Journal of Radiation Industry 5 (3) : 279~283 (2011)

Technical Paper

돼지 유래 생체 조직의 이식재 활용을 위한 방사선 조사 미생물 제어 평가

조으리 · 김정수 · 최종일* · 김재훈 · 성낙윤 · 송범석
김재경 · 박종흠 · 이주운

한국원자력연구원 정읍방사선과학연구소

Comparison of Microbiological Safety of Porcine Grafts on Gamma Irradiation for Use of Xenografts

Eu-Ri Jo, Jeongsoo Kim, Jong-il Choi*, Jae-Hun Kim, Nak-Yun Sung, Beom-Seok Song, JaeKyung Kim, Jong-Heum Park and Ju-Woon Lee

Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup 580-185, Korea

Abstract - This study was compared microbiological safety with gamma-irradiated porcine tendon and skin, as materials for the development of xenografts to regenerate damaged tissues and protect secondary contamination. The porcine tendon and skin were gamma-irradiated after inoculation of bacteria and virus to evaluate irradiation sensitivity of microorganisms. The result showed that the porcine tendon and skin were not different on the sensitivity of microorganisms by gamma irradiation. Bacteria inoculated in the porcine tendon and skin were confirmed that *E. coli* was the D_{10} values of 0.32±0.082 and 0.25±0.1 kGy on tendon and skin, and *B. subtilis* was 4.00±0.312 and 3.88±0.3 kGy on gamma irradiation, respectively. Moreover, Virus inoculated in the porcine tendon and skin was observed that poliovirus (PV) was 6.26±0.332 and 6.88±0.3 kGy, and porcine parvovirus (PPV) was 1.75±0.131 and 1.73±0.2 kGy and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) was 3.70±0.212 and 3.81±0.2 kGy on gamma irradiation, respectively. Virus showed higher resistance compared to bacteria on gamma irradiation, but was not detected CPE (cytopathic effect) by virus both tendon and skin at 25 kGy, a standard dose recommended from IAEA for sterilization of medical products. Therefore, These results were considered that gamma irradiation could control effectively bacteria and virus to develop safe porcine xenograft, and apply same irradiation doses to all tissues including tendon and skin of porcine.

Key words : Gamma irradiation, Bacteria and viruses, Porcine tissue

서 론

최근 산업재해나 교통사고, 노령화로 인한 각종 퇴행성 질환 등의 증가로 인해 생체이식을 위한 생체조직의 수요가 급증하고 있다. 이러한 이식의 방법으로는 환자 자신의 자가이식 (autograft), 다른 사람의 것을 이식하는 동종이식 (homograft 또는 allograft), 동물의 것을 이식하는 이종이식 (heterograft 또는 xenograft) 및 인공재료가 있다. 이 중 자가이식은 가장 효과적인 방법으로 알려져 있지

* Corresponding author: Jong-il Choi, Tel. +82-63-570-3210, Fax. +82-63-570-3207, E-mail. choiji@kaeri.re.kr

만, 최근 이식건수의 급격한 증가와 고비용으로 인해 이식대기 환자에 비해 절대적으로 부족한 수급 불균형 문제를 야기하고 있으며 이러한 문제는 불법 장기매매를 비롯한 여러가지 사회적, 경제적 문제를 야기하고 있다. 2007년 국립장기이식관리센터의 통계에 따르면 (Park *et al.* 2009), 고형장기의 경우 이식 대기자는 11,513명인 반면에, 이식건수는 1,961건에 불과하여 11.5%의 이식률을 보이고 있다. 미국의 경우 UNOS (United Newyork for Organ Sharing)의 통계에 따르면 장기이식 대기자 중 60%만 이식을 받고, 이식을 받지 못한 환자의 6,000여 명 이상이 매년 사망하고 있다. 이렇게 국내 외적으로 심각한 장기부족문제를 해결하기 위한 방법으로 인공장기, 줄기세포 분화, 생체조직공학 또는 이종장기 등의 연구가 임상단계에서 진행되고 있다 (Park *et al.* 2009). 인공장기의 경우 특정형태의 장기부전에 효과적인 해결책일 수 있지만, 가까운 시일 내의 치료방법으로 사용되기 어렵다. 줄기세포의 경우 현재 면역적합성 줄기세포 공급원을 확보하고 이를 다양한 조직으로 분화시켜 장기나 인체부위를 대체하려는 연구가 진행되고 있지만, 아직 장기별 분화에 이론적 토대가 매우 부족한 실정이다 (Yang and Sykes 2007). 따라서 현실적으로 장기부족문제를 가장 빠르게 해결할 수 있는 방법이 이종장기이식이다.

