 방법으로는 Van Wezel에 의해 수정된 Sanford et al.의 nuclei counting method를 사용하였다(15, 16).

#### Enzyme(collagenase)을 이용한 Cell count

Nuclei counting method와 마찬가지로 1ml sampling한 미립담체의 상등액을 버리고 enzyme(collagenase)을 1ml 정도 부어넣고 incubator에 넣어 약 15~30분간 incubation 시켜 bead를 완전히 녹인 후 1000 rpm으로 5분간 원심분리를 하여 cell을 바닥에 가라앉히고 다시 상등액을 따라 버린 후 0.1%(w/w) crystal violet in 0.1M citric acid를 넣어 1ml로 만든다. 이 tube를 incubator에서 1시간 incubation시킨 후 pasteur pipette을 이용해 여러 번 shearing한 후 hemacytometer에서 염색된 핵을 count했다.

#### Bead-to-bead transfer 방법을 이용한 배양

초기 접종 후 약 15~20일 배양을 하여 미립담체에 세포들이 완전히 자라서 stationary phase에 도달했을 때 연속배양을 위해 새로운 미립담체를 배양

액에 첨가하여 배양하는 bead-to-bead transfer 실험을 시행하였다.

이 실험방법은 우선, incubator에서 spinner flask를 꺼내어 서서히 흔들어서 미립담체들이 골고루 suspension되게 한 상태에서 disposable pipette을 이용해 80% (80ml)의 미립담체들을 제거한다. 미립담체를 제거한 후 미리 멸균해 놓은 미립담체(각각 3g/l, 5g/l의 80%에 해당)를 3차례(3일 간격)에 걸쳐 간헐적으로 첨가하는 방법과 한꺼번에 모두 첨가하는 2가지 방법을 병행하였다. 미립담체를 첨가하고 새로운 배지를 채워 다시 100ml로 하여 초기의 정상 volume으로 맞추었고, 1ml sampling하여 새로운 bead를 첨가한 상태의 초기농도를 측정하였다. 이 spinner flask를 incubator 안에 넣어 30분 간격으로 2분 동안 간헐적 교반을 시켰고 약 3시간 경과 후 40rpm으로 연속교반을 하였다. 이 실험도 마찬가지로 매일 24시간 간격으로 sampling하여 세포의 성장 정도를 측정하였고 배지의 고갈과 toxic metabolite의 제거를 위해 매일 80%의 배지를 제거한 후 새로운 배지로 채워주었다.

## 결과 및 고찰

### Cytodex-3를 이용한 세포배양

초기에 세포 접종농도를  $1.0 \times 10^5$  cells/ml로 하여 Cytodex-3를 각각 3g/l, 5g/l로 첨가하여 부착속도를 측정하는 것을 Fig. 1에 나타내었다. Fig에서 보아 알 수 있듯이 미립담체를 각각 3g/l, 5g/l 첨가했을 때 부착속도가 거의 비슷한 것으로 나타났다.

Cytodex-3 3g/l와 5g/l로 배양한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. Cytodex-3 3g/l의 경우 maximum cell density가 배양시작 6일만에 약  $1.4 \times 10^6$  cells/ml이었고, 5g/l의 경우 10일만에 약  $2.0 \times 10^6$  cells/ml까지 올라갔다. 5g/l의 경우 부착속도와 초기농도는 같으나 배양기일이 오래 걸린 이유는 3g/l와 비교할 때 세포수에 비해 미립담체의 양이 많아 담체에 할당된 세포수가 적어 유도기(lag phase)가 길어진 것으로 사료된다.

반면에 최종세포밀도가 높은 이유는 미립담체의 양이 상대적으로 많아 약 2g/l 만큼 세포가 더 성장하였다고 볼 수 있다.

Fig. 3에는 Cytodex-3 3g/l, 5g/l 각각의 bead-to-bead transfer 배양결과를 나타내었다. Fig에서 화살표는 새로운 미립담체를 첨가한 것을 보여주는 것이다. bead-to-bead transfer 연속배양에서

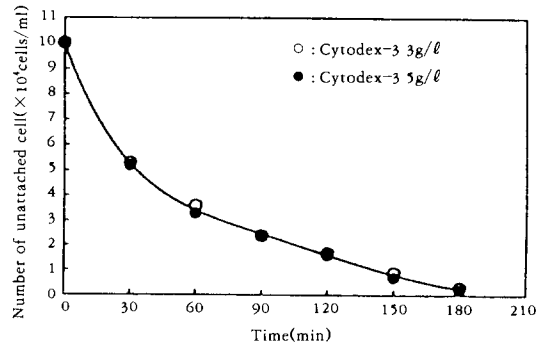


Fig. 1. Kinetics of attachment of Vero-6 on Cytodex 3.

