Journal of Radiation Industry 5 (1) : 75~80 (2011)

이종이식재 개발을 위한 감마선 조사 돼지 인대의 미생물학적 안전성 및 인장강도

김정수 · 성낙윤 · 조으리 · 최종일 · 송범석 · 김재경 · 임윤목 · 이주운
이광원[1] · 김태운[2] · 변명우[3] · 김재훈*

한국원자력연구원 정읍방사선과학연구소, [1]을지의과대학교 정형외과
[2]리온 테크놀로지, [3]우송대학교 식품생물과학과

Microbiological Safety and Tensile Strength of Gamma Irradiated Porcine Tendon for the Development of Xenografts

Jeongsoo Kim, Nak-Yun Sung, Eu-Ri Jo, Jong-il Choi, Beom-Seok Song, Jaekyung Kim, Youn-Mook Lim, Ju-Woon Lee, Kwang-Won Lee[1], Tae-Woon Kim[2], Myung-Woo Byun[3] and Jae-Hun Kim*

Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup 580-185, Korea
[1]*Department of Orthopaedic Surgery, Eulji University Hospital, Daejeon 302-799, Korea*
[2]*Rion Technology, R&D Center, Jeonbuk Technopark, Jeonabukdo 565-902, Korea*
[3]*School of Food Science and Biotechnology, Woosong University, Daejeon 300-718, Korea*

Abstract - This study was to determine the microbiological safety and tensile strength of gamma-irradiated porcine tendon for the development of safe xenografts. *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* were used as model pathogens and inoculated as $10^6 \sim 10^7$ log colonies forming unit (CFU) g^{-1}. As model virus from porcine, porcine parvovirus (PPV), bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and poliovirus were inoculated as $10^5 \sim 10^6$ tissue culture infectious dose $(TCID)_{50}$ g^{-1} into porcine skin. The D_{10} value of *E. coli* and *B. subtilis* was measured as 0.32 ± 0.082 kGy and 4.0 ± 0.312 kGy, respectively. Additionally, the D_{10} values of PPV, BVDV and poliovirus were also shown as 1.75 ± 0.131 kGy, 3.70 ± 0.212 kGy and 6.26 ± 0.332 kGy, respectively. Gamma irradiation decreased the tensile strength of porcine tendon. Results indicate that microbiological safety of porcine tendon can be improved significantly by gamma irradiation. However, further studies are needed to improve the tensile strength of gamma-irradiated porcine tendon.

Key words : Gamma irradiation, Xenografts, Porcine tendon, Microbiological safety, Tensile strength

서 론

이식수술은 외상, 감염, 선천적 질환, 노화 등으로 인해 손상된 장기, 뼈, 근육의 복구와 치료에 널리 이용되는

* Corresponding author: Jae-Hun Kim, Tel. +82-63-570-3205, Fax. +82-63-570-3207, E-mail. jaehun@kaeri.re.kr

방법으로써, 현재 정형외과학, 신경외과학, 치의학 등의 영역에서 주로 적용되며(Song and Lee 2007), 성공률을 높이고 부작용을 줄이기 위한 많은 연구들이 진행되고 있는 추세이다(Finkemeier 2002; Giannoudis *et al*. 2005).

