

바이러스 안전성이 보증된 무세포 소 양막 생물창상피복재 제조 공정 개발

배정은¹ · 김찬경¹ · 김성포² · 양은경² · 김인섭^{1*}

¹한남대학교 생명·나노과학대학 생명과학과 & 바이오의약품안전성검증센터, ²(주)바이올랜드 조직공학연구소

Process Development of a Virally-Safe Acellular Bovine Amniotic Membrane for Biological Dressing. Bae, Jung Eun¹, Chang Kyong Kim¹, Sungpo Kim², Eun Kyung Yang², and In Seop Kim^{1*}. ¹Department of Biological Sciences & Center for Biopharmaceuticals Safety validation, Hannam University, Daejeon 305-811, Korea, ²R&D Center, Bioland Co. Ltd, Cheongwon 363-885, Korea – A process for manufacturing virally-safe bovine amniotic membrane(BAM) has been developed for biological dressing. BAM was harvested from a healthy bovine placenta, and then the epithelium was removed. The remaining stromal layer was consecutively disinfected with 70% ethanol and 0.05% sodium hypochlorite. The stromal layer was incubated in a decellularization solution containing 0.25%(w/v) trypsin to remove the cellular components. The resulting acellular BAM was lyophilized to preserve its biochemical and structural integrity. The BAM was packed and exposed to 25 kGy of gamma irradiation for sterilization purpose. Histological, electron microscopical, and biochemical observations showed that the acellular BAM had intact structural integrity of three dimensional collagen fibers and contained several growth factors, accelerating wound healing, such as EGF (Epidermal growth factor), KGF (Keratinocyte growth factor), and FGF (Fibroblast growth factor). Bovine herpes virus (BHV), bovine viral diarrhoea virus (BVDV), bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV-3), and bovine parvovirus (BPV) were chosen as the biological indicators for validation of viral safety of the acellular BAM. Samples from relevant stages of the production process were spiked with each virus and subjected to viral inactivation processes. Viruses were recovered from the samples and then titrated immediately. All the viruses tested were completely inactivated to undetectable levels within 1 h of 70% ethanol treatment. Enveloped viruses such as BHV, BVDV, and BPIV-3 were more effectively inactivated than BPV by 0.05% sodium hypochlorite treatment. BHV, BVDV, and BPIV-3 were completely inactivated to undetectable levels by 25 kGy of gamma irradiation. Also BPV was effectively inactivated by 25 kGy of gamma irradiation. The cumulative log reduction factors of BHV, BVDV, BPIV-3, and BPV were ≥ 13.30 , ≥ 14.32 , ≥ 15.22 , and ≥ 7.57 , respectively. These results indicate that the production process for acellular BAM has a sufficient virus-reducing capacity to achieve a high margin of the virus safety.

Key words: Acellular bovine amniotic membrane, biological dressing, decellularization, virus inactivation

서 론

양막은 태반을 이루는 여러 층 중의 하나로서, 상피재생을 촉진하고 염증반응을 억제하는 성분을 가지고 있는 얇은 막 같은 조직이다. 양막은 epidermal growth factor와 vascular endothelial growth factor와 같은 성장인자를 함유하고 있어 다양한 의학용 소재로 이용되고 있다. 양막은 안과영역에서 지속적 각막상피 결손, 감염성 각막궤양, 깊은 각막궤양과 각막천공, 공막연화증과 공막궤양, 띠각막병증, 재발된 군날개 및 거짓군날개, 결막종양, 반흔, 눈꺼풀유착 등의 치료를 위해 이식되고 있다. 또한 양막은 복부 암이나

구강 내 암 등에서 암을 제거한 후 장 유착 방지나 구강 내 창상 치료 및 감염 방지를 위한 이식에도 사용된다. 양막은 상피줄기세포의 수명을 연장시키고 세포 고유의 특성을 유지시켜주는 역할을 하므로 줄기세포를 제외 배양하기 위한 주형 겸 운반체로 사용될 수 있다[7, 8, 20, 24, 28]. 본 연구에서는 양막을 이용한 상처치유능이 있는 조직적합 생물창상피복재 제조공정을 확립하고자 하였다.

사람 양막을 재료로 생물창상피복재를 개발할 경우 여러 가지 문제점을 해결하여야 한다. 첫째, 이식을 위해 사용하는 사람 양막은 기증자로부터 수혜자에게 바이러스, 세균, 진균과 같은 감염성 위해인자를 전파할 위험이 있다[5, 16, 18, 19, 26]. 둘째, 사람 양막은 기증자가 부족하고 양막의 크기가 작아서 넓은 면적의 창상 및 화상에 사용하기가 어렵다. 셋째, 사람 양막은 매우 얇고 약하여 가공하기가 쉽지 않다. 넷째, 사람 양막의 사용은 법적·종교적 문제를 야기

*Corresponding author

Tel: 82-42-629-8754, Fax: 82-42-629-8751

E-mail: inskim@hnu.kr

하여 사용이 제한될 수 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해 사람 양막에 비해 면적이 10배이며, 두께가 1.5~2배이고 인장강도와 신축성이 높은 소 양막을 재료로 생물창상피복재를 개발하고자 하였다. 선행연구 결과 면역반응을 일으킬 수 있는 세포들을 제거한 무세포 소 양막을 2도 화상을 유발시킨 돼지 피부에 이식할 경우 사람의 양막과 유사한 치유효과를 나타냄을 확인하였기 때문이다[25].

