

이식을 위한 사람 양막의 소독 및 멸균공정에 의한 감염성 위해인자 불활화 효과

배정은 · 김찬경 · 김인섭*

한남대학교 생명·나노과학대학 생명과학과 & 바이오의약품안전성검증센터

이식을 위해 사용하는 사람 양막은 기증자로부터 수혜자에게 바이러스, 세균, 진균과 같은 감염성 위해인자를 전파할 위험이 있다. 따라서 적절한 소독 및 멸균 공정을 통해 이식용 양막 내재 또는 혼입 가능한 감염성 위해인자를 완벽하게 불활화하여야 한다. 본 연구에서는 인체조직은행에서 사용하고 있는 소독 공정과 멸균 공정의 바이러스 및 세균, 진균 불활화 효과를 검증하기 위해 국제적 가이드에 따라 5종의 바이러스[human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), bovine herpes virus (BHV), bovine viral diarrhoea virus (BVDV), hepatitis A virus (HAV), porcine parvovirus (PPV)]와 2종의 세균(*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*), 1종의 진균(*Candida albicans*)을 생물학적 지표로 사용하였다. 양막에 각 생물학적 지표를 첨가한 후 70% 에탄올 소독 공정, 감마선 조사 공정, 산화에틸렌 가스 멸균 공정을 실시한 다음 각 바이러스, 세균, 진균을 회수하여 정량한 후 불활화 정도를 비교하였다. 70% 에탄올 처리 공정에서 HIV-1, BHV, BVDV 같은 외피 바이러스는 처리 시간 2.5분 안에 불활화되었지만, HAV와 PPV 같은 비-외피 바이러스는 에탄올에 매우 큰 저항성을 나타내었다. 감마선 2.5 kGy 조사에 의해 HIV-1, BHV, BVDV는 검출한계 이하로 완벽하게 불활화되었다. HAV와 PPV는 각각 5 kGy와 25 kGy 조사에 의해 검출한계 이하로 불활화되었다. 산화에틸렌 가스 처리에 의해 본 연구에 사용한 모든 바이러스가 검출한계 이하로 불활화되었다. 70% 에탄올 처리 공정에서 *E. coli*와 *C. albicans*는 모두 5분 안에 완벽하게 사멸하였다. 하지만 *B. subtilis*는 큰 저항성을 나타내었다. 감마선 조사 공정과 산화에틸렌 가스 멸균 공정에서 *E. coli*, *B. subtilis*, *C. albicans* 모두 완벽하게 불활화되었다.

Key words □ amniotic membrane, disinfection, sterilization, ethylene oxide gas, gamma irradiation, transplantation

사람의 뼈, 연골, 근막, 피부, 양막, 인대, 건, 심장판막, 혈관 등과 같은 인체조직은 심장, 간, 신장 등의 고형장기와 달리 면역학적 거부반응의 발생빈도가 상대적으로 낮아 다양한 용도로 환자들에게 이식이 되고 있다. 이러한 인체조직은 한 사람의 기증자로부터 불특정 다수의 수혜자에게 이식이 가능하다는 것이 특징이다. 따라서 이식을 위해 채취한 조직이 감염성 위해인자에 오염되었을 경우 그 오염이 많은 사람들에게 전파될 수 있다. 기증자의 안전성 확보를 위해 기증자의 병력을 검토하고, 기증자의 신체에 대한 육안 검사를 통해 감염의 증후, 외상 등 조직의 성상에 영향을 주는 요인의 유무를 확인하고, 또한 기증자의 혈액 검사 및 조직에 대한 미생물학적 검사를 통해 감염질환에 대한 선별검사를 실시한다 할지라도 기증된 인체 조직에 감염성 위해인자가 오염될 가능성을 배제할 수 없다(2, 3, 40).