이식은 서로 같은 종의 이식체를 교환하는 동종이식과 서로 다른 종의 이식체를 교환하는 이종이식으로 구분되며, 동종이식은 면역거부 반응을 수반하지 않아 이식부위에 이식체가 빠르게 적응 할 수 있는 장점을 가지고 있는(Burchardt 1987; Hubble 2001) 반면 이식 대기자 대비 이식건수는 10%에 불과하여 국내외적으로 급격히 증가하는 이식대기 환자에 비해 절대적으로 부족한 공여 이식체의 수급문제를 발생시킨다(Park *et al*. 2009). 또한 이러한 수급의 불균형은 불법 장기 매매를 비롯한 여러 가지 사회적, 경제적 문제를 야기시킨다. 이러한 장기부족현상을 해결하기 위해 이종장기, 인공장기, 줄기세포 분화, 생체조직공학을 이용한 조직 재생법 등의 연구가 전임상 및 임상단계에서 진행되고 있다(Park *et al*. 2009). 이중 바이오 이종장기이식은 부족한 장기를 무한정 공급할 수 있을 뿐 아니라 유전공학적 기법을 이용한 환자 맞춤형 형질전환장기의 생산이 가능하다는 점에서 타 분야에 비해 현실적으로 장기 부족문제를 가장 빠르게 해결할 수 있는 방법이라 사료된다. 이종 조직을 생산 할 수 있는 계통 안에서 영장류는 면역학적 특성을 비롯한 여러 가지 성질이 사람과 유사하여 이종이식에 있어서 가장 이상적인 동물로 판단되지만, 윤리적인 측면이나 비용적 측면에서 다양한 문제점을 수반한다(Barrack 2005). 반면, 돼지는 사육을 통해서 주변에서 풍부하게 얻을 수 있고, 또 식용으로도 사용되기 때문에 윤리적으로 문제가 적을뿐더러, 이미 신장, 췌장 섬 세포, 심장 혹은 판막조직에 대한 이종장기 적합성에 관한 연구가 여러 의학 분야에서 광범위하게 진행되고 있으므로 이종장기 이식체로서 가장 적합할 것으로 사료된다(Tseng *et al*. 2005; Wang *et al*. 2005). 그러나 동종 및 이종이식에 있어서 무엇보다도 중요한 문제점은 이식체에 오염되어 있는 감염을 일으키는 세균이나 바이러스를 제거하는 것이다. 현재까지 이러한 문제점을 해결하기 위해 다양한 방법들이 제시되어 왔으며(Pekkarinen *et al*. 2005; Alanay *et al*. 2008), 그 중 방사선의 조사는 비열처리 과정의 장점을 가지고 있어, 이식체에 큰 변성을 일으키지 않고, 오염되어 있는 세균이나 바이러스를 제거하기 위한 효과적인 방법으로 제기 되고 있을 뿐만 아니라(Angermann and Jepsen 1991; Glowacki 2005), 국제 원자력기구(IAEA)에서도 이식체를 통한 감염을 막기 위하여 25 kGy의 선량으로 방사선을 조사하는 것을 허가하고 있는 실정이다(IAEA 1973). 따라서 본 연구에서는 보다 안전한 조직이식재 개발을 위하여 돼지로부터 적출한 돼지 인대의 감마선 조사에 따른 미생물학적 안전성 및 감마선 조사된 인대의 인장강도 변화를 측정하였다.

재료 및 방법

1. 시료 준비

본 연구에서 사용한 돼지 인대는 리온테크놀로지(Jeonju, Republic of Korea)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 감마선 조사

감마선 조사는 한국원자력연구원 방사선과학연구소(Jeongeup, Republic of Korea) 내 선원 11.1 PBq, ^{60}Co 감마선 조사시설(point source AECL, IR-79, MDS Nordion International Co. Ltd, Ottawa, ON, Canada)을 이용하였다. 흡수선량 확인은 alanine dosimeter(5 mm, Bruker Instruments, Rheinstetten, Germany)를 사용하였다. Dosimetry 시스템은 국제원자력기구(IAEA)의 규격에 준용하여 표준화 한 후 사용하였으며, 총 흡수선량의 오차는 2% 이내였다.