소 양막을 이식용 재료로 사용할 경우에 해결해야 할 가장 큰 문제는 이종 유래 바이러스에 의한 감염문제이다. 또한 소 양막의 3차원 구조를 그대로 유지하면서 면역거부반응을 일으키는 소 양막 내 세포들만 완벽하게 제거하는 공정의 개발이 필요하다. 이를 위해 소의 양막으로부터 효소(트립신)를 이용하여 콜라겐 이외의 불순물을 제거한 무세포 소 양막 제조 공정을 확립하였다. 또한 환부에 직접 부착이 편리하게 필름형태로 동결건조한 재형의 창상피복재 공정을 확립하였다. 이종 조직에 오염될 가능성이 있는 감염성 위해인자에 대한 안전성을 보증하기 위하여 소 양막의 화학적 구조와 물성에 영향을 미치는 않는 70% 에탄올 소독공정, 0.05% sodium hypochlorite 처리공정, 감마선 조사 멸균공정을 확립하였다. 또한 bovine herpes virus(BHV), bovine viral diarrhoea virus(BVDV), bovine parainfluenza virus type 3(BPIV-3), bovine parvovirus(BPV)를 생물학적 지표로 사용하여 바이러스 불활화 효과를 검증하였다.

재료 및 방법

무세포 소 양막 제조 공정

가축위생시험소의 가축전염병 및 인수공통전염병 관리를 받은 소의 태반을 사용하여 무세포 양막 제조공정을 확립하였다(Fig. 1). 입고된 건강한 소의 태반으로부터 양막을 분리하고, 상피층을 제거한 후 70% 에탄올에 하루이상 침지하였다. 멸균된 초순수로 세척을 하여 에탄올을 제거한 후 0.05% sodium hypochlorite로 30분간 처리하였다. 상피를 제거하고 남은 stromal layer에서 면역거부반응을 일으키는 세포를 제거하기 위해 세포제거용액[0.25%(w/v) trypsin, 0.02%(w/v) EDTA, 0.9%(w/v) NaCl, pH 7.4]에 60분 동안 처리하였다. 세포제거가 끝난 후 멸균된 초순수로 세척을 하여 세포제거용액을 제거하였다. 무세포 소 양막의 보존 및 보관과 환부에 직접 부착이 편리하도록 필름형태로 동결건조를 하였다. 최종제품을 생산하기 위해 동결건조한 무세포 소 양막을 포장지에 넣어 포장한 후 25 kGy 감마선 조사 멸균공정을 실시하였다. 70% 에탄올 소독공정, 0.05% sodium hypochlorite 처리공정, 감마선 조사 멸균공정에 의한 바이러스 불활화 효과를 검증하기 위해 무세포 소 양막 제조공정에서 각 단계별 조직을 확보하였다.

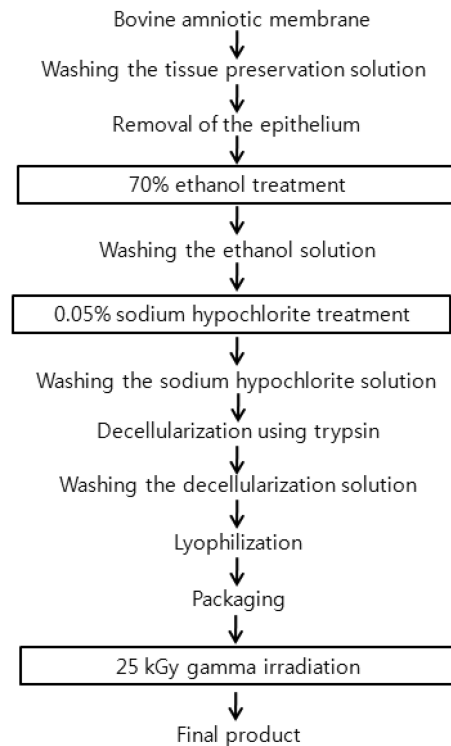


Fig. 1. Flow diagram of manufacturing process for acellular bovine amniotic membrane. The boxes indicate the validation steps evaluated for virus inactivation.

조직학적 검사

무세포 소 양막 제조공정을 통해 생산된 무세포 양막에서 기질층 매트릭스의 미세 구조 변화가 있는지와 세포가 제거되었는지의 여부를 확인하기 위해서 조직학적 평가를 실시하였다. 정상 소 양막과 무세포 소 양막의 세포 배열과 형태학적 변화를 비교하기 위해 핵과 세포질을 구분해서 볼 수 있는 H&E(hematoxylin and eosin) 염색을 하였다. 조직을 10% 포르말린에 넣고 고정시킨 다음, 파라핀에 침지시켰다. 침지되어 고정된 조직을 4 μm 두께로 절편하여 슬라이드를 제작하였다. Xylene을 이용하여 파라핀을 제거하고 다시 무수알코올로 xylene을 제거하였다. 100%, 95%, 80%, 70% 에탄올에 각각 1분간 처리하고 증류수에 10분간 넣어 수화과정을 마친 뒤 hematoxylin으로 핵을 염색하였다. 다시 흐르는 물에 1분간 슬라이드 뒷면을 대고 세척하였다. 70% 알코올을 처리한 뒤 5분간 흐르는 물에 슬라이드 뒷면을 대고 세척하였다. Eosin 염색을 3분간 하고 10초간 흐르는 물에 세척하였다. 70%에서 100% 알코올로 순차적으로 탈수를 하고 canada balsam으로 고정한 후 현미경으로 관찰 및 촬영을 하였다.

전자현미경 분석

무세포 소 양막 제조공정을 통해 생산된 무세포 양막 표면과 단면의 구조를 전자현미경으로 관찰하였다. 4% 글루타르 알데하이드와 2% 포르름 알데하이드로 조직을 고정한 뒤

2% 오스뎀 테트록사이드로 재고정하였다. 재고정된 조직을 탈수한 후 주사전자현미경으로 관찰하였다.

성장인자(Growth factor)의 정량 분석

무세포 소 양막 제조공정을 통해 생산된 무세포 양막에 정상 소 양막에 존재하는 성장인자가 얼마나 보존되는지를 확인하기 위해 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 방법을 통한 EGF(Epidermal growth factor), KGF(Keratinocyte growth factor), FGF(Fibroblast growth factor) 정량 분석을 하였다. 성장인자 정량분석을 위해 각 양막의 무게를 달고 인산완충용액으로 성장인자들을 추출하였다. 추출물을 15,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 상층액을 취하였으며, 상층액에 존재하는 EGF, KGF, FGF를 검출키트(Quantikine, R&D systems, Minneapolis, USA)를 사용하여 정량하였다. Sunrise absorbance reader(A5082, Tecan, Austria)를 이용하여 흡광도 540 nm에서 검출키트에 의한 반응을 측정하였다. 농도를 알고 있는 성장인자 표준품(Koma Biotech, Inc, Seoul, Korea)을 사용하여 정량곡선을 작성한 후 각각의 성장인자의 양을 결정하였다.