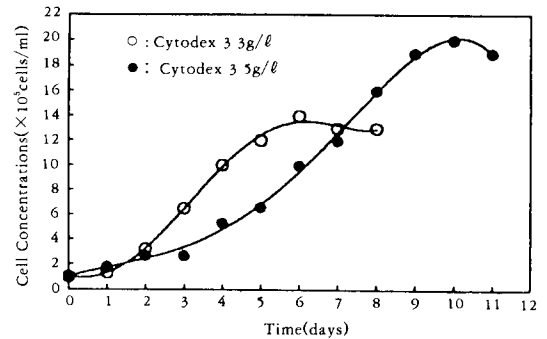


Fig. 2. The growth comparison of Vero-6 on Cytodex 3.

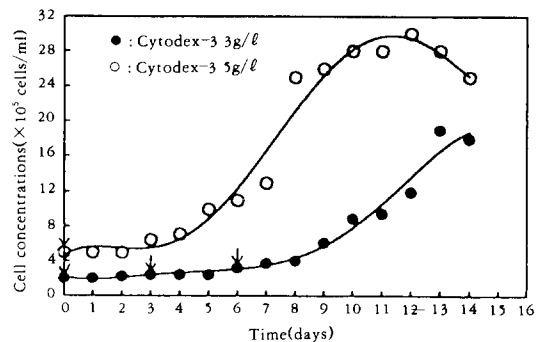


Fig. 3. Culture of Vero-6 cells on Cytodex 3 using bead-to-bead transfer technique.

는 유도기 기간이 길게 나타나는데 이러한 현상은 세포가 완전히 자라 있는 미립담체 표면에 새로운 미립담체가 붙어 세포가 옮겨 자라는 기간이 오래

걸리기 때문인 것으로 생각된다. maximum cell density는 3g/l가 약  $1.9 \times 10^6$  cells/ml, 5g/l는  $3.0 \times 10^6$  cells/ml로 비교적 높게 나왔다. 그리고 새로운 미립담체를 첨가할 때 간헐적으로 첨가한 것과 한꺼번에 전부 첨가한 것을 비교해 보면 2가지 방법이 모두 세포를 성공적으로 배양할 수 있다는 것을 입증한 결과라고 할 수 있다.

**Cultispher-G를 이용한 세포배양**

Fig. 4에는 초기접종 후 30분 간격으로 측정한 Cultispher-G의 부착시간을 나타내었다. 3g/l, 5g/l 각각의 부착시간을 비교해 보면 세포가 미립담체에 거의 붙었다고 볼 수 있는 90분 경과 후부터 비슷하게 나타났고 약 3시간 경과 후 거의 부착한 것으로 나타났다.

미립담체를 3g/l 첨가하여 배양하였을 때 최종세포밀도는 약  $1.3 \times 10^6$  cells/ml이었고, 5g/l 첨가하였을 때는 약  $3.2 \times 10^6$  cells/ml까지 세포밀도가 증가하였다. 이 결과를 Fig. 5에 나타내었다.

Fig. 5에서 보면 Cultispher-G 3g/l의 경우 초기

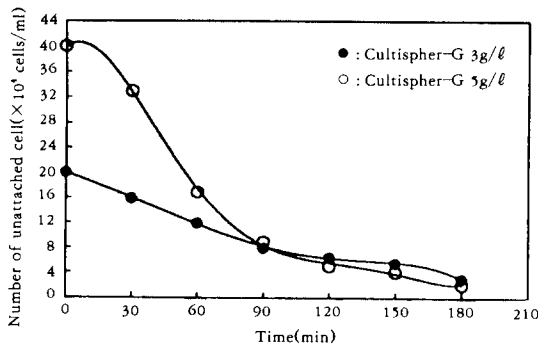


Fig. 4. Kinetics of attachment of Vero-6 on Cultispher-G.

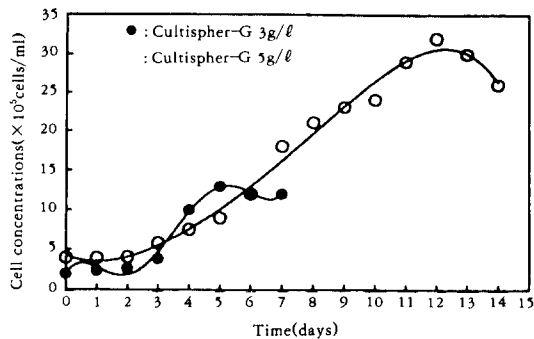


Fig. 5. The growth comparison of Vero-6 on Cultispher-G.

