



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0137149
(43) 공개일자 2017년12월12일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) C12N 5/09 (2010.01)
G01N 33/50 (2017.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/067 (2013.01)
C12N 5/0693 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7032376
- (22) 출원일자(국제) 2016년04월15일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2017년11월08일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2016/062689
- (87) 국제공개번호 WO 2016/167373
국제공개일자 2016년10월20일
- (30) 우선권주장
JP-P-2015-084590 2015년04월16일 일본(JP)
JP-P-2015-229974 2015년11월25일 일본(JP)

- (71) 출원인
닛산 가가쿠 고교 가부시키 가이샤
일본국 도쿄도 지요다구 간다니시키쵸 3쵸메 7만
지1
- (72) 발명자
아베, 나츠키
일본국, 3490294, 사이타마, 시라오카시, 시라오
카, 1470, 바이올로지컬 리서치 래버러토리스, 닛
산 가가쿠 고교 가부시키 가이샤 내
니시노, 타이토
일본국, 3490294, 사이타마, 시라오카시, 시라오
카, 1470, 바이올로지컬 리서치 래버러토리스, 닛
산 가가쿠 고교 가부시키 가이샤 내
오타니, 아야코
일본국, 3490294, 사이타마, 시라오카시, 시라오
카, 1470, 바이올로지컬 리서치 래버러토리스, 닛
산 가가쿠 고교 가부시키 가이샤 내
- (74) 대리인
손민

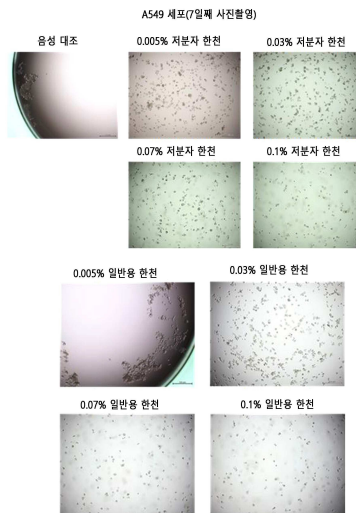
전체 청구항 수 : 총 31 항

(54) 발명의 명칭 배지 첨가물 및 배지 조성물 그리고 그것들을 사용한 세포 또는 조직의 배양 방법

(57) 요약

본 발명은, 세포 또는 조직을 양호하게 분산시킨 상태에서 효율적으로 배양할 수 있고, 또한 세포 또는 조직의 세포 이미지 해석이 가능해지는 배지 첨가물 및 배지 조성물, 그리고 배양 방법 등을 제공한다. 본 발명의 배지 첨가물 또는 배지 조성물은 한천을 함유한다. 한천으로는, 중량 평균 분자량이 10,000~60,000인 저분자량의 한천을 사용하는 것이 바람직하다. 이것을 사용하면, 세포 또는 조직이 배지 중에 양호하게 분산된 상태에서 배양할 수 있고, 세포 또는 조직의 증식 촉진 효과를 얻을 수도 있다. 또, 상기 한천의 농도를 조정함으로써, 부유 상태 및 침전된 상태 중 어느 상태에서도 배양할 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

G01N 33/5044 (2013.01)

G01N 33/5067 (2013.01)

C12N 2500/30 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

한천을 함유하는, 배지 첨가물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,
한천의 중량 평균 분자량이 10,000~60,000인, 배지 첨가물.

청구항 3

청구항 1또는 청구항 2에 있어서,
액상인, 배지 첨가물.

청구항 4

청구항 3에 있어서,
한천의 함유량이, 배지 첨가물의 전체량에 대하여 0.001(w/v)%~5(w/v)%인, 배지 첨가물.

청구항 5

한천을 함유하는, 배지 조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서,
한천의 중량 평균 분자량이 10,000~60,000인, 배지 조성물.

청구항 7

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 기재된 배지 첨가물을 함유하는, 배지 조성물.

청구항 8

청구항 5 내지 청구항 7 중 어느 한 항에 있어서,
한천의 함유량이, 배지 조성물의 전체량에 대하여 0.005(w/v)% 이상 2(w/v)% 미만인, 배지 조성물.

청구항 9

청구항 5 내지 청구항 8 중 어느 한 항에 있어서,
한천의 함유량이 0.1(w/v)%인 경우의 37℃에 있어서의 점도가 2.5mPa·s 이하인, 배지 조성물.

청구항 10

청구항 5 내지 청구항 9 중 어느 한 항에 있어서,
세포 배양용인, 배지 조성물.

청구항 11

청구항 10에 있어서,
세포가 접촉성 세포 또는 부유성 세포인, 배지 조성물.

청구항 12

청구항 11에 있어서,
접착성 세포가 담체 표면에 접촉되거나 또는 담체 내부에 포매되어 있는, 배지 조성물.

청구항 13

청구항 11에 있어서,
접착성 세포가 마이크로 캐리어에 접촉되어 있는, 배지 조성물.

청구항 14

청구항 11에 있어서,
접착성 세포가 스피어를 형성하고 있는, 배지 조성물.

청구항 15

청구항 11 내지 청구항 14 중 어느 한 항에 있어서,
접착성 세포가, 암세포, 간세포 및 암세포주로 이루어지는 군에서 선택되는, 배지 조성물.

청구항 16

청구항 5 내지 청구항 15 중 어느 한 항에 기재된 배지 조성물과, 세포 또는 조직을 함유하는, 세포 또는 조직 배양물.

청구항 17

청구항 5 내지 청구항 15 중 어느 한 항에 기재된 배지 조성물 중에, 세포 또는 조직을 분산시킨 상태에서 배양하는, 세포 또는 조직의 배양 방법.

청구항 18

청구항 17에 있어서,
세포가 접착성 세포 또는 부유성 세포인, 배양 방법.

청구항 19

청구항 18에 있어서,
접착성 세포가 담체 표면에 접촉되거나 또는 담체 내부에 포매되어 있는, 배양 방법.

청구항 20

청구항 18에 있어서,
접착성 세포가 마이크로 캐리어에 접촉되어 있는, 배양 방법.

청구항 21

청구항 18에 있어서,
접착성 세포가 스피어를 형성하고 있는, 배양 방법.

청구항 22

청구항 18 내지 청구항 21 중 어느 한 항에 있어서,
접착성 세포가, 암세포, 간세포 및 암세포주로 이루어지는 군에서 선택되는, 배양 방법.

청구항 23

(a) 피험물질의 존재하 및 비존재하에, 청구항 5 내지 청구항 15 중 어느 한 항에 기재된 배지 조성물 중에서 세포를 배양하는 공정, 및 (b) 세포의 생리학적 기능의 변화를 해석하는 공정을 포함하는, 의약품 후보 물질의 스크리닝 방법.

청구항 24

청구항 23에 있어서,

추가로, (c) 피험물질의 비존재하의 경우와 비교하여, 세포의 생리학적 기능을 억제 또는 증가시키는 물질을 의약품 후보 물질로서 선택하는 공정을 포함하는, 스크리닝 방법.

청구항 25

청구항 23 또는 청구항 24에 있어서,

(b) 세포의 생리학적 기능의 변화를 해석하는 공정이 세포 이미지 해석에 의해 실시되는, 스크리닝 방법.

청구항 26

청구항 23 내지 청구항 25 중 어느 한 항에 있어서,

배지 조성물에 있어서의 한천의 함유량이, 배지 조성물의 전체량에 대하여 0.005(w/v)% 이상 0.07(w/v)% 미만인, 스크리닝 방법.

청구항 27

(a) 피험물질의 존재하 및 비존재하에, 청구항 5 내지 청구항 15 중 어느 한 항에 기재된 배지 조성물 중에서 암세포 또는 암세포주를 배양하는 공정, 및 (b) 암세포 또는 암세포주의 증식의 변화를 해석하는 공정을 포함하는, 항암제 후보 물질의 스크리닝 방법.

청구항 28

청구항 27에 있어서,

추가로, (c) 피험물질의 비존재하의 경우와 비교하여, 암세포 또는 암세포주의 증식을 억제하는 물질을 항암제 후보 물질로서 선택하는 공정을 포함하는, 스크리닝 방법.

청구항 29

청구항 27 또는 청구항 28에 있어서,

(b) 암세포 또는 암세포주의 증식의 변화를 해석하는 공정이 세포 이미지 해석에 의해 실시되는, 스크리닝 방법.

청구항 30

청구항 27 내지 청구항 29 중 어느 한 항에 있어서,

배지 조성물에 있어서의 한천의 함유량이, 배지 조성물의 전체량에 대하여 0.005(w/v)% 이상 0.07(w/v)% 미만인, 스크리닝 방법.

청구항 31

청구항 5 내지 청구항 10 중 어느 한 항에 기재된 배지 조성물 중에서 접착성 세포를 배양하는, 스피어의 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은, 세포 또는 조직을 부유 혹은 침강시킨 상태에서 양호하게 분산시켜 배양하는 것을 가능하게 하는 배지 첨가물 및 배지 조성물, 그리고 당해 배지 첨가물 또는 배지 조성물을 사용하는 것을 특징으로 하는, 세포

[0001]

또는 조직의 배양 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 최근, 동물이나 식물체 내에서 상이한 역할을 하고 있는 여러 가지 기관, 조직, 및 세포를 생체 외에서 증식 혹은 유지시키기 위한 기술이 발전해 오고 있다. 이들 기관, 조직을 생체 외에서 증식 혹은 유지하는 것은, 각각 기관 배양, 조직 배양이라고 불리고 있으며, 기관, 조직으로부터 분리된 세포를 생체 외에서 증식, 분화 혹은 유지하는 것은 세포 배양이라고 불리고 있다. 세포 배양은, 분리한 세포를 배지 중에서, 즉 생체 외에서 증식 또는 분화시키거나, 혹은 유지하는 기술이고, 생체 내의 각종 기관, 조직, 세포의 기능 및 구조를 상세하게 해석하기 위해서 불가결한 것으로 되어 있다. 또, 당해 기술에 의해 배양된 세포 또는 조직은, 화학 물질, 의약품 등의 약효 및 독성 평가나, 효소, 세포 증식 인자, 항체 등의 유용 물질의 대량 생산, 질환이나 결손에 의해 없어진 기관, 조직, 세포를 보충하기 위한 재생 의료, 식물의 품종 개량, 유전자 재조합 작물의 제조 등, 여러 가지 분야에서 이용되고 있다.
- [0003] 동물 유래의 세포는, 그 성상으로부터 부유성 세포와 접촉성 세포로 크게 이분된다. 부유성 세포는, 생육·증식에 족장(足場)을 필요로 하지 않는 세포이고, 접촉성 세포는, 생육·증식에 족장을 필요로 하는 세포이지만, 생체를 구성하는 대부분의 세포는 후자의 접촉성 세포이다. 접촉성 세포의 배양 방법으로는, 단층 배양, 분산 배양, 포매 배양, 마이크로 캐리어 배양, 및 스피어 배양 등이 알려져 있다.
- [0004] 탈아실화 젤란검 등의 아ни온성 관능기를 갖는 고분자 화합물을 함유하는 구조체를 액체 배지 중에 혼합함으로써, 그 액체 배지의 점도를 실질적으로 높이지 않고, 동식물 세포 및/또는 조직을 정치(靜置)시킨 상태에서 균일하게 분산시켜, 부유 배양할 수 있는 것, 이 배지 조성물을 사용하여 배양함으로써, 세포의 증식 활성이 향진되는 것이 보고되어 있다(특허문헌 1). 또, 메틸셀룰로오스 등의 증점제를 사용하여 접촉성 세포를 분산시켜, 스페로이드(세포끼리가 집합·응집화된 세포 집합체를 말한다. 본 명세서에 있어서는 「스피어」라고 칭하는 경우가 있다)의 형성을 촉진시켜, 세포 증식을 향진시키는 예도 보고되어 있다(특허문헌 2, 비특허문헌 1).

선행기술문헌

특허문헌

- [0005] (특허문헌 0001) 국제 공개 제2014/017513호
 (특허문헌 0002) 일본 공개특허공보 평7-79772호

비특허문헌

- [0006] (비특허문헌 0001) Paola Longati들, BMC Cancer 2013, 13:95

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 상기 서술한 바와 같이, 특허문헌 1에는, 탈아실화 젤란검 등의 아ни온성 관능기를 갖는 고분자 화합물을 함유하는 구조체를 액체 배지 중에 혼합함으로써, 그 액체 배지의 점도를 실질적으로 높이지 않고, 세포 또는 조직을 정치시킨 상태에서 양호하게 분산시켜, 부유 배양할 수 있는 것, 이 배지 조성물을 사용하여 배양함으로써, 세포의 증식 활성이 향진되는 것이 보고되어 있다. 그러나, 본 발명자들은, 이 배지 조성물을 사용하여 세포 또는 조직을 배양한 경우에는, 세포 또는 조직이 부유 상태이기 때문에, 세포 또는 조직을 세포 이미징 장치로 해석할 때에 렌즈의 초점이 맞지 않아, 배양물을 그대로 세포 이미징 해석에 제공할 수 없다는 새로운 과제를 알아내었다.
- [0008] 본 발명은, 세포 또는 조직을 양호하게 분산시킨 상태로 효율적으로 배양할 수 있고, 또한 세포 또는 조직의 세포 이미징 해석이 가능해지는 배지 조성물 및 배양 방법 등을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명자들은 상기 과제를 해결하기 위하여 예의 검토한 결과, 한천을 배지 첨가물로서 사용함으로써, 세포 또는 조직을 양호하게 분산시킬 수 있고, 또한 한천의 농도에 따라서는, 부유 상태에서도 침강된 상태에서도, 양호한 효율로 배양이 가능해지는 것을 알아내었다. 또한 그 배지 첨가물을 사용한 조성물에서 배양함으로써, 세포 또는 조직의 세포 이미징 장치에서의 해석을 신속하고 또한 간편하게 실시하는 것이 가능해지는 것을 알아내어, 본 발명을 완성시키기에 이르렀다.
- [0010] 즉, 본 발명은 하기와 같다:
- [0011] [1] 한천을 함유하는, 배지 첨가물.
- [0012] [2] 한천의 중량 평균 분자량이 10,000~60,000인, [1]에 기재된 배지 첨가물.
- [0013] [3] 액상인, [1] 또는 [2]에 기재된 배지 첨가물.
- [0014] [4] 한천의 함유량이, 배지 첨가물의 전체량에 대하여 0.001(w/v)%~5(w/v)%인, [3]에 기재된 배지 첨가물.
- [0015] [5] 한천을 함유하는, 배지 조성물.
- [0016] [6] 한천의 중량 평균 분자량이 10,000~60,000인, [5]에 기재된 배지 조성물.
- [0017] [7] [1]~[4] 중 어느 하나에 기재된 배지 첨가물을 함유하는, 배지 조성물.
- [0018] [8] 한천의 함유량이, 배지 조성물의 전체량에 대하여 0.005(w/v)% 이상이고 2(w/v)% 미만인, [5]~[7] 중 어느 하나에 기재된 배지 조성물.
- [0019] [9] 한천의 함유량이 0.1(w/v)%인 경우의 37℃에 있어서의 점도가 2.5mPa·s 이하인, [5]~[8] 중 어느 하나에 기재된 배지 조성물.
- [0020] [10] 세포 배양용인, [5]~[9] 중 어느 하나에 기재된 배지 조성물.
- [0021] [11] 세포가 접촉성 세포 또는 부유성 세포인, [10]에 기재된 배지 조성물.
- [0022] [12] 접촉성 세포가 담체 표면에 접촉되고 또는 담체 내부에 포매되어 있는, [11]에 기재된 배지 조성물.
- [0023] [13] 접촉성 세포가 마이크로 캐리어에 접촉되어 있는, [11]에 기재된 배지 조성물.
- [0024] [14] 접촉성 세포가 스피어를 형성하고 있는, [11]에 기재된 배지 조성물.
- [0025] [15] 접촉성 세포가, 암세포, 간세포 및 암세포주로 이루어지는 군에서 선택되는, [11]~[14] 중 어느 하나에 기재된 배지 조성물.
- [0026] [16] [5]~[15] 중 어느 하나에 기재된 배지 조성물과, 세포 또는 조직을 함유하는, 세포 또는 조직 배양물.
- [0027] [17] [5]~[15] 중 어느 하나에 기재된 배지 조성물 중에, 세포 또는 조직을 분산시킨 상태로 배양하는, 세포 또는 조직의 배양 방법.
- [0028] [18] 세포가 접촉성 세포 또는 부유성 세포인, [17]에 기재된 배양 방법.
- [0029] [19] 접촉성 세포가 담체 표면에 접촉되고 또는 담체 내부에 포매되어 있는, [18]에 기재된 배양 방법.
- [0030] [20] 접촉성 세포가 마이크로 캐리어에 접촉되어 있는, [18]에 기재된 배양 방법.
- [0031] [21] 접촉성 세포가 스피어를 형성하고 있는, [18]에 기재된 배양 방법.
- [0032] [22] 접촉성 세포가, 암세포, 간세포 및 암세포주로 이루어지는 군에서 선택되는, [18]~[21] 중 어느 하나에 기재된 배양 방법.
- [0033] [23] (a) 피험물질의 존재하 및 비존재하에, [5]~[15] 중 어느 하나에 기재된 배지 조성물 중에서 세포를 배양하는 공정, 및 (b) 세포의 생리학적 기능의 변화를 해석하는 공정을 포함하는, 의약품 후보 물질의 스크리닝 방법.
- [0034] [24] 추가로, (c) 피험물질의 비존재하의 경우와 비교하여, 세포의 생리학적 기능을 억제 또는 증가시키는 물질을 의약품 후보 물질로서 선택하는 공정을 포함하는, [23]에 기재된 스크리닝 방법.
- [0035] [25] (b) 세포의 생리학적 기능의 변화를 해석하는 공정이 세포 이미지 해석에 의해 실시되는, [23] 또는 [24]

에 기재된 스크리닝 방법.

- [0036] [26] 배지 조성물에 있어서의 한천의 함유량이, 배지 조성물의 전체량에 대하여 0.005(w/v)% 이상 0.07(w/v)% 미만인, [23]~[25] 중 어느 하나에 기재된 스크리닝 방법.
- [0037] [27] (a) 피험물질의 존재하 및 비존재하에, [5]~[15] 중 어느 하나에 기재된 배지 조성물 중에서 암세포 또는 암세포주를 배양하는 공정, 및 (b) 암세포 또는 암세포주의 증식의 변화를 해석하는 공정을 포함하는, 항암제 후보 물질의 스크리닝 방법.
- [0038] [28] 추가로, (c) 피험물질의 비존재하의 경우와 비교하여, 암세포 또는 암세포주의 증식을 억제하는 물질을 항암제 후보 물질로서 선택하는 공정을 포함하는, [27]에 기재된 스크리닝 방법.
- [0039] [29] (b) 암세포 또는 암세포주의 증식의 변화를 해석하는 공정이 세포 이미지 해석에 의해 실시되는, [27] 또는 [28]에 기재된 스크리닝 방법.
- [0040] [30] 배지 조성물에 있어서의 한천의 함유량이, 배지 조성물의 전체량에 대하여 0.005(w/v)% 이상 0.07(w/v)% 미만인, [27]~[29] 중 어느 하나에 기재된 스크리닝 방법.
- [0041] [31] [5]~[10] 중 어느 하나에 기재된 배지 조성물 중에서 접착성 세포를 배양하는, 스피어의 제조 방법.