바이러스 배양 및 정량

본 연구를 위해 사용한 바이러스들의 특성은 Table 1과 같다. BHV(ATCC VR-188), BVDV(ATCC VR-534), BPIV-3(ATCC VR-281), BPV(ATCC VR-767)의 배양과 정량을 위해 Madian-Derby bovine kidney cell(MDBK; ATCC CRL-22), bovine turbinate cell(BT; ATCC CRL-1390), vero cell(ATCC CCL-81), EBTr cell(ATCC CCL-44)를 각각 사용하였다[15, 17]. 각 세포들은 10% FBS를 첨가한 Dulbecco's Minimum Essential Medium(DMEM; Gibco BRL, Gaithersburg, USA)에 배양하였다. 바이러스 배양을 위해서는 2% FBS가 첨가된 배지를 사용하였다. T-150 flask에 배양된 단층 세포에 바이러스를 감염시킨 후 주기적으로 세포 병변효과(cytopatic effect)를 관찰하였다. 세포병변효과가 명백하게 관찰될 때 배양액과 세포를 수거한 다음, 400xg에서 7분간 원심분리하여 상층액은 따로 모으고 침전물은 현탁하였다. 침전물을 동결과 해빙과정을 2회 반복하여 파쇄한 후 400xg에서 7분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 원심 상등액을 혼합한 후 0.45 µm 필터로 여과한 다음 소분하여 -70°C에 보관하였다.

본 연구에서는 감염성 있는 바이러스의 역가를 50% 조직 배양감염용량[50% tissue culture infectious dose(TCID₅₀)]으로 나타내었다[13]. 바이러스 불활화 실험시 바이러스 역가를 정확하게 측정하기 위해서 먼저 바이러스를 첨가하지 않은 음성대조 실험에서 취한 시료들이 바이러스의 정량 분석을 위해 사용되는 세포에 세포독성을 나타내는지, 바이러스 정량분석에 간섭효과를 일으키는지를 먼저 실험하였다[10, 14]. 바이러스 불활화 실험 중 취한 시료들을 세포독성과 간섭효과를 나타내지 않은 농도로 바이러스 배양 배지를 사용하여 희석하였다. 희석된 시료를 7배수로 희석하여 24 well plate에 배양된 세포에 0.25 mL씩 접종하였다. 각 바이러스의 양성 대조군으로 역가를 알고 있는 바이러스를 7배수로 희석하여 각 plate에 배양된 세포에 접종하였다. 음성대조군으로 바이러스가 첨가되지 않은 배양배지를 접종하였다. 그 후 CO₂ 배양기에서 35°C로 배양하면서 계속적으로 현미경으로 세포병변효과를 관찰하였다. 감염성 바이러스가 검출되지 않을 때, 즉 검출한계 이하로 관찰될 때에는 바이러스의 역가를 98% 신뢰도를 가지고 이론적 최소 검출량(a theoretical minimal detection level)을 사용하여 계산하였다[10]. 바이러스의 농도가 낮을 경우 시료에 감염성 바이러스가 없을 확률은 $c = \ln p / -v$ 라는 Poisson 분포를 따르게 되는 데, c는 mL 당 감염성 바이러스의 농도, p는 시료에 감염성 바이러스가 없을 확률, v는 시료의 부피를 나타낸다. 95% 신뢰도로 이론적 최소 검출량을 계산할 때 p는 0.05이다.

불활화 효과 실험

70% 에탄올 처리, 0.05% sodium hypochlorite 처리, 감마선 조사공정에 의한 불활화 효과를 검증하기 위해 각 단계별로 확보한 소 양막을 동결건조한 후 각 바이러스를 첨가하여 바이러스 용액이 소 양막에 침투하도록 하였다. 각 불활화 공정을 실시한 후 조직에서 각 바이러스를 회수하여 정량한 후 불활화 정도를 비교하였다. 조직으로부터 바이러스를 회수하기 위해 세포배양배지를 첨가한 후 혼합 실험기(vortex mixer)를 이용하여 격렬하게 반응시킨 후 바이러스를 추출하였다. 바이러스 추출은 바이러스 회수율이 90% 이상이 되게 3차례 이상 실시하였다.

70% 에탄올 소독공정에서 바이러스 불활화 검증

동결건조한 6x6 cm 소 양막에 바이러스를 1 ml 첨가하

Table 1. Salient features of viruses used for the evaluation of virus clearance.

| Virus | Family | Genome | Envelop | Size (nm) | Resistance to physico-chemical reagents |
|--|-----------------|--------|---------|-----------|---|
| Bovine herpes virus (BHV) | Herpesviridae | ds-DNA | Yes | 100-200 | Medium |
| Bovine viral diarrhea virus (BVDV) | Flaviviridae | ss-RNA | Yes | 45-55 | Medium |
| Bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV-3) | Paramyxoviridae | ss-RNA | Yes | 150-200 | Low |
| Bovine parvovirus (BPV) | Parvoviridae | ss-DNA | No | 18-26 | High |

여 바이러스 용액을 조직속으로 침투시켰다. 바이러스를 첨가한 조직으로부터 바이러스를 회수하여 즉시 정량하였다. 또한 바이러스가 첨가된 소 양막을 70% 에탄올에 1시간, 6시간, 24시간 동안 처리한 후 바이러스를 회수하여 즉시 정량하였다.