접종농도가 약  $2.0 \times 10^5$  cells/ml이고, 5g/l의 경우 약  $4.0 \times 10^5$  cells/ml인데 초기 접종농도를 다르게 한 이유는 미립담체의 농도를 높게 첨가하였을 때 세포가 미립담체 1개에 붙을 수 있는 수가 적어지기 때문에 5g/l의 경우 3g/l에 비해 약 2배 정도 많은 세포를 접종한 것이다.

Fig. 6에는 Cultispher-G 3g/l와 5g/l 배양 후 bead-to-bead transfer 세포배양을 한 것으로써 새로운 미립담체를 간헐적으로 첨가하여(화살표) 배양하였다. 3g/l의 경우 9일만에 최고세포밀도가  $1.8 \times 10^6$  cells/ml까지 증가하였고 5g/l의 경우 11일만에 약  $2.5 \times 10^6$  cells/ml까지 세포농도가 증가하였는데 3g/l에 비해 배양기간이 오래 걸린 이유는 앞에서 언급하였듯이 미립담체의 밀도가 높아 담체 서로간에 부착하는 시간이 오래 걸렸기 때문인 것으로 사료된다.

**VX-100을 이용한 세포배양**

Fig. 7에는 Verax Co.에서 생산한 VX-100 bead

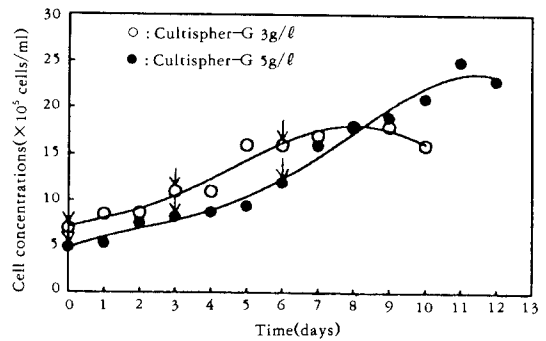


Fig. 6. Culture Vero-6 cells on cultispher-G using bead-to-bead transfer technique.

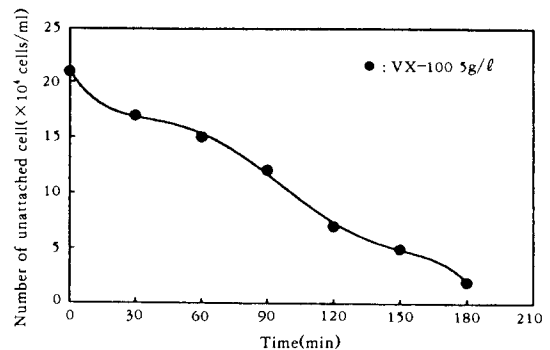


Fig. 7. Kinetics of attachment Vero-6 on VX-100.

에 세포가 부착되는 시간을 측정한 것이다. VX-100은 Cytodex 3나 Cultispher-G와 비슷한 부착시간을 보였다. 초기 접종농도는 약  $2.1 \times 10^5$  cells/ml로 접종하였다.

**최종세포밀도 측정**

VX-100에서 세포가 자라는 상태를 볼 때 타 미립담체에 세포가 자라는 것보다 빨리 자란다는 것을 알 수 있었다. Fig. 8에는 VX-100의 세포 성장 정도를 나타내었는데 초기 접종 후 유도기(lag phase)가 비교적 짧고 최종세포밀도도 약  $4.4 \times 10^6$  cells/ml로 다른 3가지의 미립담체와 비교했을 때 가장 높았다.

**Informatrix bead를 이용한 세포 배양**

Informatrix bead의 경우 직경이 약  $500 \mu\text{m}$ 로 다른 미립담체와 비교할 때 약 2~3배 정도 큰 편이다. 그러므로 세포가 자랄 수 있는 면적이 큰 반면에 Cytodex 3나 Cultispher-G의  $5\text{g}/\ell$ 에 해당하는 양을

첨가하였을 경우 미립담체의 수는 상대적으로 적다.

Fig. 9에는 초기 접종농도를 약  $3.0 \times 10^5$  cells/ml로 접종하였을 때 세포가 미립담체에 붙는 시간을 측정한 것으로 다른 미립담체에 비해 상당히 부착시간이 오래 걸린다는 것을 알 수 있다. 이 이유는 미립담체의 밀도가 낮아 세포가 미립담체에 접촉할 수 있는 기회가 적어 부착시간이 오래 걸린 것으로 생각된다. 초기 접종 후 24시간 뒤에 미립담체에 세포들이 거의 붙은 것을 확인할 수 있었다.