3. 방사선 조사에 따른 박테리아 사멸율 측정

방사선 조사에 따른 돼지 인대의 박테리아 사멸율을 측정하기 위해 *E. coli*(DH5α), *Bacillus subtilis*를 사용하였다. Luria-bertani Broth(LB)배지 15 ml에 24시간 동안 배양한 DH5α를 원심분리하여 상층액을 제거 하고, PBS (Phosphate Buffered Saline)를 사용하여 3회 반복 세척한 후 1×10^8 logCFU g^{-1}의 농도로 돼지 인대의 절단면(1×2 cm^2)에 도말하여, 0, 0.1, 0.3, 0.5, 1 및 2 kGy의 흡수선량으로 조사하였다. 포자형성균인 *Bacillus subtilis*는 충분한 포자를 형성하기 위하여 5일 동안 배양한 후 영양세포를 제거하기 위하여 80°C에서 10분 동안 가열하였고, 원심분리를 통하여 상층액을 제거한 포자층만 취하여 1×10^8 logCFU g^{-1}의 농도로 돼지 인대의 절단면(1×2 cm^2)에 도말하여 0, 1, 2, 3, 5, 7 및 10 kGy의 흡수선량으로 조사하였다. 박테리아 접종 후 조사선량에 따라 조사된 돼지 인대를 10 ml의 PBS에 담가 돼지 인대에 존재하는 박테리아를 부유시킨 후, LB Agar 배지 위에 도말하여 24시간 동안 37°C에서 배양하였다. 배양 후 각 선량에 따라 형성된 colony를 counting하여 생존곡선으로 표현하였다. 생존곡선은 감마선 조사에 대해 살아남은 DH5α가 형성하는 CFU ml^{-1}에 의해 측정되었으며, D_{10} Values (박테리아의 생존율을 90% 감소시키는 gamma irradiation

dose; kGy)로 표현하였다. 박테리아 사멸율 측정은 3회 반복실험을 통해 평균값과 오차값을 계산하였다.

4. 방사선 조사에 따른 바이러스 사멸율 측정

방사선 조사에 따른 돼지 인대의 바이러스 사멸율 측정을 위해 poliovirus (PV; ATCC VR 1464), porcine parvovirus (PPV; ATCC, No. VR 534) 및 bovine viral diarrhoea virus (BVDV; ATCC VR 534)를 구입하여 사용하였다. Poliovirus의 배양과 정량을 위해 Monkey kidney 기원의 세포주인 LLC-MK2 세포를 american tissue culture collection (ATCC, CCL-7.1)으로부터 분양 받아 사용하였다. Porcine parvovirus 배양과 정량을 위해 Mini-pig kidney의 기원의 세포주인 MPK (No. CCL-166) 세포를 ATCC로부터 분양 받아 사용하였다. Bovine viral diarrhoea virus의 배양과 정량을 위해 bovine turbiate 기원의 세포주인 EBTr 세포를 korean collection for type cultures (KCTC, No. 10044)로부터 분양 받아 사용하였다. LLC-MK2, EBTr 및 MPK 세포는 eagle's minimal essential medium (EMEM)배지에 10% fetal bovine serum (FBS)를 넣어 37°C, 5% CO_2의 조건에서 배양하였다. 각각의 배양된 세포에 바이러스를 감염시키고 3～4일 동안 배양한 후 세포병변효과 (cytopathic effects: CPE)가 관찰되면 50 ml 시험관에 세포를 회수하여 액체질소로 급속냉동 시킨 후 37°C 항온수조에 녹인 다음 vortex하여 세포를 파쇄함으로써 세포내 바이러스를 포집하였다. 위의 과정을 2회 추가 반복한 후 1,500 rpm에서 5분간 원심분리하고 상등액을 모아 4°C에서 보관하며 사용하였다. 또한 바이러스의 계수는 Reed and Meunch (1938)의 방법에 따라 $TCID_{50}$의 값의 측정을 통해 측정하였다. 이상의 포집된 3종의 바이러스는 절단면이 $1 \times 1\ cm^2$ 크기로 제단된 돼지인대에 도말한 후 1, 2, 3, 5, 10 및 25 kGy의 흡수선량으로 조사하였다. 방사선 조사 후 돼지 인대를 수거하여 10 ml의 멸균된 PBS용액에 담그고, 1분간 강하게 교반하였다. 교반 후 용액을 1/10로 연속적으로 희석하여, 세포주가 5×10^3 cell $well^{-1}$의 농도로 분주된 plate에 10 µl씩 처리한 후, 5～7일간 37°C, 5% CO_2의 조건으로 세포주를 배양하였다. 배양 후 세포의 세포병변 (cytopa-thic effects; CPE)을 관찰하여, CPE가 관찰된 well을 바이러스 감염 양성반응으로 판정하고, 희석배율별 양성 반응을 보인 well을 기록한 후 Titer 프로그램 (Titer, version 1.2, Neurogenex)을 이용하여 바이러스의 수를 계산하였다. 한편, 방사선 조사에 따른 바이러스의 사멸율 (D_{10})은 바이러스를 90% (1 log cycle) 사멸 시키는데 소요되는 방사선 조사선량 (kGy)으로 산출하였다.

