Journal of Radiation Industry 4 (4) : 381~384 (2010)

방사선 조사된 골수복제의 저장 안전성 평가

이학증 · 김재훈 · 김태운[1] · 이주운 · 최종일*

한국원자력연구원 정읍방사선과학연구소, [1]리온테크놀로지

Study on the Storage Stability of Xeno-Bone Graft Material by Irradiation

Hak-Jyung Lee, Jae-Hun Kim, Tae-woon Kim[1], Ju-Woon Lee and Jong-il Choi*

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

[1]*315, R&D Center, Jeonbuk Technopark, Jeonbuk 565-902, Korea*

Abstract - In this study, the microbial safety and mechanical properties of xeno-bone graft material irradiated were investigated during the storage. Xeno-bone graft of the deminerlized bone matrix in carboxy-methyl-cellulose was gamma-irradiated and was cultured in PCA and PDA agar to check microbial contamination. Total aerobic bacteria and fungi were not detected in the irradiated and non-irradiated sample stored in accelerator at 30˚C for 10 months. Viscosity of CMC treated gamma irradiation was also not changed by holding period.

Key words : Gamma irradiation, Viscosity, Carboxy-methyl-cellulose, Storage safety

서 론

방사선 기술을 이용한 미생물 멸균에 관한 선량은 1967년 IAEA에서 처음으로 보고되었다. 미국, 영국, 덴마크, 소련의 전문가들은 수술용 봉합사나 주사기와 같은 의료용품의 안전한 멸균을 위해서는 25 kGy의 선량이 필요하다고 보고하였다. 이어 1973년과 1990년에도 IAEA에서는 의료용 생물학적 재료의 멸균을 위해서는 25 kGy의 선량을 기준으로 제시하였다. 최근에는 2002년 IAEA, American Association of Tissue Banking (AATB), European Association of Musculo Skeletal Transplantation (EAMST) 등이 bone tissue의 미생물 멸균을 위해서는 최소 25 kGy의 dose를 제안하였다.

최근 각광받는 기술로 전자선은 감마선 조사에 버금가는 좋은 살균법으로 (Abramyan 1999), 비교적 짧은 시간, 높은 효과, 낮은 설치비용, 높은 에너지를 가지는 장점이 있다. CMC는 방사선 조사에 의해 화학적 변화가 일어나는 것으로 알려져 있다 (von Sonntag 2003). 높은 농도의 수용액 상태의 CMC는 hydrogel 형성을 위한 가교를 형성하며 (Fei *et al*. 2000; Liu *et al*. 2002), 낮은 농도에서의 CMC는 점성을 가지는 수용액을 분해하는 역할을 한다.

본 실험에 사용된 Carboxy-methyl-cellulose (CMC)는 glucopyranose monomer의 hydroxyl group 중 carboxy-methyl group 결합을 가지는 세포성 물질로서 (Sanford and Baird 1983), 산업에서 널리 사용되고 있다. 그 예로 식품 산업에서는 점증제와 결합제로 이용되고, 석유 산

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

업에서는 윤활유로, 우주 산업에서는 안정제와 결합제로 이용되는 등 매우 넓은 범위에서 사용되고 있다(Yang and Zhu 2007).

Bone Morphogenetic Protein (BMP)은 탈회골기질을 골격외 부위인 근육내나 피하에 이식하면 국소적으로 연골이나 골의 분화가 유도된다는 관찰을 통하여 골기질내에 성장과 분화인자가 존재함을 알게 되었고 Urist는 골형성을 일으키는 골유도인자인 BMP라 명명하였다. 이는 비특이성의 성장인자나 유사분열물질이 아닌 조직특이성을 가지고 있는 세포분화인자 혹은 형태발생인자로서 골조직이 손상을 받았다던지 이식되었을 때 또는 정상적인 골교체 시 비교원질성 단백복합체로부터 유리되어 골형성의 태생기 과정과 유사한 반응을 일으킨다는 가설을 정립하였다.

따라서 본 연구에서는 방사선원에 따른 골수복제의 멸균효과를 알아보았고, 저장기간에 다른 CMC의 점성의 영향 변화에 대해 연구하였다.