발명의 효과

- [0042] 본 발명의 배지 첨가물 또는 배지 조성물을 사용함으로써, 세포 또는 조직이 양호하게 분산되어 부유한 상태, 침강한 상태 중 어느 상태에서도 효율적으로 배양할 수 있다.
- [0043] 특히, 본 발명의 배지 첨가물 또는 배지 조성물을 사용함으로써, 담체 표면에 접촉되거나 혹은 담체 내부에 포매된 접착성 세포, 또는 스피어를 형성한 접착성 세포를, 과잉인 응집을 일으키지 않고, 양호하게 분산된 상태로 배양할 수 있다.
- [0044] 또한 본 발명의 배지 첨가물 또는 배지 조성물을 사용하여 배양함으로써, 세포 이미지 해석에 의한 세포의 성장, 기능의 해석이 가능해져, 항암제 등, 의약품의 후보 물질의 스크리닝을 바람직하게 실시할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0045] 도 1은, 분석예 1에 있어서, 저분자 한천을 함유하는 배지 조성물 중에 있어서의 폴리스티렌 비즈의 상태를 나타내는 도면이다.
- 도 2는, 분석예 1에 있어서, 일반용 한천을 함유하는 배지 조성물 중에 있어서의 폴리스티렌 비즈의 분산 상태를 나타내는 도면이다.
- 도 3은, 분석예 2에 있어서, 저분자 한천을 함유하는 배지 조성물에서 HepG2 세포를 7일간 배양한 후의 상태를 나타내는 도면이다.
- 도 4는, 분석예 3에 있어서, 저분자 한천을 함유하는 배지 조성물 중에 있어서의 폴리스티렌 비즈의 상태를 나타내는 도면이다.
- 도 5는, 시험예 1에 있어서, 7일간 배양 후의 A549 세포의 스피어의 현미경 관찰 결과를 나타내는 도면이다.
- 도 6은, 시험예 2에 있어서, 7일간 배양 후의 HepG2 세포의 스피어의 현미경 관찰 결과를 나타내는 도면이다.
- 도 7은, 시험예 3에 있어서, 7일간 배양 후의 A549 세포의 스피어의 현미경 관찰 결과를 나타내는 도면이다.
- 도 8은, 시험예 5에 있어서, A549 세포의 세포 이미지 장치에 의한 관찰 이미지를 나타내는 도면이다.
- 도 9는, 시험예 6에 있어서, 7일간 배양 후의 A549 세포의 스피어의 현미경 관찰 결과를 나타내는 도면이다.
- 도 10은, 시험예 7에 있어서, 7일간 배양 후의 A549 세포의 스피어의 현미경 관찰 결과를 나타내는 도면이다.
- 도 11은, 시험예 11에 있어서, 21일간 배양 후의 HeLa 세포의 스피어의 현미경 관찰 결과를 나타내는 도면이다. 도면 중, 실선 화살표는, 단단하게 구상으로 응집된 스피어를 나타내고, 점선 화살표는, 무르게 응집된 스피어를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0046] 본 발명은, 한천을 함유하는 배지 첨가물을 제공한다.
- [0047] 또, 본 발명은, 한천을 함유하는 배지 조성물을 제공한다.
- [0048] 한천은, 아가로오스와, 아가로오스가 부분적으로 황산에스테르화되거나, 또는 메톡시기, 피루브산기, 카르복실기에 의해 치환된 아가로펙틴에 의해 구성되지만, 이들 구성 성분의 비율에 관해서 제한은 없고, 아가로오스만으로 구성되어도 된다. 또, 아가로오스가 하이드록시에틸화된 저융점 아가로오스나, 원료 해조의 선택에 의해, 또는 하이드록시에틸화를 실시하는 등에 의해 조절된 저융점 한천, 또한 온탕(溫湯)에 대해서도 높은 용해성을 나타내는 즉용성 한천 등도, 본 발명에 있어서의 「한천」에 포함된다.
- [0049] 본 발명에서는, 공업적으로 제조되는 분말상, 플레이크상 또는 고형상의 한천이 고순도이고 품질도 균일하기 때문에, 바람직하게 사용된다. 또, 의약품, 식품 등의 분야에서, 일반적으로 사용되는 여러 가지 성상, 물성을 갖는 것을 사용할 수 있고, 중량 평균 분자량이 10,000~60,000인 저분자량의 한천, 중량 평균 분자량이 60,000을 초과하고 100,000 이하 정도이고, 겔 강도가 낮은 저강도 한천, 중량 평균 분자량이 290,000 정도인 고분자량의 한천 등을 사용할 수 있다. 이러한 한천으로는, 시판되고 있는 제품을 이용할 수 있고, 예를 들어, 이나 식품공업 주식회사로부터 판매되고 있는 「울트라 한천 이나」, 「울트라 한천 AX-30」, 「울트라 한천 AX-100」, 「S-6」, 「S-7」 등을 사용할 수 있다.
- [0050] 본 발명에 있어서는, 중량 평균 분자량이 10,000~60,000이고, 일반적인 한천보다 저분자량의 한천(이하, 본 명세서에 있어서 「저분자 한천」이라고 칭하는 경우가 있다)을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0051] 본 발명에서 바람직하게 사용되는 저분자 한천의 중량 평균 분자량은, 상기와 같이 10,000~60,000이고, 20,000~60,000인 것이 보다 바람직하고, 30,000~60,000인 것이 더욱 바람직하고, 40,000~60,000인 것이 더욱 더 바람직하고, 43,000~60,000인 것이 보다 더 바람직하고, 43,000~50,000인 것이 특히 바람직하다.
- [0052] 중량 평균 분자량이 10,000 미만인 한천을 사용한 경우에는, 세포를 분산시키는 효과를 얻는 것이 곤란한 경우가 있다. 한편, 중량 평균 분자량이 60,000을 초과하는 한천을 사용한 경우에는, 세포 또는 조직의 배지 중에 있어서의 분산이 불균일해져, 충분한 증식 촉진 효과를 얻을 수 없는 경우가 있다.
- [0053] 또한, 본 발명에서 사용하는 저분자 한천으로는, 분자량 분포가 좁은 것임이 바람직하고, 한천의 중량 평균 분자량(Mw)을 수평균 분자량(Mn)으로 나눈 값으로서 얻어지는 분자량 분포(Mw/Mn)는, 1.1~8.0인 것이 바람직하고, 1.5~7.0인 것이 보다 바람직하고, 2.0~6.0인 것이 더욱 바람직하고, 2.5~5.5인 것이 보다 더 바람직하고, 3.5~5.0인 것이 특히 바람직하다.
- [0054] 또한, 한천의 상기 중량 평균 분자량 및 수평균 분자량은, 고속 액체 크로마토그래피(HPLC)에 의한 겔 침투 크로마토그래피법에 의해 측정할 수 있다.
- [0055] 구체적으로는, 예를 들어 다음과 같은 측정 기기, 조건 등에 의해 측정할 수 있다.
- [0056] (1) 측정용 시료: 한천을 예를 들어 0.15(w/v)% (「(w/v)%」는 「중량/체적%」를 나타낸다, 이하 동일) 정도의 농도가 되도록, 정제수에 95℃~97℃에서 용해시킨 후, 50℃까지 냉각시켜, 시료로 한다.
- [0057] (2) 측정 기기: 주식회사 시마즈 제작소 제조 액체 크로마토그래프 LC-10AT VP, RID-10A 등
- [0058] (3) 칼럼: 토소 주식회사 제조 TOSOH TSK-GEL for HPLC, TSK-GEL GMPWXL 등
- [0059] (4) 용매: 0.1M 질산나트륨 수용액 등
- [0060] (5) 검출기: 시차 굴절계
- [0061] (6) 측정 온도: 50℃
- [0062] (7) 표준 물질: 분자량이 이미 알려진 폴루란(Shodex STANDARD P-82 등)
- [0063] 또, 본 발명에서 사용하는 저분자 한천은, 1.5(w/v)%의 겔에 대하여, 20℃에서 측정할 겔 강도가 25g/cm² 이하인 것이 바람직하고, 15g/cm² 이하인 것이 보다 바람직하고, 12g/cm² 이하인 것이 더욱 바람직하다.
- [0064] 상기 「겔 강도」란, 한천의 1.5(w/v)% 수용액을 20℃에서 15시간 정치시키고, 응고된 겔에 대해, 그 표면 1cm² 당 20초간 견딜 수 있는 최대 하중을 말하며, 예를 들어 일한수식(日寒水式) 측정 장치를 사용하여, 일본 공업 규격(JIS) K 8263:1994의 규정에 따라 측정된다.
- [0065] 또한, 본 발명에서 사용하는 저분자 한천은, 1.5(w/v)% 겔 압출 하중이 10g~1,400g인 것이 바람직하고, 10g~

1,000g인 것이 보다 바람직하고, 10g~500g인 것이 더욱 바람직하고, 100g~300g인 것이 보다 더 바람직하다.

- [0066] 상기 압출 하중은, 예를 들어, 텍스처 애널라이저(에이코 정기 주식회사 제조)에 부수하는 원주 용기(내경 50mm, 높이 110mm, 아크릴 수지제)의 저부 중앙부의 구멍(직경 3mm)을 테이프로 막고, 한천의 1.5(w/v)% 수용액 100g을 충전하고, 20℃에서 18시간 정치시켜 겔화시킨 후, 저부의 테이프를 떼어내고, 직경 49mm의 플런저를 사용하여 겔 상부로부터 가압하여(20℃, 진입 속도 20mm/분), 겔이 붕괴되어 하부의 구멍으로부터 유출되었을 때의 하중을 측정함으로써 구해진다.
- [0067] 상기한 저분자 한천은, 통상적인 한천의 산처리에 의한 저분자화, 혹은 우뭇가사리, 강리, 개우무 등의 해조로부터의 추출 공정시에, 또는 상기 추출 공정 혹은 여과 공정 중 어느 것을 거친 한천에 대해 산처리를 실시하는 등, 공지된 방법에 의해 제조할 수 있지만, 저분자 한천으로서 시판되고 있는 제품, 예를 들어 상기한 「울트라 한천 이나」(이나 식품 공업 주식회사 제조) 등을 사용할 수도 있다.
- [0068] 본 발명에 있어서 사용하는 저분자 한천 등의 한천은, 필요에 따라 멸균 처리를 실시해도 된다. 멸균 방법에는 특별히 제한은 없고, 예를 들어, 방사선 멸균, 에틸렌옥사이드 가스 멸균, 오토클레이브 멸균 등을 들 수 있다. 이들 멸균 처리는, 한천이 고형이어도 용액의 상태이어도 실시할 수 있다.
- [0069] 본 발명에 있어서는, 상기한 한천을 그대로 배지 첨가물로 해도 되고, 또, 물 등의 용매에 용해시키거나, 혹은 부형제, 결합제 등의 일반적으로 제제화에 사용되는 성분과 혼합하여, 분말상, 과립상 등의 고형상의 배지 첨가물, 또는 수용액 등의 액상의 배지 첨가물로 해도 된다.
- [0070] 또, 상기한 한천을, 탄수화물, 무기염 등의 이하에 서술하는 배지 성분의 일부와 혼합하여, 배지 첨가물로서 조제해도 된다.
- [0071] 세포 또는 조직의 배양에 사용되는 배지에 간편하게 첨가할 수 있고, 또, 특히 액체의 배지와와의 혼화성 등의 관점에서, 본 발명의 배지 첨가물은, 바람직하게는 액상의 형태로 제공된다.
- [0072] 액상의 배지 첨가물은, 한천을 적당한 용매에 용해시켜, 용액으로서 조제된다. 본 발명에 있어서 사용할 수 있는 용매로는, 물;디메틸설폭사이드(DMSO);메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 등의 저급 알코올;프로필렌글리콜, 부틸렌글리콜, 글리세린 등의 다가 알코올 등의 극성 용매를 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다. 특히 바람직한 용매는 물이고, 본 발명의 배지 첨가물은, 특히 바람직하게는, 수용액으로서 제공된다.
- [0073] 본 발명의 배지 첨가물에 있어서의 한천의 함유량은, 배지에 첨가했을 때의 배지 조성물 중에 있어서의 한천의 함유량이, 후술하는 소정의 함유량이 되도록 설정된다.
- [0074] 수용액 등, 액상의 배지 첨가물에 있어서의 한천의 함유량은, 0.001(w/v)%~5(w/v)%인 것이 바람직하고, 0.01(w/v)%~2(w/v)%인 것이 보다 바람직하고, 0.1(w/v)%~1(w/v)%인 것이 더욱 바람직하다.
- [0075] 본 발명의 배지 첨가물에는, 한천의 효과를 높이고, 그 사용량을 저감시킬 수 있는 다른 성분을 첨가할 수도 있다. 이러한 성분으로는, 핵수론산(글루쿠론산, 갈락투론산 등) 등의 우론산;구아검, 타마린드검, 알긴산, 알긴산프로필렌글리콜에스테르, 로커스트빈검, 아라비아검, 타라검, 젤란검, 탈아실화 젤란검, 람산검, 디우탄검, 크산탄검, 카리기난, 키틴, 후코이단, 펙틴, 펙트산, 펙틴산, 람난황산 등의 다당류 및 그 유도체;히알루론산, 헤파란황산, 헤파린, 케라타황산, 콘드로이틴황산, 데르마탄황산 등의 무코 다당류;메틸셀룰로오스, 하이드록시 에틸셀룰로오스, 하이드록시프로필셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스 등의 셀룰로오스 유도체;카르복시비닐 폴리머, 아크릴산·메타크릴산알킬 공중합체 등의 친수성 고분자;그리고 이들의 염 등을 들 수 있고, 상기 성분은 1종 또는 2종 이상을 선택하여 사용할 수 있다. 본 발명의 배지 첨가물에 있어서의 상기 성분의 함유량은, 0.001(w/v)%~5(w/v)%인 것이 바람직하고, 0.01(w/v)%~2(w/v)%인 것이 보다 바람직하고, 0.1(w/v)%~1(w/v)%인 것이 더욱 바람직하다.
- [0076] 수용액의 형태로 제공되는 본 발명의 배지 첨가물은, 한천, 및 필요에 따라 다른 성분을 물에 첨가하고, 90℃~97℃로 가열하여 용해시키고, 바람직하게는 멸균 처리를 실시하여 조제된다.
- [0077] 멸균 처리의 방법은 특별히 제한되지 않고, 예를 들어, 121℃에서 20분간의 오토클레이브 멸균, 방사선 멸균, 에틸렌옥사이드 가스 멸균, 필터 여과 멸균 등을 들 수 있다.
- [0078] 필터 여과 멸균(이하, 「여과 멸균」이라고 하는 경우도 있다)을 실시할 때의 필터 부분의 재질은 특별히 제한되지 않지만, 예를 들어, 유리 파이버, 나일론, PES(폴리에테르술폰), 친수성 PVDF(폴리불화비닐리덴), 셀룰로오스 혼합 에스테르, 셀룰로오스아세테이트, 폴리테트라플루오로에틸렌 등을 들 수 있다. 필터의 세공의

크기는, 본 발명의 배지 첨가물이 통과하고, 미생물이 통과하지 않는 크기이면 특별히 제한되지 않지만, 바람직하게는 0.1 μ m~10 μ m, 보다 바람직하게는 0.1 μ m~1 μ m, 가장 바람직하게는, 0.1 μ m~0.5 μ m이다. 필터 여과 멸균을 할 때의 배지 첨가물의 온도는, 30 $^{\circ}$ C~80 $^{\circ}$ C인 것이 바람직하고, 40 $^{\circ}$ C~70 $^{\circ}$ C인 것이 보다 바람직하고, 50 $^{\circ}$ C~60 $^{\circ}$ C인 것이 더욱 바람직하다.

- [0079] 본 발명의 배지 조성물은, 상기한 한천을, 세포 또는 조직 배양에 통상 사용하는 배지 성분과 함께 함유한다.
- [0080] 상기한 한천은, 통상 사용되는 배지 성분, 상기의 본 발명의 배지 첨가물로서, 첨가되는 것이어도 된다.
- [0081] 세포 또는 조직 배양에 통상 사용하는 배지 성분으로는, 글루코오스, 프룩토오스, 자당, 말토오스 등의 탄수화물; 아스파라긴, 아스파르트산, 글루타민, 글루타민산 등의 아미노산; 알부민, 트랜스페린 등의 단백질 또는 펩티드; 혈청; 비타민 A, 비타민 B군(티아민, 리보플라빈, 피리독신, 시아노코발라민, 비오틴, 엽산, 판토텐산, 니코틴아미드 등), 비타민 C, 비타민 E 등의 비타민; 올레산, 아라키돈산, 리놀레산, 콜레스테롤 등의 지방산 또는 지질; 염화칼륨, 염화칼슘, 황산마그네슘, 염화나트륨, 인산이수소나트륨 등의 무기염; 아연, 구리, 셀렌 등의 미량 원소; N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid(BES), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid(HEPES), N-[tris(hydroxymethyl)methyl]glycine(Tricine) 등의 완충 시약; 암포테리신 B, 카나마이신, 겐타마이신, 스트렙토마이신, 페니실린 등의 항생 물질; Type I 콜라겐, Type II 콜라겐, 콘드로이틴황산나트륨, 피브로넥틴, 라미닌, 폴리-L-리신, 폴리-D-리신 등의 세포 접착 인자 또는 세포간 매트릭스; 인터류킨, 간세포 증식 인자(HGF), 트랜스포밍 증식 인자(TGF)- α , 트랜스포밍 증식 인자(TGF)- β , 혈관 내피 증식 인자(VEGF) 등의 시토카인 또는 증식 인자; 텍사메타손, 하이드로코르티손, 에스트라디올, 프로그스테론, 글루카곤, 인슐린 등의 호르몬 등을 들 수 있고, 배양하는 세포 또는 조직에 따라 적절한 성분을 선택하고, 공지된 조성에 따라 배지 조성물을 조제하여 사용할 수 있다.
- [0082] 또, 본 발명에 있어서는, 세포 또는 조직 배양용으로서 범용되는 배지를 사용할 수도 있고, 이러한 배지로는, 간세포를 비롯한 동물 세포나, 동물 유래 조직의 배양, 암세포의 배양에 사용되는 배지, 및 식물 세포 또는 식물 유래 조직의 배양에 사용되는 배지를 들 수 있다.
- [0083] 동물 세포 또는 동물 유래 조직의 배양용 배지로는, 돌베코 개변 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMEM), 함 F12 배지(Ham's Nutrient Mixture F12), DMEM/F12 배지, 맥코이 5A 배지(McCoy's 5A medium), 이글 MEM 배지(Eagle's Minimum Essential Medium; EMEM), α MEM 배지(alpha Modified Eagle's Minimum Essential Medium; α MEM), MEM 배지(Minimum Essential Medium), RPMI(Roswell Park Memorial Institute) 1640배지, 이스코브 개변 돌베코 배지(Iscove's Modified Dulbecco's Medium; IMDM), MCDB131 배지, 윌리엄 배지 E, IPL41 배지, Fischer's 배지, StemPro34(인비트로젠 주식회사 제조), X-VIVO 10(캠브렉스사 제조), X-VIVO 15(캠브렉스사 제조), HPGM(캠브렉스사 제조), StemSpan H3000(스템셀 테크놀로지사 제조), StemSpanSFEM(스템셀 테크놀로지사 제조), StemLine II(시그마 알드리치사 제조), QBSF-60(켈리티 바이오로지컬 사 제조), StemProhESCSFM(인비트로젠 주식회사 제조), Essential8(등록상표) 배지(Gibco 사 제조), mTeSR1 혹은 2배지(스템셀 테크놀로지사 제조), 리프로 FF 혹은 리프로 FF2(주식회사 리프로셀 제조), PSGro hESC/iPSC 배지(시스템 바이오사이언스사 제조), NutriStem(등록상표) 배지(바이오로지컬 인더스트리즈사 제조), CSTI-7배지(주식회사 세포 과학 연구소 제조), MesenPRO RS 배지(Gibco사 제조), MF-Medium(등록상표) 간엽계 줄기 세포 증식 배지(토요보 주식회사 제조), Sf-900II(인비트로젠 주식회사 제조), Opti-Pro(인비트로젠 주식회사 제조) 등을 들 수 있다.
- [0084] 암세포의 배양에 사용되는 배지로는, 상기 동물 세포 또는 동물 유래 조직의 배양용 배지에 세포 접착 인자를 함유하는 것을 사용할 수 있고, 세포 접착 인자로는, 매트릭셀, 콜라겐젤, 젤라틴, 폴리-L-리신, 폴리-D-리신, 라미닌, 피브로넥틴 등을 들 수 있다. 이들 세포 접착 인자는, 1종을 단독으로, 또는 2종류 이상을 조합하여 첨가할 수 있다.
- [0085] 간세포의 배양에 사용되는 배지로는, 상기 동물 세포 또는 동물 유래 조직의 배양용 배지에 더하여, HepatoZYME-SFM(라이프 테크놀로지스사 제조), HCM(등록상표)-간세포 배양 배지 BulletKit(등록상표, 론자사 제조), HBM(등록상표)-간세포 기본 배지(론자사 제조), HMM(등록상표)-간세포 메인터너스 배지(론자사 제조), 변법 란포드 배지(닛스이 제약 주식회사 제조), ISOM's 배지, 간세포 증식 배지(타카라 바이오 주식회사 제조), 간세포 유지 배지(타카라 바이오 주식회사 제조), 간세포 기본 배지(타카라 바이오 주식회사 제조), 활성 유지 슈퍼 배지(인비트로 ADMET 래버러토리즈사 제조) 등을 들 수 있다. 이들 배지에는, 매트릭셀, 콜라겐젤, 젤라틴, 폴리-L-리신, 폴리-D-리신, 라미닌, 피브로넥틴 등의 세포 접착 인자를 첨가하는 것이 가능하고, 상기 세포 접착 인자는, 1종 또는 2종 이상을 선택하여 첨가할 수 있다.

- [0086] 식물 세포 또는 식물 유래 조직의 배양용 배지로는, 무라시게·스쿠그(MS) 배지, 린즈마이어·스쿠그(LS) 배지, 화이트 배지, 감보그 B5 배지, 니체 배지, 헬라 배지, 모델 배지 등의 기본 배지, 혹은 이들 배지 성분을 지적 농도로 수정한 수정 배지(예를 들어, 암모니아태 질소 농도를 절반으로 하는 등)에, 옥신류 및 필요에 따라 시토키닌류 등의 식물 생장 조절 물질(식물 호르몬)을 적당한 농도로 첨가한 배지를 들 수 있다. 이들 배지에는, 필요에 따라, 카세인 분해 효소, 옥수수 침지액, 비타민류 등을 추가로 보충할 수 있다. 옥신류로는, 예를 들어, 3-인돌아세트산(IAA), 3-인돌부티르산(IBA), 1-나프탈렌아세트산(NAA), 2,4-디클로로페녹시 아세트산(2,4-D) 등을 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다. 옥신류는, 예를 들어, 약0.1ppm~약10ppm의 농도로 배지에 첨가될 수 있다. 시토키닌류로는, 예를 들어, 키네티ن, 벤질아데닌(BA), 제아틴 등을 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다. 시토키닌류는, 예를 들어, 약0.1ppm~약10ppm의 농도로 배지에 첨가될 수 있다.
- [0087] 본 발명에 있어서는, 배양하는 세포 또는 조직의 종류, 배양 목적 등에 따라, 적절한 배지를 선택하여 사용할 수 있다. 상기한 배지는, 그들 조성에 기초하여 조제하여 사용해도 되지만, 각 사로부터 제공되고 있는 시판되는 제품을 사용할 수도 있다.
- [0088] 본 발명의 배지 조성물에 있어서의 한천의 함유량은, 배지 조성물의 전체량에 대하여, 0.005(w/v)% 이상이고 2(w/v)% 미만인 것이 바람직하고, 0.03(w/v)% 이상이고 2(w/v)% 미만인 것이 보다 바람직하고, 0.03(w/v)% ~1(w/v)%인 것이 더욱 바람직하고, 0.03(w/v)%~0.1(w/v)%인 것이 더욱 더 바람직하다.
- [0089] 배지 조성물 중의 한천의 함유량이 0.005(w/v)% 이상이면, 세포 또는 하나의 세포로 형성된 스피어, 혹은 조직은 과잉인 크기의 응집 덩어리를 형성하지 않고 증식되어, 저점착 조건에 있어서의 세포의 증식 촉진 효과를 볼 수 있다. 또, 배지 조성물 중의 한천의 함유량이 0.03(w/v)% 이상이면, 세포 또는 조직의 균일한 분산이 얻어지기 때문에, 보다 바람직하다. 한편, 배지 조성물 중의 한천의 함유량이 2(w/v)% 이상이면, 실온에서 겔화되어 버리는 경우가 있기 때문에, 취급이 곤란해지는 경우가 있다.
- [0090] 또, 본 발명의 배지 조성물에 있어서의 한천의 함유량은, 후술하는 바와 같이, 배양하는 세포 또는 조직의 종류나 배양 방법, 배양의 목적 등에 따라, 적절한 농도가 되도록 선택할 수 있다.
- [0091] 본 발명에 있어서는, 상기한, 일반적인 한천에 비해 저분자량의 한천을 저농도로 함유하는 배지 조성물이, 마이크로 캐리어 배양이나 스피어 배양에 사용할 수 있는 배지 조성물인면서, 저점도이고, 취급하기 쉬운 배지 조성물이기 때문에 바람직하다.
- [0092] 본 발명에 있어서는, 한천의 함유량이 0.1(w/v)%인 배지 조성물의 점도는, E형 점도계로 37℃에서 후술하는 조건으로 측정했을 경우, 3mPa·S 이하인 것이 바람직하고, 2.5mPa·S 이하인 것이 보다 바람직하고, 2.1mPa·S 이하인 것이 더욱 바람직하다. 이러한 저점도의 배지 조성물은, 상기한 저분자 한천을 사용함으로써, 용이하게 조제할 수 있다.
- [0093] 본 발명의 배지 조성물은, 공지된 방법에 준하여 조제할 수 있고, 예를 들어, 배지 성분 및 한천을 소정 농도가 되도록 정제수에 첨가하고, 90℃~97℃로 가열하여 용해시키고, 121℃에서 20분간 오토클레이브 멸균하여 조제할 수 있다.
- [0094] 또, 한천을 0.6(w/v)%~2(w/v)%의 농도가 되도록 정제수에 첨가하고 90℃~97℃로 가열, 용해시키고, 121℃에서 20분간 오토클레이브 멸균하여 조제한 한천 수용액과, 임의의 배지를 소정량 혼합하여 조제할 수도 있다.
- [0095] 게다가 또한, 0.01(w/v)%~0.2(w/v)%의 농도가 되도록 정제수에 첨가하고 90℃~97℃로 가열, 용해시키고, 121℃에서 20분간 오토클레이브 멸균하여 조제한 한천 수용액과, 2배 이상으로 성분을 농축한 배지를 소정량 혼합하여 조제할 수도 있다.
- [0096] 한천 수용액과 임의의 배지를 혼합할 때의 그 배지의 온도는, 25℃~80℃인 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 30℃~50℃, 더욱 바람직하게는 32℃~37℃이다. 또, 그 때의 한천 수용액의 온도는, 30℃~80℃인 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 40℃~70℃, 더욱 바람직하게는 50℃~60℃이다.
- [0097] 혹은 또, 상기 본 발명의 배지 첨가물과 배지 성분을, 각각 소정의 농도가 되도록 정제수에 첨가하고, 상기와 같이 가열 용해시키고, 오토클레이브 멸균하여 조제할 수 있고, 또는 멸균 처리된 본 발명의 배지 첨가물을, 소정의 한천 농도가 되도록 배지에 첨가하여 조제할 수도 있다.
- [0098] 본 발명의 배지 조성물의 조제에 사용하는 한천 수용액은, 상기한 수용액의 형태의 배지 첨가물과 동일하게 조제할 수 있고, 또, 동일하게 멸균 처리를 실시할 수 있다.