5. 감마선 조사된 돼지 인대의 인장강도 측정

감마선 조사된 돼지 인대의 인장 강도를 측정하기 위하여 길이 10 cm 직경 8 mm의 돼지 인대를 30 kGy의 조사선량으로 조사한 후, 인장력 측정기 Instron® (Instron, Model No. 5569, Mass, USA)를 사용하여 돼지 인대의 인장강도를 측정하였으며, 이때 비조사군을 대조구로 사용하여, 방사선 조사에 따른 인장강도의 변화를 비교하였다. 인장강도 측정을 위한 인장력 측정기의 세부조건으로 30 kN 용량의 load cell을 사용하였고, 인장 속도는 분당 50 mm를 유지하면서 X-Y 기록계에 표시하여 최대 인장력을 측정하였다.

6. 통계처리

모든 실험은 3번 이상 반복하여 평균값과 오차를 결과로 나타내었고, 이상의 실험에서 얻어진 결과는 Statistical Package for Social Sciences (SPSS, 10.0)를 이용하여 One Way ANOVA test 방법으로 분석하였으며, 시료간의 유의성은 Duncan's multiple range test로 $p < 0.05$ 수준에서 비교하였다.

결과 및 논의

1. 감마선 조사에 따른 돼지 인대의 박테리아 안전성

방사선 기술을 이용하여 안전한 이종조직을 개발하고 돼지로부터 적출한 돼지 인대에 박테리아를 접종한 후, 감마선을 조사하고 미생물학적 안전성을 평가 하였다 (Fig. 1). 실험에 적용한 박테리아는 고 병원성 미생물로 안전성 평가에서 많이 이용되는 *E. coli* (DH5α)와 포자를 형성하여 완전사멸이 어려운 포자형성균인 *Bacillus subtilis*가 이용되었다. 돼지 인대의 감마선 조사에 따른 박테리아의 사멸율을 확인하기 위하여 일정량으로 절단된 돼지 인대의 절단면에 박테리아를 도말한 후 방사선 (0, 0.1, 0.3, 0.5, 1, 2 kGy)을 조사한 결과, DH5α는 1 kGy 이하의 선량에서 방사선 조사선량에 의존적으로 수적인 감소가 관찰 되었다 (Fig. 1a). 포자균은 극한 환경에서 포자를 형성하고 발아시켜 우세적으로 살아남는 특징이 있다. 따라서 생존율이 포자를 형성하지 않는 박테리아에 비해 높게 관찰되며, 자극에 대한 내성 또한 *E. coli*보다 훨씬 더 우세한 것으로 알려져 있다. 이러한 포자균에 대한 감마선 사멸율을 확인한 결과, *B. subtilis* 또한 10 kGy 이하의 선량에서 방사선 조사 (0, 1, 2, 3, 5, 7, 10 kGy)에 의해 수적인 감소가 급격하게 일어나는 것을 관찰 할 수