0.05% sodium hypochlorite 처리공정에서 바이러스 불활화 검증

동결건조한 6×6 cm 소 양막에 바이러스를 1 mL 첨가하여 바이러스 용액을 조직속으로 침투시켰다. 바이러스를 첨가한 조직으로부터 바이러스를 회수하여 즉시 정량하였다. 또한 바이러스가 첨가된 소 양막을 0.05% sodium hypochlorite에 10분, 20분, 30분 동안 처리한 후 바이러스를 회수하여 즉시 정량하였다.

감마선 조사 멸균공정에서 바이러스 불활화 검증

동결건조한 6×6 cm 소 양막에 바이러스를 1 mL 첨가하였다. 바이러스를 첨가한 후 바이러스를 회수하여 즉시 정량하였다. 또한 바이러스가 첨가된 소 양막에 감마선을 5, 10, 25 kGy로 조사한 후 바이러스를 회수하여 즉시 정량하였다. 감마선 조사는 (주)그린피아에 위탁하여 실시하였으며, 감마선 조사를 규정한 ISO 13409 규정에 따라 실시하였다[12].

바이러스 감소인수(Virus reduction factor)의 계산

바이러스 정량 분석이 끝난 후 그 결과를 기초로 각 공정에서 바이러스 감소인수를 구하였다. 바이러스 감소인수는 바이러스가 첨가된 공정출발물질에 존재하는 바이러스 양의 log 값에서 공정진행 후에 존재하는 바이러스 양의 log 값을 뺀 log 감소인수(reduction factor)로 정의하였다[3, 10]. 모든 실험은 독립적으로 두 번 실시하여 평균값을 구하였다.

결 과

무세포 소 양막 제조 공정 확립과 특성분석

상피층을 제거한 소 양막에 trypsin을 처리하여 기질세포를 제거한 무세포 소 양막 제조 공정을 확립하였다(Fig. 1). 정상 소 양막과 무세포 소 양막 제조 공정을 통해 생산된 무세포 소 양막의 조직학적 미세구조를 H&E 염색 후 비교하였다(Fig. 2). 소 양막에는 단층의 상피세포 층과 기질세포들이 존재하고 있지만 무세포 소 양막에는 면역반응의 대상

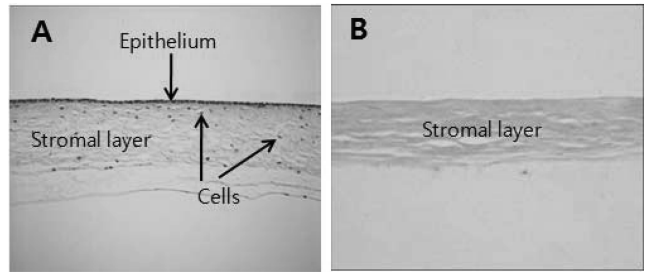


Fig. 2. Histological photographs of bovine amniotic membrane (A) and acellular bovine amniotic membrane (B). The specimens were stained with H&E.

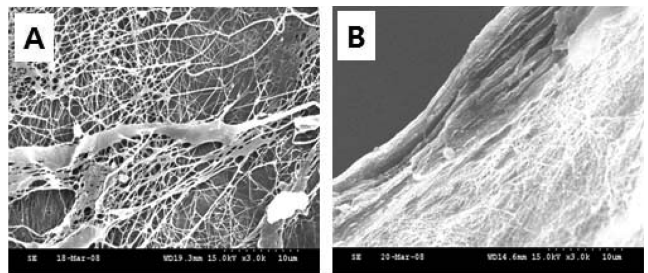


Fig. 3. Scanning electron microscopic analysis of acellular bovine amniotic membrane. Surface (A) and cross section (B) of the acellular bovine amniotic membrane were examined.

인 상피세포와 기질세포들이 존재하지 않았다. 무세포 소 양막 기질층의 미세구조는 정상 소 양막의 기질층의 미세구조와 차이가 없었다. 무세포 소양막의 주사식 전자현미경 관찰 결과 기질면의 콜라겐 섬유층과 단면의 콜라겐 sheet가 잘 유지되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 3). 정상 소 양막과 무세포 소 양막에 존재하는 성장인자를 비교한 결과 성장인자 중 EGF는 51%, KGF는 94%, FGF 45%가 잔존하였다 (Table 2).

70% 에탄올 처리에 의한 바이러스 불활화

이식을 위한 무세포 소 양막 제조공정은 기질을 제거한 소 양막을 70% 에탄올에서 4~10°C 조건으로 1일 이상 보관하는 공정을 포함한다. 70% 에탄올을 처리하면서 처리시간에 따른 바이러스 불활화 효과를 비교 검증하였다(Table 3). BHV, BVDV, BPIV-3와 같은 외피 바이러스(enveloped virus)뿐만 아니라 BPV 같은 비-외피 바이러스(non-enveloped virus)도 1시간 처리 후 검출한계 이하로 완벽하게 불활화되었다. BHV, BVDV, BPIV-3, BPV의 log 바이러스

Table 2. Analysis of growth factors present in the bovine amniotic membrane and acellular bovine amniotic membrane.

| Sample | Concentration (pg/mg) | | |
|------------------------------------|-----------------------|------------|-----------|
| | EGF | KGF | FGF |
| Bovine amniotic membrane | 1.66±0.41 | 31.01±0.25 | 919.8±3.4 |
| Acellular bovine amniotic membrane | 0.86±0.17 | 29.16±0.19 | 417.8±2.7 |

Table 3. Inactivation of viruses during 70% ethanol treatment.

| Sample | Total virus titer (Log ₁₀ TCID ₅₀) | | | |
|---------------------------------------|---|------------|------------|------------|
| | BHV | BVDV | BPIV-3 | BPV |
| Spiked starting material | 7.63 | 6.83 | 7.15 | 4.93 |
| 1 h after 70% ethanol treatment | ND ^a (≤2.34) ^b | ND (≤2.34) | ND (≤2.34) | ND (≤2.34) |
| 6 h after 70% ethanol treatment | ND (≤2.34) | ND (≤2.34) | ND (≤2.34) | ND (≤2.34) |
| 24 h after 70% ethanol treatment | ND (≤2.34) | ND (≤2.34) | ND (≤2.34) | ND (≤2.34) |
| Reduction factor (log ₁₀) | ≥5.29 | ≥4.49 | ≥4.81 | ≥2.59 |

^aNo infectious virus was detected.