- [0099] 본 발명의 배지 조성물은, 세포 또는 조직의 배양에 바람직하게 사용할 수 있다.
- [0100] 여기서, 「세포」란, 동물 혹은 식물을 구성하는 가장 기본적인 단위이고, 그 요소로서 세포막의 내부에 세포질과 각종 세포 소기관을 갖는 것이다. 이 때, DNA를 내포하는 핵은, 세포 내부에 함유되어도 되고 함유되지 않아도 된다.
- [0101] 동물 유래의 세포에는, 정자, 난자 등의 생식 세포, 생체를 구성하는 체세포, 줄기 세포, 전구 세포, 암세포, 생체로부터 분리되어 불사화능(不死化能)을 획득하여 체외에서 안정적으로 유지되는 세포(세포주), 생체로부터 분리되어 인위적으로 유전자 개변이 이루어진 세포, 생체로부터 분리되어 인위적으로 핵이 교환된 세포 등이 포함된다.
- [0102] 생체를 구성하는 체세포의 예로는, 이하에 한정되는 것은 아니지만, 선유아세포, 골수 세포, B림프구, T림프구, 호중구, 적혈구, 혈소판, 매크로파지, 단구, 골세포, 골수 세포, 주피 세포, 수상 세포, 지방 세포, 간엽 세포, 상피 세포, 표피 세포(예를 들어, 각화 세포(케라티노사이트), 각질 세포 등), 내피 세포, 혈관 내피 세포, 간 실질 세포, 연골 세포, 난구 세포, 신경 세포, 글리어 세포, 올리고덴드로사이트(희돌기교 세포), 마이크로 글리어(소교 세포), 아스트로사이트(성상교 세포), 심장 세포, 식도 세포, 근육 세포(예를 들어, 평활근 세포, 골격근 세포), 췌장 베타 세포, 멜라닌 세포 및 단핵 세포 등을 들 수 있다.
- [0103] 당해 체세포에는, 예를 들어 피부, 신장, 비장, 부신, 간장, 폐, 난소, 췌장, 자궁, 위, 결장, 소장, 대장, 방광, 전립선, 정소, 흉선, 근육, 결합 조직, 뼈, 연골, 혈관 조직, 혈액(체대혈을 포함한다), 골수, 심장, 눈, 뇌 또는 신경 조직 등의 임의의 조직으로부터 채취되는 세포가 포함된다.
- [0104] 줄기 세포란, 자기 자신을 복제하는 능력과 다른 복수 계통의 세포로 분화되는 능력을 겸비한 세포이고, 그 예로서, 이하에 한정되는 것은 아니지만, 신경 줄기 세포, 조혈 줄기 세포, 간엽계 줄기 세포, 간 줄기 세포, 췌장 줄기 세포, 근육 줄기 세포, 생식 줄기 세포, 장 줄기 세포, 모낭 줄기 세포 등의 성체 줄기 세포, 배성 줄기 세포(ES 세포), 배성 중앙 세포, 배성 생식 줄기 세포, 인공 다능성 줄기 세포(iPS 세포) 등의 다능성 줄기 세포, 암 줄기 세포 등을 들 수 있다.
- [0105] 전구 세포란, 상기 줄기 세포로부터 특정한 체세포나 생식 세포로 분화되는 도중의 단계에 있는 세포이고, 위성 세포, 췌장 전구 세포, 혈관 전구 세포, 혈관 내피 전구 세포, 조혈 전구 세포(체대혈 유래의 CD34 양성 세포 등)를 들 수 있다.
- [0106] 암세포란, 체세포로부터 파생되어 무한 증식능을 획득한 세포이고, 위암, 식도암, 대장암, 결장암, 직장암, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평 상피 세포암, 기저 세포암, 선암, 골수암, 신장 세포암, 요관암, 간암, 담관암, 자궁 경부암, 자궁 내막암, 정소암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 방광암, 상피암, 두개 인두암, 후두암, 설암, 섬유 육종, 점막 육종, 지방 육종, 연골 육종, 골원성 육종, 척색종, 혈관 육종, 림프관 육종, 림프관 내피 육종, 활막종, 중피종, 유방 중앙, 평활근 육종, 횡문근 육종, 정상피종, 윌름스 중앙, 신경 교종, 성장 세포종, 골수아종, 수막종, 흑색종, 신경아세포종, 수아종, 망막아세포종, 악성 림프종, 암환자 유래의 혈액 등의 암조직의 세포를 들 수 있다.
- [0107] 암세포주로는, 인간 유방암 세포주로서 HBC-4, BSY-1, BSY-2, MCF-7, MCF-7/ADR RES, HS578T, MDA-MB-231, MDA-MB-435, MDA-N, BT-549, T47D, 인간 자궁 경부암 세포주로서 HeLa, C-33A, 인간 폐암 세포주로서 A549, EKVX, HOP-62, HOP-92, NCI-H23, NCI-H226, NCI-H322M, NCI-H460, NCI-H522, DMS273, DMS114, 인간 대장암 세포주로서 Caco-2, COLO-205, HCC-2998, HCT-15, HCT-116, HT-29, KM-12, SW-620, WiDr, 인간 전립선암 세포주로서 DU-145, PC-3, LNCaP, 인간 중추 신경계암 세포주로서 U251, SF-295, SF-539, SF-268, SNB-75, SNB-78, SNB-19, 인간 난소암 세포주로서 OVCAR-3, OVCAR-4, OVCAR-5, OVCAR-8, SK-OV-3, IGROV-1, 인간 신장암 세포주로서 RXF-631L, ACHN, UO-31, SN-12C, A498, CAKI-1, RXF-393L, 786-0, TK-10, 인간 위암 세포주로서 MKN45, MKN28, St-4, MKN-1, MKN-7, MKN-74, 피부암 세포주로서 LOX-IMVI, LOX, MALME-3M, SK-MEL-2, SK-MEL-5, SK-MEL-28, UACC-62, UACC-257, M14, 백혈병 세포주로서 CCRF-CRM, K562, MOLT-4, HL-60TB, RPMI8226, SR, UT7/TPO, Jurkat, 인간 상피형암 세포주로서 A431, 인간 멜라노마 세포주로서 A375, 인간 골육종 세포주로서 MNNG/HOS, 인간 췌장암 세포주로서 MIAPaCa-2, 마우스 골수종 세포주로서 Ns0, Ns1, 래트 갈색 세포종 유래의 세포주로서 PC12 등을 들 수 있다.
- [0108] 정상 세포 유래의 세포주로는, CHOK1 세포(ATCC CCL-61(상표)), CHO-S 세포, CHO-DG44 세포(차이니스 햄스터 난소 유래), HEK293(인간 태아 신장 세포 유래), MDCK(개 신장 요세관 상피 세포 유래), MDBK(소 신장 유래), BHK(시리안 햄스터 신장 유래), AE-1(마우스 비장 세포 유래), NIH3T3(마우스 태자(胎仔) 선유아 세포 유래),

S2(초파리 배아 유래), Sf9(밤나방 난소 세포 유래), Sf21(밤나방 난소 세포 유래), High Five(등록상표, 은무늬밤나방 난세포 유래), Vero(아프리카 녹색 원숭이 신장 상피 세포 유래) 등을 들 수 있다.

- [0109] 간세포로는, 간장 조직으로부터 채취된 초대 간세포 외에, 생체 외에서의 배양에 최적화된 조건으로 계대 배양되어 확립된 간세포주, 및 간장 이외의 조직 유래의 세포, iPS 세포나 ES 세포 등의 다능성 줄기 세포, 간엽계 줄기 세포, 말초혈 유래 줄기 세포, 골수 줄기 세포, 지방 줄기 세포, 간 줄기 세포, 간 전구 세포 등으로부터 생체 외에서 분화 유도된 간세포 등이 사용된다.
- [0110] 간장 조직은, 인간, 래트, 마우스, 모르모트, 햄스터, 토끼, 돼지, 소, 말, 개, 고양이, 혹은 원숭이 등으로부터 채취된 간장이고, 정상적인 간장뿐만 아니라 암화된 간장이어도 된다.
- [0111] 초대 간세포는, 상기 간장 조직으로부터 콜라게나아제를 사용한 관류법에 의해 분리하여 채취할 수 있지만, 주식회사 프라이머리셀, 닛폰 백톤·딕킨슨 주식회사, 타카라 바이오 주식회사, 홋카이도 시스템·사이언스 주식회사, 룬자 재팬 주식회사, 주식회사 베리타스, 라이프 테크놀로지즈 재팬 주식회사 등의 시약 회사로부터 구입한 것이어도 된다. 구입하는 간세포는, 동결된 상태 혹은 콜라겐 등의 담체에 접촉된 상태일 수 있다.
- [0112] 간세포주의 예로는, 이하에 한정되는 것은 아니지만, HepG2, Hep3B, HepaRG(등록상표), JHH7, HLF, HLE, PLC/PRF/5, WRL68, HB611, SK-HEP-1, HuH-4, HuH-7 등을 들 수 있다.
- [0113] 식물 유래의 세포에는, 식물체의 각 조직으로부터 분리된 세포가 포함되고, 당해 세포로부터 세포벽을 인위적으로 제거한 프로토플라스트도 포함된다.
- [0114] 본 발명에 있어서, 「조직」이란, 몇 종류인가의 상이한 성질이나 기능을 갖는 세포가 일정한 양식으로 집합한 구조의 단위이고, 동물 조직의 예로는, 상피 조직, 결합 조직, 근육 조직, 신경 조직 등을 들 수 있다. 식물 조직의 예로는, 분열 조직, 표피 조직, 동화 조직, 엽육 조직, 통도 조직, 기계 조직, 유조직, 탈분화된 세포 덩어리(캘러스) 등을 들 수 있다.
- [0115] 본 발명의 배지 조성물은, 세포의 배양에 바람직하게 사용되고, 상기한 바와 같은 동물 유래의 세포의 배양에 의해 바람직하게 사용된다.
- [0116] 동물 유래의 세포는, 상기와 같이, 생육·증식시의 성장에 의해 부유성 세포와 접촉성 세포로 이분된다. 부유성 세포로는, 호중구, 호산구, 림프구, 매크로파지 등의 혈액 내에 존재하는 세포 등을 들 수 있고, 접촉성 세포로는, 상피 세포, 내피 세포, 신경 세포, 선유아 세포 등을 들 수 있다. 본 발명의 배지 조성물은, 부유성 세포, 접촉성 세포 중 어느 것에도 바람직하게 사용할 수 있지만, 생체를 구성하는 체세포나, 체세포 또는 암세포 유래의 세포주에는 접촉성 세포가 많으므로, 본 발명의 배지 조성물은, 접촉성 세포의 배양에 의해 바람직하게 사용할 수 있다. 본 발명의 배지 조성물은, 담체 표면에 접촉되거나 혹은 담체 내부에 포매된 상태에서, 또는 스피어(세포 덩어리)를 형성한 상태에서 접촉성 세포를 배양하는 데에 특히 바람직하게 사용할 수 있다.
- [0117] 또, 본 발명의 배지 조성물은, 암세포, 간세포 및 암세포주의 배양에 특히 바람직하게 사용된다.
- [0118] 접촉성 세포를 표면에 접촉시킬 수 있는 담체로는, 비닐 수지, 우레탄 수지, 에폭시 수지, 폴리스티렌, 폴리메틸메타크릴레이트, 폴리에스테르, 폴리아미드, 폴리이미드, 실리콘 수지, 페놀 수지, 멜라민 수지, 우레아 수지, 아닐린 수지, 아이오노머 수지, 폴리카보네이트, 콜라겐, 텍스트란, 젤라틴, 셀룰로오스, 알긴산염 및 이들의 혼합물 등에 의해 구성된 마이크로 캐리어, 유리 비즈, 세라믹스 비즈, 폴리스티렌 비즈, 텍스트란 비즈 등을 들 수 있다.
- [0119] 이들 담체는, 세포의 접촉성을 높이거나, 혹은 세포로부터의 물질의 방출을 높이는 코팅재로 피복되어 있어도 된다. 이러한 코팅재의 예로는, 폴리(모노스테아로일글리세리드숙신산), 폴리-D,L-락티드-코-글리콜라이드, 히알루론산나트륨, n-이소프로필아크릴아미드, I형~XIX형 콜라겐, 피브로넥틴, 비트로넥틴, 라미닌-1~12, 테나신, 트롬보스폰딘, 폰 빌브란드(von Willebrand) 인자, 오스테오펀틴, 피브리노겐, 각종 엘라스틴, 각종 프로테오글리칸, 각종 카드헤린, 데스모콜린, 데스모글레인, 각종 인테그린, E-셀렉틴, P-셀렉틴, L-셀렉틴, 면역 글로블린 슈퍼패밀리, 매트릭셀, 폴리-D-리신, 폴리-L-리신, 키틴, 키토산, 세파로스, 알긴산겔, 각종 하이드로겔 등을 들 수 있고, 이들 코팅재는, 1종을 단독으로, 또는 2종 이상을 조합하여 사용해도 된다.
- [0120] 또, 당해 담체는, 자성 재료, 예를 들어 페라이트를 함유하고 있어도 된다.
- [0121] 당해 담체의 직경은 수 10 μ m~수 100 μ m, 보다 바람직하게는 100 μ m~200 μ m이고, 그 비중은, 1에 가까운 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 0.9~1.2, 특히 바람직하게는 약 1.0이다.

- [0122] 당해 담체의 예로는, 이것에 한정되는 것은 아니지만, Cytodex1(등록상표), Cytodex3(등록상표), Cytoline1(등록상표), Cytoline2(등록상표), Cytopore1(등록상표), Cytopore2(등록상표)(이상 GE 헬스케어사 제조), Biosilon(등록상표)(NUNC사 제조), Cultispher-G(등록상표), Cultispher-S(등록상표)(이상 서모 사이언티픽 사 제조), HILLEXCT(등록상표), ProNectinF-COATED(등록상표), 및 HILLEXII(등록상표)(솔로힐 엔지니어링사 제조), GEM(등록상표)(글로벌 유카리오틱 마이크로케리어사 제조) 등을 들 수 있다
- [0123] 당해 담체는, 필요에 따라 멸균 처리를 실시해도 된다. 멸균 방법은 특별히 제한되지 않고, 예를 들어, 방사선 멸균, 에틸렌옥사이드 가스 멸균, 오토클레이브 멸균 및 건열 멸균 등을 들 수 있다.
- [0124] 당해 담체를 사용하여 접착성 세포를 배양함으로써, 당해 담체에 상기 세포를 접착시킬 수 있지만, 그 배양 방법으로는 특별히 제한은 없고, 통상적인 유동층형 배양조 또는 충전층형 배양조를 사용하는 배양 방법 등을 사용할 수 있다.
- [0125] 접착성 세포를 내부에 포매시킬 수 있는 담체로는, 콜라겐, 젤라틴, 알긴산염, 키토산, 아가로오스, 폴리글리콜산, 폴리락트산, 피브린 접착제, 폴리락트산·폴리글리콜산 공중합체, 프로테오글리칸, 글리코사미노글리칸, 폴리우레탄폼 등의 스펀지, 온도 감수성 고분자(예를 들어, DseA-3D(등록상표), 폴리N-치환 아크릴아미드 유도체, 폴리N-치환 메타아크릴아미드 유도체 및 이들의 공중합체, 폴리비닐메틸에테르, 프로필렌옥사이드와 에틸렌옥사이드의 공중합체, 폴리비닐알코올 부분 아세트화물 등), 폴리아크릴아미드, 폴리비닐알코올, 메틸셀룰로오스, 니트로셀룰로오스, 셀룰로오스부틸레이트, 폴리에틸렌옥사이드, 폴리(2-하이드록시에틸메타크릴레이트)/폴리카프로락톤 등의 하이드로겔 등에서 선택한 1종 또는 2종 이상의 고분자 재료에 의해 제조된 담체를 사용할 수 있다.
- [0126] 당해 담체에는, 추가로 세포 증식 인자, 분화 유도 인자, 세포 접착 인자, 항체, 효소, 시토카인, 호르몬, 렉틴 또는 세포 외 매트릭스 등의 생리 활성 물질을 함유시킬 수도 있다.
- [0127] 상기 담체에 접착성 세포를 포매시키는 방법은 특별히 제한되지 않지만, 예를 들어, 상기 세포와 담체 형성 재료인 고분자의 혼액을 시린지에 흡인하고, 25G~19G 정도의 주사 바늘을 통해서 배지 중에 적하하거나, 혹은 마이크로 피펫을 사용하여 배지 중에 적하하는 등의 방법을 사용할 수 있다. 이러한 방법으로 형성되는 비즈상 담체의 크기는, 상기 세포와 고분자 혼합액을 적하할 때에 사용하는 기구 선단의 형상에 의해 결정되고, 바람직하게는 수 10 μ m~수 1,000 μ m, 보다 바람직하게는 100 μ m~2,000 μ m이다. 비즈상 담체에 포매하여 배양할 수 있는 세포수는 특별히 제한되지 않고, 비즈상 담체의 크기에 맞춰 자유롭게 선택하면 된다. 예를 들어, 직경 약 2,000 μ m의 비즈상 담체의 경우, 500만개까지의 세포를 담체 중에 포매할 수 있다. 또, 포매된 세포는, 담체 내에서 1개씩 분산되어 있어도 되고, 복수개의 세포가 집합한 스피어를 형성하고 있어도 된다.
- [0128] 접착성 세포의 스피어를 형성시키는 방법에는 특별히 제한은 없고, 범용되는 방법으로부터 당업자가 적절히 선택할 수 있다. 그 예로는, 세포 비접착 표면을 갖는 용기를 사용한 방법, 행잉 드롭법, 선회 배양법, Micromolding법, 3차원 스캐폴드법, 원심법, 전기장이나 자장에 의한 응집을 사용한 방법 등을 들 수 있다.
- [0129] 예를 들어, 세포 비접착 표면을 갖는 용기를 사용하는 방법에서는, 목적으로 하는 세포를, 세포 접착을 저해하는 표면 처리를 실시한 배양 용기 중에서 배양하여, 스피어를 형성시킬 수 있다. 이 세포 비접착성 배양 용기를 사용하는 경우에는, 먼저, 목적으로 하는 세포를 채취하고, 이어서 그 세포의 부유액을 조제하고, 당해 배양 용기 중에 과중하여 배양을 실시한다. 일주일정도 배양을 계속하면, 세포는 자발적으로 스피어를 형성한다. 이 때 사용하는 세포 비접착성 표면으로는, 일반적으로 사용되는 살레 등의 배양 용기의 표면에, 세포 접착을 저해하는 물질을 코트한 것 등을 사용할 수 있다. 세포 접착을 저해하는 물질로는, 아가로오스, 폴리-HEMA(폴리-(2-하이드록시에틸메타크릴레이트)), 2-메타크릴로일옥시에틸포스포릴콜린과 다른 모노머(예를 들어 부틸메타크릴레이트 등)의 공중합체, 폴리(2-메톡시메틸아크릴레이트), 폴리-N-이소프로필아크릴아미드, 메비올젤(등록상표) 등을 들 수 있다.
- [0130] 스피어 형성을 위한 배양시, 스피어의 형성을 빠르게 하거나, 혹은 그 유지를 촉진시키는 성분을 배지 중에 함유시킬 수도 있다. 이러한 효과를 갖는 성분의 예로는, 디메틸설폭사이드, 슈퍼옥사이드디스무타아제, 셀룰로플라스민, 카탈라아제, 퍼옥시다아제, L-아스코르브산, L-아스코르브산인산에스테르, 토코페롤, 플라보노이드, 요산, 빌리루빈, 함셀렌 화합물, 트랜스페린, 불포화 지방산, 알부민, 테오필린, 포스포콜린, 글루카곤, 디부티릴 cAMP 등을 들 수 있다. 함셀렌 화합물로는, 아셀렌산나트륨, 셀렌산나트륨, 디메틸셀레나이드, 셀렌화수소, 셀레노메티오닌, Se-메틸셀레노시스테인(rac-(R*)-2-아미노-3-(메틸셀레노)프로판산), 셀레노시스타티오닌, 셀레노시스테인, 셀레노호모시스테인, 아데노신-5'-포스포셀렌산, Se-아데노실셀레노메티오닌(4-[5'-아데노실(메

틸)셀레노니오]-2-아미노부티르산), Y27632, Fasudil(HA1077), H-1152, Wf-536 등의 ROCK(Rho-associated coiled-coil-forming kinase) 저해제를 들 수 있다.