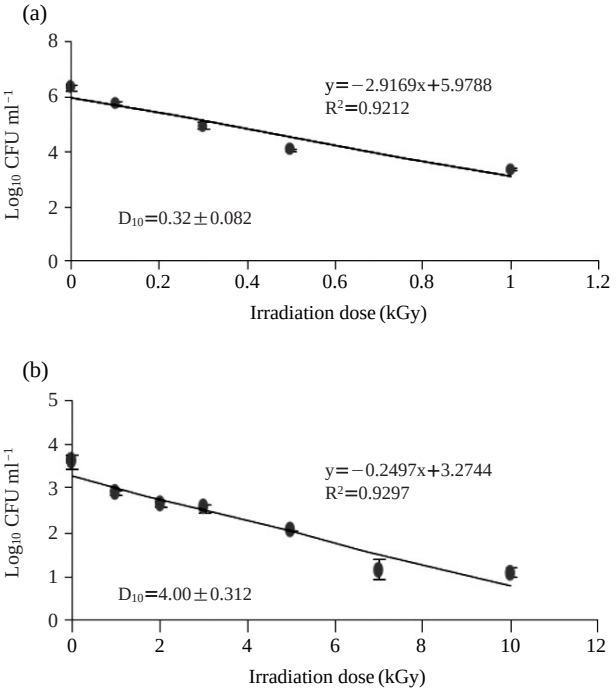

Fig. 1. Linear regression analysis for gamma-irradiation sensitivity of bacteria. (a): *E. coil* (DH5α). (b): *B. subtilis.*

있었다 (Fig. 1b). 또한 *B. subtilis*는 10 kGy에서도 생존함으로써 DH5α와 비교하여 볼 때 생존율이 훨씬 높은 것을 확인할 수 있었다. D_{10}값을 확인한 결과, DH5α는 0.32±0.082 kGy로 감마선에 대하여 매우 약한 것으로 관찰되었으며, *B. subtilis*는 4.00±0.312 kGy로 DH5α에 비해 12.5배 높게 나타난 것으로 보아 *B. subtilis*는 DH5α 보다 방사선에 대한 감수성이 낮은 것으로 사료되었다. 동종 및 이종조직의 사용에 있어서 질병의 전이와 기증자로부터 또는 조직의 채취 및 처리시 발생 가능한 세균의 오염에 의한 합병증 발생에 대한 많은 문제들이 대두되고 있으며, 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 조직의 선별검사와 안전한 조직 처리 및 멸균방법이 발전하게 되었다 (Currey *et al*. 1997). 조직은행에서 채취된 동종조직 중 경조직의 경우, 단순 냉동상태로 사용되어지는 경우를 제외한 조직처리과정을 거친 대부분의 경우, 감염원이 되는 골수 및 혈액이 제거되며 다양한 최종멸균방법이 사용되며, 특히 최근에 광범위하게 사용되는 방사선 조사 멸균법은 여러 종류의 세균뿐만 아니라 Human immunodeficient virus (HIV)에 대한 멸균에 효과적인 것으로 보고되고 있다 (Sullivan *et al*. 1971; Kitchen *et al*. 1989). 따라서 본 연구에서도 박테리아뿐만 아니라 동물용 바이러스 3종에 관한 방사선 멸균 효과에 관하여도 확인하였다.