감염성 세균 및 진균이 오염된 골 조직을 이식하였을 경우 통계적으로 18~75%에서 감염이 발생하였고, 세균 및 진균이 전혀 검출되지 않았던 조직을 이식한 경우라도 1.6~3.2%의 감염이 발생하였다는 보고가 있다. 또한 잘 보관되어 있던 골 조직도 이식 전에

균 검출을 실시한 결과 1.6~4.6%에서 오염이 발견되었다는 보고도 있다(6, 21). 양막의 경우에도 *Bacillus* sp., *Bacteroides fragilis*, *B. vulgatus*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus kristinae*, *Propionibacterium acnes*, *P. avidum*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. intermedius*, *S. lugdunensis*, *Streptococcus agalactiae*, *S. constellatus*, *S. gordonii*, *S. vestibularis*와 같은 다양한 세균에 오염된 사례가 있다(4). 또한 인체조직은 hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), human immunodeficiency virus (HIV), human T cell leukaemia virus (HTLV) I과 II, cytomegalovirus, herpes virus 같은 외피 바이러스(enveloped virus)와 hepatitis A virus (HAV), human parvovirus B19 (B19) 같은 비-외피 바이러스(non-enveloped virus) 등 다양한 바이러스에 오염된 사례가 있다(2, 3, 9, 22, 34). 따라서 저장되어 있는 조직을 이식하기 전에 만약에 발생할 지도 모를 감염성 위해인자의 오염을 방지하기 위해 소독과 멸균을 실시하여야만 한다.

인체조직 중 양막은 태반을 이루는 여러 층중의 하나로서, 상피재생을 촉진하고 염증반응을 억제하는 성분을 가지고 있는 얇은 막 같은 조직이다. 양막이식은 안과영역에서 지속적 각막상피결손, 감염성 각막궤양, 깊은 각막궤양과 각막천공, 공막연화증과 공막궤양, 락막막염, 재발된 군날개 및 거짓군날개, 결막종양,

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-42-629-8754, Fax: 82-42-629-8751
E-mail: inskim@hnu.kr

반흔, 눈꺼풀유착 등의 치료를 위해 시술하고 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 점 운반체로 사용될 수 있다(10, 11, 23, 32, 33, 36).

조직은행에서는 인체조직에 오염될 수 있는 감염성 위해 인자 중 바이러스에 대한 안전성을 보증하기 위해 인체조직 기증자의 혈액검사 검사를 통해 HBV, HCV, HIV를 검사한다(14). 이러한 바이러스 검사는 혈액이나 조직에 존재할지도 모를 위해 바이러스를 모두 검사하기 보다는 특정지표 바이러스들을 대상으로 수행된다. 이러한 특정지표 바이러스 조사만으로는 현재 수행하고 있는 분석 방법으로는 검색되지 않는 변이주 또는 미동정 바이러스를 검색할 수가 없어 인체조직의 안전성을 보증할 수가 없다. 또한 바이러스 검사를 위해 조직의 일부만 채취하기 때문에 검사의 한계가 있고, 만약 바이러스가 너무 낮은 농도로 존재하여 검출한계 이하라면 검사의 오류를 범할 수 있다. 이러한 이유 때문에 바이러스 안전성을 보증하기 위해서 인체조직 내재 또는 혼입 가능 위해 바이러스에 대한 멸균공정을 포함하여야 한다. 또한 이러한 멸균공정에 의한 바이러스 불활화 정도가 과학적이고, 합리적으로 검증되어야만 한다(16).

우리나라의 경우 ‘인체조직안전 및 관리 등에 관한 법률시행령’ 제5장 조직의 기증, 채취, 저장, 처리, 보관, 분배 등에서 인체조직의 감염성 위해인자 안전성 보증을 위한 구체적 방법으로 제12조(조직의 기증 및 채취), 제13조(조직의 혈액검사 및 세균학적검사), 제14조(조직의 저장), 제15조(조직의 처리), 제16조(조직의 멸균 및 소독)를 규정하였지만, 조직은행별로 조직의 소독 및 멸균에 관한 방법이 상이하여 표준화 되어 있지 않고, 또한 각 조직은행에서 실시하고 있는 소독 및 멸균 방법은 그 효과가 검증된 경우가 거의 없다(1). 양막의 경우에는 소독과 멸균을 위해 70% 에탄올, 0.8% 과초산, 에탄올/과초산, 감마선 조사, 산화에틸렌 가스 처리 등이 사용되고 있지만, 감염성 위해인자 불활화 효과 보다는 이러한 처리가 양막의 물성과 임상적 효과에 미치는 영향 위주로 연구가 진행되어 왔다(30, 31, 35, 37, 38, 39). 감염성 위해인자 불활화에 대한 연구는 양막 처리 공정에 따른 오염 세균의 감소 정도와 멸균 공정 후 무균 여부를 조사하는 수준으로 진행이 되었다(13, 37). 뼈와 같은 조직의 경우 불활화 공정에 의한 감염성 위해인자 사멸 효과를 검증하기 위해 생물학적 지표를 사용하여 불활화 효과를 직접 연구하였다(12). 하지만 양막의 경우 지금까지 소독 및 멸균 공정에서 생물학적 지표