재료 및 방법

1. 골수복제 제조

골수복제는 carboxy-methyl-cellulose와 demineralized bone matrix을 질량 비율 7 : 3으로 혼합하여 제조하였다. Demineralized bone matrix의 제작 과정은 보고된 문헌을 사용하였다(REF). 구체적인 방법은 다음과 같다. Bone에서 muscle을 철저히 분리한 후 물로 세척한다. 뼈를 잘게 (1 × 3 cm) 자른 후 뼈가 충분히 잠기도록 95% ethanol을 가한 후 overnight하면서 탈수시킨다. Hood에서 1시간 동안 air drying 시킨 후 diethyl ether으로 약 6시간 동안 반응시키면서 defatting 한다. Defatting 후 1시간 동안 air drying 시키고, particle size가 150～710 μM이 되도록 다시 재 분쇄한다. H_2O_2 3% 5 ml g^{-1}를 가하여 분쇄한 뼈를 표백한다. 잔존 과산화수소가 없어질 때까지 충분히 물로 세척한 후 hood에서 하루 동안 air drying 시킨다. HCl 0.5 N 20 ml g^{-1}으로 3시간 동안 탈회 (demineralization) 시킨다. 탈회과정 후 phosphate buffered saline (PBS)를 이용하여 2～3회 세척하여 pH가 7.0～7.4가 될 때까지 중화시킨다. 중화 적정시 생기는 염을 DW를 이용하여 수차례 washing해 준 후 freezing drying 하여 본 실험에 사용하였다. CMC는 Sigma사에서 구입하여 실험에 사용하였으며, 방사선 조사를 위해 골수복제를 각각 10 g씩 취하여 멸균된 polyethylene bag (20 × 30 cm; Sunkyung, Seoul, Korea)에 넣은 다음 포장한 후 감마선 및 전자선 조사를 실시하였다.

2. 감마선 및 전자선 조사

감마선 조사는 한국원자력연구원 (Jeongeup, Korea) 내 선원 480 kCi, ^{60}Co 감마선 조사시설 (point source AECL, IR-79, MDS Nordion International Co. Ltd., Ottawa, ON, Canada)을 이용하여 실온 (14±1°C)에서 시간당 10 kGy의 선량율로 각각 0 및 30 kGy의 총 흡수선량을 얻도록 하였다. 흡수선량 확인은 alanine dosimeter (5 mm, Bruker Instruments, Rheinstetten, Germany)를 사용하였다. Dosimetry 시스템은 국제원자력기구 (IAEA)의 규격에 준용하여 표준화한 후 사용하였으며, 총 흡수선량의 오차는 2% 이내였다. 전자선 조사는 ELV4-electron accelerator (Energy 10 MeV, beam power 570 kW)를 이용하여 감마선 조사와 동일한 총 흡수선량을 갖도록 하였다. 이때 에너지는 10 MeV beam current 1 mA 였다. 그리고 낮은 투과력 때문에 CMC powder pack의 두께는 3 mm로 하여 조사하였다. 감마선 및 전자선 조사된 CMC powder는 실온에 저장하면서 실험에 사용하였다.

3. 미생물 검사

감마선 또는 전자선 조사된 골수복제를 물에 희석 시킨 후 혼합희석평판배양법에 의해 일반세균 생균수를 측정하였다. 즉, 시료 1 g을 멸균 peptone수 (0.1%, Difco Co., Detroit, USA) 9 ml에 부유시켜 Stomacher lab blender (model W, Interscience Co., Nom, France)에서 2분간 혼합한 다음 희석액 1 ml에 미리 준비한 50°C의 Plate Count Agar (PCA, Difco Co., Detroit, USA) 15 ml를 가하여 혼합하였다. 시료와 배지를 잘 섞은 후 굳혀 37°C에서 2일간 배양한 후 집락수가 30～300개가 형성된 평판배지의 것을 계수하여 시료 1 g당 colony forming unit (CFU g^{-1})으로 나타냈으며, 미생물 검출을 위한 최소 한계치는 10^1 CFU g^{-1}이었다. 한편, 효모 및 곰팡이는 단계별로 희석된 용액을 Potato Dextrose Agar (PDA, Difco Co., Detroit, USA)에 도말하여 25°C에서 5일간 배양한 후 집락수를 계수하였다. 또한 감마선 조사된 골수복제를 30°C의 가속저장 조건에서 10개월 보관한 후 물에 희석한 후 혼합희석평판배양법에 의해 일반세균 생균수를 측정하였다.

4. 점도 측정

감마선 및 전자선 조사에 의한 점도 변화 관찰을 위하여 CMC의 농도를 3%, Vitamin C, −70°C 조건에서 Viscometer (DV-II+pro, Drookfield Engineering Laboratories, MA, USA)로 200 rpm, 6번 spindle을 사용하여 측정하였다.

