

동종조직에서의 방사선 멸균효과에 대한 연구

이은영^{1,4,5} · 김성진^{2,4} · 박우윤^{3,4} · 김경원^{1,4} · 엄인웅⁵ · 류주연⁵
충북대학교 의과대학 ¹구강악안면외과학교실, ²진단방사선과학교실,
³치료방사선과학교실, ⁴의학연구소, ⁵한국조직은행

Abstract

THE EFFECT OF STERILIZATION OF GAMMA IRRADIATION ON ALLOGENEIC TISSUE MATERIALS

Eun-Young Lee^{1,4,5}, Sung-Jin Kim^{2,4}, Woo-Yoon Park^{3,4}, Kyoung-Won Kim^{1,4}, In-Woong Um⁵, Ju-Youn Ryu⁵

¹Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery, ²Dept. of Radiology,

³Dept. Radiation Oncology, College of Medicine and ⁴Medical Research Institute, Chungbuk National University, ⁵Korea Tissue Bank

Allograft donations are commonly found to be contaminated. The most of tissue banks has promoted the use of ionizing radiation for the sterilization of biological tissues. The potential for transmission of human infectious diseases and contamination of microorganism has created serious concern for the continued clinical use of hard and soft-tissue allografts. Tissue banks have employed 15-25kGy for sterilization of hard and tendon allografts, which, according to the national standards, approaches the level at which the tissue quality is adversely affected for transplantation.

The donations of allogeneic tissues to the Korea Tissue Bank over a 2-year period were reviewed, and the incidence and bacteriology of contamination were detailed. Clinical outcomes were determined for donors who had positive cultures at the time of retrieval and during the processing and they were compared with those of post sterilization.

After exposure of the frozen block bone to 25kGy and the processed tissues to 15kGy of gamma irradiation, the authors were able to demonstrate complete inactivation of the bacteria. The aim of this study was to obtain the effects of gamma irradiation and the irradiation dose according to the type of tissue, through conventional microbiologic test without on influence of biocompatibility in allografts.

The contamination rate after the final irradiation sterilization is 0% in the processed allografts. This may be due to the fact that the gamma radiation and processing steps are effective to control contamination.

Key words : Gamma irradiation, Irradiation dose, Processed tissues

1. 서 론

조직은행의 목적은 동종조직을 수혜 받는 환자와 수술하는 의사에게 안전한 조직을 공급하는 것이다. 조직은행의 설립과 조직처리기술의 발달로 여러 외과분야에서 재건을 위한 동종조직의 사용은 점차 증가하는 추세이다. 동종조직

사용에 있어 질병의 전이와 기증자로부터 또는 조직의 채취 및 처리 시 발생 가능한 세균의 오염에 의한 합병증 발생에 대한 많은 고찰이 있었다^{1,2)}.

보다 안전한 동종조직의 사용을 위해 이식용으로 선택하기 위한 규정, 즉 기증자 선별검사와 안전한 조직 처리 및 멸균방법이 발전하게 되었다. 간염과 에이즈 같은 전염성

※ 이 논문은 2005년도 충북대학교병원 연구비에 의하여 연구되었음.

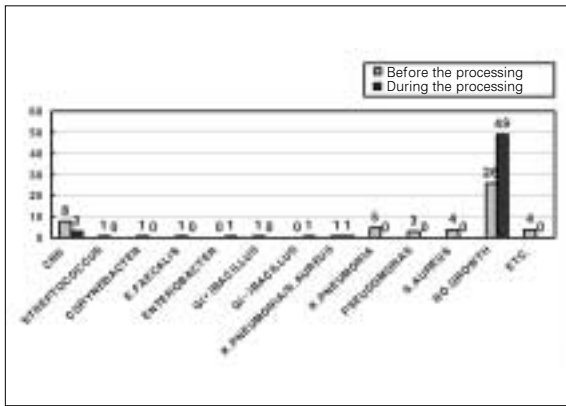


Fig. 3. Micro-organisms isolated from Tissues during the processing (Freeze-Dried).