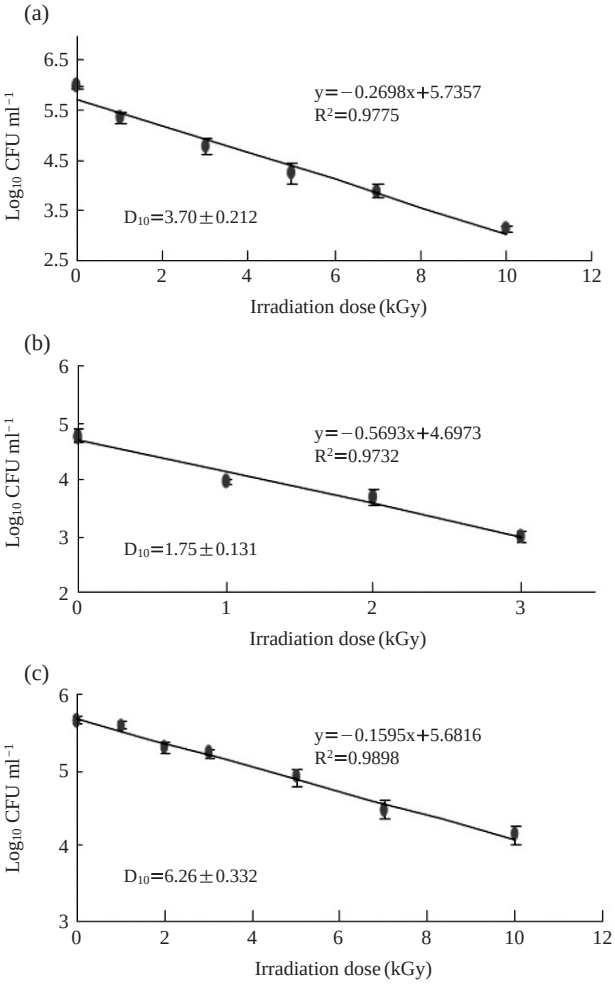

Fig. 2. Linear regression analysis for gamma-irradiation sensitivity of various type of viruses (a): Bovine viral diarrhoea virus (BVDV). (b): Porcine parvovirus (PPV). (c): Poliovirus (PV).

2. 감마선 조사에 따른 돼지 인대의 바이러스 안전성 평가

방사선 기술을 이용하여 안전한 이종조직을 개발하고자 돼지로부터 적출한 돼지 인대에 바이러스를 접종한 후, 감마선을 조사하고 미생물학적 안전성을 평가 하였다. 서로 다른 타입의 바이러스인 poliovirus (PV), porcine parvovirus (PPV) 및 bovine viral diarrhoea virus (BVDV)를 일정량으로 절단된 돼지 인대의 절단면에 도말한 후 방사선 (1～10 kGy)을 조사한 결과 (Fig. 2a-c), 바이러스들에 대한 D_{10}값은 PV가 6.26±0.332 kGy, BVDV 3.70±0.212 kGy 및 PPV 1.75±0.131 kGy로 관찰되었으며, PPV, BVDV, PV순으로 방사선에 대한 감수성이 높게 나타났다. 일반적으로 방사선 조사에 의한 바이러스의 사멸과정은, 방사선 조사시 일어나는 물 분자가 해리 및 자유라디칼을 생성을 개시단계로 이루어지고, 이때 생성된 자

유라디칼은 바이러스의 핵산과 단백질 구조에 간접적인 영향을 주어 바이러스를 불활성화 시키다고 보고된다 (Wientroub and Reddi 1998). 이러한 방사선 멸균공정이 밝혀지면서 국제 원자력기구(IAEA)는 동종 및 이종이식에 사용되는 조직 및 뼈의 멸균을 위해 25 kGy의 방사선 조사처리 과정을 권고하고 있으며 (Nguyen *et al*. 2006), 미국의 조직은행에서는 박테리아뿐만 아니라 바이러스로의 감염으로부터 안전한 이식재의 멸균공정을 확립하기 위하여 25 kGy나 이보다 높은 선량 조사를 허가하고 있고, 이러한 공정에 따라 생산된 골 및 조직 이식재를 판매 할 수 있도록 규정하고 있다 (Angermann and Jepsen 1991). 따라서 본 연구에서도 30 kGy의 선량을 이용하여 이종이식 재료로 잠재성이 높은 돼지 인대를 방사선을 조사할 경우, 바이러스의 통한 감염을 효과적으로 제어할 수 있을 것으로 사료된다.