결과 및 논의

1. 방사선원에 따른 멸균 효과

본 실험에서 사용된 골수복제를 30 kGy의 선량으로 감마선이나 전자선으로 조사하여 혼합희석평판배양법에 의해 일반세균 생균수를 측정한 결과 일반호기성세균과 곰팡이나 효모에서 모두 균체가 검출되지 않았다(Table 1). 따라서 30 kGy의 선량에서는 감마선이나 전자선의 방사선종에 관계없이 미생물 들이 효과적으로 멸균된다는 것이 확인되었고, 30 kGy의 선량에서 미생물 멸균을 위한 선원별 차이는 없는 것으로 확인이 되었다.

Table 1. Microbial population (CFU g^{-1}) of xeno-bone graft treated with gamma irradiation.

Gamma irradiation	Total aecobic bacteria	ND[1)]
	Yeast & mold	ND
Electro beam irradiation	Total aecobic bacteria	ND
	Yeast & mold	ND

[1)] Viable cell was not detected at detection limit $< 10^1$ CFU g^{-1}.

2. 골수복제의 저장에 따른 미생물 안정성 평가

30 kGy의 감마선 조사된 골수복제를 30°C의 가속저장 조건에서 10개월 보관 후, 미생물의 오염도를 평가하였다(Fig. 1). 그 결과 일반 호기성 박테리아나, 곰팡이와 효모 모두 발견되지 않았다. 이러한 결과는 방사선 조사로 멸균된 골수복제 제품이 외부와의 접촉이 없는 일반적인 저장 조건에서 미생물에 의한 오염이 발생하지 않는다고 사료된다.

3. 저장 기간에 따른 CMC 점도의 영향 측정

감마선과 전자선 처리된 CMC의 저장 기간에 따른 Vitamin C 첨가와 온도에 따른 점도의 영향을 확인하였

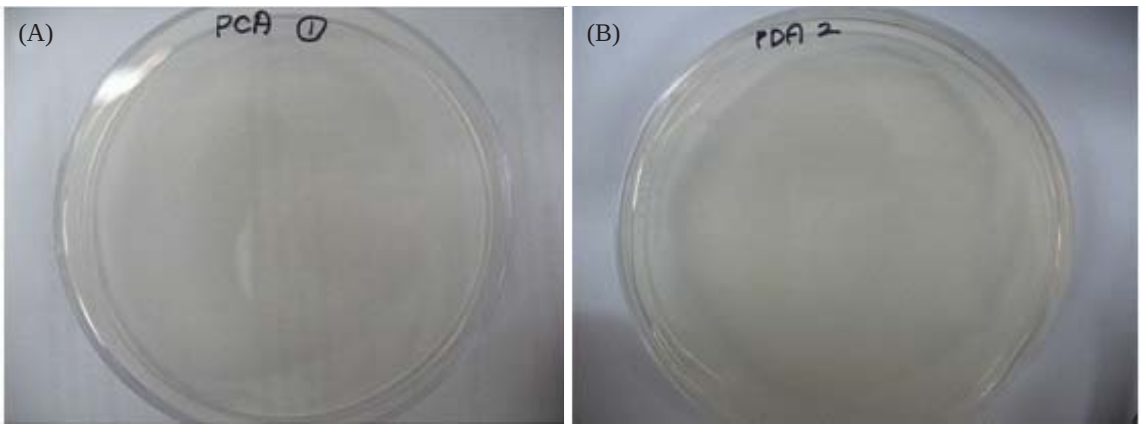

Fig. 1. Microbial test of 30 kGy gamma-irradiated xeno-bone graft in PCA agar and PDA agar condition after 10 month with irradiation treatment.