Fig. 10에는 Informatrix bead의 배양결과를 나타낸 것이다. 이 결과를 보면 초기 접종 후 유도기가 상당히 길고 세포가 완만하게 자라는 것을 알 수 있다. 최종세포밀도는 약  $2.1 \times 10^6$  cells/ml였다. 이러한 결과로 볼 때 세포가 자랄 수 있는 표면적과 공극도 중요하지만 미립담체의 밀도를 높여 세포와 담체간의 접촉기회를 부여하는 것도 중요하다고 생각된다.

**희수한 세포의 재접종**

Fig. 11에는 VX-100을 이용하여 세포를 배양한

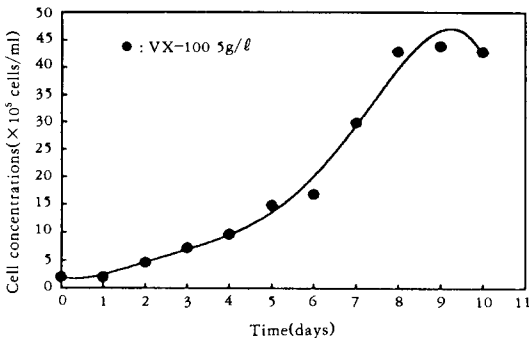


Fig. 8. The growth of Vero-6 on VX-100.

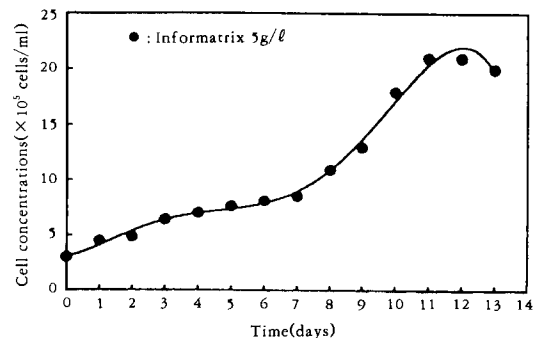


Fig. 10. The growth of Vero-6 on Informatrix bead.

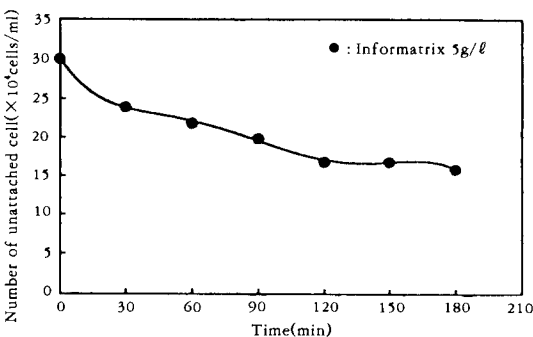


Fig. 9. Kinetics of attachment of Vero-6 on Informatrix bead.

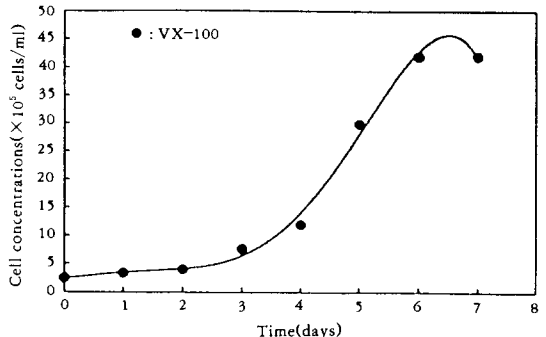


Fig. 11. The growth of recovered cells on VX-100 using collagenase enzyme.

후 collagenase로 bead를 녹여 세포를 회수하여 재접종하였을 때의 실험결과이다. 세포를 회수하여 재접종하였을 때의 초기농도는 약  $2.5 \times 10^5$ 이었고, 배양시작 일주일 지난 후 maximum cell density는 약  $4.2 \times 10^6$  cells/ml이었다. 따라서 미립담체를 효소로 녹여 세포를 회수한 후 재접종할 수 있는 가능성이 입증되었다.