를 대상으로 불활화 방법의 효과를 연구한 보고가 문헌상 거의 없다.

본 연구의 목표는 양막에 대한 안전하고 효율적인 소독방법과 멸균방법을 실험을 통하여 제시하고, 동 방법에 대한 표준모델을 확립하여, 표준화 되어 있지 못한 소독 및 멸균방법에 대하여 표준모델을 제시함으로써 인체조직은행의 이식용 양막 안전성 확보수준을 향상시키고, 안전한 양막조직이 공급되도록 하는데 있다. 본 연구에서는 인체조직 소독 공정(70% 에탄올 처리 공정)과 멸균 공정(감마선조사 공정과 산화에틸렌 가스 공정)의 바이러스 및 세균, 진균 불활화 효과를 검증하기 위해 5종의 바이러스[HIV type 1 (HIV-1), bovine herpes virus (BHV), Bovine viral diarrhoea virus (BVDV), HAV, porcine parvovirus (PPV)]와 2종의 세균(*E. coli*, *B. subtilis*), 1종의 진균(*C. albicans*)을 생물학적 지표로 사용하였다.

재료 및 방법

바이러스 배양 및 정량

본 연구를 위해 사용한 바이러스들의 특성은 Table 1과 같다. HIV-1 (HBX2 strain), BHV (ATCC VR 188), BVDV (ATCC VR 534), HAV (ATCC VR 1402), PPV (ATCC VR 742)의 배양과 정량을 위해 C8166-45 세포, Minipig Kidney (MPK) 세포 (ATCC CCL 166), bovine turbinate (BT) 세포(ATCC CRL 1390), FRhK-4 세포(ATCC CRL 1688), Minipig Kidney (MPK) 세포(ATCC CCL 166)를 각각 사용하였다(8, 18). C8166-45 세포는 10% fetal bovine serum (FBS: Gibco BRL, USA)를 첨가한 RPMI 1640 배지에 배양하였다. 다른 세포들은 10% FBS를 첨가한 Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM: Gibco BRL)에 배양하였다. 바이러스 배양을 위해서는 2% FBS가 첨가된 배지를 사용하였다. T-175 flask에 배양된 단층 세포에 바이러스를 감염시킨 후 주기적으로 HIV의 경우 거대세포(syncytium), 다른 바이러스들의 경우에는 세포병변효과(cytopathic effect)를 관찰하였다. 거대세포 또는 세포병변효과가 명백하게 관찰 될 때 배양액과 세포를 수거한 다음, 400×g에서 7분간 원심분리하여 상등액은 따로 모으고 침전물은 현탁하였다. 침전물을 동결과 해빙과정을 2회 반복하여 파쇄한 후 400×g에서 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% 조직배양 감염용량[50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀)]으로 나타

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

Virus	Family	Genome	Envelop	Size (nm)	Resistance to physicochemical reagents
Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)	Retroviridae	ss-RNA	Yes	100	Low
Bovine herpes virus (BHV)	Herpesviridae	ds-DNA	Yes	100-200	Medium
Bovine viral diarrhea virus (BVDV)	Flaviviridae	ss-RNA	Yes	45-55	Medium
Hepatitis A virus (HAV)	Picornaviridae	ss-RNA	No	27-32	Medium-High
Porcine parvovirus (PPV)	Parvoviridae	ss-DNA	No	18-26	High

내었다(19). 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 실험하였다(20). 바이러스 불활화 실험 중 취한 시료들을 세포독성과 간섭효과를 나타내지 않은 농도로 바이러스 배양 배지를 사용하여 희석하였다. 희석된 시료를 7배수로 희석하여 HIV-1의 경우 96 well plate에 배양된 세포에 0.1 ml씩, BHV, BVDV, HAV, PPV의 경우에는 24 well plate에 배양된 세포에 0.25 ml씩 접종하였다. 각 바이러스의 양성 대조구로 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 거대세포 또는 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.