이종장기이식은 부족한 장기를 무한정 공급할 수 있을 뿐 아니라. 공여장기를 미리 준비하고 수여자도 미리 파악할 수 있다는 점에서 뇌사자 장기에서 볼 수 있는 장기의 손상 (Pratschke *et al.* 1999)이나 장기의 보관기간이 길어짐으로써 발생할 수 있는 허혈, 재관류 손상 (ischemia and reperfusion injury)을 줄일 수 있으며 (Laskowski *et al.* 2000), 장기공여동물의 유전자 조작을 통하여 맞춤형 장기를 공급할 수 있다는 장점이 있다 (Salama *et al.* 2001). 그 중 돼지유래 이종 이식재는 대량생산이 가능하여 공급에 제한이 없으며, 광우병 등 다른 동물에 비해 인체에 치명적인 병원성 질환이 적고, 건/인대의 경우 생체적합성 및 인장강도 등 물리적 특성이 유사하기 때문에 적합성이 가장 높다. 미니돼지는 성체의 경우 130 kg 정도로 사람의 것과 크기가 비슷하고 생리적으로 유사하다. 또한 임상에 적용하기 위한 거부반응을 극복하기 위해 필요한 유전자 조작을 빠른 시일에 적용할 수 있다는 장점이 있다.

한편, 동종 및 이종조직을 사용하기 위해서는 병원성 미생물을 완전히 제거해야 하는데, 현재 멸균을 위한 다양한 방법들이 이용되고 있지만 (Pekkarinen *et al.* 2005), 그 중 방사선을 이용한 멸균은 많은 이점을 가지고 있다. 먼저 방사선 조사 동안 온도에 영향을 받지 않고, 포장 후 조사에 대해서도 product에 효과적으로 침투하며, 환경문제를 일으키는 ethyleneoxidegas와 같은 chemicals의 사용으로 인해 발생되는 조직에 해로운 어떠한 residuals을 남기지 않기 때문에 안전성에 있어서 확실한 이점을 제공한다. 그러므로 방사선을 이용한 멸균은 현재 증가되고 있는 조직은행에게 탁월한 방법으로 이용되고 있다. 이러한 방사선 멸균공정에 대해 국제원자력기구 (IAEA)는 동종 및 이종이식재의 멸균을 위해 25 kGy의 선량을 권장하고 있으며 (Nguyen *et al.* 2006), 미국의 조직은행에서는 박테리아를 비롯한 바이러스 감염으로부터 안전한 이식재를 위해 25 kGy 이상의 선량을 사용하고 있고 이러한 방사선 멸균공정에 따라 생산된 이식조직을 생산 및 이용할 수 있도록 허가하고 있다 (Angermann and Jepsen 1991). 우리는 전 연구에서 감마선 조사 돼지인대의 미생물학적 안전성을 평가하였다 (Kim *et al.* 2011). 따라서 본 연구에서는 인체조직과 가장 유사한 기능과 구조를 가진 돼지를 이용하여 인체의 장기를 대체할 수 있는 생체이식재 생산을 위해 인대를 비롯한 피부에 대해서 감마선 조사에 따른 미생물학적 영향을 평가 및 비교하였다.

재료 및 방법

1. 시료준비

본 연구에 사용한 돼지인대와 피부는 리온테크놀로지 (Jeonju, Republic of Korea)로부터 구입하였고, 샘플은 20% glycerol과 함께 −20°C에 보관하였다.