- [0131] 또, 목적으로 하는 사이즈의 균일한 스피어를 얻기 위해서는, 사용하는 세포 비접착성 배양 용기 상에, 목적으로 하는 스피어와 동일 직경의 복수의 오목부를 도입할 수도 있다. 이들 오목부가 서로 접하고 있거나, 혹은 목적으로 하는 스피어의 직경의 범위 내이면, 세포를 파종했을 때, 파종한 세포는 오목부와 오목부 사이에서 스피어를 형성하지 않고, 확실하게 오목부 중에서 그 용적에 따른 크기의 스피어를 형성하여, 균일 사이즈의 스피어 집단을 얻을 수 있다. 이 때의 오목부의 형상으로는 반구 또는 원추상이 바람직하다. 이러한 오목부의 제조는, 미리 설계한 주형(템플릿)을 이용하는 Micromolding법에 의해 바람직하게 실시할 수 있다.
- [0132] 혹은, 세포 접착성을 갖는 지지체를 기초로 스피어를 형성시킬 수도 있다. 이 같은 지지체의 예로는, 콜라겐, 폴리락타산, 폴리락트산(PLA), 폴리락트산글리콜산 공중합체(PLGA), 하이드로겔 등을 들 수 있다.
- [0133] 또, 피더 세포와 공배양함으로써, 스피어를 형성시킬 수도 있다. 스피어 형성을 촉진시키기 위한 피더 세포로는, 어떠한 접착성 세포에서도 사용하는 것이 가능하지만, 바람직하게는 각종 세포에 따른 피더 세포가 바람직하다. 예를 들어 간장이나 연골 유래의 세포의 스피어를 형성시키는 경우, 그 피더 세포의 예로는 COS-1 세포나 혈관 내피 세포를 바람직한 세포종으로서 들 수 있다.
- [0134] 스피어의 형성에 사용하는 용기로는, 일반적으로 동물 세포의 배양이 가능한 것이면 특별히 한정되지 않지만, 예를 들어, 플라스크, 디쉬, 페트리디쉬, 조직 배양용 디쉬, 멀티 디쉬, 마이크로 플레이트, 마이크로웰 플레이트, 멀티 플레이트, 멀티웰 플레이트, 챔버 슬라이드, 세포 배양 플라스크, 스피너 플라스크, 튜브, 트레이, 배양 백, 롤러 보틀, EZ SPHERE(아사히 글라스 주식회사 제조), 스밀론 셀 타이트 플레이트(스미토모 베이클라이트 주식회사 제조) 등을 들 수 있다.
- [0135] 본 발명에서 사용하는 스피어의 크기(직경)는, 세포종 및 배양 기간에 따라 상이하어 특별히 한정되지 않지만, 스피어가 구 형상 혹은 타원구 형상인 경우에는 20 μ m~1,000 μ m, 바람직하게는 40 μ m~500 μ m, 보다 바람직하게는 50 μ m~300 μ m, 가장 바람직하게는 80 μ m~200 μ m이다.
- [0136] 접착성 세포가 스피어를 형성한 상태는, 생체 내 환경에 가까운 세포-세포간 상호 작용 및 세포 구조체가 재구축되어 있고, 세포 기능이 장기적으로 유지되는 점, 그리고 세포의 회수가 비교적 용이한 점에서, 스피어를 형성한 상태의 배양 세포는, 세포의 생리적 기능의 해석이나, 의약품 후보 물질 등의 스크리닝 등에 가장 바람직하게 사용할 수 있다. 본 발명의 배지 조성물은, 이러한 스피어를 형성한 상태에서의 세포의 배양에 가장 바람직하게 사용할 수 있다.
- [0137] 본 발명에 있어서는, 1종의 세포가 복수개 집합하여 스피어를 형성한 것, 및 2종 이상의 세포가 집합하여 스피어를 형성한 것 중 어느 것도 바람직하게 사용된다.
- [0138] 또한 본 발명의 배지 조성물을 사용하여 단세포로부터 스피어를 형성시킬 수도 있다. 그 때, 배지 조성물 중의 한천의 농도는, 당해 배지 조성물의 점도를 실질적으로 높이지 않고 세포나 스피어의 분산을 향상시켜, 스피어 끼리의 회합을 방지할 수 있는 농도이고, 예를 들어 0.005(w/v)% 이상이고 2(w/v)% 미만인 것이 바람직하고, 0.03(w/v)% 이상이고 2(w/v)% 미만인 것이 보다 바람직하고, 0.03(w/v)%~1(w/v)%인 것이 더욱 바람직하고, 0.03(w/v)%~0.1(w/v)%인 것이 더욱 더 바람직하다. 스피어는, 본 발명의 배지 조성물 중에 목적으로 하는 세포를 분산시키고, 3일간~12일간 정치시켜 배양함으로써 형성된다. 여기서 얻어진 스피어에 대해서는, 현미경이나 세포 이미징 장치를 사용함으로써, 그 크기, 수, 형태, 구성 세포수 등을 해석할 수 있다. 이와 같은 해석은, 스피어 어세이(Sphere assay), 스페로이드 콜로니 어세이(Spheroid colony assay), 스피어 형성 어세이(Sphere formation assay), 종양 형성 어세이(Tumor formation assay) 등이라고 불리고 있으며, 암 줄기 세포, 신경 줄기 세포, 조혈 전구/줄기 세포 등의 분류나 정량 평가에 바람직하게 사용할 수 있다.
- [0139] 후술하는 바와 같이, 본 발명의 배지 조성물을 사용함으로써, 배양 중 진탕, 교반 등의 조작을 실시하지 않아도, 세포 또는 조직이 양호하게 분산된 배양물을 얻을 수 있다.
- [0140] 따라서, 본 발명에 의해, 목적으로 하는 세포 또는 조직의 기능이 저해되지 않고 정상적으로 유지된 배양물을 얻을 수 있다.
- [0141] 또, 본 발명의 배지 조성물을 사용함으로써, 세포 또는 조직의 증식을 양호하게 촉진시킬 수 있다.
- [0142] 특히, 한천으로서, 상기한 저분자 한천을 사용한 경우, 저점도의 배지 조성물이 얻어지고, 세포 또는 조직의 분

산성이 우수하고, 세포 또는 조직의 증식 촉진 효과도 우수하기 때문에 바람직하다.

- [0143] 본 발명은 또, 상기의 본 발명의 배지 조성물 중에, 상기한 세포 또는 조직을 분산시킨 상태에서 배양하는 방법을 제공한다.
- [0144] 본 발명의 배양 방법에 있어서는, 별도로 조제한 세포 또는 조직을 본 발명의 배지 조성물에 첨가하고, 양호하게 분산되도록 혼합한다. 그 때의 혼합 방법에는 특별히 제한은 없고, 예를 들어 피켓팅 등의 수동으로의 혼합, 스티러, 볼텍스 믹서, 마이크로 플레이트 믹서, 진탕기 등의 기기를 사용한 혼합을 들 수 있다. 혼합 후에는 배양액을 정치 상태로 해도 되고, 필요에 따라 배양액을 회전, 진탕 혹은 교반해도 된다. 그 회전수와 빈도 또는 진탕 빈도는, 배양하는 세포 또는 조직의 종류나 배양의 목적에 맞춰 적절히 설정할 수 있다. 또한, 세포 또는 조직의 기능 등에 미치는 손상을 회피하기 위해서는, 정치 상태로 배양하는 것이 바람직하다.
- [0145] 또, 정치 배양의 기간에 있어서 배지 조성물의 교환이 필요할 때에는, 원심분리나 여과 처리를 실시함으로써 세포 또는 조직과 배지 조성물을 분리한 후, 새로운 배지 조성물을 세포 또는 조직에 첨가하면 된다. 혹은, 원심분리나 여과 처리를 실시함으로써 세포 또는 조직을 적절히 농축한 후, 새로운 배지 조성물을 이 농축액에 첨가하면 된다.
- [0146] 상기 원심분리시의 중력 가속도(G)는, 예를 들어 50G~1,000G, 보다 바람직하게는, 100G~500G이고, 여과 처리에 사용하는 필터의 세공의 크기는, 예를 들어 10 μ m~100 μ m이지만, 세포 또는 조직과 배지 조성물을 분리할 수 있는 한, 이들에 한정되지 않는다.
- [0147] 또, 목적으로 하는 세포에 특이적으로 결합하는 항체를 표면 상에 코팅한 자성 미립자를 사용하여, 자력에 의해 배양한 세포 또는 조직을 분리할 수 있다. 이와 같은 자성 미립자의 예로는, 다이아비즈(주식회사 베리타스 제조), MACS 마이크로 비즈(밀테니 바이오테크 주식회사 제조), BioMag(테크노케미컬 주식회사 제조), 자성 마이크로스피어(폴리사이언스사 제조) 등을 들 수 있다.
- [0148] 세포 또는 조직을 배양할 때의 온도는, 동물 세포이면 통상 25℃~39℃, 바람직하게는 33℃~39℃이다. CO₂ 농도는, 통상, 배양의 분위기 중, 4(v/v)% (「(v/v)%」는 「체적/체적%」를 나타낸다, 이하 동일)~10(v/v)%이고, 4(v/v)%~6(v/v)%가 바람직하다. 배양 기간은 통상 3일간~35일간이지만, 배양의 목적에 맞춰 적절히 설정할 수 있다.
- [0149] 식물 세포의 배양 온도는, 통상 20℃~30℃이고, 광이 필요하면 조도 2,000룩스~8,000룩스의 조건하에서 배양하면 된다. 배양 기간은 통상 3일간~70일간이지만, 배양의 목적에 맞춰 적절히 설정할 수 있다.
- [0150] 본 발명의 배양 방법에 의해 배양된 세포 또는 조직은, 상기와 동일하게 원심분리 또는 필터를 사용한 여과에 의해 회수할 수 있다.
- [0151] 세포가 담체에 접촉된 상태인 경우에는, 그대로의 상태에서, 50G~1,000G, 바람직하게는 100G~500G로 원심분리하거나, 또는 10 μ m~100 μ m 정도의 세공을 갖는 필터를 사용하여 여과하여 회수할 수 있다. 또, 담체 중에 페라이트 등의 자성을 갖는 재료를 내포시켜 두면, 자력에 의해 배양한 담체를 회수할 수 있다.
- [0152] 이어서, 회수된 담체로부터, 각종 킬레이트제에 의한 처리, 열처리, 효소 처리 등에 의해, 배양된 세포를 박리하여 회수할 수 있다.
- [0153] 세포가 담체에 포매된 상태인 경우도, 그대로의 상태에서, 50G~1,000G, 바람직하게는 100G~500G로 원심분리하거나, 또는 10 μ m~100 μ m 정도의 세공을 갖는 필터를 사용하여 여과하여 회수할 수 있다. 그 때, 사용한 배지 조성물에 함유되는 액체 배지를 첨가한 후에, 원심분리나 여과를 실시해도 된다.
- [0154] 배양된 세포는, 각종 킬레이트제에 의한 처리, 열처리, 효소 처리 등에 의해 담체를 분해하여 분산시켜, 회수할 수 있다.
- [0155] 세포가 스피어를 형성하고 있는 경우, 본 발명의 방법에 의해 배양된 스피어는, 50G~1,000G, 바람직하게는 100G~500G로 원심분리하거나, 또는 10 μ m~100 μ m 정도의 세공을 갖는 필터를 사용하여 여과하여 회수할 수 있다. 그 때, 사용한 배지 조성물에 함유되는 액체 배지를 첨가한 후에, 원심분리나 여과를 실시해도 된다.
- [0156] 또, 목적으로 하는 세포에 특이적으로 결합하는 항체를 표면 상에 코팅한 자성 미립자, 예를 들어, 상기한 다이아비즈(주식회사 베리타스 제조), MACS 마이크로 비즈(밀테니 바이오테크 주식회사 제조), BioMag(테크노케미컬 주식회사 제조), 자성 마이크로스피어(폴리사이언스(Polysciences Inc) 사 제조) 등을 사용하여, 자력에 의해

배양한 스피어를 회수할 수 있다.

- [0157] 회수된 스피어는, 각종 킬레이트제에 의한 처리, 열처리, 효소 처리 등에 의해 분해됨으로써, 단일 세포로서 분산시킬 수 있다.
- [0158] 상기의 세포의 회수나 배지 조성물의 교환은, 기계적인 제어하 및 폐쇄 환경하에서 실행이 가능한 바이오리액터나, 자동 배양 장치를 사용하여 실시할 수도 있다.
- [0159] 본 발명의 배양 방법에 의해, 식물 유래의 세포 또는 조직을 정지 배양할 수 있다. 그 때, 분화되어 있지 않은 식물 세포 덩어리인 캘러스를 배양할 수 있다. 캘러스의 유도는, 사용하는 식물종에 대해 각각 공지된 방법에 의해 실시할 수 있고, 예를 들어, 분화된 식물체의 일부의 조직(예를 들어, 뿌리, 줄기, 잎의 절편, 종자, 생장점, 배, 화분 등) 표면을, 필요에 따라 70(v/v)% 알코올이나 1(w/v)% 차아염소산나트륨 수용액 등에 의해 멸균한 후, 필요에 따라 메스 등을 사용하여 적당한 크기의 조직편(예를 들어, 가로세로 약1mm~가로세로 약5mm의 뿌리 절편)을 잘라내고, 클린 벤치 등을 사용한 무균 조작에 의해, 당해 조직편을 미리 멸균한 캘러스 유도 배지에 과중하여 적당한 조건하에서 무균 배양한다. 여기서 유도된 캘러스는, 곧바로 대량 증식을 위해서 액체 배양에 부여되어도 되고, 혹은 계대용 배지에서 계대 배양함으로써 종주(種株)로서 유지할 수도 있다. 계대 배양은, 액체 배지 및 고형 배지 중 어느 것을 사용하여 실시해도 된다.
- [0160] 본 발명의 배지 조성물을 사용하여 정지 배양을 개시할 때에 접종되는 식물 세포 덩어리의 양은, 목적으로 하는 세포의 증식 속도, 배양 양식(회분 배양, 유가 배양, 연속 배양 등), 배양 기간 등에 따라 변동되지만, 예를 들어, 캘러스 등의 식물 세포 덩어리를 배양하는 경우, 본 발명의 배지 조성물에 대한 세포 덩어리의 습중량이 4(w/v)%~8(w/v)%, 바람직하게는 5(w/v)%~7(w/v)% 가 되도록 접종된다. 배양시의 식물 세포 덩어리의 입경은 1mm~40mm, 바람직하게는 3mm~20mm, 보다 바람직하게는 5mm~15mm이다. 여기서 「입경」이란, 예를 들어 식물 세포 덩어리가 구형인 경우에는 그 직경을 의미하고, 타원구형인 경우에는 그 장경을 의미하고, 그 밖의 형상에 있어서도, 동일하게 취할 수 있는 최대 길이를 의미한다.
- [0161] 본 발명의 배양 방법은, 동물 유래의 세포의 배양에 바람직하게 사용되고, 접촉성 세포의 배양에 의해 바람직하게 사용된다. 접촉성 세포는, 담체 표면에 접촉된 상태 혹은 담체 내부에 포매된 상태, 또는 스피어를 형성한 상태에서 배양하는 것이 더욱 바람직하고, 암세포, 간세포 및 암세포주의 배양에 특히 바람직하게 사용된다.
- [0162] 본 발명의 배양 방법에 의해, 진탕, 교반 등의 조작을 실시하지 않아도, 세포 또는 조직이 양호하게 분산된 상태에서 배양할 수 있다.
- [0163] 따라서, 본 발명에 의해, 목적으로 하는 세포 또는 조직을, 그 기능을 저해시키지 않고 정상적으로 유지한 상태에서 배양할 수 있다.
- [0164] 또, 본 발명의 배양 방법에 의해, 세포 또는 조직의 증식을 촉진시킬 수 있으므로, 세포 또는 조직을 효율적으로 배양할 수 있다.
- [0165] 또한 본 발명의 배양 방법에 있어서는, 배지 조성물 중의 한천의 농도를 조정함으로써, 세포 또는 조직을 부유한 상태 또는 침전시킨 상태에서 배양할 수 있고, 배양하는 세포 또는 조직의 종류, 배양의 목적 등에 따라, 배양 상태를 선택할 수 있다.
- [0166] 세포 또는 조직을 배지 조성물 중에서 부유시키기 위해서 필요한 한천의 농도로는, 배양하는 세포 또는 조직의 종류나 상태, 예를 들어 담체에 접촉되어 있는 상태 또는 스피어를 형성하고 있는 상태인지의 여부 등에 따라 상이하지만, 배지 조성물의 전체량에 대하여 0.07(w/v)% 이상인 것이 바람직하고, 0.1(w/v)% 이상인 것이 보다 바람직하다.
- [0167] 또한, 배지 조성물의 점도를 저점도로 할 수 있고, 우수한 세포 또는 조직의 증식 촉진 효과를 갖고, 또한 세포 또는 조직의 양호한 분산이 얻어지므로, 한천으로서, 상기한 저분자 한천을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0168] 본 발명은, 추가로, (a) 피험물질의 존재하 및 비존재하에, 상기한 본 발명의 배지 조성물 중에서 세포를 배양하는 공정, 및 (b) 세포의 생리학적 기능의 변화를 해석하는 공정을 포함하는 의약품 후보 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0169] 본 발명의 상기 스크리닝 방법은, 추가로 (c) 피험물질의 비존재하와 비교하여, 세포의 생리학적 기능을 억제 또는 증가하는 물질을 의약품 후보 물질로서 선택하는 공정을 포함할 수 있다.
- [0170] 본 발명의 배지 조성물 및 그 조성물을 사용한 본 발명의 배양 방법은, 암세포, 간세포 및 암세포주의 배양에

특히 바람직하게 사용할 수 있기 때문에, 본 발명의 상기 스크리닝 방법은, 이들 세포를 사용한 의약품 후보 물질의 스크리닝 방법에 특히 바람직하게 적용할 수 있고, 각종 암에 대한 항암제 후보 물질의 스크리닝 방법, 또는 간세포에 대한 의약품 후보 물질의 약효 또는 독성의 평가 방법으로서, 바람직하게 사용할 수 있다.

- [0171] 본 발명의 항암제 후보 물질의 스크리닝 방법은, (a) 피험물질의 존재하 및 비존재하에, 상기한 본 발명의 배지 조성물 중에서 암세포 또는 암세포주를 배양하는 공정, 및 (b) 암세포 또는 암세포주의 증식의 변화를 해석하는 공정을 포함한다. 또, 추가로, (c) 피험물질의 비존재하의 경우와 비교하여, 암세포 또는 암세포주의 증식을 억제하는 물질을 항암제 후보 물질로서 선택하는 공정을 포함할 수 있다.
- [0172] (a)의 공정에 있어서의 암세포 또는 암세포주의 배양은, 상기한 본 발명의 배양 방법에 따라 실시할 수 있다.
- [0173] (b)의 공정에 있어서의 암세포 또는 암세포주의 증식의 변화의 해석은, 암세포 등의 세포수의 측정, 세포에 대한 장해성의 평가 등에 의해 실시할 수 있다.
- [0174] 세포수의 측정은, 콜로니 형성법, 크리스탈 바이올렛법, 티미딘 흡수법, 트리판블루 염색법, 아데노신3인산(ATP) 측정법, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 염색법, WST-1(2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) 염색법, WST-8(2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) 염색법, 플로우 사이토메트리법, 세포수 자동 측정 장치를 사용한 방법, 세포 내의 형광 시그널을 검출, 수치화하는 세포 이미지 해석 등을 사용할 수 있다. 이들 중에서는, 세포 이미지 해석이 가장 바람직하게 사용된다.
- [0175] 세포에 대한 장해성을 평가하는 방법으로는, 락트산 탈수소 효소(LDH) 활성 측정법, CytoTox-ONE(등록상표)법 등을 사용할 수 있다. 혹은, 배양한 세포에 대해 특이적 항체를 사용하여 염색한 후, 세포 표면 분화 마커를 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay(ELISA)나 플로우 사이토메트리에 의해 검출하고, 항암제 후보 물질이, 암세포의 증식이나 아포토시스에 미치는 영향을 관찰할 수 있다. 또한, 항암제 후보 물질에 의해 발현이 변화한 유전자는, 배양한 세포로부터 DNA(디옥시리보핵산) 혹은 RNA(리보핵산)를 추출하고, 서던 블로팅법, 노던 블로팅법, RT-PCR법 등에 의해 검출할 수 있다.
- [0176] 본 발명의 간세포에 대한 의약품 후보 물질의 약효 또는 독성의 평가 방법에 있어서, (b)의 공정에 있어서의 간세포의 생리학적 기능의 변화로는, 간세포의 증식 또는 사멸, 시토크롬 P450 활성의 증가 또는 감소 등을 들 수 있다.
- [0177] 간세포수의 측정은, 상기한 암세포의 경우와 동일한 방법에 의해 실시할 수 있다. 또, 시토크롬 P450의 효소 활성은, 당해 효소에 의한 기질의 구조 변환 활성을 방사성 동위체법, 고속 액체 크로마토그래피법, 발광법, 발색법 등을 사용함으로써 검출하여, 측정할 수 있다.
- [0178] 상기 서술한 바와 같이, 본 발명의 배지 조성물 및 배양 방법을 사용하여 배양함으로써, 세포 또는 조직의 분산성이 향상된 상태의 배양물이 얻어지고, 세포가 담체 표면에 접촉된 상태 혹은 담체 내부에 포매된 상태, 또는 스피어를 형성하고 있는 상태이더라도, 그들의 상태에서 양호하게 분산된 배양물을 얻을 수 있다. 또한 배지 조성물 중의 한천의 농도를 조정함으로써, 세포 또는 조직이 배지 중에 부유한 상태 또는 배양 용기 저부에 침전된 상태로 배양할 수 있다.
- [0179] 본 발명의 상기 스크리닝 방법에 있어서, 암세포 또는 암세포주의 세포수의 측정, 세포에 대한 장해성 등의 평가 등에 의한 암세포 등의 증식의 변화의 해석이나, 간세포수의 측정, 시토크롬 P450 활성의 측정 등에 의한 간세포의 생리학적 기능의 변화의 평가를 실시하기 위해서는, 암세포 또는 암세포주, 간세포 등이 배양 조성물 중에 부유되지 않고 배양 용기 저면에 침전되어 있지만, 양호하게 분산된 상태의 배양물을 얻는 것이 바람직하다.
- [0180] 이러한 상태의 배양물을 얻기 위해서는, 본 발명의 배지 조성물 중에 있어서의 한천의 농도는, 배양하는 세포 또는 조직의 종류나 상태, 예를 들어 담체에 접촉되어 있는 상태 또는 스피어를 형성하고 있는 상태인지의 여부 등에 따라 상이하지만, 0.005(w/v)% 이상 0.07(w/v)% 미만인 것이 바람직하고, 0.03(w/v)% 이상 0.07(w/v)% 미만인 것이 보다 바람직하고, 0.03(w/v)%~0.05(w/v)%인 것이 더욱 바람직하다.
- [0181] 본 발명의 배지 중에 있어서의 한천의 농도가 0.03(w/v)% 이상인 경우, 세포 또는 조직의 분산성이 보다 향상되어, 세포 또는 조직이 균일하게 분산된 배양물을 얻을 수 있다. 세포 또는 조직이 배양 조성물 중에 부유되지 않고 배양 용기 저면에 침전되어 있지만, 균일하게 분산된 상태의 배양물은, 원심분리 등, 세포 또는 조직을 침강시키는 조작을 반복하여 실시하지 않고, 또 배양물을 희석시키지 않고, 그대로 세포 이미징 장치에 의해 해석할 수 있기 때문에, 본 발명의 배양 방법 및 배양물은, 세포 이미지 해석에 의한 의약품 후보 물질의 하이콘텐

트 스크리닝 또는 하이콘텐트 아날리시스에 바람직하게 사용할 수 있다.