E. coli, *B. subtilis*, *C. albicans* 배양 및 정량

E. coli HB101은 Luria-Bertani (LB) 배지를 사용하여 37°C에서 배양하였다. *B. subtilis* (KCTC 1102)는 Nutrient broth (NB) 배지를 사용하여 37°C에서 배양하였다. *C. albicans* SC5314는 YPD 배지를 사용하여 30°C에서 배양하였다. 일반적으로 세균 또는 진균의 경우 성장이 정체기일 때가 지수성장기 때보다 물리·화학적 처리에 더 큰 저항성을 나타내기 때문에, 먼저 각 시험균주를 배양하면서 성장곡선을 분석한 후, 정체기의 균주를 가지고 실험을 실시하였다. 각 균주의 정량을 위해 도말 평판법을 사용하여 생균수를 측정하고, 그 수를 집단 형성 단위(Colony Forming Unit; CFU)로 나타내었다.

소독 및 멸균 공정에 의한 불활화 효과 실험

소독 및 멸균 공정에 의한 불활화 효과를 검증하기 위해 (주) 바이오랜드에서 양막을 기증받아 사용하였다. 기질층을 제거한 후 동결건조한 양막에 각 바이러스, 세균, 진균을 첨가한 후 불활화 공정을 실시한 다음 양막에서 각 바이러스, 세균, 진균을 회수하여 정량한 후 불활화 정도를 비교하였다. 양막으로부터 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. 양막으로부터 세균과 진균을 회수하기 위해 인산완충용액(phosphate buffered saline)을 첨가한 후 혼합 실험기를 이용하여 격렬하게 반응시킨 후 균주를 추출하였다. 각 균주 추출은 회수율이 90% 이상이 되게 3차례 이상 실시하였다.

70% 에탄올 처리 공정

일반적으로 인체조직은행에서는 바이러스 및 세균, 진균과 같은 감염성 위해인자를 소독하기 위해 70% 에탄올을 사용한다.

70% 에탄올 처리 공정에서 각 바이러스들의 불활화 정도를 비교하였다. 3×3 cm 양막에 바이러스를 1 ml 첨가하였다. 바이러스를 첨가한 후 바이러스를 회수하여 즉시 정량하였다. 또한 바이러스가 첨가된 양막을 70% 에탄올에 2.5분, 5분, 10분, 20분간 처리한 후 바이러스를 회수하여 즉시 정량하였다. *E. coli*, *B. subtilis*, *C. albicans*도 동일하게 70% 에탄올을 처리하면서 불활화 정도를 정량하였다.

감마선 조사 공정

일반적으로 감마선을 멸균의 목적으로 사용할 때 25 kGy를 조사한다. 감마선 조사량에 의한 바이러스 불활화 정도를 비교하였다. 2×2 cm 양막에 바이러스를 0.5 ml 첨가하였다. 바이러스를 첨가한 후 바이러스를 회수하여 즉시 정량하였다. 또한 바이러스가 첨가된 양막에 감마선을 2.5, 5, 15, 25 kGy로 조사한 후 바이러스를 회수하여 즉시 정량하였다. 감마선 조사는 (주)그린피아에 위탁하여 실시하였으며, 감마선 조사를 규정한 ISO 13409 규정에 따라 실시하였다(17). *E. coli*, *B. subtilis*, *C. albicans*도 동일하게 감마선 조사를 하면서 불활화 정도를 정량하였다.