2. 감마선 조사

감마선 조사는 한국원자력연구원 방사선과학연구소 (Jeongeup, Republic of Korea) 내 선원 11.1 PBq, Co-60 감마선 조사시설 (point source AECL, IR-79, MDS Nordion International Co. Ltd., Ottawa, ON, Canada)을 이용하여 실온 (22±1°C)에서 시간당 10 kGy의 선량률로 각각 0, 1, 3, 5 및 10 kGy의 총 흡수선량을 얻도록 하였다. 흡수선량 확인은 alanine dosimeter (5 mm, Bruker Instruments, Rheinstetten, Germany)를 사용하였다. Dosimetery 시스템은 국제원자력기구 (IAEA)의 규격에 준용하여 표준화한 후 사용하였으며, 총 흡수선량의 오차는 2% 이내였다. 비조사구인 0 kGy는 동일한 온도효과를 얻기 위하여 감마선 조사시설 외부에 둔 후, 조사 직후 처리구와 함께 실험에 사용되었다.

3. 미생물의 배양 및 접종

조직에 접종한 박테리아는 *E. coli* (DH5α)가 사용되었

고 포자균으로서 *Bacillus substilis*가 사용되었다. 박테리아는 15 ml의 LB와 함께 37°C에서 배양되었다.

24시간 배양한 DH5α는 원심 분리를 통해 상층액이 제거되었고 멸균된 증류수와 함께 세척되었다. 그리고 1 ml의 PBS (Phosphate Buffered Saline)에 희석한 뒤 1×10^8 CFU ml^{-1}의 농도로 돼지인대와 피부에 도말하여 0, 0.1, 0.3, 0.5, 1 및 2 kGy의 흡수선량으로 조사하였다.

충분한 포자를 형성하기 위하여 5일 동안 배양한 *Bacillus subtilis*는 영양세포를 제거하고 포자만을 얻기 위해 80°C에서 10분 동안 가열하였다. 그리고 원심분리를 통해 상층액이 제거되었고 멸균된 증류수로 세척한 후 포자만 남도록 하였다. 그리고 1 ml의 PBS에 희석한 뒤 1×10^8 CFU ml^{-1}의 농도로 조직에 도말하여 0, 1, 2, 3, 5, 7 및 10 kGy의 흡수선량으로 조사하였다.

조직에 접종한 바이러스는 Poliovirus (PV), porcine parvovirus (PPV), bovine viral diarrhoea virus (BVDV)가 사용되었고, Poliovirus (ATCC VR 1464)의 배양과 정량을 위해 Monkey kidney (LLC-MK2) 기원의 세포 (ATCC Number CCL-7.1™)를 사용하였다. Porcine parvovirus (PPV) (ATCC VR 534)의 배양과 정량을 위해 Mini pig Kidney (MPK)기원의 세포 (ATCC CRL 1390)를 사용하였다. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) (ATCC VR 534)의 배양과 정량을 위해 Bovine turbiate (EBTr)기원의 세포 (KCTC Number 10044)을 사용하였다. LLC-MK2, EBTr and MPK (ATCC Number CCL-166™)세포들은 Eagle's Minimal Essential Medium (MEM)에 10% irradiated fetal bovin serum (FBS)를 넣어 37°C에서 5% CO_2 조건에서 배양하였다. 배양한 단층 세포에 바이러스를 감염시킨 후 37°C에서 배양하였고, 3～4일 배양한 후 세포병변효과 (cytopathic effects: CPE)가 일어나 부착된 세포들이 떨어지면 50 ml 시험관에 회수하여 액체질소로 급속냉동시킨 후 37°C 항온수조에 녹인 다음 vortex하여 세포를 파쇄시킨 후 바이러스를 회수하였다. 위의 과정을 2회 추가 반복한 후 1,500 rpm에서 5분간 원심분리하고 상등액을 모아 4°C에서 보관하여 사용하였다. 그리고 사용된 바이러스의 particle 수는 Reed and Meunch (1938)의 방법에 따라 $TCID_{50}$ 측정을 통해 정량화하였다. 배양한 바이러스 3종은 조직에 도말한 후 0, 1, 2, 3, 5, 10, 25 kGy의 흡수선량으로 조사하였다.