- [0182] 또한, 세포 이미징 장치에 의해 해석하기 전에, 세포 또는 조직의 배양물을 원심분리 등에 의해 침강시키는 조작을 실시해도 되지만, 이러한 조작은 1회 정도이면 충분하다.
- [0183] 세포 이미징 장치의 예로는, 「OperaPhenix」(등록상표)(피킨 엘머사 제조), 「Operetta」(등록상표)(피킨 엘머사 제조), 「Cytel Cell Imaging System」(GE 헬스케어사 제조), 「IN Cell Analyzer 2000 혹은 6000」(GE 헬스케어사 제조), 「셀보이저(CellVoyager)(등록상표) CV7000(요코가와 전기 주식회사 제조), 「ArrayScan(등록상표) VTI HCS Reader」(서모 피셔 사이언티픽사 제조), 「ArrayScan(등록상표) XTI HCA Reader」(서모 피셔 사이언티픽사 제조), 「CellInsight(등록상표)」(서모 피셔 사이언티픽사 제조), 「ImageXpress Micro」(몰레큘러 디바이스사 제조) 등을 들 수 있다. 그러나, 세포 이미징 장치는, 이들에 한정되지 않고, 형광 또는 명시야 화상 데이터를 이용하여, 측정 대상으로 하는 세포를 개별 또한 복수의 파라미터에 대해 시간 경과적으로 또한 상세하게 조사할 수 있으면 된다.
- [0184] 세포 또는 조직이 배양 조성물 중에 부유되지 않고 배양 용기 저부에 침전되어 있지만, 균일하게 분산된 상태의 배양물을 얻기 위해서는, 배지 조성물 중에 있어서의 한천의 농도는, 배양하는 세포 또는 조직의 종류나 상태, 예를 들어 담체에 접촉되어 있는 상태 또는 스피어를 형성하고 있는 상태인지의 여부 등에 따라 상이하지만, 0.03(w/v)% 이상 0.07(w/v)% 미만인 것이 바람직하고, 0.03(w/v)%~0.05(w/v)%인 것이 보다 바람직하고, 0.03(w/v)%인 것이 특히 바람직하다.
- [0185] 따라서, 세포 이미지 해석에 의한 의약품 후보 물질의 스크리닝을 목적으로 하여 세포 또는 조직의 배양을 실시하는 경우, 본 발명의 배지 조성물에 있어서의 한천의 농도를 0.03(w/v)% 이상 0.07(w/v)% 미만으로 하는 것이 바람직하고, 0.03(w/v)%~0.05(w/v)%로 하는 것이 보다 바람직하고, 0.03(w/v)%로 하는 것이 특히 바람직하다.
- [0186] 또한, 본 발명에 있어서는, 한천으로서 상기한 저분자 한천을 사용하는 것이, 세포 또는 조직의 보다 균일한 분산과, 보다 양호한 증식 촉진이 얻어지기 때문에 바람직하다.
- [0187] 실시예
- [0188] 이하에 본 발명의 배지 조성물의 분석예, 제조예, 시험예를 실시예로서 구체적으로 서술함으로써, 본 발명을 더욱 상세하게 설명하지만, 본 발명은 이들에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0189] 이하의 실시예에 있어서, CO₂ 인큐베이터에 있어서의 CO₂의 농도(%)는, 분위기 중의 CO₂의 (v/v)%로 나타냈다. 또, 「PBS」는 인산 완충 생리 식염수(시그마 알드리치 재팬사 제조)를 의미하고, 「FBS」는 소 태아 혈청(바이오로지컬 인더스트리즈사 제조)을 의미한다.
- [0190] [분석예 1] 한천을 함유하는 배지 조성물에서의 폴리스티렌 비즈의 부유 시험
- [0191] 저분자 한천 함유 배지 조성물, 일반용 한천 함유 배지 조성물의 조제
- [0192] 저분자 한천(「울트라 한천 이나」, 이나 식품 공업 주식회사 제조)을 2.0(w/v)%가 되도록 순수에 현탁시킨 후, 90℃에서 가열 교반하여 용해시켰다. 본 수용액을 교반하고, 또한 121℃에서 20분 오토클레이브 멸균하여 완전히 용해시켰다. 실온까지 방랭한 후, 겔화된 저분자 한천 수용액을 전자 레인지로 가열하여 재용해시켰다. 본 수용액 150 μ l를 15ml 원심관(애즈윈 주식회사 제조)에 넣고, 37℃로 가온한 DMEM(둘베코 개변 이글 배지)(와코순약 공업 주식회사 제조) 9.85ml를 첨가하고, 신속하게 교반함으로써, 저분자 한천의 중농도가 0.03(w/v)%인 배지 조성물을 조제하였다. 동일하게, 저분자 한천의 중농도가 0.07(w/v)%, 0.10(w/v)%가 되도록, 상기 저분자 한천 수용액을 첨가하여, 배지 조성물을 조제하였다. 일반용 한천(「S-6」, 이나 식품 공업 주식회사 제조)을 함유하는 배지 조성물에 대해서도 동일하게 조제하였다.
- [0193] 상기 저분자 한천 및 일반용 한천의 물성은 이하와 같다.
- [0194] (1) 중량 평균 분자량 및 분자량 분포(Mw/Mn)
- [0195] HPLC에 의한 겔 침투 크로마토그래피-시차 굴절계법에 의해, 0.15(w/v)% 수용액을 시료로서 측정된 저분자 한천의 중량 평균 분자량 및 분자량 분포는, 43,000 및 4.9이다.
- [0196] 한편, 일반용 한천의 중량 평균 분자량은 약 290,000이다.
- [0197] (2) 1.5(w/v)% 겔의 강도

[0198] 일한수식 측정 장치를 사용하여, JIS K 8263:1994의 규정에 따라 20℃에서 측정된 1.5(w/v)% 겔의 겔 강도는, 저분자 한천에 대해 10g/cm², 일반용 한천에 대해 630g/cm² 초과이다.

[0199] (3) 1.5(w/v)% 겔 압출 하중

[0200] 텍스처 애널라이저(에이코 정기 주식회사 제조)로, 상기에 기재한 방법으로 측정(20℃, 플런저의 직경=49mm, 진입 속도=20mm/분)한 1.5(w/v)% 겔 압출 하중은, 저분자 한천에 대해 170g, 일반용 한천에 대해 2,000g 이상이다.

[0201] 저분자 한천 함유 배지 조성물 및 일반용 한천 함유 배지 조성물에 있어서의 폴리스티렌 비즈의 부유 시험

[0202] 상기에서 조제한 각 배지 조성물 10ml에, 폴리스티렌 비즈(폴리사이언스사 제조, 비즈 직경=200 μ m~300 μ m, 600 μ m)를 현탁하고, 37℃에서 24시간 인큐베이트한 후, 폴리스티렌 비즈의 분산 상태를 육안으로 관찰하였다. 그 결과를 표 1 및 표 2에 나타냈다.

[0203] 또, 상기와 동일하게 하여, 저분자 한천 및 일반용 한천의 각각을 0.01(w/v)%, 0.015(w/v)%, 0.05(w/v)%의 농도로 함유하는 배지 조성물을 조제하고, 이들 배지 조성물을 포함하여, 폴리스티렌 비즈를 분산시켰을 경우의 폴리스티렌 비즈의 상태를 도 1 및 도 2에 나타냈다.

표 1

저분자 한천 농도 (w/v)%	배지의 상태	폴리스티렌 비즈의 상태
0.03	액상	침전
0.07	액상	균일하게 부유
0.10	액상	균일하게 부유

[0204]

표 2

일반용 한천 농도 (w/v)%	배지의 상태	폴리스티렌 비즈의 상태
0.03	액상	침전
0.07	액상	부유하지만 불균일
0.10	액상	부유하지만 불균일

[0205]

[0206] 표 1, 2 및 도 1, 2에 나타내는 바와 같이, 저분자 한천, 일반용 한천 모두 0.07(w/v)% 이상의 농도로 함유하는 배지 조성물에 있어서, 폴리스티렌 비즈가 부유하는 것이 분명해졌다.

[0207] 그러나, 일반용 한천을 함유하는 배지 조성물에서는, 폴리스티렌 비즈의 분산은 불균일했지만, 저분자 한천을 함유하는 배지 조성물에서는 균일한 분산이 관찰되었다.

[0208] [분석예 2] 한천을 함유하는 배지 조성물의 점도 측정 및 세포 부유 시험

[0209] 저분자 한천 함유 배지 조성물의 조제 및 점도 측정

[0210] 분석예 1과 동일한 방법을 사용하여, 0.03(w/v)%, 0.05(w/v)% 및 0.10(w/v)%의 저분자 한천을 DMEM(와코순약 공업 주식회사 제조) 중에 함유하는 배지 조성물을 조제하고, 점도 측정을 실시하였다. 본 배지 조성물의 점도는, 37℃ 조건하에서 E형 점도계(토키 산업 주식회사 제조, Viscometer TVE-22L, 표준 로터 1° 34'×R24)를 사용하여, 회전수 100rpm으로 5분간 측정하였다.

[0211] 그 결과를 표 3에 나타냈다.

[0212] 저분자 한천 함유 배지 조성물에 있어서의 세포 부유 시험

[0213] 인간 간장암 세포주 HepG2(DS 파마 바이오메디칼 주식회사 제조)를, 10(v/v)% FBS를 함유하는 DMEM(와코순약 공업 주식회사 제조)에 50,000개/ml가 되도록 현탁하고, 본 현탁액 10ml를 EZ SPHERE(아사히 글라스 주식회

사 제조)에 과중한 후, CO₂ 인큐베이터(5% CO₂) 내에서 2일간 배양하였다. 여기서 얻어진 스피어(직경 100 μ m~200 μ m)의 현탁액 10ml를 원심분리(200G, 3분간)하여 스피어를 침강시키고, 상청을 제거함으로써 스피어 현탁액 1.0ml를 조제하였다. 계속해서, 상기에서 조제한 저분자 한천 함유 배지 조성물을 15ml 원심관(애즈윈 주식회사 제조)에 10ml씩 넣고, 또한 HepG2 세포 현탁액 50 μ l를 첨가하였다. 태핑에 의해 세포 덩어리를 분산시키고, 37 $^{\circ}$ C에서 인큐베이트하고, 7일 후의 세포의 분산 상태를 육안으로 관찰하였다. 그 결과를 표 3에 아울러 나타냈다. 또 관찰시의 세포의 상태를 도 3에 나타냈다.

표 3

저분자 한천 농도 (w/v)%	점도 (mPa·s)	HepG2 세포 의 상태
0	1.126	침전
0.03	1.308	침전
0.07	1.624	침전
0.10	2.002	부유

[0214]

[0215] 표 3 및 도 3에 나타내는 결과로부터, 0.1(w/v)% 가 되도록 저분자 한천을 배지 조성물에 첨가함으로써, HepG2 세포의 스피어를 부유시키는 것이 가능하고, 그 때의 배지 조성물의 점도는 2.002mPa·s라는 낮은 값인 것을 알 수 있었다.

[0216] [분석예 3] 한천을 함유하는 배지 조성물에 있어서의 폴리스티렌 비즈의 부유 시험

[0217] 저분자 한천 함유 배지 조성물의 조제

[0218] 저분자 한천(「울트라 한천 이나」, 이나 식품 공업 주식회사 제조)을 0.2(w/v)% 가 되도록 순수에 현탁시킨 후, 90 $^{\circ}$ C에서 가열 교반하여 용해시켰다. 본 수용액을 교반하고, 또한 121 $^{\circ}$ C에서 20분 오토클레이브 멸균하여 완전히 용해시켰다. DMEM 분체 배지(시그마 알드리치사 제조)를 사용하여 2배 농축 DMEM을 조제하였다. 2배 농축 DMEM은 0.22 μ m 필터(코닝사 제조)에 통과시켜 여과 멸균을 실시하였다. 오토클레이브 멸균 후의 용해된 상태의 0.2(w/v)%의 저분자 한천 수용액과, 37 $^{\circ}$ C로 가온한 상기의 2배 농축 DMEM 배지를 등량씩 혼합하여 현탁하여, 0.1(w/v)%의 저분자 한천을 함유하는 DMEM을 조제하였다.

[0219] 저분자 한천 함유 배지 조성물에 있어서의 폴리스티렌 비즈의 부유 시험

[0220] 상기 배지 조성물 10ml에 폴리스티렌 비즈(폴리사이언스사 제조, 비즈 직경 200 μ m~300 μ m, 600 μ m)를 현탁하고, 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 인큐베이트 후, 폴리스티렌 비즈의 분산 상태를 육안으로 관찰하였다. 그 결과를 표 4에 나타냈다. 또, 관찰시의 폴리스티렌 비즈의 상태를 도 4에 나타냈다.

표 4

저분자 한천 농도 (w/v)%	배지의 상태	폴리스티렌 비즈 의 상태
0.1	액상	균일하게 부유

[0221]

[0222] 표 4 및 도 4에 나타내는 바와 같이, 상기의 조제법에 의해 0.1(w/v)%의 저분자 한천을 함유하는 배지 조성물을 조제해도, 폴리스티렌 비즈가 균일하게 부유하는 것이 분명해졌다.

[0223] [제조예 1] 저분자 한천을 함유하는 배지 조성물의 제조

[0224] 저분자 한천(「울트라 한천 이나」, 이나 식품 공업 주식회사 제조)을 0.06(w/v)%가 되도록 순수에 현탁시킨 후, 90 $^{\circ}$ C에서 가열 교반하여 용해시켰다. 본 수용액을 교반하여 수용액 온도가 42 $^{\circ}$ C가 될 때까지 방랭한 후, 0.22 μ m 직경의 필터(코닝사 제조)에 의해 여과 멸균을 실시하였다. 또 분석예 3의 방법과 동일하게 하여, 2배 농축 DMEM을 조제하였다. 여과 멸균 직후의 0.06(w/v)% 저분자 한천 수용액에 대해, 37 $^{\circ}$ C로 가온한 등량의 2배 농축 DMEM을 첨가함으로써, 0.03(w/v)%의 저분자 한천을 함유하는 배지 조성물을 조제하였다.

- [0225] [시험예]
- [0226] 다음으로, 본 발명의 배지 조성물의 세포 배양에 있어서의 유용성에 대해, 이하의 시험예에 있어서 구체적으로 설명하지만, 본 발명은 이들에만 한정되는 것은 아니다.
- [0227] [시험예 1] A549 세포를 분산시켰을 때의 세포 증식 시험
- [0228] 분석예 1의 배지 조성물의 조제 방법과 동일한 방법을 사용하여, 10(v/v)% FBS와, 0.005(w/v)%, 0.03(w/v)%, 0.07(w/v)%, 0.10(w/v)%의 저분자 한천 또는 일반용 한천을 DMEM(와코우 순약 공업 주식회사 제조) 중에 함유하는 배지 조성물을 조제하였다.
- [0229] 이어서, 인간 폐포 기저 상피선암 세포주 A549(DS 파마 바이오메디칼 주식회사 제조)를, 20,000개/ml가 되도록 상기의 저분자 한천 또는 일반용 한천을 함유하는 각 배지 조성물에 파종한 후, 96웰 평저(平底) 초저접착 표면 마이크로 플레이트(코닝사 제조, #3474)의 웰에, 1웰당 100 μ l가 되도록 분주(分注)하였다. 또한, 음성 대조로서, 저분자 한천, 일반용 한천 모두 함유하지 않는 10(v/v)% FBS 함유 DMEM에 A549 세포를 현탁한 것을 분주하였다.
- [0230] 계속해서, 각 마이크로 플레이트를 CO₂ 인큐베이터(37℃, 5% CO₂) 내에서 7일간 정치 상태로 배양하였다. 2일, 5일, 7일간 배양 후의 각 세포 배양액에 대해, CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay(프로메가 주식회사 제조)를 100 μ l 첨가하고 10분간 실온에서 정치시키고, 마이크로 플레이트 리더(「FlexStation3」, 몰레쿨러 디바이스사 제조)로, 프로메가 주식회사의 추천 프로토콜에 따라 발광량(Relative Light Unit;RLU)을 측정하고, 각각 배지 조성물만인 경우의 발광량을 뺀으로써 생세포의 수를 측정하였다.
- [0231] 저분자 한천 또는 일반용 한천을 함유하는 각 배지 조성물에서, 7일간 배양한 후의 A549 세포의 스피어의 현미경 관찰(사용 기기: 「도립형 리서치 현미경 IX73」(올림푸스 주식회사 제조), 배율:40배)의 결과를 도 5에 나타냈다. 또, 7일간 배양 후의 A549 세포의 웰 내에서의 상태 및 분산성에 대해 표 5에 나타냈다. 또한 저분자 한천 또는 일반용 한천을 함유하는 각 배지 조성물에서, 2일, 5일 및 7일간 정치 배양 후의 발광량(A549 세포의 세포수에 상당한다)으로부터, 음성 대조의 발광량을 1로 했을 때의 상대적 세포수를 구하고, 표 6에 나타냈다.

표 5

시 료	A549 세포의 상태	A549 세포의 분산성
음성 대조	침전	불균일
저분자 한천0.005(w/v)%	침전	불균일
저분자 한천0.03(w/v)%	침전	균일
저분자 한천0.07(w/v)%	부유	균일
저분자 한천0.1(w/v)%	부유	균일
일반용 한천 0.005(w/v)%	침전	불균일 또한 응집 있음
일반용 한천 0.03(w/v)%	침전	균일
일반용 한천 0.07(w/v)%	부유	균일
일반용 한천 0.1(w/v)%	부유	균일

[0232]

표 6

시 료	세포수		
	2일	5일	7일
저분자 한천0.005(w/v)%	1.267	2.277	2.525
저분자 한천0.03(w/v)%	1.176	2.263	2.534
저분자 한천0.07(w/v)%	1.209	2.529	2.863
저분자 한천0.1(w/v)%	1.172	2.470	2.924
일반용 한천0.005(w/v)%	1.037	1.921	1.876
일반용 한천0.03(w/v)%	0.861	1.815	1.772
일반용 한천0.07(w/v)%	1.044	2.192	2.239
일반용 한천0.1(w/v)%	0.872	1.894	2.022

[0233]

[0234]

도 5로부터, 음성 대조에서는, A549 세포의 스피어는 배지 중에 분산되지 않고, 웰의 벽면 부근에서 큰 응집 덩어리를 형성하는 것이 관찰되었다. 이에 대해, 저분자 한천 또는 일반용 한천을 함유하는 배지 조성물에서는, A549 세포는 하나의 세포로부터 스피어를 형성하고, 일반용 한천 농도가 0.005(w/v)%인 배지 조성물에서 응집이 관찰된 것 외에는, 스피어끼리의 회합이 일어나지 않고, 과잉인 크기의 응집 덩어리를 형성하지 않고 증식되는 것이 관찰되었다.

[0235]

또, 표 5로부터, 0.03(w/v)% 이상의 저분자 한천 또는 일반용 한천을 함유하는 배지 조성물에 있어서, A549 세포의 스피어의 분산성은 보다 향상되어, 균일하게 분산된 상태로 배양되는 것이 나타났다. 0.005(w/v)% 또는 0.03(w/v)%의 저분자 한천 또는 일반용 한천을 함유하는 배지 조성물에서는, A549 세포의 스피어는, 웰 저부에 침전된 상태로 증식되는 것이 관찰되었다. 저분자 한천 또는 일반용 한천의 농도가 0.03(w/v)%인 배지 조성물에서는, 배지 중에 부유하지 않고 균일하게 분산된 상태에서의 배양이 가능하였다.

[0236]

또한, 도 5 및 표 5에 나타내는 바와 같이, 일반용 한천을 함유하는 배지 조성물에 비해, 저분자 한천을 함유하는 배지 조성물에 있어서, A549 세포의 스피어는, 보다 양호하게 분산된 상태로 배양되는 것이 관찰되었다.