^bThese values were calculated using a theoretical minimum detectable level of infectious virus with a 95% confidence level.

감소인수는 각각 ≥5.29, ≥4.49, ≥4.81, ≥2.59이었다.

0.05% sodium hypochlorite 처리에 의한 바이러스 불활화

이식을 위한 무세포 소 양막 제조공정은 바이러스 불활화 공정으로 0.05% sodium hypochlorite를 30분간 처리하는 공정을 포함한다. 0.05% sodium hypochlorite를 처리하면서 처리시간에 따른 바이러스 불활화 효과를 비교 검증하였다 (Table 4). BHV, BVDV, BPIV-3와 같은 외피 바이러스는 0.05% sodium hypochlorite에 민감하게 반응하여 처리시간에 따라 급격히 불활화되었다. BHV, BVDV, BPIV-3의 log 바이러스 감소인수는 각각 2.69, 4.50, 4.12이었다. BPV의 경우 외피 바이러스에 비해 0.05% sodium hypochlorite에 큰 저항성을 나타내었지만 시간에 따라 점진적으로 불활화되어 30분 처리 후 log 바이러스 감소인수는 1.55이었다.

감마선 조사에 의한 바이러스 불활화

무세포 소 양막의 안정성과 유효성에 영향을 미치지 않는

범위인 25 kGy까지 감마선을 조사하면서 조사량(0, 5, 15, 25 kGy)에 따른 바이러스 불활화 효과를 측정하였다 (Table 5). BHV는 15 kGy 조사에 의해 검출한계 이하로 완벽하게 불활화되었다. BVDV와 BPIV-3는 5 kGy 조사에 의해 검출한계 이하로 완벽하게 불활화되었다. BHV, BVDV, BPIV-3의 log 바이러스 감소인수는 각각 ≥5.32, ≥5.33, ≥6.29이었다. BPV는 감마선 조사에 큰 저항성을 나타내었다. 5, 15, 25 kGy 조사에 의해 BPV 바이러스 역가가 6.14 log₁₀ TCID₅₀에서 각각 5.72, 4.19, 2.71 log₁₀ TCID₅₀로 감마선 조사량에 비례하여 점진적으로 감소하였다. 감마선 조사에 의한 BPV log 바이러스 감소인수는 3.43이었다.

고 찰

본 연구를 통해 인체 이식용 생체조직의 국제 규격과 미국 및 대한민국 식품의약품안전청의 관리 규정을 만족하며 안전성이 보증된 조직적합성 소 양막 창상피복체 제조공정

Table 4. Inactivation of viruses during 0.05% Sodium hypochlorite treatment.

| Sample | Total virus titer (Log ₁₀ TCID ₅₀) | | | |
|--|---|------|--------|------|
| | BHV | BVDV | BPIV-3 | BPV |
| Spiked starting material | 7.59 | 8.82 | 6.28 | 5.76 |
| 10 min after 0.05% Sodium hypochlorite treatment | 5.37 | 4.90 | 4.80 | 4.74 |
| 20 min after 0.05% Sodium hypochlorite treatment | 5.06 | 4.69 | 3.43 | 4.48 |
| 30 min after 0.05% Sodium hypochlorite treatment | 4.90 | 4.32 | 2.16 | 4.21 |
| Reduction factor (log ₁₀) | 2.69 | 4.50 | 4.12 | 1.55 |

Table 5. Inactivation of viruses during gamma irradiation.

| Sample | Total virus titer (Log ₁₀ TCID ₅₀) | | | |
|---------------------------------------|---|------------|-------------|------|
| | BHV | BVDV | BPIV-3 | BPV |
| 0 kGy | 7.25 | 6.51 | 7.47 | 6.14 |
| 5 kGy | 1.66 | ND (≤1.18) | ND (≤1.18) | 5.72 |
| 15 kGy | ND ^a (≤1.18) ^b | ND (≤1.18) | ND (≤1.18) | 4.19 |
| 25 kGy | ND (≤1.18) | ND (≤1.18) | ND (≤1.189) | 2.71 |
| Reduction factor (log ₁₀) | ≥5.32 | ≥5.33 | ≥6.29 | 3.43 |

^aNo infectious virus was detected.

^bThese values were calculated using a theoretical minimum detectable level of infectious virus with a 95% confidence level.

을 확립하고자 하였다. 소 양막 소재는 원료 자체에 감염성 바이러스가 오염될 가능성이 있기 때문에 바이러스 제거 및 불활화 공정 개발이 필수적이다[11, 12, 26]. 생체조직을 이용한 조직공학 제제는 다른 제품과는 달리 안전성이 엄격하게 확보되지 않는 한 상품화 될 수 없는 특성을 가지고 있기 때문이다. 생체적합성과 치유 능력을 갖는 이중 조직 이식재를 제조하기 위해서는 소 양막의 3차원 구조를 그대로 유지하면서 면역거부반응을 일으키는 소 양막 내 세포들만 완벽하게 제거하는 공정의 개발이 필요하다. 또한 상처 치유 효과가 있는 성장인자를 포함하도록 공정을 확립하여야 한다. 이를 위해 소의 양막으로부터 효소(트립신)를 이용하여 콜라겐 이외의 불순물을 제거한 무세포 소 양막 제조 공정을 확립하였다.