3. 감마선 조사에 따른 돼지 인대의 인장강도 측정

앞선 결과에서 방사선 조사에 의한 돼지 인대의 미생물학적인 감수성에 관하여 평가하였고, 방사선 조사에 의해 박테리아 및 바이러스가 효과적으로 감소되는 것을 관찰 할 수 있었다. 그러나 고선량의 방사선을 조사할 경우 미생물학적인 안전성은 증가하지만 조직의 물리적인 강도를 약화시키는 결과를 초래한다. 따라서 방사선 조사에 따른 돼지 인대의 물리적인 강도를 조직의 인장력 측정을 통하여 알아보았다 (Fig. 3). 인장력 측정 결과, 비조사군 (control)의 인장력은 823.5±67.73 N으로 관찰되었으며, 30 kGy의 선량으로 방사선을 조사한 조사군의 인장력은 641.96±43.63 N으로 관찰되었다. 결국 멸균을 위한 방사선의 조사는 돼지 인대의 인장력을 20% 정도 감소시키는 것으로 관찰 되었으며, 이러한 물리적인 결손을 막기 위하여 최근의 연구에서는 Glucose, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC), Glutaraldehyde 등의 단백질 cross-linker들을 사용하여 단백질간의 결합을 강화하는 연구들을 수행되고 있으며 (Cheung and Nimni 1982; Reddy 2003; Powell and Boyce 2006), 본 연구에서도 안전한 이종이식재 개발을 위한 돼지 인대의 사용에 있어서, 미생물학적인 안전성뿐만 아니라 물리적 결손을 막기 대책이 필요할 것으로 사료된다.

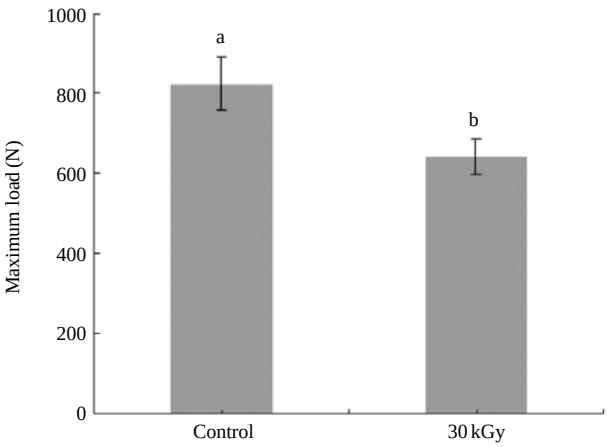

Fig. 3. Tensile strength of gamma irradiated (30 kGy) and non-irradiated porcine tendon (n=5). [a,b]Values with different letters differ significantly ($p < 0.05$).

결 론

본 연구에서는 안전한 조직이식재 개발을 위하여 인간조직과 유사성이 높은 이종조직인 돼지 인대를 사용하여 미생물학적인 안전성과 인장강도를 측정하였다. 미생물학적인 안전성 평가를 위하여 박테리아를 돼지 인대에 접종한 후 방사선을 조사하였을 때, D_{10}값은 DH5α는 0.32±0.082 kGy로 *B. substilis*는 4.00±0.312 kGy로 나타나 DH5α가 방사선에 대한 감수성이 높은 것으로 평가 되었으며, 바이러스를 대상으로 돼지 인대에 접종한 후 방사선을 조사하였을 때 poliovirus (PV)가 6.26±0.332 kGy, bovine viral diarrhoea virus (BVDV) 3.70±0.212 kGy 및 porcine parvovirus (PPV) 1.75±0.131 kGy로 관찰 되었으며, PPV, BVDV, PV순으로 방사선 감수성이 높게 나타났다. 또한 방사선 조사에 따른 물리적인 강도를 측정하였을 때 방사선 조사에 따라 인장력이 감소하는 것으로 관찰되어 안전한 이종이식재 개발에 있어서 이식재의 물리적인 강도 개선에 관한 연구가 반드시 필요할 것으로 사료되었다.