할 수 있었으나 Enterobacter, G(-) Bacillus 등은 처리과정중에 나타나지 않은 균종이 처리 후 배양된 것으로 보아 처리과정 중 오염이 발생했음을 알 수 있었고, 처리 전에도 확인되었던 K. Pneumonia, S. aureus 등의 일부 세균이 처리 후에도 잔존함을 확인하였다(Fig. 3). 냉동 건조과정 후 최종포장을 완성한 뒤에 15kGy 방사선멸균 조사를 시행하였고 최종세균배양 검사에서 모두 음성 반응을 보여 효과적으로 멸균되었음을 확인하였다. 최종 분배되는 조직은 최종 멸균후 세균배양 검사를 실시하여 음성을 확인한 뒤 분배, 이식이 가능하다.

IV. 총괄 및 고찰

19세기 말에 방사선의 살균작용이 발견되면서 방사선의 산업적 효용성이 검토되었으며, 1956년부터 의료용구의 멸균에 상용화되었다. 1958년 Vries 등은 동종골의 멸균에 방사선조사법의 효용성에 대해 발표하였으며 이후 HIV 등의 전염성 질환의 전이 방지에 대한 효과가 연구되면서 최근에는 미국조직은행연합회, 유럽조직은행연합회, 아시아 태평양조직은행연합회(IAEA 지원) 등에서 동종조직 멸균의 방법으로 널리 사용되고 있다³⁾.

멸균(sterilization)은 대상의 표면 또는 내부에 분포하는 모든 세균이 사멸되어 무균의 상태로 만드는 과정을 말하며, 소독(disinfection)이라 함은 대상의 표면 또는 내부에 있는 병원성 미생물을 죽이거나 불활성시켜 감염력을 억제하여 안전한 상태를 만드는 과정이다. 멸균의 정도는 대상에 생존이 추정되는 오염균의 최대 생존확률로 나타내며, 무균성 보증수준(sterility assurance level: SAL), 10^{-6} 으로 표현된다. 신체에 직접 접촉되거나 이식되는 의료용구에 대해서는 10^{-6} 의 SAL이 요구된다. 의료용구 멸균에 대한 국제기준에 있어서 감마선 멸균법의 특징은 멸균 후 멸균을 확인하는 B.I(Biological Indicator) Test 및 멸균검사

(Sterility Test)를 실행할 필요가 없다(ISO11137 B.3.5.5 참조). EO 가스 멸균 및 Steam (Autoclave) 멸균은 매 멸균처리 배취별로 B.I 및 멸균 검사를 실행하는 반면 방사선 멸균 조사의 경우 선량측정(Dosimetry) 결과만으로 멸균을 보증할 수 있다⁴⁾.

그러나 의료용구와 달리 인체조직이식재의 경우 방사선멸균의 효과와 더불어 조직 성상의 변화를 최소화해야 하므로 가장 적절한 조사선량을 결정하는 것은 안전하고 질높은 이식재를 처리해야 하는 조직은행의 중요 관심사이다. 세균을 사멸시키기 위해 많은 양의 방사선 조사를 하는 것이 요구될 수 있으나 이 경우 물리적 강도 저하 및 이식재의 생물학적 특성에 영향을 주어 이식 후 자가조직과의 융합에 장, 단기적으로 영향을 미칠 수 있기 때문이다.

일반적으로 멸균 시 15~25kGy정도의 방사선량을 적용시키는데 이러한 방사선 조사 시 미생물 세포내에서 전리와 여기 작용에 의해 미생물의 생체분자 절단과 라디칼 생성, 소멸반응이 일어나 죽게 된다. 즉 멸균의 효과를 위해선 15~25kGy정도의 방사선량이 필요하며, 방사선 멸균 시 환경은 상온, 상압, 공기의 존재 하에서 이루어지므로 고온, 고압을 필요하지 않아 온도에 영향을 받은 골형성유도단백(Bone Morphogenic Protein; BMP)의 손실이 없어 뼈의 멸균에 효과적으로 알려져 있다.