무세포 소 양막의 조직학적 분석과 전자현미경 분석 결과 단층의 상피세포 층과 기질층의 세포들이 잘 제거되었으며, 소 양막 자체의 콜라겐 섬유는 3차원적 구조가 잘 유지되어 있음을 알 수 있었다. 또한 성장인자를 분석한 결과 EGF, KGF, FGF는 무세포 소 양막 추출 단백질 mg 당 각각 0.86 ng, 29.16 ng, 417.8 ng이 존재하였으며, 이는 정상 소 양막 추출 단백질에 존재하는 각 성장인자의 51%, 94%, 45%에 해당하는 양이었다. 이와 같은 결과 70% 에탄올 소독공정, 0.05% sodium hypochlorite 처리공정, 감마선 조사 멸균공정을 포함하는 무세포 소 양막 제조 공정은 소 양막의 3차원 구조를 그대로 유지하면서 면역거부반응을 일으키는 소 양막 내 세포들만 완벽하게 제거하고, 성장인자를 포함하는 무세포 소 양막을 제조할 수 있는 공정임을 확인하였다.

소독 및 멸균 공정에서 바이러스 불활화 효과 평가 연구를 위한 생물학적 지표 선택 시 고려하여야만 할 사항은 다음과 같다[1]. 첫째, 검증을 위해 사용될 생물학적 지표는 조직에 오염 가능성이 있는 바이러스 그 자체 또는 가장 유사한 바이러스이어야 한다. 또한 다양한 물리·화학적 성질의 생물학적 지표를 선택하여 불활화 효과검증을 함으로써 일반적으로 모든 종류의 바이러스를 불활화할 수 있다는 것을 보여 주어야 한다. 둘째, 선택된 생물학적 지표는 되도록 물리·화학적 처리에 큰 저항성을 나타내는 것이어서 다른 미지의 또는 동정되지 않은 바이러스의 불활화를 보장할 수 있어야 한다. 셋째, 검증용 생물학적 지표는 되도록 쉽게 분석 가능하며 고농도로 배양할 수 있어야 한다. 넷째, 선택된 생물학적 지표는 시험자에게 감염의 위험이 적어야 한다. 본 연구에서는 무세포 소 양막 안전성 검증을 위한 지표 바이러스로 BHV, BVDV, BPIV-3, BPV를 선정하였다. BHV는 소에게 전염성 비기관염(infectious bovine rhinotracheitis), 전염성 농포성 외음질염(infectious pustular vulvovaginitis), 전염성 농포성 포피염(infectious pustular balanoposthitis), 유산, 결막염, 뇌염 등을 유발하는 가장 전형적인 병원성 바이러스이다. 이 바이러스는 Herpesviridae과에 속하며, 선형의 double-strand DNA로 구성된 137 kb 유전체를 갖고 있

는 외피 바이러스이다[30]. BVDV는 소에게 설사, 임신 중 기형유발, 호흡기 질환, 출혈증상, 유산 등을 유발하며, 감염된 어미 소로부터 태어난 송아지도 역시 보균자가 되어 지속적으로 다른 소에게 BVDV를 전염시킨다. 이 바이러스는 Flaviviridae과의 Pestivirus속에 속하며, 12,500개의 nucleotide를 갖는 positive-sense, single-strand RNA로 구성되어 있고, 하나의 open reading frame을 갖고 있는 외피 바이러스이다[29]. BPIV-3는 소에게 발열과 원기 및 식욕감퇴, 침 흘림, 수양성 내지는 농양성 콧물, 기침, 폐포음의 이상 등 호흡기 증상을 유발하며, 유산을 유발하는 경우도 있다. 이 바이러스는 Paramyxoviridae과의 Respirivirus속에 속하며, 15,100개의 nucleotide를 갖는 negative-sense, single-strand RNA로 구성되어 있고, HN, F, M, N, P, L과 같은 6개의 유전자를 갖는 외피 바이러스이다[4]. BPV는 소에게 설사와 호흡기 증상을 유발하며, 유산을 유발하는 경우도 있다. 이 바이러스는 Parvoviridae과의 Bocavirus속에 속하며, 5,491개의 nucleotide를 갖는 linear single-strand DNA로 구성되어 있고, 3개의 open reading frame을 갖고 있는 비-외피 바이러스이다[2]. BHV, BVDV, BPIV-3, BPV는 소에게 가장 만연한 바이러스들이다.

일반적으로 소독의 개념은 비교적 약한 살균력을 이용하여 병원미생물의 성장을 억제하거나 파괴하여 감염의 위험성을 없애는 조작으로 소독제에 민감한 미생물만을 사멸시킨다[22]. 조직과 조직을 다루는 용기는 주로 알코올을 사용하여 소독하고 있다. 알코올은 인지질을 녹여내고, 단백질을 변성시켜 살균 효과를 나타낸다[21]. 소 양막 조직을 소독하고 보관하기 위해 70% 에탄올로 1일 이상 처리하는 공정은 외피 바이러스(BHV, BVDV, BPIV-3) 뿐만 아니라 비-외피 바이러스(BPV)에 대해 완벽한 불활화 효과를 나타내었다.

Sodium hypochlorite(NaOCl)는 강력한 살균작용이 있어 주로 수술실, 병실, 배설물, 오염물 등의 소독제로 사용되고 있다[6, 27]. 살균작용은 수용액상태에서 발생하는 HOCl이 미생물 성분을 할로겐화 및 산화시켜 일어난다. 소독의 효과는 농도, pH, 온도 등에 의해 달라지는데, 최적 pH 범위는 4에서 7이며, 보통 0.5% 용액을 사용한다. 소 양막을 고농도의 sodium hypochlorite로 처리할 경우 조직의 변성이 일어날 수 있어, 조직의 3차원적 구조에 영향을 미치지 않는 조건인 0.05%로 30분 처리하는 공정을 확립하였다. 이러한 조건에서 BHV, BVDV, BPIV-3 같은 외피 바이러스는 0.05% sodium hypochlorite에 민감하게 반응하여 처리시간에 따라 급격히 불활화되었다. BPV는 외피바이러스에 비해 저항성을 나타내었지만, 30분 처리 후 log 바이러스 감소인수는 1.55이었다.