사 사

본 연구는 교육과학기술부 지원 원자력연구개발사업에 의해 수행되었으며 이에 감사드립다.

참 고 문 헌

Alanay A, Wang JC, Nick SA, Napoli A, Chen C and Tsou P. 2008. A novel application of high-dose (50 kGy) gamma irradiation for demineralized bone matrix: effects on fusion rate in a rat spinal fusion model. *Spine Journal* **8**: 789-795.

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.

Barrack RL. 2005. Bone graft extenders, substitutes, and osteogenic proteins. *J. Arthroplasty* **20**:94-97.

Burchardt H. 1987. Biology of bone transplantation. *Orthop. Clin. North Am.* **18**:187-196.

Cheung DT and Nimni ME. 1982. Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde II. Reaction with monomeric and polymeric collagen. *Connect. Tissue Res.* **10**(2):201-216.

Currey JD, Foreman J, Laketic I, Mitchell J, Pegg DE and Reilly GC. 1997. Effects of ionizing radiation on the mechanical properties of human bone. *J. Orthop. Res.* **15**:111-117.

Finkemeier CG. 2002. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J. Bone. Joint Surg. Am.* **84**(A):454-464.

Giannoudis PV, Dinopoulos H and Tsiridis E. 2005. Bone substitutes: an update. *Injury* **36**(S3):S20-27.

Glowacki J. 2005. A review of osteoinductive testing methods and sterilization processes for demineralized bone. *Cell Tissue Bank* **6**:3-12.

Hubble MJW. 2001. Bone transplantation. *Curr. Orthop.* **15**: 199-205.

IAEA. 1973. Manual on radiation sterilization of medical and biological materials. IAEA, Vienna.

Kitchen AD, Mann GF, Harrison JF and Zuckerman AJ. 1989. Effects of gamma irradiation on the human immunodeficiency virus and human coagulation proteins. *Vox. Sang.* **56**:223-229.

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, Jämsä 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.

Powell HM and Boyce ST. 2006. EDC cross-linking improves skin substitute strength and stability. *Biomaterials* **27**(34): 5821-5827.

Reddy GK. 2003. Glucose-mediated in vitro glycation modulates biomechanical integrity of the soft tissues but not hard tissues. *J. Orthop. Res.* **21**(4):738-743.

Reed LJ and Meunch HA. 1938. A simple method of estimating fifty percent end point. *Am. J. Epidemiol.* **27**:493-497.

Song HN and Lee JI. 2007. Comparison of efficacy of new bone formation according to implant treatment in xenograft transplanted for experimental bone defects of rabbits. *J. Vet. Clin.* **24**(3):350-357.

Sullivan R, Fassolitis AC, Larkin EP, Read RB Jr and Peeler JT. 1971. Inactivation of thirtyviruses by gamma radiation. *Appl. Microbiol.* **22**:61-65.

Tseng YL, Kuwaki K, Dor FJMF, Shimizu A, Houser SL, Hisashi Y, Yamada K, Robson Y, Awwad M, Schuurman HJ, Sacha DH and Cooper DKC. 2005. Alpha1,3-Galac tosyltransferase gene-knockout pig heart transplantation in baboons with survival approaching 6 months. *Transplantation* **80**:1493-1500.

Wang DZ, Skinner S, Elliot R, Escobar L, Salto-Tellez M, Garkavenko O, Khoo A, Lee KO, Calne R and Isaac JR. 2005. Xenotransplantation of neonatal porcine islets and Sertoli cells into nonimmunosuppressed streptozotocin-induced diabetic rats. *Transplant. Proc.* **37**:470-471.

Wientroub S and Reddi AH. 1998. Influence of irradiation on the osteoinductive potential of demineralized bone matrix. *Calcif. Tissue. Int.* **42**:255-260.

Manuscript Received: March 2, 2011
Revision Accepted: March 6, 2011