뼈조직의 경우 최종멸균법으로 사용하는 방사선 조사는 일반적 지침사항이나 여러 조직은행에서 시행하는 방사선 조사의 환경은 다양하다. 미국조직은행연합회(AATB)의 경우 최종 조직멸균을 위해 감마 방사선이나 electron beam 방사선을 사용하도록 권고하고 방사선 조사의 과정은 모두 처리서류에 기록하도록 하고 있다. 방사선 조사 후 최종 분배 전에 10% destructive sterility 검사 또는 100% 스왑 검사를 시행하고 AAMI(Association for the Advancement of Medical Instrumentation)의 지침사항을 따르도록 명시하였다. Bacillus pumilis 포자를 이용한 세균학적 평가를 하며 최소 조사량을 15kGy로 규정하였다⁵⁾. 아시아 태평양 지역에서 주로 채택하고 있는 IAEA 지침서에서는 이온화 방사선(ionizing irradiation)조사법을 사용하여 세균의 소독(decontamination)을 위해선 15kGy, 세균의 멸균(sterilization)을 위해 25kGy를 규정하고 있다. 바이러스 멸균(virus inactivation)에 대해선 영향을 미치는 요인이 다양하므로 보다 많은 조사량을 명시하였으나 아직 추천 조사량을 결정하고 있지 않다⁶⁾. 유럽조직은행지침서(EATB)와 한국조직은행 지침서에서도 방사선 조사법을 이식재의 최종 멸균법에 포함시키고 있다⁷⁾.

조직은행에서 방사선 멸균법을 채택 시 멸균효과와 더불어 생체조직의 성상 및 효능의 보존에 대한 고려를 해야 한다. 조직은행에서 사용하는 방사선조사량에 따라 저장골의 강도에 영향을 받는데 20~30kGy까지는 비교적 물리적 강

도의 변화가 없다고 보고되어 있고 골극과 염전 강도가 90%까지 유지된다고 한다. 30kGy 이상인 경우 이식골의 50~70%까지 감소하며 60kGy의 경우 압축강도는 80%, 염전강도는 65% 감소한다고 보고되었다⁸⁾.

대퇴골이나 경골과 같이 골연부(osteochondral side)를 이식하는 경우 물리적 강도의 유지는 필수 사항이며, 적절한 강도를 유지할 수 있도록 초저온 냉동상태 또는 신선 냉장상태로 이식수술이 시행되기 때문에 물리적 강도를 유지할 수 있는 방사선 멸균조사가 효과적이다. 방사선 멸균조사의 경우 실온 또는 냉동상태로 시행되는데 방사선 조사 시 수분이 함유된 경우 프리라디칼이 발생되며, 경조직의 경우 프리라디칼에 의해 콜라겐 알파체인이 파괴되면서 물리적 강도가 약화될 수 있다. -78℃이하의 냉동상태인 경우 물분자의 이동이 정지되어 프리라디칼이 발생이 감소함으로써 실온상태로 시행하는 경우보다 경조직의 물리적 강도에 미치는 영향이 적어진다⁹⁾.

이와 같이 냉멸균의 장점이 있어 물리적 강도가 필수적인 덩어리 뼈로 사용되는 단순 초저온 냉동골의 멸균에 사용되며, 밀봉포장상태로 멸균을 실시하므로 멸균과정중의 오염을 최소화 할 수 있다. 본 연구에서도 물리적 강도가 중요시되는 경조직의 경우 국제조직은행지침서에 명시된 25kGy를 조사하면서 -80℃의 초저온 냉동상태를 유지하였으며 멸균 전에 발견된 여러 종류의 미생물이 뼈의 물리적 강도의 손실 없이 멸균되었음을 확인 할 수 있었다.

단순 초저온 냉동법에 의한 조직 처리와 함께 동종 조직의 항원성을 제거하기 위해 골수와 혈액을 제거하고, 시약을 통해 탈수와 탈지 및 무기물 제거 등을 시행 후 냉동건조를 하는 처리방법이 흔히 사용되는 조직은행술식이다. 동결 건조한 경우 30~35kGy의 방사선 조사에 의해 염전 강도가 70%까지 감소한다고 보고되었다⁸⁾. 그러나 냉동건조를 하는 골이식재의 경우 대부분 분말형태나 칩형태로 처리되어 결손부의 필러(filler)역할을 하므로 방사선 멸균조사 시 물리적 강도보다는 골유도능에 미치는 영향을 고려해야 한다. 본 연구에서는 세척과 시약처리 후 냉동건조를 시행한 이식재에 대해서 국제조직은행지침서상에 명시된 최저 방사선 조사량인 15kGy를 조사하여 처리전과 처리 후 발견된 미생물의 효과적 멸균을 확인할 수 있었다. 시약 및 냉동건조

처리된 이식재의 골유도능에 대한 가도 두개골의 이식수술에서 양호한 골형성을 확인하여 골유도능의 보존과 미생물의 멸균을 효과적으로 수행할 수 있는 방사선량을 확인하였다¹⁰⁾.