감마선 조사는 코발트-60 방사성동위원소에서 나오는 단파장 빛인 감마선을 조직에 조사하여 치명적인 바이러스, 전염병 세균, 기생충 및 해충들을 사멸시킬 수 있는 유익하고 효과적인 방법이다[9, 23]. 감마선은 고(高)침투력을 가진 파

Table 6. Cumulative log reduction factors of viruses achieved during the manufacturing processes of bovine acellular amniotic membrane.

| Process step | Reduction factor (Log ₁₀) | | | |
|-------------------------------------|---------------------------------------|--------|--------|-------|
| | BHV | BVDV | BPIV-3 | BPV |
| 70% ethanol treatment | ≥5.29 | ≥4.49 | ≥4.81 | ≥2.59 |
| 0.05% sodium hypochlorite treatment | 2.69 | 4.50 | 4.12 | 1.55 |
| Gamma irradiation | ≥5.32 | ≥5.33 | ≥6.29 | 3.43 |
| Cumulative log reduction factor | ≥13.30 | ≥14.32 | ≥15.22 | ≥7.57 |

장이기 때문에 보건의료제품을 완전 밀봉한 상태로 조사 처리하여도 무균제품을 생산할 수 있다는 장점이 있다. 또한 감마선 조사 공정은 감마선이 완전 포장된 제품 깊숙이 투과하므로 효과적이고, 열, 습도, 진공 등의 조작이 없어 인체조직에 그대로 적용할 수 있다는 장점이 있다. 외피 바이러스들은 5 kGy 또는 15 kGy 조사량에 의해서 검출한계 이하로 완벽하게 불활화되었다. 비-외피 바이러스인 BPV의 경우에는 25 kGy 조사후에도 감염성 바이러스가 검출되었지만, 감마선 조사량에 비례하여 불활화 효과가 크게 나타나 log 바이러스 감소인수는 3.43이었다.

인체이식용 조직 소독 및 멸균 공정은 다양한 물리·화학적 특성을 갖는 광범위한 영역의 바이러스에 대하여 효과적인 불활화 공정을 포함하여야 한다[11, 12]. 이식용 무세포 소 양막 조직의 안전한 소독과 멸균을 위해서 최초의 감염성 위해인자 불활화공정에서 남아 있는 감염성 위해인자를 다음 공정 단계에서 효과적으로 불활화할 수 있도록 상호보완적인 두 단계 이상의 공정을 포함하는 것이 바람직하다. 특정 불활화공정에서 감염성 위해인자 불활화 효과가 매우 크다고 할지라도, 부적절하게 공정이 진행될 수도 있고, 그 공정에 저항성을 갖는 새로운 감염성 위해인자가 오염될 수도 있기 때문이다. 70% 에탄올 소독공정, 0.05% sodium hypochlorite 처리공정, 감마선 조사 멸균공정을 포함하는 3 가지 공정에서 BHV, BVDV, BPIV-3, BPV에 대한 log 바이러스 감소인수 합은 각각 ≥13.30, ≥14.32, ≥15.22, ≥7.57이었다(Table 6). 이와 같은 결과에서 무세포 소 양막 제조 공정은 바이러스 안전성을 보증할 수 있는 충분한 바이러스 불활화 능력을 갖고 있는 것으로 판단된다.

요 약

바이러스 안전성이 보증된 무세포 소 양막 생물창상피복재 제조공정을 확립하고자 하였다. 기질세포를 제거하기 위해 효소(트립신)를 처리하는 공정과 바이러스를 불활화하기 위해 70% 에탄올, 0.05% sodium hypochlorite, 25 kGy 감마선 처리 공정을 포함하는 무세포 소 양막 제조공정을 확립하였다. 무세포 소 양막의 조직학적 분석과 전자현미경 분석 결과 면역거부반응을 일으킬 수 있는 상피층과 기질세포들이 잘 제거되었으며, 소 양막 콜라겐 섬유의 3차원적 구

조가 잘 유지되어 있음을 확인하였다. 또한 상처치유효과가 있는 EGF, KGF, FGF와 같은 성장인자를 포함하고 있었다. 바이러스 불활화 효과를 검증하기 위해 국제적 가이드에 따라 4종의 바이러스(BHV, BVDV, BPIV-3, BPV)를 생물학적 지표로 사용하여 소 양막에 각 생물학적 지표를 첨가한 후 각 바이러스 불활화 공정을 실시한 다음 각 바이러스를 회수하여 정량한 후 불활화 정도를 비교하였다. 24시간 70% 에탄올 처리 공정에서 BHV, BVDV, BPIV-3, BPV 모두 처리 시간 1시간 안에 검출한계 이하로 완벽하게 불활화되었다. 30분 0.05% sodium hypochlorite 처리 공정에서 BHV, BVDV, BPIV-3 같은 외피 바이러스는 BPV 같은 비-외피 바이러스에 비해 효과적으로 불활화되었다. 25 kGy 감마선 조사에 의해 BHV, BVDV, BPIV-3는 검출한계 이하로 완벽하게 불활화되었고, BPV도 효과적으로 불활화되었다. 3가지 바이러스 불활화 공정에서 BHV, BVDV, BPIV-3, BPV에 대한 log 바이러스 감소인수 합은 각각 ≥13.30, ≥14.32, ≥15.22, ≥7.57이었다. 이와 같은 결과 본 연구를 통해 확립된 무세포 소 양막 제조공정은 바이러스 안전성을 보증할 수 있는 충분한 바이러스 불활화 능력을 갖고 있는 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구의 일부는 지식경제부와 한국산업기술진흥원의 전략기술인력양성사업으로 수행된 연구결과임.

REFERENCES

- Bae, J. E., J. Kim, J. Ahn, D. M. Choi, H. S. Jeong, D. H. Lee, and I. S. Kim. 2010. Virus inactivation process for manufacturing of human acellular dermal matrix. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 168-176.
- Chen, K. C., B. C. Shull, E. A. Moses, M. Lederman, E. R. Stout, and R. C. Bates. 1986. Complete nucleotide sequence and genome organization of bovine parvovirus. *J. Virol.* **60**: 1085-1097.
- Choi, Y. W. and I. S. Kim. 2008. Viral clearance during the manufacture of urokinase from human urine. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **13**: 25-32.