산화에틸렌 가스 처리 공정

3×3 cm 양막에 바이러스를 3 ml 첨가한 후 동결건조를 하였다. 동결건조한 양막으로부터 바이러스를 회수하여 즉시 정량하였다. 또한 바이러스를 첨가한 양막에 산화에틸렌 가스를 처리한 후 바이러스를 회수하여 불활화 정도를 비교하였다. 산화에틸렌 가스 멸균에 의한 감염성 위해인자 불활화 검증을 위해 37°C, 상대습도 60% 조건에서 1,000 mg/L의 산화에틸렌 가스 농도로 4 시간 동안 처리하였다. 양막에 잔존하는 산화에틸렌 가스가 바이러스 정량 분석을 위한 감염성 세포주에 독성을 일으킬 수 있기 때문에 양막으로부터 바이러스를 회수하기 전에 산화에틸렌 가스를 제거하기 위해 상온에서 7일 이상 보관하였다. 산화에틸렌 가스 멸균은 한스바이오메드(주)에 위탁하여 실시하였으며, 산화에틸렌 가스 멸균 공정을 규정한 ISO 11135 규정에 준하여 검증을 실시하였다(15). *E. coli*, *B. subtilis*, *C. albicans*도 동일하게 산화에틸렌 가스를 처리하면서 불활화 정도를 정량하였다.

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 공정 진행 후에 존재하는 바이러스 양의 log 값을 뺀 log 감소인수(reduction factor)로 정의하였다(20). 모든 실험은 독립적으로 두 번 실시하여 평균값을 구하였다.

결 과

70% 에탄올 처리에 의한 바이러스, 세균, 진균 불활화

양막의 안정성과 유효성에 영향을 미치지 않는 처리시간인 20 분 동안 70% 에탄올을 처리하면서, 처리시간에 따른 바이러스

Table 2. Inactivation of viruses during 70% ethanol treatment

Sample	Total virus titer (Log ₁₀ TCID ₅₀)				
	HIV-1	BHV	BVDV	HAV	PPV
Spiked starting material on amniotic membrane	5.17	8.56	6.71	6.14	7.66
2.5 min after 70% Ethanol treatment	ND ^a (≤2.09) ^b	ND (≤2.09)	ND (≤2.09)	5.89	7.47
5 min after 70% Ethanol treatment	ND (≤2.09)	ND (≤2.09)	ND (≤2.09)	5.62	7.04
10 min after 70% Ethanol treatment	ND (≤2.09)	ND (≤2.09)	ND (≤2.09)	5.04	6.78
20 min after 70% Ethanol treatment	ND (≤2.09)	ND (≤2.09)	ND (≤2.09)	4.24	6.57
Log reduction factor	≥3.08	≥6.47	≥4.62	1.90	1.09

^aNo infectious virus was detected.

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

불활화 효과를 비교 검증하였다(Table 2). HIV-1, BHV, BVDV와 같은 외피 바이러스는 2.5분 안에 검출한계이하로 완벽하게 불활화되었다. HIV-1, BHV, BVDV의 log 바이러스 감소인수는 각각 ≥3.08, ≥6.47, ≥4.62이었다. 하지만 HAV와 PPV 같은 비외피 바이러스는 70% 에탄올에 큰 저항성을 나타내었다. HAV의 경우 초기 바이러스 역가가 6.14 log₁₀ TCID₅₀에서 처리 시간에 비례하여 점진적으로 감소하여, 20분 처리 후 4.24 log₁₀ TCID₅₀를 나타내어 log 바이러스 감소인수는 1.90이었다. PPV의 경우에도 초기 바이러스 역가가 7.66 log₁₀ TCID₅₀에서 처리 시간에 비례하여 점진적으로 감소하였지만, 20분 처리 후 6.57 log₁₀ TCID₅₀를 나타내어 log 바이러스 감소인수는 1.09이었다.

70% 에탄올 처리에 의한 *E. coli*, *B. subtilis*, *C. albicans* 불활

화 효과를 비교 검증하였다(Table 3). 70% 에탄올 처리에 의해 1.38×10⁸ CFU의 *E. coli*는 처리 5분만에 완벽하게 불활화되었다. 또한 3.68×10⁷ CFU의 *C. albicans*도 5분만에 완벽하게 불활화되었다. 하지만 *B. subtilis*는 70% 에탄올 처리에 매우 큰 저항성을 나타내었다. *B. subtilis*는 70% 에탄올 처리 20분까지 점진적인 불활화가 일어나 3.82×10⁷ CFU가 5.79×10⁵ CFU로 감소하였지만, 처리 시간을 30분으로 증가시켰을 때 1.41×10⁵ CFU가 검출되었고, 처리 시간을 60분으로 증가시켰을 때에도 1.38×10⁵ CFU가 검출되었다.