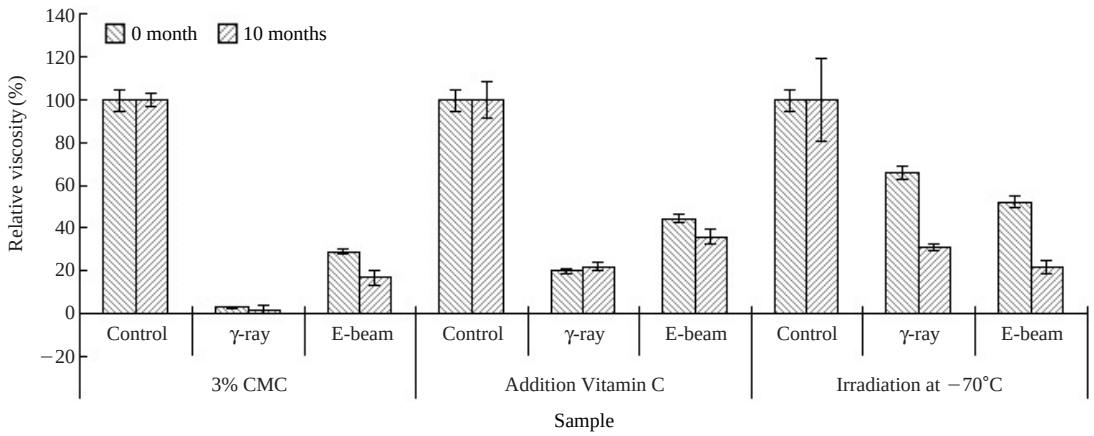

Fig. 2. Viscosity of gamma-irradiated and electron beam-irradiated CMC after 10 month with irradiation treatment.

다(Fig. 2). 저장 기간에 따라 방사선종에 따른 차이와 분해 저해를 위해 Vitamin C와 −70°C의 온도에서 얼려져 있는 상태의 조사에서 점도는 저장 기간에 따라 약간 감소하였으나 경향성은 크게 변하지 않는 것으로 확인되어졌다.

결 론

골수복제에 조사선원에 따른 혼합희석평판배양법에 의해 일반세균 생균수를 측정한 결과 방사선종에 상관없이 일반 호기성세균 및 곰팡이나 효모 모두 효과적으로 멸균된다는 것을 확인하였다. 이는 방사선 조사로 멸균된 골수복제 제품은 일반적인 저장 조건에서 외부 접촉이 없을 시 오염이 발생하지 않는다고 사료된다. 감마선 및 전자선 조사 후 저장 기간에 따른 점도의 영향을 확인한 결과 조사선원에 따른 CMC와 저해를 위한 Vitamin C를 처리하였을 때 저장 기간에 따라 전자선에 비해 감마선에서 더 감소하는 것을 알 수 있었고 −70°C의 온도에서는 저장 기간에 따라 약간 감소하였으나 경향성은 크게 변하지는 않는다는 것을 알 수 있었다. 이로 보아 멸균과 저장 안정성의 경향은 비슷하지만 전자선에 비해 투과력이 높은 감마선이 더 효과적이라고 사료된다.

사 사

본 연구는 한국원자력연구원 기본사업을 통해 수행되었으며, 그 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

Abramyan EA. 1999. Industrial electron accelerators and applications, *Springer-Verlag, Berlin* **26**(6): 1825-1828.

Ershov BG. 1998. Radiationechemical degradation of cellulose and other polysaccharides. *Russian Chemical Reviews* **67**(4): 315-334.

Fei B, Wach RA, Mitomo H, Yoshii F and Kume T. 2000. Hydrogel of biodegradable cellulose derivatives. I. Radiation-induced crosslinking of CMC. *J. Appl. Polymer. Sci*. **78**:278-283.

Liu P, Zhai M, Li J, Peng J and Wu J. 2002. Radiation preparation and swelling behavior of sodium carboxymethyl cellulose hydrogels. *Radiation Phys. Chem*. **63**:525-528.

Sanford PA and Baird J. 1983. Industrial utilization of polysaccharides. pp. 411-490. *In*: The polysaccharides (Aspinall GA *ed*.), Academic Press, New York.

Santa-Comba A, Pereira A, Lemos R, Santos D, Amarante J and Pinto M. 2001. Evaluation of carboxymethylcellulose, hydroxypropylmethylcellulose, and aluminum hydroxide as potential carriers for rhBMP-2. *J. Bio. Mater. Res*. **55**:396-400.

Vieira FF and Del Mastro NL. 2002. Comparison of gamma irradiation and electron beam irradiation effects on gelatin. *Radiation Phys. Chem.* **63**(3-6):331-332.

Wach RA, Mitomo H, Yoshii F and Kume T. 2001. Radiation crosslinking of carboxymethylcellulose of various degree of substitution at high concentration in aqueous solutions of natural pH. *J. Appl. Polym. Sci*. **68**:771-779.

Yang XH and Zhu WL. 2007 Viscosity properties of sodium carboxymethylcellulose solutions. *Cellulose* **14**(5):409-417.

Manuscript Received: November 30, 2010
Revision Accepted: December 6, 2010