4. Collins, P. L., R. M. Chanock, and K. McIntosh. 1996. Parainfluenza Viruses, p. 1205. In B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman, and S. E. Straus, (ed.), *Virology*, vol. 1, Fields Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
5. Eastlund, T. 1995. Infectious disease transmission through cell, tissue, and organ transplantation: reducing the risk through donor selection. *Cell Transplant.* **4**: 455-477.
6. Erwin, D., P. Bijkerk, B. Rockx, A. de Groot, F. Twisk, and M. Koopmans. 2004. Inactivation of Caliciviruses. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 4538-4543.
7. Gomes, J. A., A. Roman, M. S. Santos, and H. S. Dua. 2005. Amniotic membrane use in ophthalmology. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **16**: 233-240.
8. Goyal, R, S. M. Jones, M. Espinosa, V. Green, and K. K. Nischal. 2006. Amniotic membrane transplantation in children with symblepharon and massive pannus. *Arch. Ophthalmol.* **124**: 1435-1440.
9. Grieb, T. A., R.-Y. Fornig, R. E. Stafford, J. Lin, J. Almeida, S. Bogdansky, C. Ronholdt, W. N. Drohan, and W. H. Burgess. 2005. Effective use of optimized, high-dose (50 kGy) gamma irradiation for pathogen inactivation of human bone allografts. *Biomaterials* **26**: 2033-2042.
10. Immelmann, A., K. Kellings, O. Stamm, and K. Tarrach. 2005. Validation and quality procedures for virus and prion removal in biopharmaceuticals. *BioProcess Int.* **3**: 38-44.
11. International organization for standardization. 1998. Sterilization of medical devices-Microbiological methods. Part 2: Test of sterility performed in the validation of a sterilization process. Geneva, Switzerland.
12. International Organization for Standardization. 2002. Sterilization of health care products - Radiation sterilization – Substantiation of 25 kGy as a sterilization dose for small or infrequent production batches. Geneva, Switzerland.
13. Kärber, J. 1931. Beitrag zur kollektiven behandlung pharmakologische reihenversuche. *Arch. Exp. Path. Pharmacol.* **162**: 480-483.
14. Kim, I. S., Y. W. Choi, Y. Kang, H. M. Sung, K. W. Sohn, and Y.-S. Kim. 2008. Improvement of virus safety of an antihemophilic factor IX by virus filtration process. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 1317-1325.
15. Kim, I. S., Y. W. Choi, Y. Kang, H. M. Sung, K. W. Sohn, and J. S. Shin. 2008. Dry-heat treatment process for enhancing viral safety of an antihemophilic factor VIII concentrate prepared from human plasma. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 997-1003.
16. Lavanchy, D. 2008. Hepatitis B virus transmission in organ, tissue, and cell transplantation. *Gastroenterol.* **135**: 1041-1043.
17. Lee, D. H., C. K. Kim, T. E. Kim, and I. S. Kim. 2008. Real-time RT-PCR for quantitative detection of bovine parainfluenza virus type 3 during the manufacture of biologics. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **36**: 173-181.
18. Lee, E.-Y., K.-W. Kim, and I.-W. Um. 2006. The review of transmission of infectious disease in human tissue transplantation: part I allogeneic bone. *J. Kor. Assoc. Maxillofacial Plast. Reconst. Surg.* **28**: 365-370.
19. Lee, E.-Y., K.-W. Kim, and I.-W. Um. 2007. The review of transmission of infectious disease in human tissue transplantation: phase II. allogeneic soft tissue. *J. Kor. Assoc. Maxillofacial Plast. Reconst. Surg.* **29**: 262-267.
20. Lee, S. H. and S. C. Tseng. 1997. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am. J. Ophthalmol.* **123**: 303-312.
21. McDonnell, G. and A. D. Russell. 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**: 147-179.
22. McDonnell, G. E. 2007. Antisepsis, disinfection, and sterilization, pp. 32-54. ASM Press, American Society for Microbiology, Washington D.C., U.S.A.
23. McDonnell, G. E. 2007. Antisepsis, disinfection, and sterilization, pp. 62-63. ASM Press, American Society for Microbiology, Washington D.C., U.S.A.
24. Paridaens, D., H. Beekhuis, W. van den Bosch, L. Remeyer, and G. Melles 2001. Amniotic membrane transplantation in the management of conjunctival malignant melanoma and primary acquired melanosis with atypia. *Br. J. Ophthalmol.* **85**: 658-661.
25. Park, M., S. Kim, I. S. Kim, and D. Son. 2008. Healing of a porcine burn wound dressed with human and bovine amniotic membranes. *Wound Rep. Reg.* **16**: 520-528.
26. Pruss, A., M. Kao, T. Garrel, L. Frommelt, L. Gurtler, F. Benedix, and G. Pauli. 2003. Virus inactivation in bone tissue transplants (femoral heads) by moist heat with the 'Marburg bone bank system'. *Biologicals* **31**: 75-82.
27. Resnick, L., K. Veren, S. Z. Salahuddin, S. Tondreau, and P. D. Markham. 1986. Stability and inactivation of HTLV-III/LAV under clinical and laboratory environments. *J. Am. Med. Assoc.* **255**: 1887-1891.
28. Sangwan, V. S., S. Burman, S. Tejwani, S. P. Mahesh, and R. Murthy. 2007. Amniotic membrane transplantation: A review of current indications in the management of ophthalmic disorders. *Curr. Ophthalmol.* **55**: 251-260.
29. Warren, P. and M. C. Collett. 1995. Pestivirus NS3(p80) protein possess RNA helicase activity. *J. Virol.* **69**: 1720-1726.
30. Whitebeck, J. C., L. J. Bello, and W. C. Lawrence. 1988. Comparison of the bovine herpesvirus 1 gI gene and the herpes simplex virus type 1 gB gene. *J. Virol.* **62**: 3319-3327.

(Received Nov. 16, 2010/Accepted Nov. 23, 2010)