[0237]

또한 표 6으로부터, 음성 대조인 일반용 한천, 저분자 한천 모두 무점가의 배지에 비해, 일반용 한천 및 저분자 한천을 함유하는 배지 조성물에서는, 세포 증식의 촉진이 관찰되었다. 이 때, 저분자 한천을 함유하는 배지 조성물에서는, 동 농도의 일반용 한천을 함유하는 배지 조성물을 사용한 경우에 비해, 세포 증식을 보다 촉진시키는 것이 관찰되었다.

[0238]

[시험예 2] HepG2 세포를 분산시켰을 때의 세포 증식 시험

[0239]

분석예 1의 배지 조성물의 조제 방법과 동일한 방법을 사용하여, 10(v/v)% FBS와, 0.03(w/v)%의 저분자 한천을 DMEM(와코순약공업 주식회사 제조) 중에 함유하는 배지 조성물을 조제하였다.

[0240]

이어서, 인간 간장암 세포주 HepG2(DS 과마 바이오메디칼 주식회사 제조)를, 20,000개/ml가 되도록 상기의 저분자 한천을 함유하는 배지 조성물에 파종한 후, 96웰 평저 초저접착 표면 마이크로 플레이트(코닝사 제조, # 3474)의 웰에, 1웰당 100 μ l가 되도록 분주하였다. 또한, 음성 대조로서, 10(v/v)% FBS를 함유하는 DMEM에 HepG2 세포를 현탁한 것을 분주하였다.

[0241]

계속해서, 본 플레이트를 CO₂ 인큐베이터(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂) 내에서 7일간 정지 상태로 배양하였다. 2일, 5일, 7일간 배양 후의 세포 배양액에 대해, CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay(프로메가 주식회사 제조)를 100 μ l 첨가하고 10분간 실온에서 정치시키고, 마이크로 플레이트 리더(「SPECTRA MAX 190」, 몰레큘러 디바이스사 제조)로, 프로메가 주식회사의 추천 프로토콜에 따라 발광량을 측정하고, 배지만인 경우의 발광량을 뺀으로써 생세포의 수를 측정하였다.

[0242]

7일간 배양 후의 HepG2 세포의 스피어를 현미경 관찰(사용 기기:도립형 리서치 현미경 IX73(올림푸스사 제조), 배율:40배)한 결과를 도 6에 나타냈다. 또, 7일간 배양 후의 HepG2 세포의 웰 내에 있어서의 상태 및 분산성을 표 7에 나타냈다. 또한 2일, 5일 및 7일간 정지 배양한 후의 발광량(HepG2 세포의 세포수에 상당한다)으로부터, 음성 대조에 있어서의 발광량을 1로 했을 경우의 상대적 세포수를 구하고, 표 8에 나타냈다.

표 7

시 료	HepG2 세포의 상태	HepG2 세포의 분산성
음성 대조	침전	불균일
저분자 한천0.03(w/v)%	침전	균일

[0243]

표 8

시 료	세포수		
	2일	5일	7일
저분자 한천0.03(w/v)%	0.984	1.316	2.044

[0244]

[0245] 도 6에 나타내는 바와 같이, 저분자 한천을 함유하는 본 발명의 배지 조성물에서는, HepG2 세포는 하나의 세포로부터 스피어를 형성하고, 그 스피어끼리의 회합이 일어나지 않기 때문에, 스피어가 과잉으로 크게 응집되지 않고, 스피어가 균일하게 분산된 상태로 배양되었다. 한편, 음성 대조에서는, 웰의 벽면 부근에 있어서, HepG2 세포의 스피어의 응집이 관찰되었다.

[0246] 또, 표 7에 나타내는 바와 같이, 저분자 한천을 함유하는 본 발명의 배지 조성물에서는, HepG2 세포의 스피어는 웰 저면에 침전되지만, 균일하게 분산된 상태로 배양되었다. 또한, 표 8로부터, 음성 대조인 저분자 한천 무첨가의 배지에 비해, 저분자 한천을 함유하는 본 발명의 배지 조성물에서는, HepG2 세포의 증식의 축진이 관찰되었다.

[0247] [시험예 3] 메틸셀룰로오스 또는 탈아실화 젤란검 함유 배지 조성물과의 세포 증식 비교 시험

[0248] 저분자 한천 함유 배지 조성물 및 탈아실화 젤란검 함유 배지 조성물의 조제

[0249] 분석예 1의 배지 조성물의 조제 방법과 동일한 방법을 사용하여, 10(v/v)% FBS와, 0.005(w/v)%, 0.03(w/v)%, 0.05(w/v)%, 0.10(w/v)%의 저분자 한천을 DMEM(와코우 순약 공업 주식회사 제조) 중에 함유하는 배지 조성물을 조제하였다. 또, 저분자 한천 수용액과 동일하게 0.3(w/v)%의 탈아실화 젤란검(KELCOGEL CG-LA, 산쇼 주식회사 제조)을 함유하는 수용액을 조제하고, 본 수용액을 사용하여, 10(v/v)% FBS와 0.015(w/v)%의 탈아실화 젤란검을 DMEM(와코우 순약 공업 주식회사 제조) 중에 함유하는 배지 조성물을 조제하였다.

[0250] 메틸셀룰로오스 함유 배지 조성물의 조제

[0251] 메틸셀룰로오스(M0387, 시그마 알드리치사 제조)를 2.6(w/v)%가 되도록 순수에 현탁시킨 후, 121°C에서 20분 오토클레이브 멸균하였다. 실온까지 방랭한 후, 4°C에서 하룻밤 정치시키고, 메틸셀룰로오스를 균일화시켰다. 2.6(w/v)% 메틸셀룰로오스 수용액에 20(v/v)% FBS를 함유하는 2배 농도의 DMEM(와코우 순약 공업 주식회사 제조)을 등량 첨가하고, 1.3(w/v)%의 메틸셀룰로오스를 함유하는 배지 조성물을 조제하였다. 본 배지를 10(v/v)% FBS를 함유하는 DMEM으로 희석시키고, 0.1(w/v)%, 0.3(w/v)%, 0.6(w/v)%의 메틸셀룰로오스를 함유하는 배지 조성물을 조제하였다.

[0252] A549 세포를 분산시켰을 때의 세포 증식 시험

[0253] 인간 폐포 기저 상피선암 세포주 A549(DS 파마 바이오메디칼 주식회사 제조)를, 20,000개/ml가 되도록, 상기의 각 배지 조성물에 과중한 후, 96웰 평저 초저접착 표면 마이크로 플레이트(코닝사 제조, #3474)의 웰에, 1웰당 100µl가 되도록 분주하였다. 또한, 음성 대조로서, 10(v/v)% FBS를 함유하는 DMEM에 A549 세포를 현탁한 것을 분주하였다.

[0254] 계속해서, 본 플레이트를 CO₂ 인큐베이터(37°C, 5% CO₂) 내에서 7일간 정치 상태로 배양하였다. 2일, 5일 및 7일간 배양 후의 세포 배양액에 대해, CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay(프로메가 주식회사 제조)를 100µl 첨가하고 10분간 실온에서 정치시키고, 마이크로 플레이트 리더(「FlexStation3」, 몰레쿨러 디바이스사 제조)로, 프로메가 주식회사의 추천 프로토콜에 따라 발광량을 측정하고, 각각 배지만인 경우의 발광량

을 뺀으로써 생세포의 수를 측정하였다.

[0255] 7일간 배양 후의 A549 세포의 스피어의 현미경 관찰(사용 기기:도립형 리서치 현미경 IX73(올림푸스 주식회사 제조), 배율:40배) 결과를 도 7에 나타냈다. 또, 7일간 배양 후의 A549 세포의 웰 내에서의 상태 및 분산성에 대해 표 9에 나타냈다. 또한 2일, 5일 및 7일간 정치 배양한 후의 발광량(A549 세포의 세포수에 상당한다)으로부터, 음성 대조에 있어서의 발광량을 1로 했을 때의 상대적 세포수를 구하고, 표 10에 나타냈다.

표 9

시 료	A549 세포의 상태	A549 세포의 분산성
음성 대조	침전	불균일
저분자 한천0.03(w/v)%	침전	균일
저분자 한천0.05(w/v)%	부유	균일
탈아실화 젤란검0.015(w/v)%	부유	균일
메틸셀룰로오스0.1(w/v)%	침전	불균일
메틸셀룰로오스0.3(w/v)%	침전	불균일
메틸셀룰로오스0.6(w/v)%	침전	불균일

[0256]

표 10

시 료	세포수		
	2일	5일	7일
저분자 한천0.03(w/v)%	1.079	1.886	2.286
저분자 한천0.05(w/v)%	1.071	1.888	2.237
탈아실화 젤란검0.015(w/v)%	0.987	1.814	2.381
메틸셀룰로오스0.1(w/v)%	0.941	0.793	0.743
메틸셀룰로오스0.3(w/v)%	0.971	0.828	0.784
메틸셀룰로오스0.6(w/v)%	1.043	1.005	1.011

[0257]

[0258] 도 7 및 표 9, 10에 나타내는 바와 같이, 저분자 한천을 함유하는 본 발명의 배지 조성물, 및 탈아실화 젤란검을 함유하는 배지 조성물에서는, A549 세포의 스피어는 균일하게 분산된 상태에서 양호하게 증식되었지만, 메틸셀룰로오스를 함유하는 배지 조성물에서는, A549 세포의 스피어의 분산은 불균일하여, 응집이 관찰되고, 증식 촉진 효과도 관찰되지 않았다.

[0259]

[시험예 4] SKOV3 세포를 분산시켰을 때의 세포 증식 시험

[0260]

분석예 1의 배지 조성물의 조제 방법과 동일한 방법을 사용하여, 10(v/v)% FBS와, 0.03(w/v)%의 저분자 한천을 DMEM(와코순약 공업 주식회사 제조) 중에 함유하는 배지 조성물을 조제하였다.

[0261]

인간 난소암 세포주 SKOV3(DS 파마 바이오메디칼 주식회사 제조)를 37,000개/ml가 되도록, 상기의 저분자 한천을 함유하는 배지 조성물에 현탁한 후, 96웰 평면 초저접착 표면 마이크로 플레이트(코닝사 제조, #3474)의 웰에, 1웰당 135 μ l가 되도록 분주하였다. 본 플레이트를 CO₂ 인큐베이터(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂) 내에서 정치시키고, 다음 날 증식 인자를 첨가하였다. 또, 저분자 한천을 함유하지 않는 10(v/v)% FBS 함유 DMEM에서도 동일한 조작을 실시하였다. 증식 인자로서, 인간 hepatin 결합성 상피 세포 증식 인자(hHB-EGF)(페프로텍사 제조)를 30ng/ml 및 100ng/ml, 인간 상피 세포 증식 인자(hEGF)(페프로텍사 제조) 및 인간 트랜스포밍 증식 인자 α (hTGF α)(페프로텍사 제조)를 1ng/ml, 3ng/ml 및 10ng/ml의 농도가 되도록, 각각 1웰당 15 μ l 첨가하였다.

[0262]

계속해서, 본 플레이트를 CO₂ 인큐베이터(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂) 내에서 10일간 정치 상태에서 배양하였다. 또한, 음성 대조로서, 증식 인자와 등량의 DMEM을 첨가하였다. 10일간 배양 후의 세포 배양액에 대해, CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay(프로메가 주식회사 제조)를 100 μ l 첨가하고 10분간 실온에서 정치시키고,

마이크로 플레이트 리더(「FlexStation3」, 몰레큘러 디바이스사 제조)로 프로메가 주식회사의 추천 프로토콜에 따라 발광량을 측정하고, 배지 조성물만인 발광량을 뺀으로써 생세포의 수를 측정하였다.

[0263] 증식 인자의 첨가 후 10일간 배양한 후의 발광량(SKOV3 세포의 세포수에 상당한다)으로부터, 음성 대조에서의 발광량을 1로 했을 때의 상대적 세포수를 구하고, 표 11에 나타냈다.

표 11

세포 증식 인자	저분자 한천 농도((w/v)%)	
	0	0.03
hHB-EGF30ng/mL	1.358	1.774
hHB-EGF100ng/mL	1.451	1.748
hEGF1ng/mL	1.380	1.413
hEGF3ng/mL	1.392	1.745
hEGF10ng/mL	1.678	1.984
hTGF α 1ng/mL	1.448	1.371
hTGF α 3ng/mL	1.445	1.916
hTGF α 10ng/mL	1.512	2.167

[0264]

[0265] 표 11에 나타내는 바와 같이, 저분자 한천을 함유하지 않는 배지 조성물과 비교하여, 저분자 한천을 0.03(w/v)% 함유하는 본 발명의 배지 조성물에서는, 증식 인자의 농도 의존적인 SKOV3 세포의 증식 촉진이 관찰되었다.

[0266] [시험예 5] 저분자 한천을 함유하는 배지 조성물을 사용한 항암제의 하이콘텐트 아날리시스

[0267] 분석예 1의 배지 조성물의 조제 방법과 동일한 방법을 사용하여, 10(v/v)% FBS와, 0.03(w/v)%의 저분자 한천을 DMEM(와코우 순약 공업 주식회사 제조) 중에 함유하는 배지 조성물을 조제하고, 또한 파클리탁셀(Paclitaxel)(와코우 순약 공업 주식회사 제조)을, 중농도가 0.001 μM, 0.01 μM 및 0.1 μM가 되도록 첨가하였다. 계속해서, 인간 폐포 기저 상피선암 세포주 A549(DS 파마 바이오메디칼 주식회사 제조)를, 5,000개/ml가 되도록 상기 저분자 한천을 함유하는 배지 조성물에 현탁한 후, 96웰 평저 초저접착 표면 마이크로 플레이트(코닝사 제조, #3474)의 웰에, 1웰당 100 μl가 되도록 분주하였다. 계속해서, 본 플레이트를 CO₂ 인큐베이터(37℃, 5% CO₂) 내에서 10일간 정치 상태로 배양하였다.

[0268] 이어서, 200mg/ml의 호크스트(Hoechst) 33342(인비트로젠사 제조)의 DMEM(페놀 레드, L-글루타민 불함유)(와코우 순약 공업 주식회사 제조) 용액을 조제하고, 10일간 정치 배양한 상기 배양물에, 1웰당 10 μl 첨가하고, CO₂ 인큐베이터(37℃, 5% CO₂) 내에서 45분간 정치시켰다. 계속해서, 20 μg/ml의 프로피디움아이오다이드(Propidium Iodide)(바이오몰사 제조)의 DMEM(페놀 레드, L-글루타민 불함유)(와코우 순약 공업 주식회사 제조) 용액을 조제하고, 1웰당 10 μl 첨가하였다. 본 플레이트를 1,500rpm으로 10분간 원심분리하고, 세포 이미징 장치(「ArrayScan VTI HCS Reader」, 서모 피셔 사이언티픽 주식회사 제조)를 사용하여, 세포 이미지 해석에 의한 하이콘텐트 아날리시스를 실시하였다. 그 때, 4배의 대물 렌즈를 사용하여, 1웰당 10시야에서 관찰을 실시하고, 호크스트 33342 형광 이미지로부터 세포의 외형과 세포핵, 프로피디움아이오다이드 형광 이미지로부터 사세포의 검출을 실시하였다. 또 항암제를 최고 농도로 첨가했을 때의 구성 세포수를 스피어의 형성 저해율 100%로 하여, 하이콘텐트 아날리시스에 의한 파클리탁셀의 50% 저해 농도(nM)를 산출하였다.

[0269] 음성 대조로서, 10(v/v)% FBS만을 DMEM(와코우 순약 공업 주식회사 제조) 중에 함유하는 배지 조성물을 조제하였다. 또 비교 대조로서, 시험예 3과 동일하게, 10(v/v)% FBS와 0.015(w/v)%의 탈아실화 젤란검을 DMEM(와코우 순약 공업 주식회사 제조) 중에 함유하는 배지 조성물을 조제하였다. 음성 대조와 비교 대조의 배지 조성물에 대해서도 상기 농도로 파클리탁셀을 첨가하고, A549 세포를 현탁하여 분주하였다. 계속해서, 본 플레이트를 CO₂ 인큐베이터(37℃, 5% CO₂) 내에서 10일간 정치 상태로 배양하였다.

[0270] 음성 대조 및 비교 대조의 각 세포 배양액에 대해, CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay(프로메가 주식회사 제조)를 100 μl 첨가하고 10분간 실온에서 정치시키고, 마이크로 플레이트 리더(「FlexStation3」, 몰레큘러 디바이스사 제조)로 프로메가 주식회사의 추천 프로토콜에 따라 발광량을 측정하고, 배지만인 경우의 발

광량을 뺀으로써 생세포의 수를 측정하였다. 또 파클리탁셀 비침가의 경우의 생세포수를 저해율 0% 로 하여, 발광량에 의한 파클리탁셀의 50% 저해 농도(nM)를 산출하였다.

[0271]

저분자 한천을 함유하는 본 발명의 배지 조성물, 음성 대조 및 비교 대조(탈아실화 젤란검을 함유하는 배지 조성물)로 10일간 배양한 A549 세포의 세포 이미징 장치에 의한 관찰 이미지(1시야당 면적:1mm²)를 도 8에 나타냈다. 또, 세포 이미지 해석으로부터 얻어진 A549 세포 스피어의 구성 세포수(스피어당 평균 세포수), 스피어수(10mm²당 평균 스피어수), 스피어의 투영 면적(크기)(μm^2)을 표 12에 나타냈다. 또한, 음성 대조와 비교 대조에 대해서는, 세포 내 ATP를 지표로 한 생존 세포수 측정 결과로부터, 항암제 비침가의 경우의 발광량을 1로 했을 때의 상대적 세포수를 구하고, 표 13에 나타냈다. 또한 세포 내 ATP에 기초하는 발광량과, 하이콘텐트 아날리시스 각각으로부터 산출한 파클리탁셀의 50% 저해 농도(nM)를 표 14에 나타냈다.

표 12

파클리탁셀 첨가 농도 (μM)	스피어당 평균 세포수	10mm ² 당 평균 스피어수	투영 면적 (μm^2)
0	5.04	32.66	1156
0.001	5.353	39.33	1161
0.01	1.52	18	578
0.1	1.165	6.333	402

[0272]

표 13

파클리탁셀 첨가 농도 (μM)	상대적 세포수	
	음성 대조	비교 대조
0.001	1.004	0.842
0.01	0.249	0.156

[0273]

표 14

해석법/시료	형광에 의한 세포 생존성 어세이		세포 이미지 해석에 의한 하이콘텐트 아날리시스
	음성 대조	비교 대조	0.03(w/v)% 저분자 한천
파클리탁셀 50% 저해 농도 (nM)	4.4	2.9	1.9

[0274]

[0275]

도 8 및 표 12, 14로부터, 본 발명의 배지 조성물을 사용한 하이콘텐트 아날리시스에 의해, 세포로 형성된 스피어의 구성 세포수, 스피어수, 스피어의 투영 면적(크기)을 측정할 수 있는 것이 확인되었다. 또한 본 발명의 배지 조성물을 사용한 하이콘텐트 아날리시스에 의해, 항암제를 효율적으로 평가할 수 있는 것이 확인되었다. 즉, 저분자 한천을 0.03(w/v)% 함유하는 본 발명의 배지 조성물로 배양했을 경우, 세포가 부유하지 않고 균일하게 분산된 상태로 배양되기 때문에, 한 번의 원심분리 조작을 실시함으로써, 세포 배양물을 회석시키지 않아도 세포 이미지 해석이 가능하여, 항암제의 효과를 신속하고 또한 정확하게 평가할 수 있었다.

[0276]

한편, 음성 대조에서는, 웰의 벽면 부근에서 세포가 과잉으로 응집되어 있기 때문에, 세포 이미징 장치의 해석 가능한 영역 내에 세포가 들어가지 않았다. 또 탈아실화 젤란검을 0.015(w/v)% 함유하는 비교 대조의 배지 조성물로 배양한 경우에는, 탈아실화 젤란검의 세포 부유능에 의해, 한 번의 원심분리 조작에서는 세포가 웰 저면에 낙하하지 않았기 때문에 초점이 맞지 않아, 세포 이미지 해석을 할 수 없었다.

- [0277] [시험예 6] 아가로오스 함유 배지와의 세포 증식 비교 시험
- [0278] 저분자 한천(「울트라 한천 이나」, 이나 식품 공업 주식회사 제조)을 2.0(w/v)%가 되도록 초순수(Milli-Q수)에 현탁한 후, 90℃에서 가열하여 교반하여 용해시키고, 본 수용액을 121℃에서 20분간 오토클레이브 멸균하였다. 본 수용액을 사용하여, 10(v/v)% FBS와, 중농도 0.03(w/v)%의 저분자 한천을 DMEM(와코우 순약 공업 주식회사 제조) 중에 함유하는 배지 조성물을 조제하였다. 동일하게, 아가로오스(「Agarose S」, 주식회사 닛폰 진 제조)를 0.03(w/v)%, 저융점 아가로오스(「Agarose, Low Gelling Temperture」, 시그마 알드리치사 제조)를 0.1(w/v)%, 즉용성 한천(「맥스」, 이나 식품 공업 주식회사 제조)을 0.07(w/v)% 함유하는 배지 조성물을 조제하였다.
- [0279] 본 시험예에서 사용한 아가로오스, 저융점 아가로오스 및 즉용성 한천의 물성은, 이하와 같다.
- [0280] (1) 중량 평균 분자량
- [0281] 아가로오스: 약 220,000
- [0282] (2) 겔 강도
- [0283] (i) 아가로오스: 1.5(w/v)% 겔로 1,200g/cm² 이상
- [0284] (ii) 저융점 아가로오스: 1.0(w/v)% 겔로 200g/cm² 이상
- [0285] (iii) 즉용성 한천: 1.5(w/v)% 겔로 450±50g/cm²
- [0286] (3) 융점
- [0287] (i) 아가로오스: 1.5(w/v)% 수용액의 경우, 88℃~90℃
- [0288] (ii) 저융점 아가로오스: 65℃ 이하
- [0289] 인간 폐포 기저 상피선암 세포주 A549(DS 파마 바이오메디칼 주식회사 제조)를, 20,000개/ml가 되도록, 상기 각 배지 조성물에 파종한 후, 96웰 평저 초저접착 표면 마이크로 플레이트(코닝사 제조, #3474)의 웰에, 1웰당 100μl가 되도록 분주하였다. 또한, 음성 대조로서, 10(v/v)% FBS를 함유하는 DMEM에 A549 세포를 현탁한 것을 분주하였다. 계속해서, 본 플레이트를 CO₂ 인큐베이터(37℃, 5% CO₂) 내에서 7일간 정치 상태로 배양하였다. 2일, 5일, 7일간 배양 후의 세포 배양액에 대해, CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay(프로메가 주식회사 제조)를 100μl 첨가하고 10분간 실온에서 정치시키고, 마이크로 플레이트 리더(「FlexStation3」, 몰레쿨러 디바이스사 제조)로, 프로메가 주식회사의 추천 프로토콜에 따라 발광량을 측정하고, 각각 배지만인 경우의 발광량을 뺀으로써 생세포의 수를 측정하였다.
- [0290] 7일간 배양 후의 A549 세포의 스피어의 현미경 관찰(사용 기기: 독립형 리서치 현미경 IX73(올림푸스 주식회사 제조), 배율: 40배) 결과를 도 9에 나타냈다. 또, 2일, 5일 및 7일간 정치 배양한 후의 발광량(A549 세포의 세포수에 상당한다)으로부터, 음성 대조에 있어서의 발광량을 1로 했을 때의 상대적 세포수를 구하고, 표 15에 나타냈다.