4. 감마선 조사에 대한 미생물의 영향평가

감마선 조사 후 박테리아는 조사선량에 따라 조직을 10 ml의 PBS에 10진 희석법으로 희석하여 조직에 접종한 박테리아를 부유시킨 뒤 LB Agar 배지 (Difico Laboratories, USA) 위에 도말하여 24시간 동안 37°C에서 배양하였다. 배양 후 각 선량에 따라 형성된 Colony를 Counting하여 20～200개의 집락을 형성한 배지만 계수하여 Log CFU ml^{-1}로 나타내었다. 이를 D_{10} value (미생물의 생존율을 90% 감소시키는 조사선량; kGy)으로 표현하였다. 사멸율 평가는 3회의 반복실험을 통해 평균값과 오차값을 계산하였다.

감마선 조사 후 바이러스는 조사선량에 따라 조직을 박테리아와 동일하게 희석하였다. 바이러스의 계수는 동물세포주를 이용한 바이러스 계수법 ($TCID_{50}$)을 이용하였다. 배양된 세포주를 96 well plate (Corning, NY, USA)에 5×10^3 cell로 각 well에 분주한 후 2일간 37°C, 5% CO_2 상태로 배양하였다. 배양 후 각 well에 10^{-1}씩 단계적으로 희석된 시료 10 μL를 각각 10개의 well에 분주한 후 5～7일간 37°C, 5% CO_2 상태로 배양하였다. 배양한 후 세포의 세포병변 (CPE; cytopathic effect)을 관찰하였다. CPE가 관찰된 well을 바이러스 양성반응으로 판정하고, 희석배율별 양성 반응을 보인 well을 기록한 후 Titer 프로그램 (Titer, version 1.2, Neurogenex)을 이용하여 바이러스의 수를 계산하였다. 한편, 감마선에 대한 사멸율 (D_{10})은 박테리아와 동일하게 산출하였다.

5. 통계처리

실험은 3회 반복하여 평균값과 오차를 경과로 나타내었고, 얻어진 결과는 Statistical Package for Social Sciences (SPSS, 10.0)를 이용하여 One Way ANOVA test로 분석하였으며, 시료 간의 유의성은 Duncan's multiple range test법으로 $p<0.05$ 수준에서 평가하였다.

결과 및 논의

1. 조직에 대한 박테리아의 감마선 영향평가

Deijkers *et al.* (1997)은 병원성 박테리아균에 대해 저병원성균 (low pathogenicity)과 고병원성균 (high pathogenicity)으로 분류하였다. 저병원성균으로는 *Staphylococcus*, *Corynebaterium*, *Bacillus* species 등이 포함하고, 고병원성균으로는 *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* species 등을 포함한다. 저병원성균의 경우, 공정과정에서 피부와 같은 표면적인 오염으로 발생되지만, 고병원성균의 경우 호흡 또는 소화기관을 통해 오염되기 때문에 환자에게 쉽게 감염될 수 있다 (Deijkers *et al.* 1997). 본 실험에서는 병원성 박테리아균인 *E. coli*와 *B. subtilis*를 접종한 돼지인대와 피부에 대하여 감마선 조사에 대한 영

Table 1. D_{10} values for gamma irradiation of bacteria inoculated in the porcine tendon and skin

Species		D_{10} values (kGy)	
		Tendon	Skin
Bacteria	*E. coli* (DH5α)	0.32±0.082[a]	0.25±0.1
	B. subtilis	4.00±0.312	3.88±0.3

[a]Means±standard deviation (n=3)

Table 2. D_{10} values for gamma irradiation of virus inoculated in the porcine tendon and skin

Species		D_{10} values (kGy)	
		Tendon	Skin
Virus	Poliovirus (PV)	1.75±0.131[a]	1.73±0.2
	Porcine parvovirus (PPV)	3.70±0.212	3.81±0.2
	Bovine viral diarrhoea virus (BVDV)	6.26±0.332	6.88±0.3