최근에 냉동건조된 조직이식재의 품질 관리(quality control)를 위해서 일반적인 에틸렌 옥사이드 가스(ethylene oxide gas)소독보다는 방사선을 이용한 멸균법의 우수성이 추천되고 있고, 탈무기질화 및 항생제 추가가 시도되고 있고, 또한 방사선으로 재 멸균하여 무균상태 하에서 사용하는 것이 효과적이고, 방사선으로 멸균하여 1년이 경과한 칩본(chip bone) 및, 근막(fascia lata)이 조직 적합성이 높음이 보고되었다¹¹⁾.

저장된 냉동골의 골수에 존재하는 많은 양의 지질이 방사선멸균 후 osteoblast-like cell에 유해한 영향을 미친다는 보고가 있어 동종골 처리과정 중의 지방제거가 동종골의 생체적합성에 유효함이 입증되었다¹²⁾. 이식재의 지질을 제거하는 처리과정이 시행되는 경우와 이식재의 성상 및 처리 전 오염도 측정 하에 방사선 조사량의 변화를 줄 수 있다는 가정 하에 본 연구에서는 15kGy를 처리조직의 방사선 조사량으로 결정하여 시행한 결과 멸균상태를 확인할 수 있었다.

방사선 멸균조사 전부터 사용되어온 에틸렌 옥사이드(ethylene oxide: EO)는 약 60년의 역사를 가지고 있으며, 낮은 온도와 습도 하에서 의료용구의 멸균뿐만 아니라 조직은행에서 조직의 멸균에도 상용되어 오고 있다. 일정한 습도(40~100% RH) 및 온도(40~60℃)의 EO가스에 수 시간 이상 노출시킴으로써 미생물을 구성하는 단백질 말단기(-OH, -SH, -COOH, -CHO, -NH₂)에 hydroxy기(-CH₂CH₂OH)형태로 반응하여 미생물을 살균키는 방법으로 이들은 금속염화물 또는 염산과 반응하여 ethylene chlorohydrin(ECH)을 생성하고 물과 반응하면 ethylene glycol(EO)을 생성하여 강력한 살균력과 함께 강한 독성을 지니고 있다. 그러나 EO가스는 점막과 피부에 대해 자극성, 용혈성, 세포변이성이 있어 미국조직은행연합회에서는 EO가스를 이용하여 생체조직을 멸균시 EO 가스잔존수치한계를 지킬 것을 규정하고 있다⁵⁾(Table 1).

세균의 멸균뿐만 아니라 이식 골 조직의 바이러스 비활성화시키는 방법으로 감마선 조사 멸균법(25kGy)외에, 증

Table 1. Residual level in Parts per Million of Ethylene Oxide

Tissue Size/Weight	Ethylene oxide	Ethylene chlorohydrin	Ethylene glycol
Very Small (<100mg)	2500	2500	5000
Small(<10 grams)	250	250	5000
Medium(10~100 grams)	100	100	2000
Large(>100grams)	25	25	500

provided by AATB Standards

기 가열 처리(82.5℃/154min)와 화학적인 멸균법-Peracetic Acid-Ethanol 처리법 (PES, 2% peracetic Acid, 96% Ethanol, Aqua[2:1:1], 200mbar, 교반, 4시간)이 있으나, EO가스의 잔존가능성 및 이식재 성장 및 물리적 강도 보존에 용이한 방사선 조사법의 바이러스 멸균에 대한 연구가 활발히 진행됨에 따라 방사선 멸균조사의 효용성은 더욱 확대되었다¹³⁾.

V. 결 론

멸균 방법 중의 하나로 사용되어온 방사선 조사법은 오랫동안 의료계에서 상용되어왔고 국제 조직은행 지침서에도 최종 멸균법의 하나로 소개되어 있다. 조사량은 지침서 별로 상이하나 대부분 15~25kGy를 추천하고 있으나 조직은행의 이식재 처리기술이 날로 변화되고 향상됨에 따라 멸균의 효과뿐만이 아니라 이식재의 특성을 보존하면서 멸균될 수 있는 적절한 조사량을 규정해야 하는 필요성이 대두되고 있다.