표 15

배양 일수(일)		2	5	7
세포수	저분자 한천 0.03(w/v)%	1.172	3.214	3.831
	아가로오스 0.03(w/v)%	0.866	2.06	3.162
	저융점 아가로오스 0.1(w/v)%	0.954	2.429	3.179
	즉용성 한천 0.07(w/v)%	1.041	2.741	3.547

- [0291]
- [0292] 도 9에 나타내는 바와 같이, 상기 저분자 혹은 즉용성 한천, 또는 상기 각 아가로오스를 함유하는 배지 조성물

을 사용함으로써, A549 세포는 양호하게 분산된 상태로 증식되는 것이 관찰되었다. 또, 표 15에 나타내는 바와 같이, 어느 배지 조성물을 사용한 경우에도, 음성 대조와 비교하여 양호한 증식 촉진 효과가 관찰되었지만, 저분자 한천을 함유하는 배지 조성물에 있어서, 가장 양호한 증식 촉진을 볼 수 있었다.

[0293] [시험예 7] 각종 다당류의 혼합제를 사용한 스피어의 세포 증식 시험

[0294] 시험예 3과 동일한 방법을 사용하여, 0.015(w/v)%의 저분자 한천(「울트라 한천 이나」, 이나 식품 공업 주식회사 제조)과 0.05(w/v)%의 크산탄검(「KELTROL CG」, 산쇼 주식회사 제조), 0.03(w/v)%의 상기 저분자 한천과 0.05(w/v)%의 κ-카리기난(「GENUGEL WR-80-J」, 산쇼 주식회사 제조), 및 0.03(w/v)%의 상기 저분자 한천과 0.005(w/v)%의 탈아실화 젤란검(「KELCOGEL CG-LA」, 산쇼 주식회사 제조)을, 각각 10(v/v)% FBS를 첨가한 DMEM 중에 함유하는 배지 조성물을 조제하였다.

[0295] 인간 폐포 기저 상피선암 세포주 A549(DS 파마 바이오메디칼 주식회사 제조)를, 20,000개/ml가 되도록, 상기의 각 배지 조성물에 파종한 후, 96웰 평저 초저접착 표면 마이크로 플레이트(코닝사 제조, #3474)의 웰에, 1웰당 100μl가 되도록 분주하였다. 또한, 음성 대조로서, 10(v/v)% FBS를 첨가한 DMEM에 A549 세포를 현탁한 것을 분주하였다.

[0296] 계속해서, 본 플레이트를 CO₂ 인큐베이터(37℃, 5% CO₂) 내에서 7일간 정치 상태로 배양하였다. 2일, 5일, 7일간 배양 후의 세포 배양액에 대해, CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay(프로메가 주식회사 제조)를 100μl 첨가하고 10분간 실온에서 정치시키고, 마이크로 플레이트 리더(「FlexStation3」, 몰레큘러 디바이스사 제조)로, 프로메가 주식회사의 추천 프로토콜에 따라 발광량을 측정하고, 각각 배지만인 경우의 발광량을 뺀으로써 생세포의 수를 측정하였다.

[0297] 7일간 배양 후의 A549 세포의 스피어의 현미경 관찰(사용 기기:도립형 리서치 현미경 IX73(올림푸스 주식회사 제조), 배율:40배) 결과를 도 10에 나타냈다. 또, 2일, 5일 및 7일간 정치 배양한 후의 발광량(A549 세포의 세포수에 상당한다)으로부터, 음성 대조에 있어서의 발광량을 1로 했을 때의 상대적 세포수를 구하고, 표 16에 나타냈다.

표 16

	저분자 한천 농도[(w/v)%]	다당류 농도 [(w/v)%]	배양 일수(일)		
			2	5	7
세포 수	0.015	크산탄검 0.05	1.281	3.854	4.954
	0.03	κ-카라기난 0.05	1.095	2.522	3.87
	0.03	탈아실화 젤란검 0.005	1.173	3.048	3.555

[0298]

[0299] 도 10에 나타내는 바와 같이, 저분자 한천과 각종 다당류를 함유하는 배지 조성물 중에서, A549 세포는 양호하게 분산되어 증식되는 것이 나타났다.

[0300] 또, 표 16에 나타내는 바와 같이, 저분자 한천과 각종 다당류를 함유하는 배지 조성물을 사용하여 배양함으로써, 양호한 세포 증식 촉진 효과가 관찰되었다.

[0301] [시험예 8] 저분자 한천 함유 배지를 사용한 하이콘텐트 아날리시스

[0302] 시험예 1의 배지 조성물의 조제 방법과 동일한 방법을 사용하여 10(v/v)% FBS와, 0.03(w/v)%의 저분자 한천(「울트라 한천 이나」, 이나 식품 공업 주식회사 제조)을 DMEM(와코순약 공업 주식회사 제조) 중에 함유하는 배지 조성물을 조제하였다.

[0303] 인간 폐포 기저 상피선암 세포주 A549(DS 파마 바이오메디칼 주식회사 제조)를 11,000개/ml가 되도록, 상기 저분자 한천을 함유하는 배지 조성물에 현탁하였다. 96웰 평저 초저접착 표면 마이크로 플레이트(코닝사 제조, #3474)의 웰에, 상기 세포 현탁액을 1웰당 90μl가 되도록 분주하고, 본 플레이트를 CO₂ 인큐베이터(37℃, 5%

CO₂) 내에서 하룻밤 정치시켰다. 다음날, 추가로 파클리탁셀(와코우 순약 공업 주식회사 제조) 및 트라메티닙(산타크루즈사 제조)을, 각각 농도가 0.001 μM, 0.01 μM 및 0.1 μM, 마이토마이신 C(와코우 순약 공업 주식회사 제조)를 농도가 0.005 μM, 0.05 μM 및 0.5 μM, MK2206(산타크루즈사 제조)을 농도가 0.001 μM, 0.01 μM, 0.1 μM 및 1 μM가 되도록, 1웰당 10 μl씩 첨가하였다. 계속해서, 본 플레이트를 CO₂ 인큐베이터(37°C, 5% CO₂) 내에서 추가로 7일간 정치 상태에서 배양하였다.

[0304] 음성 대조로서, 10(v/v)% FBS만을 DMEM(와코우 순약 공업 주식회사 제조) 중에 함유하는 배지 조성물을 조제하였다. 또, 비교 대상으로서, 시험에 3과 동일하게, 10(v/v)% FBS와 0.015(w/v)%의 탈아실화 헐란검을 DMEM(와코우 순약 공업 주식회사 제조) 중에 함유하는 배지 조성물을 조제하였다. 음성 대조 및 비교 대조의 각 배지 조성물에 대해서도, 각각에 A549 세포를 현탁하고, 음성 대조에 대해서는 96웰 평저 접착 표면 마이크로 플레이트(코닝사 제조, #3585)에 분주하고, 비교 대조에 대해서는 96웰 평저 초저접착 표면 마이크로 플레이트(코닝사 제조, #3474)에 분주하였다. 다음날, 상기한 농도로 각 항암제를 첨가하고, 계속해서, 본 플레이트를 CO₂ 인큐베이터(37°C, 5% CO₂) 내에서 추가로 7일간 정치 상태로 배양하였다.

[0305] 이어서, 200mg/ml의 호크스트(Hoechst) 33342(인비트로젠사 제조)의 DMEM(페놀 레드, L-글루타민 불함유)(와코우 순약 공업 주식회사 제조) 용액을 조제하고, 8일간 정치 배양한 상기 저분자 한천 함유 배지에서의 배양물에, 1웰당 10 μl 첨가하고, CO₂ 인큐베이터(37°C, 5% CO₂) 내에서 45분간 정치시켰다. 계속해서, 20 μg/ml의 프로피디움아이오다이드 (Propidium Iodide)(바이오몰사 제조)의 DMEM(페놀 레드, L-글루타민 불함유)(와코우 순약 공업 주식회사 제조) 용액을 조제하고, 1웰당 10 μl 첨가하고 배양액을 현탁하였다. 본 플레이트를 1,500rpm으로 1분간 원심분리하고, 세포 이미징 장치(「ArrayScan VTI HCS Reader」, 서모 피셔 사이언티픽 주식회사 제조)를 사용하여, 세포 이미지 해석에 의한 하이콘텐트 아날리시스를 실시하였다. 그 때, 10배의 대물렌즈를 사용하여, 1웰당 20시야에서 관찰을 실시하고, 호크스트 33342 형광 이미지로부터 세포의 외형과 세포핵, 프로피디움아이오다이드 형광 이미지로부터 사세포의 검출을 실시하였다. 또 구성 세포수가 5이상인 스피어수로부터 하이콘텐트 아날리시스에 의한 각 항암제의 50% 저해 농도(nM)를 산출하였다. 그 때, 항암제 비첨가의 경우의 값을 스피어의 형성 저해율 0% 로 하였다.

[0306] 또, 저분자 한천 함유 배양액 그리고 음성 대조 및 비교 대조의 각 세포 배양액에 대해, CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay(프로메가 주식회사 제조)를 100 μl 첨가하고 10분간 실온에서 정치시키고, 마이크로 플레이트 리더(「FlexStation3」, 몰레큘러 디바이스사 제조)로 프로메가 주식회사의 추천 프로토콜에 따라 발광량을 측정하고, 배지만인 경우의 발광량을 뺀으로써 생세포의 수를 측정하였다. 또 항암제 비첨가의 경우의 생세포수를 저해율 0% 로 하여, 발광량에 의한 항암제의 50% 저해 농도(nM)를 산출하였다.

[0307] 세포 이미지 해석으로부터 얻어진 A549 세포 스피어의 구성 세포수(스피어당 평균 세포수), 스피어수(20mm²당 평균 스피어수), 스피어의 투영 면적(크기), 스피어 내의 평균 사세포수를 표 17~20에 나타냈다. 또한 세포 내 ATP를 지표로 한 생존 세포수 측정 결과로부터, 항암제 비첨가의 경우의 발광량을 100으로 했을 때의 상대적 세포수를 구하고, 표 21~24에 나타냈다. 또, 세포 내 ATP에 기초하는 발광량과, 하이콘텐트 아날리시스 각각으로부터 산출한 각 항암제의 50% 저해 농도(nM)는 표 25에 나타냈다.

표 17

파클리탁셀 첨가 농도(μM)	스피어당 평균 세포수	20mm ² 당 평균 스피어수	투영 면적 (μm ²)	스피어 내의 평균 사세포수
0	4.464	343.3	1208	0.029
0.001	4.817	297.7	1271	0.064
0.01	2.3	187	797	0.336
0.1	1.662	133	647	0.591

[0308]

표 18

트라메티닙 첨가 농도 (μM)	스피어당 평균 세포수	20mm ² 당 평균 스피어수	투영 면적 (μm^2)	스피어 내의 평균 사세포수
0	4.476	244.9	1248	0.038
0.001	4.272	218.7	1200	0.073
0.01	2.906	173.9	976.6	0.09
0.1	1.867	132.8	618.3	0.178

[0309]

표 19

마이토마이신C 첨가 농도 (μM)	스피어당 평균 세포수	20mm ² 당 평균 스피어수	투영 면적 (μm^2)	스피어 내의 평균 사세포수
0	4.962	321.1	1398	0.077
0.005	3.72	265.2	1139	0.151
0.05	2.187	190.6	810.7	0.33
0.5	1.447	113.3	460.8	0.606

[0310]

표 20

MK2206 첨가 농도 (μM)	스피어당 평균 세포수	20mm ² 당 평균 스피어수	투영 면적 (μm^2)	스피어 내의 평균 사세포수
0	4.917	223.2	1376	0.086
0.001	5.044	230.6	1361	0.104
0.01	4.774	213.7	1343	0.074
0.1	4.323	206.1	1199	0.076
1	3.423	142.3	931.2	0.332

[0311]

표 21

파클리탁셀 첨가 농도 (μM)	저분자 한천 함유 배지	음성 대조	비교 대조
0.001	102.4	100.1	99.9
0.01	27	18.8	23.5
0.1	12.1	5.5	10.8

[0312]

표 22

트라메티닙 첨가 농도 (μM)	저분자 한천 함유 배지	음성 대조	비교 대조
0.001	92.2	101.2	93.3
0.01	45.8	99	52.5
0.1	18.2	37.4	18.1

[0313]

표 23

마이토마이신 첨가 농도 (μM)	저분자 한천 함유 배지	음성 대조	비교 대조
0.005	59.5	94	62.8
0.05	27.8	55.9	29.5
0.5	8.1	12.3	8.6

[0314]

표 24

MK2206 첨가 농도 (μM)	저분자 한천 함유 배지	음성 대조	비교 대조
0.001	100.1	100.2	95.8
0.01	93.9	101.3	89.1
0.1	66.5	97.6	61.8
1	25.7	95.7	25.2

[0315]

표 25

해석법/시료		발광에 의한 세포 생존성 어세이			세포 이미지 해석에 의한 하이콘텐트 아날리시스
		저분자 한천 함유 배지	음성 대조	비교 대조	저분자 한천 함유 배지
50% 저해 농도 (nM)	파클리탁셀	4.9	4.1	4.5	4.1
	트라메티닙	8.1	62.5	11.5	5.1
	마이토마이신C	10	71.4	12.1	6.4
	MK2206	250	1000	210	210

[0316]

[0317] 표 17~25로부터, 저분자 한천을 함유하는 본 발명의 배지 조성물을 사용한 하이콘텐트 아날리시스에 의해, 세포로 형성된 스피어의 구성 세포수, 스피어수, 스피어의 투영 면적(크기), 스피어 내의 사세포수를 측정할 수 있는 것이 확인되었다.

[0318] 또한 저분자 한천을 함유하는 본 발명의 배지 조성물을 사용한 하이콘텐트 아날리시스에 의해, 항암제를 효율적으로 평가할 수 있는 것이 확인되었다. 즉, 저분자 한천을 0.03(w/v)% 함유하는 본 발명의 배지 조성물에서 배양했을 경우, 세포가 부유하지 않고 균일하게 분산된 상태에서 배양되기 때문에, 한 번의 원심분리 조작을 실시함으로써, 세포 배양물을 회석시키지 않아도 세포 이미지 해석이 가능하며, 항암제의 효과를 신속하고 또한 정확하게 평가할 수 있었다.

[0319] 한편, 음성 대조에서는, 웰의 벽면 부근에서 세포가 과잉으로 응집되어 있기 때문에, 세포 이미징 장치의 해석 가능한 영역 내에 세포가 들어가지 않았다. 또 탈아실화 젤란검을 0.015(w/v)% 함유하는 비교 대조의 배지 조성물에서 배양한 경우에는, 탈아실화 젤란검의 세포 부유능에 의해, 한 번의 원심분리 조작에서는 세포가 웰 저면에 낙하하지 않았기 때문에 초점이 맞지 않아, 세포 이미지 해석을 할 수 없었다.

[0320] [시험예 9] 저분자 한천 함유 배지를 사용한 간독성 물질의 평가

[0321] 시험예 1의 배지 조성물의 조제 방법과 동일한 방법을 사용하여, 10(v/v)% FBS와, 0.03(w/v)%의 저분자 한천(「울트라 한천 이나」, 이나 식품 공업 주식회사 제조)을 DMEM(와코순약 공업 주식회사 제조) 중에 함유하는 배지 조성물을 조제하였다. 인간 간장암 세포주 HepG2(DS 파마 바이오메디칼 주식회사 제조)를 11,000개/ml가 되도록, 상기 저분자 한천을 함유하는 배지 조성물에 현탁하였다. 96웰 평저 초저접착 표면 마이크로 플레이

트(코닝사 제조, #3474)의 웰에, 상기 세포 현탁액을 1웰당 90 μ l가 되도록 분주하고, 본 플레이트를 CO₂ 인큐베이터(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂) 내에서 3일간 배양하였다. 배양 3일째에, 플루타미드(시그마 알드리치사 제조)를 1웰당 10 μ l씩 첨가하였다. 계속해서, 본 플레이트를 CO₂ 인큐베이터(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂) 내에서 추가로 2일간 정지 상태에서 배양하였다. 비교 대조로서, 10(v/v)% FBS를 함유하는 DMEM에 HepG2 세포를 현탁하고, 96웰 평저 접착 표면 마이크로 플레이트(코닝사 제조, #3585)에 분주하고, 동일한 조작을 실시하였다.

[0322] 이어서, 200mg/ml의 호크스트(Hoechst) 33342(인비트로젠사 제조)의 DMEM(페놀 레드, L-글루타민 불함유)(와코우 순약 공업 주식회사 제조) 용액을 조제하고, 상기 저분자 한천 함유 배지 및 비교 대조를 사용하여 5일간 정지 배양한 각 배양물에, 1웰당 10 μ l 첨가하고, CO₂ 인큐베이터(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂) 내에서 45분간 정지시켰다. 계속해서, 20 μ g/ml의 프로피디움아이오다이드 (Propidium Iodide)(바이오몰사 제조)의 DMEM(페놀 레드, L-글루타민 불함유)(와코우 순약 공업 주식회사 제조) 용액을 조제하고, 1웰당 10 μ l 첨가하고 배양액을 현탁하였다. 본 플레이트를 1,500rpm으로 1분간 원심하고, 세포 이미징 장치(「ArrayScan VTI HCS Reader」, 서모 피셔 사이언티픽 주식회사 제조)를 사용하여, 세포 이미지 해석에 의한 하이콘텐트 아날리시스를 실시하였다. 그 때, 10배의 대물 렌즈를 사용하여, 1웰당 20시야에서 관찰을 실시하고, 호크스트 33342 형광 이미지로부터 세포의 외형과 세포핵, 프로피디움아이오다이드 형광 이미지로부터 사세포의 검출을 실시하였다. 또 플루타미드 비첨가의 경우의 값을 스피어의 형성 저해율 0%로 하고, 스피어의 구성 세포수의 값으로부터, 하이콘텐트 아날리시스에 의한 플루타미드의 50% 저해 농도(μ M)를 산출하였다.

[0323] 또, 저분자 한천 함유 배양액 및 비교 대조에 의한 각 세포 배양액에 대해, CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay(프로메가 주식회사 제조)를 100 μ l 첨가하고 10분간 실온에서 정지시키고, 마이크로 플레이트 리더(「FlexStation3」, 몰레큘러 디바이스사 제조)로 프로메가 주식회사의 추천 프로토콜에 따라 발광량을 측정하고, 배지만인 경우의 발광량을 뺀으로써 생세포의 수를 측정하였다. 또 플루타미드 비첨가의 경우의 생세포 수를 저해율 0%로 하고, 발광량에 의한 플루타미드의 50% 저해 농도(μ M))를 산출하였다.

[0324] 세포 이미지 해석으로부터 얻어진 HepG2 세포 스피어의 구성 세포수, 스피어수, 스피어의 투영 면적(크기), 스피어 내의 사세포수를 표 26에 나타냈다. 또한 세포 내 ATP를 지표로 한 발광에 의한 생존 세포수 측정 결과로부터, 플루타미드 비첨가의 경우의 발광량을 100으로 했을 때의 상대적 세포수를 구하고, 표 27에 나타냈다. 또, 세포 내 ATP에 기초하는 발광량과, 하이콘텐트 아날리시스로부터 얻어진 구성 세포수의 각각으로부터 산출한 플루타미드의 50% 저해 농도(μ M)는 표 28에 나타냈다.

표 26

플루타미드 첨가 농도 (μ M)	스피어당 평균 세포수	20mm ² 당 평균 스피어수	투영 면적 (μ m ²)	스피어 내의 평균 사세포수
0	9.637	230.3	2326	0.043
0.8	7.977	190.7	1988	0.06
4	8.89	145.3	2180	0.037
20	9.263	129.7	2403	0.067
100	3.76	153.7	861	0.007
500	1.567	7.3	408	1.163

[0325]

표 27

플루타미드 첨가 농도 (μ M)	저분자 한천 함유 배지	비교 대조
0.8	109.6	100.2
4	98.7	109.6
20	89.8	93.5
100	22.4	22.5
500	8.1	15.4

[0326]

표 28

해석법/시료		발광에 의한 세포 생존성 어세이		세포 이미지 해석에 의한 하이콘텐트 아날리시스
		저분자 한천 함유 배지	비교 대조	저분자 한천 함유 배지
50% 저해 농도 (μM)	플루타미드	53.6	51.7	73.4

[0327]

[0328] 표 26~28에 나타내는 결과로부터, 저분자 한천을 함유하는 본 발명의 배지 조성물을 사용하여 세포 배양을 실시함으로써, 세포 이미지 해석에 의한 하이콘텐트 아날리시스를 사용하여 플루타미드의 간독성을 평가할 수 있는 것이 확인되었다.