[a]Means±standard deviation (n=3)

향이 평가되었다. 돼지인대에 대한 감마선 조사의 미생물 안정성은 이미 평가하였다. 그 결과, *E. coli*는 0, 0.1, 0.3, 0.5, 1, 2 kGy의 증가된 조사선량에 따라 미생물의 수적인 감소를 확인할 수 있었고, D_{10} value는 0.32±0.082였다(Table 1). 더불어 돼지피부에 대한 감마선 영향을 확인하였을 때, D_{10} value가 0.25±0.1으로 나타남으로써 돼지의 인대와 피부가 유의적인 차이가 없음을 확인할 수 있었다(Table 1). 또한, 극한 환경에서 포자를 형성하고 발아시키는 포자균인 *B. subtilis*에 대하여 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10 kGy의 선량에 따른 감마선 영향을 평가하였을 때, 인대는 4.00±0.312, 피부는 3.88±0.3의 D_{10} value가 확인됨으로써 *E. coli*보다 감마선 저항성이 높게 나타났으며, 조직에 대한 박테리아의 감마선 저항성은 피부나 인대에 있어 조직별 차이를 나타나지 않음을 확인할 수 있었다.

2. 조직에 대한 바이러스의 감마선 영향평가

병원성 바이러스균인 porcine parvovirus (PPV), bovine viral diarrhoea virus (BVDV), poliovirus (PV)를 접종한 돼지인대와 피부에 대해서도 감마선 조사에 대한 영향이 평가 및 비교되었다. 그 결과, 조사 선량 0, 1, 2, 3, 5, 10, 25 kGy에 대해 PPV를 접종한 돼지인대와 피부의 D_{10} value는 각각 1.75±0.131, 1.73±0.2였고, BVDV를 접종한 돼지인대와 피부에 대해서는 각각 3.70±0.212. 3.81 ± 0.2였으며, PV에 대해서는 각각 6.26±0.332, 6.88±0.3임을 확인할 수 있었다(Table 2). 그러므로 인대와 피부에 접종한 박테리아보다 바이러스가 더 높은 저항성을 갖는 것을 알 수 있었다. IAEA는 의료용 또는 생물학적 소재의 멸균을 위한 기준 선량으로서 25 kGy를 권장하고 있다(IAEA 2002a). 그리고 조직은행들 또한 멸균과 함께 조직손상을 막기 위해 대부분 10에서 35 kGy 사이의 선량을 적용하고 있다(Strickland *et al.* 2003). 인대와 피부에 접종한 바이러스는 감마선 조사 결과, 25 kGy에서 바이러스에 의한 세포의 CPE (cytopathic effect)가 세 바이러스 모두 검출되지 않음을 확인할 수 있었다. 그러므로 감마선 조사를 이용하여 바이러스를 비롯한 병원성 균을 효과적으로 제어할 수 있고, 이종이식을 위한 돼지 인대, 피부를 비롯한 모든 조직에 대해 25 kGy의 선량은 충분한 멸균선량이 될 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