## 요 약

현재 상용화되어 시판되고 있는 4가지의 미립담체를 이용해 각각의 성능을 비교하기 위하여 부착성 동물세포배양 실험을 수행한 결과를 요약하면 다음과 같다. Cytodex 3의 경우 세포의 초기 접종농도를 약  $2.0 \times 10^5$  cells/ml로 하였을 때, 3g/l는 약  $1.4 \times 10^6$  cells/ml, 5g/l는 약  $2.0 \times 10^6$  cells/ml의 최종세포밀도를 얻을 수 있었다. 또한 bead-to-bead transfer 실험을 한 결과 3g/l를 간헐적으로 첨가하였을 때는 약  $1.9 \times 10^6$  cells/ml, 5g/l 첨가하였을 때는 약  $3.0 \times 10^6$  cells/ml까지 최종세포밀도가 증가하였다.

Cultispher-G, 3g/l를 이용해 초기 접종농도를 약  $2.0 \times 10^6$  cells/ml로 하여 배양하였을 때 약  $1.3 \times 10^6$  cells/ml까지 세포농도가 증가했고, 5g/l를 이용해 초기 접종농도를 약  $4.0 \times 10^5$  cells/ml로 접종하였을 때 최종세포농도가 약  $3.2 \times 10^6$  cells/ml까지 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 bead-to-bead transfer배양 실험결과에서 3g/l의 미립담체를 간헐적으로 첨가해 약  $1.8 \times 10^6$  cells/ml까지 최종세포밀도가 올라갔고 5g/l를 간헐적으로 첨가하였을 때  $2.5 \times 10^6$  cells/ml까지 세포밀도를 얻었다. VX-100을 사용하여 세포를 배양하였을 때 초기 접종농도가 약  $2.0 \times 10^5$  cells/ml에서 최종세포밀도가 약  $4.4 \times 10^6$  cells/ml까지 증가하는 것을 알게 되었다. 따라서 실험에 사용한 다른 종류의 다공성 젤라틴 bead보다 성능이 우수함을 알 수 있었고 Cytodex-3보다는 최종세포농도가 약 2배 이상 증가한 결과를 얻었다.

Informatrix bead는 초기 접종농도를 약  $3.0 \times 10^5$  cells/ml로 하였을 때 최종세포밀도가 약  $2.1 \times 10^6$  cells/ml까지 증가하였다. Collagenase효소를 이용하여 젤라틴 bead를 녹인 후 회수한 세포는 대부분 viable하였고 새로 도입된 bead에 성공적으로 부착하여 성장하였다. 따라서 담체 내부에서 자라는 세포도 회수하여 재사용 할 수 있게 되었다.

## 감 사

본 연구를 위하여 1990년도 한국과학재단 신진기초연구비지원에 감사드리며 또한 Cell line을 분양해주신 KAIST 생물공학과 김정희 박사님과 실험실 여러분들에게 감사드립니다.

## 참고문헌

1. D. J. Giard, D. H. Loeb, W. G. Thilly, D. I. C. Wang and D. W. Levine(1979), Human interferon production with diploid fibroblast cells grown on microcarriers, *Biotech. Bioeng.*, **21**, 433-442.
2. R. E. Spier(1981), Animal cells or genetically engineered bacteria for the manufacture of particular bioproducts, *Develop. Biol. Standard*, **50**, 311-321.
3. W. I. Wood et al.(1984), Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones, *Nature*, **312**, 330-337.
4. G. Köhler and C. Mistein(1985), *Nature*, **256**, 495.
5. Karl. Maramorosch et al.(1985), Advance in cell culture., *Academic Press.*, **4**, 213.
6. R. Shaul and M. Avshalom, Factor affecting cell attachment, spreading and growth on derivatized microcarrier, 11, Introduction of hydrophobic elements.
7. A. L. Van Wezel(1967), *Nature*, **216**, 64.
8. D. W. Levine, D. I. C. Wang and W. G. Thilly (1979), *Biotech. Bioeng.*, **21**, 821.
9. H. S. Lim(1990), MS Thesis.
10. Pharmacia, Microcarrier cell culture, **27**.
11. H. S. Lim, J. H. Choi and J. H. Kim(1990), Proc. APBioCHEC '90, Kyungju, Korea, 161.
12. R. C. Dean et al.(1987), Large Scale Cell Culture Technology, B. K. Lydersen, New York.
13. S. Reuveny et al.(1983), *Biotech. Bioeng.*, **25**, 469.
14. C. L. Crepsi and W. G. Thilly(1981), Continuous cell propagation using low-charge microcarrier, *Biotech. Bioeng.*, **23**, 983.
15. K. K. Sanford et al.(1951), *J. Nat Cancer Inst.*, **11**, 773.

16. A. L. Van Wegel(1973), Microcarrier culture of animal cells, in Tissue Culture: Methods and Applications, P. F. Kruse and M. K. Patterson, Eds. Academic Press, New York, 372.