[0329] [시험예 10] 필터 여과한 배지 조성물을 사용한 세포 분산성 시험

[0330] 저분자 한천 함유 배지 조성물의 조제

[0331] 저분자 한천(「울트라 한천 이나」, 이나 식품 공업 주식회사 제조)을 1.0(w/v)%가 되도록 초순수(Milli-Q수)에 현탁시킨 후, 90°C에서 가열 교반하여 용해시켰다. 본 수용액을 교반하고, 또한 121°C에서 20분간 오토클레이브 멸균하여 완전히 용해시켰다. 실온까지 방랭한 후, 멸균된 저분자 한천 수용액을 전자 레인지로 가열하여 재용해시켰다. 본 수용액 150 μl 를 15ml 원심관(애즈윈 주식회사 제조)에 넣고, 37°C로 가온한 DMEM(와코우 순약 공업 주식회사 제조) 9.85ml를 첨가하고, 신속하게 교반함으로써, 저분자 한천의 중농도가 0.03(w/v)%인 배지 조성물을 조제하였다. 본 배지 조성물을, 표 29에 나타내는 4조건하에 두고, 구멍 직경 70 μm , 40 μm 의 필터(BD 팔콘사 제조), 30 μm , 20 μm 의 필터(애즈윈 주식회사 제조), 10 μm 의 필터(Partec 사 제조), 5 μm , 1.2 μm , 0.45 μm , 0.2 μm 의 필터(사토리우스·스테덤·재팬사 제조)를 사용하여 각각 여과하였다. 그 때, 여과액은 최저 2ml가 되도록 하였다.

표 29

조건	저분자 한천 첨가 후의 보존 조건	FBS첨가의 유무	여과시의 배지 조성물의 온도
①	실온에서 1시간	없음	실온
②	실온에서 1시간	있음	실온
③	4°C에서 24시간	없음	4°C
④	4°C에서 24시간	없음	37°C

[0332]

[0333] 상기의 여과액에 대해, FBS 무첨가의 여과액에 대해서는 중농도가 10(v/v)%가 되도록 FBS를 첨가하고, 인간 폐포 기저 상피선암 세포주 A549(DS 파마 바이오메디칼 주식회사 제조)를, 10,000개/ml가 되도록 파종한 후, 96 웰 평저 초저접착 표면 마이크로 플레이트(코닝사 제조, #3474)의 웰에, 1웰당 100 μl 가 되도록 분주하였다. 또한, 음성 대조로서, 저분자 한천을 함유하지 않는 전술 배지, 양성 대조로서 저분자 한천을 함유하고, 필터 여과되어 있지 않은 전술 배지에, 각각 A549 세포를 현탁한 것을 분주하였다. 계속해서, 본 플레이트를 CO₂ 인큐베이터(37°C, 5% CO₂) 내에서 7일간 정지 상태로 배양하였다. 7일 후의 세포의 분산 상태를 육안으로 관찰하였다. 분산 상태를, 「0;양호하게 분산되어 있다」, 「△;일부에 응집이 관찰된다」, 「×;현저하게 응집이 관찰된다」로서 평가하고, 결과를 표 30에 나타냈다.

표 30

필터의 구멍 직경 (μm)	저분자 한천 첨가의 유무	저분자 한천 첨가 후의 배지의 보전 조건			
		①	②	③	④
음성 대조	-	x	x	x	x
양성 대조	+	○	○	○	○
0.2		○	○	x	x
0.45		○	○	x	x
1.2		○	○	△	△
5		○	○	○	○
10		○	○	○	○
20		○	○	○	○
30		○	○	○	○
40		○	○	○	○
70		○	○	○	○

[0334]

[0335]

표 30에 나타내는 바와 같이, 저분자 한천을 첨가 후 실온에서 1시간 보존하고, 구멍 직경 0.2 μm 이상의 필터로 여과한 배지 조성물에 있어서는, A549 세포 스피어가 양호하게 분산된 상태로 유지되었다. 한편, 저분자 한천을 첨가한 후, 배지 조성물을 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보존하고, 4 $^{\circ}\text{C}$ 와 37 $^{\circ}\text{C}$ 의 각 조건에서 각각 필터 여과한 배지 조성물에 있어서는, 필터의 구멍 직경이 5 μm 이상이면, A549 세포 스피어는 양호하게 분산된 상태로 유지되지만, 필터의 구멍 직경이 1.2 μm 인 경우, A549 세포 스피어의 일부 응집이 관찰되고, 필터의 구멍 직경이 0.45 μm 이하인 경우에는, A549 세포 스피어는 응집되는 것을 확인하였다.

[0336]

이상의 결과로부터, 본 배지 조성물 중에 함유되는 저분자 한천의 응집 구조체의 크기는, 0.45 μm 내지 5 μm 정도 인 것이 시사되었다.

[0337]

[시험예 11] 스피어 형성 어세이(Sphere formation assay)

[0338]

시험예 1의 배지 조성물의 조제 방법과 동일한 방법을 사용하여, 10(v/v)% FBS와, 0.03(w/v)%의 저분자 한천 (「울트라 한천 이나」, 이나 식품 공업 주식회사 제조)을 DMEM(와코우 순약 공업 주식회사 제조) 중에 함유하는 배지 조성물을 조제하였다. 인간 자궁 경부암 세포주 HeLa(DS 과마 바이오메디칼 주식회사 제조)를 5,000개/ mL 가 되도록, 상기 저분자 한천을 함유하는 배지 조성물에 현탁하였다. 96웰 평저 초저접착 표면 마이크로 플레이트(코닝사 제조, #3474)의 웰에, 상기 세포 현탁액을 1웰당 100 μl 가 되도록 분주하고, 본 플레이트를 CO₂ 인큐베이터(37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂) 내에서 최장 21일간 배양하였다. 음성 대조로서, 저분자 한천을 함유하지 않는 전술 배지에 HeLa 세포를 현탁한 것을 분주하였다. 배양 21일째의 HeLa 세포의 상태를 현미경 관찰(사용 기기:도립형 리서치 현미경 IX73(올림푸스 주식회사 제조), 배율:40배) 한 결과를 도 11에 나타낸다.

[0339]

도 11에 나타내는 바와 같이, 저분자 한천을 함유하지 않는 배지로 배양한 음성 대조에서는, 과중한 HeLa 세포가 웰의 가장자리에 모여들어, 과응집되어 있는 모습이 관찰되어, 각 세포의 스피어 형성능을 평가할 수 없었다. 한편, 0.03(w/v)%의 저분자 한천을 함유하는 배지에서 배양한 경우에는, HeLa 세포의 과응집이 억제되어 있었다. 또 도 11 중, 실선 화살표로 나타내는 바와 같이, 단단하게 구상으로 응집된 스피어뿐만 아니라, 점선 화살표로 나타내는 바와 같이, 무르게 응집된 스피어의 형성도 관찰되었다.

[0340]

이상으로부터, 본 발명의 배지 조성물로 세포를 배양함으로써, 각 세포의 증식성이나 줄기 세포성을 평가하는 스피어 형성 어세이가 가능하다는 것이 확인되었다.

[0341]

산업상 이용가능성

[0342]

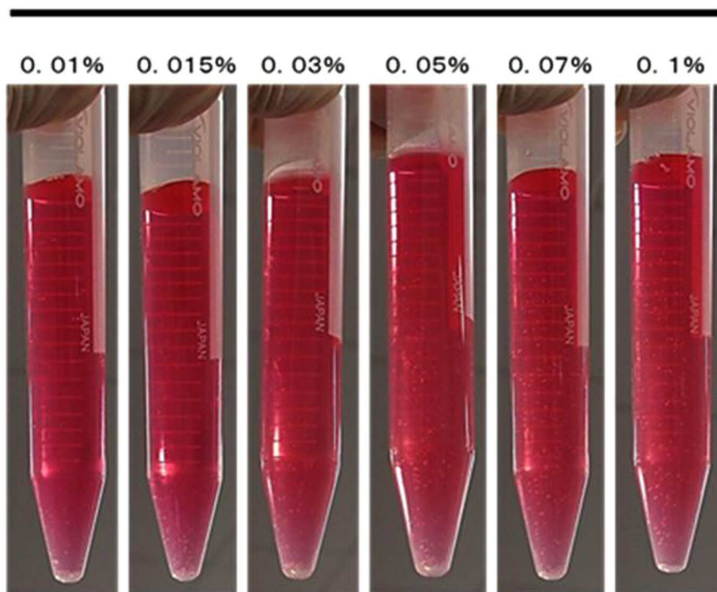
이상 상세히 서술한 바와 같이, 본 발명에 의해, 세포 또는 조직을 부유한 상태, 침전된 상태 중 어느 상태에 있어서도, 양호하게 분산된 상태에서 배양할 수 있는 배지 첨가물 및 배지 조성물 그리고 배양 방법을 제공할 수 있다.

- [0343] 본 발명의 배지 첨가물 및 배지 조성물 그리고 배양 방법은, 담체 표면에 접착되거나 혹은 담체 내부에 포매된 접착성 세포, 또는 스피어를 형성한 접착성 세포의 배양에 바람직하게 사용할 수 있다.
- [0344] 또, 본 발명의 배지 첨가물 또는 배지 조성물을 사용함으로써, 배양한 배양물을 신속하게 세포 이미지 해석에 의해 해석할 수 있기 때문에, 본 발명은, 항암제 등의 의약품 후보 물질의 스크리닝에 바람직하게 사용할 수 있다.
- [0345] 본 출원은, 일본에서 출원된 일본 특허출원 2015-84590 및 일본 특허출원 2015-229974를 기초로 하고 있으며, 그들 내용은 본 명세서에 모두 포함되는 것이다.

도면

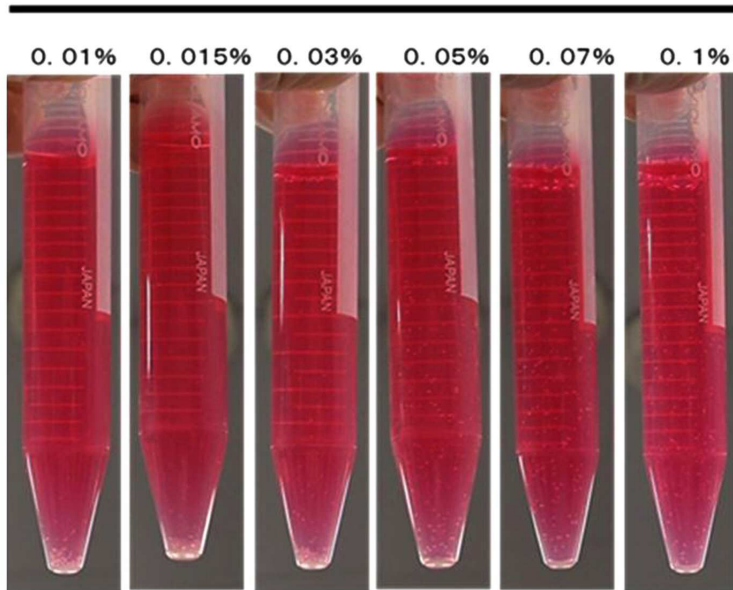
도면1

저분자 한천



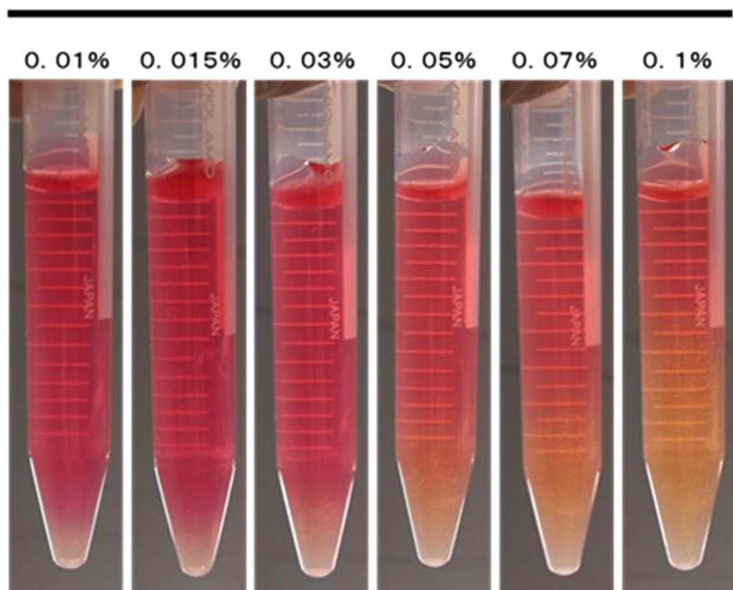
도면2

일반용 한천



도면3

저분자 한천

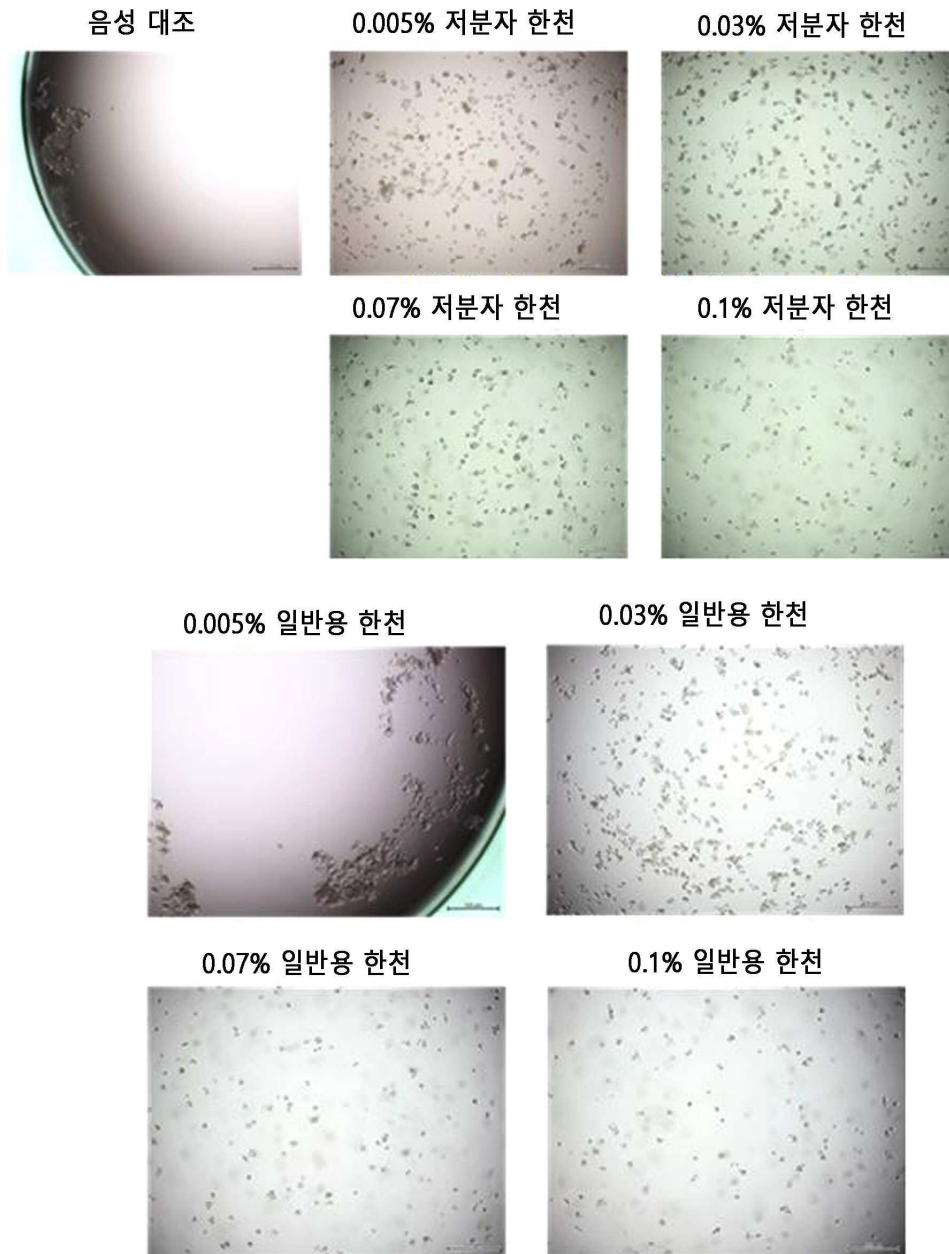


도면4



도면5

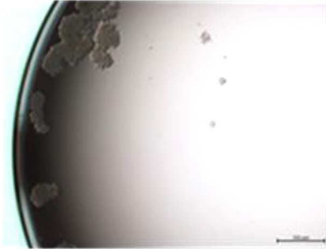
A549 세포(7일째 사진촬영)



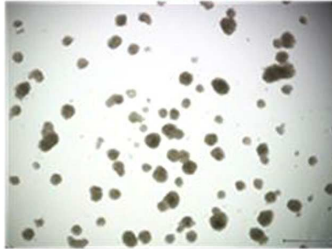
도면6

HepG2세포(7일째 사진 촬영)

음성 대조

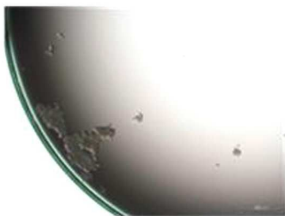


0.03% 저분자 한천

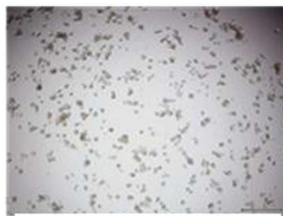


도면7

음성 대조



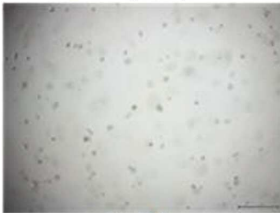
0.03% 저분자 한천



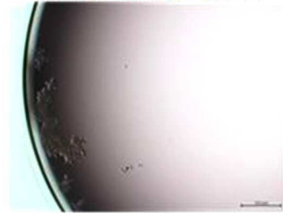
0.05% 저분자 한천



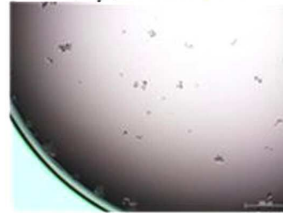
0.015% 탈아실화 젤란검



0.1% 메틸셀룰로오스



0.6% 메틸셀룰로오스

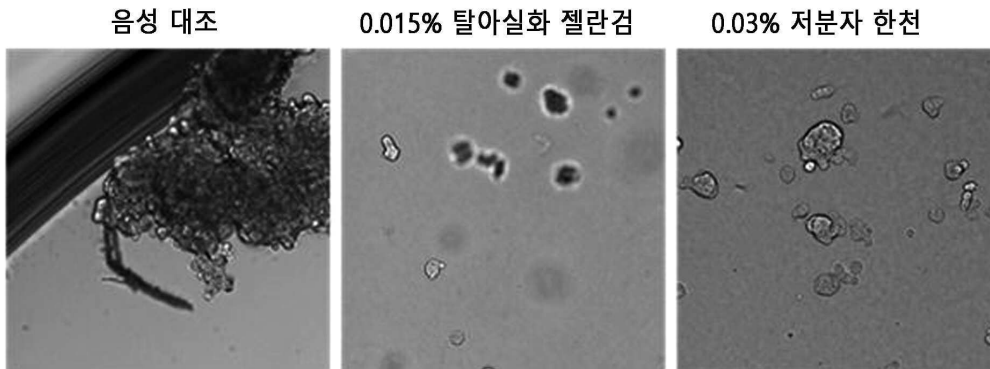


0.3% 메틸셀룰로오스

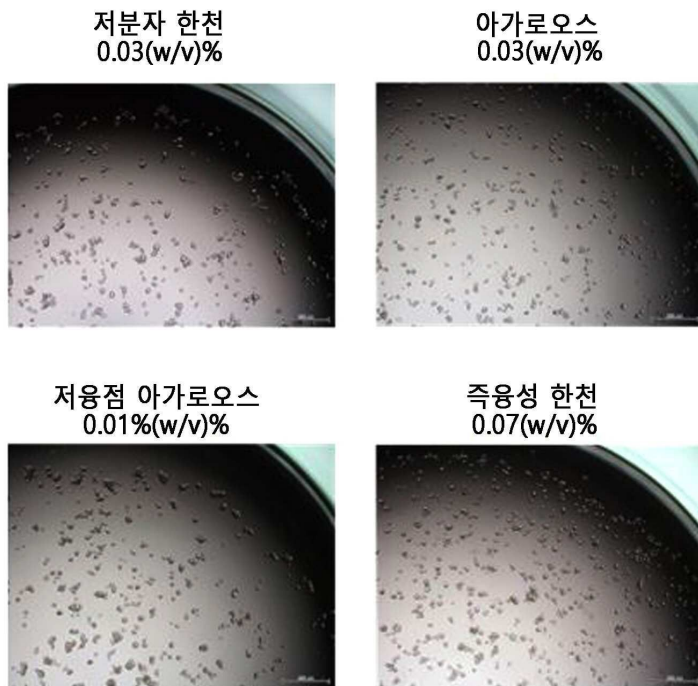


도면8

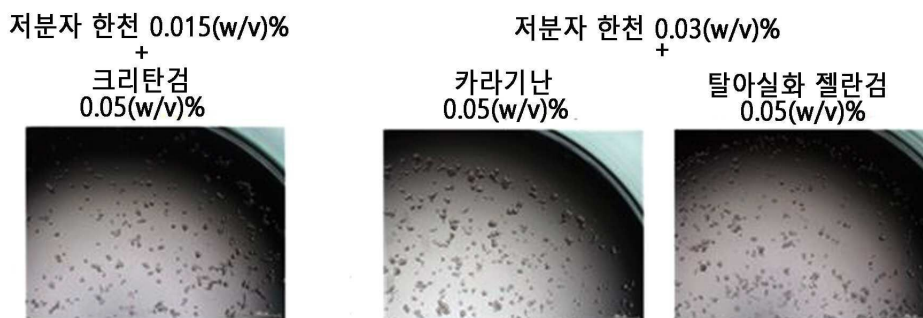
A549 세포(10일째 ArrayScan에 의한 관찰 이미지)



도면9

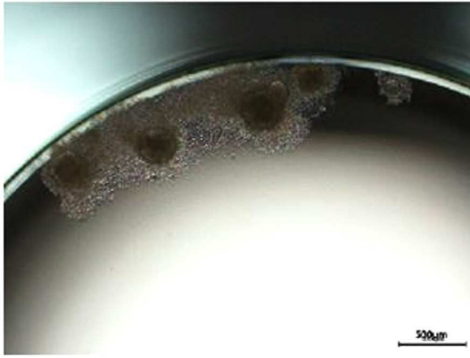


도면10



도면11

음성 대조



0.03(w/v)% 저분자 한천