본 연구는 손상된 조직을 재생시키면서 2차 감염으로부터 보호하기 위한 안전한 이종이식재의 개발을 위해 감마선 조사한 이종조직의 미생물학적 안전성이 비교 및 평가되었다. 이종조직은 돼지인대와 피부가 사용되었으며, 미생물학적 안전성을 평가하기 위하여 박테리아와 바이러스 접종 후 감마선 조사되었다. 그 결과, 돼지인대와 피부는 감마선 조사에 대하여 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 돼지인대와 피부에 접종한 박테리아를 감마선 조사하였을 때, *E. coli*의 D_{10} value는 각각 0.32±0.082 그리고 0.25±0.1 kGy였고, *B. subtilis*의 D_{10} value는 인대와 피부에 대해 각각 4.00±0.312 그리고 3.88±0.3 kGy였다. 또한 바이러스를 접종한 돼지인대와 피부를 감마선 조사하였을 때, Poliovirus (PV)의 D_{10} value는 각각 6.26±0.332 그리고 6.88±0.3 kGy였고, porcine parvovirus (PPV)는 각각 1.75±0.131 그리고 1.73±0.2 kGy였으며, Bovine viral diarrhoea virus (BVDV)는 각각 3.70±0.212 그리고 3.81±0.2 kGy로 확인되었다. 박테리아보다 감마선에 대한 저항성이 높게 확인된 PV, PPV, BVDV 세가지 바이러스는 의료용 재료로서 사용하기 위해 IAEA에서 권장하는 멸균선량인 25 kGy에서 바이러스에 의한 CPE (cytopathic effect)가 나타나지 않음을 확인할 수 있었다. 그러므로 감마선 조사는 돼지의 안전한 이종이식재 개발을 위하여 박테리아나 바이러스를 효과적으로 제어할 수 있고, 인대와 피부를 비롯한 모든 조직에 같은 조사선량을 적용할 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 교육과학기술부 원자력 연구개발사업과 전

라북도 도비지원 R & D 사업으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

Angermann P and Jepsen OB. 1991. Procurement, banking and decontamination of bone and collagenous tissue allografts guidelines for infection control. *J. Hosp. Infect.* **17**:159-169.

Deijkers RLM, Bloem RM and Petit PLC. 1997. Contamination of bone allografts-analysis of incidence and predisposing factors. *J. Bone Joint Surg. Br*. **79**:161-166.

IAEA. 2002. International standards on tissue banking first meeting of the IAEA technical advisory committee. pp. 44. *In*: The IAEA Programme in Radiation and Tissue Banking (Committee ITA *ed*.). IAEA, Boston, USA.

Kim JS, Sung NY, Jo ER, Choi JI, Song BS, Kim JK, Lim YM, Lee JW, Lee KW, Kim TW, Byun MW and Kim JH. 2011. Microbiological safety and tensile strength of gamma irradiated porcine tendon for the development of xenografts. *Journal of Radiation Industry* **5**:75-80.

Laskowski I, Pratschke J, Wilhelm MJ, Gasser M and Tilney NL. 2000. Molecular and cellur events associated with ischemia/reperfusion injury. *Ann. Transplant* **5**:29-35.

Nguyen H, Morgan DA and Forwood MR. 2006. Sterilization of allograft bone: is 25 kGy the gold standard for gamma irradiation? *Cell Tissue Bank* **8**:81-91.

Park CG, Kim JS, Shin JS, Kim YH and Kim SJ. 2009. Current status and future perspectives of xenotransplantation. *J. Korean Soc. Transplant* **23**:203-213.

Pekkarinen T, Hietala O, Jamsa T and Jalovaara P. 2005. Gamma irradiation and ethylene oxide in the sterilization of native reindeer bone morphogenetic protein extract. *Scand. J. Surg.* **94**:67-70.

Pratschke J, Wilhelm MJ, Kusaka M, Basker M, Cooer DK, Hancock WW and Tilney NL. 1999. Brain death and its influence on donor organ quality and outcome after transplantation. *Transplantation* **67**:343-348.

Salama AD, Delikouras A, Pusey CD, Cook HT, Bhangal G, Lechler RI and Dorling A. 2001. Transplant accommodation in highly sensitized patients: a potential role for Bcl-xL and alloantibody. *Am. J. Transplant* **1**:260-269.

Strickland SM, MacGillivray JD and Warren RF. 2003. Anterior cruciate ligament reconstruction with allograft tendons. *Orthop. Clin. North Am.* **34**:41-47.

Suarez LS and Richmond JC. 2007. Overview of procurement, processing, and sterilization of soft tissue allografts for sports medicine. *Sports Med. Arthrosc*. **15**:106-113.

Yang YG and Sykes M. 2007. Xenotransplantation: current status and a perspective on the future. *Nature Review* **7**:519-531.

Manuscript Received: September 1, 2011
Revised: September 7, 2011
Revision Accepted: September 14, 2011