현재 세균의 멸균을 위해서 제시되고 있는 조사량과 바이러스 사멸을 목적으로 제시되고 있는 조사량은 차이가 있으며 본 연구에서는 이식재 처리 방법에 따른 세균 멸균을 중심으로 하는 조사량의 결정에 대해 1년 8개월간의 이식재 멸균과 세균배양 검사에 대한 조사를 시행하였다. 덩어리 뼈로 골수와 혈액의 완전한 제거가 용이하지 않는 골연부 이식재에 대해선 -80℃의 냉동상태로 25kGy의 방사선을 조사한 경우 물리적 강도의 약화 없이 효과적으로 멸균상태를 유지 할 수 있었다. 세척과 시약처리를 통해 감염원이 되는 골수와 혈액을 제거하고 경조직의 경우 시약 사용으로 지질을 제거하고 냉동건조를 하는 처리방법을 선택한 경우 15kGy의 조사량으로 충분한 세균의 멸균 상태를 확보할 수 있었기에 보고하는 바이다.

향후 바이러스 사멸에 관한 실험과 연구 조사가 필요하리라 사료된다.

참고문헌

1. Eun-Young Lee : Interpretation of bacterial contamination of allogeneic tissues obtained from cadaveric and living donors. JKAOMFS 1 : 31, 2005.
2. Tomford WW, Thongphasuk J, Mankin HJ et al : Frozen musculoskeletal allografts. A study of the clinical incidence and causes of infection associated with their use. J Bone Joint Surg(Am) 72-A(8) : 1137, 1990.
3. de Vries P, Budgley CE, Hanman J : Radiation sterilization of homogeneous bone transplants utilizing radioactive cobalt. J Bone Joint Surg (Am) 40 : 187, 1958.
4. Hernigou : Allograft Sterility as Exemplified by Human Immunodeficiency Virus and Sterilization by Irradiation. The Journal of Arthroplasty 15 : 8, 1051, 2000.
5. Woll JE, Kasprisin D : American Association of Tissue Banks, Standards for Tissue Banking, 9th ed, Virginia, AATB, 2001, p.55.
6. IAEA : IAEA International Standards for Tissue Banks, 2002, p.37.
7. Eun-Young Lee, In-Woong Um : Technical Manual, 3rd ed, Seoul, KTB, 2001, p.31.
8. Shon WY : Biomechanical Behavior of Bone Grafts. JKMTTS 1(2) : 110, 2001.
9. Hamer AJ, Stockley I, Elson RA : Changes in allograft bone irradiated at different temperatures. J Bone Joint Surg(Br) 81-B 342, 1999.
10. Eun-Young Lee, In-Woong Um, Jong-Ho Lee : The experimental study of osteoinduction capacity of hBMP-I. Dental Profession 4 : 55, 2002.
11. Petri WH, Schaberg SJ : The effect of antibiotic-supplemented bone allografts on contaminated, partially avulsive fractures of canine ulna. J Oral Maxillofac Surg 42 : 631, 1984.
12. Moreau M F, Gallois Y, Basle M et al : Gamma irradiation of human bone allograft alters medullary lipids and releases toxic compounds for osteoblast-like cells. Biomaterials 21 4 : 369, 2000.
13. Campvell DG, Peng Li, Stephenson AJ et al : Sterilization of HIV by Gamma Irradiation. A Bone Allograft Model. International Orthopaedics 18. 172, 1994.

저자 연락처

우편번호 361-711
 충북 청주시 흥덕구 개신동 62번지
 충북대학교 의과대학 구강악안면외과학교실
이은영

원고 접수일 2005년 5월 21일
 게재 확정일 2005년 9월 4일

Reprint Requests

Eun-Young Lee

Dept. of OMFS, College of Medicine and Medical Research Institute,
 Chungbuk National University
 Gaeshin-dong 62, Heungdeok-gu, Cheongju, Chungbuk 361-711, South Korea
 Tel: 82-43-269-6296
 E-mail: ley926@chungbuk.ac.kr

Paper received 21 May 2005
 Paper accepted 4 September 2005