감마선 조사에 의한 바이러스, 세균, 진균 불활화

양막의 안정성과 유효성에 영향을 미치지 않는 감마선 조사량

Table 3. Inactivation of *E. coli*, *B. subtilis*, and *C. albicans* during 70% ethanol treatment

Sample	Total titer (Colony Forming Unit)		
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>
Spiked starting material on amniotic membrane	1.38×10 ⁸	3.82×10 ⁷	3.68×10 ⁷
5 min after 70% Ethanol treatment	0	8.60×10 ⁶	0
10 min after 70% Ethanol treatment	0	3.27×10 ⁶	0
20 min after 70% Ethanol treatment	0	5.79×10 ⁵	0
30 min after 70% Ethanol treatment	0	1.41×10 ⁵	0
60 min after 70% Ethanol treatment	0	1.38×10 ⁵	0

Table 4. Inactivation of viruses during gamma irradiation

Sample	Total virus titer (Log ₁₀ TCID ₅₀)				
	HIV-1	BHV	BVDV	HAV	PPV
Spiked starting material on amniotic membrane	6.19	7.92	6.89	5.70	6.49
2.5 kGy Gamma irradiation	ND ^a (≤1.79) ^b	ND (≤1.79)	ND (≤1.79)	2.53	5.64
5 kGy Gamma irradiation	ND (≤1.79)	ND (≤1.79)	ND (≤1.79)	ND (≤1.79)	5.33
15 kGy Gamma irradiation	ND (≤1.79)	ND (≤1.79)	ND (≤1.79)	ND (≤1.79)	4.27
25 kGy Gamma irradiation	ND (≤1.79)	ND (≤1.79)	ND (≤1.79)	ND (≤1.79)	ND (≤1.79)
Log reduction factor	≥4.40	≥6.13	≥5.10	≥3.91	≥4.70

^aNo infectious virus was detected.

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

인 25 kGy까지 감마선을 조사하면서 조사량(0, 2.5, 5, 15, 25 kGy)에 따른 바이러스 불활화 효과를 측정하였다(Table 4). HIV-1, BHV, BVDV와 같은 외피 바이러스는 2.5 kGy 조사에 의해 검출한계이하로 완벽하게 불활화되었다. 감마선 조사에 의한 HIV-1, BHV, BVDV의 log 바이러스 감소인수는 각각 ≥ 4.40 , ≥ 6.13 , ≥ 5.10 이었다. HAV의 경우 바이러스 역가가 $5.70 \log_{10}$ TCID₅₀에서 2.5 kGy 조사에 의해 $2.53 \log_{10}$ TCID₅₀로 감소하였고, 5 kGy 조사에 의해 검출한계 이하로 불활화되었다. 감마선 조사에 의한 HAV log 바이러스 감소인수는 ≥ 3.91 이었다. PPV는 감마선 조사에 가장 큰 저항성을 나타내었다. 바이러스 역가가 $6.49 \log_{10}$ TCID₅₀에서 2.5, 5, 15 kGy 조사에 의해 5.64, 5.33, $4.27 \log_{10}$ TCID₅₀로 감마선 조사량에 비례하여 점진적으로 불활화되다가, 25 kGy 조사에 의해 검출한계 이하로 불활화되었다. 감마선 조사에 의한 PPV log 바이러스 감소인수는 ≥ 4.70 이었다.

세균과 진균에 대한 감마선 조사 효과를 알아보기 위해 감마선 조사량(0, 2.5, 5, 15, 25 kGy)에 따른 *E. coli*, *B. subtilis*, *C. albicans* 불활화 효과를 비교 검증하였다(Table 5). *E. coli*는 2.5 kGy 감마선 조사에 의해 3.25×10^6 CFU가 4.20×10^2 CFU로 감소되었으며, 5 kGy 감마선 조사에 의해 완벽하게 불활화되었다. *B. subtilis*도 2.5 kGy 감마선 조사에 의해 4.75×10^7 CFU가 2.29×10^3 CFU로 감소되었으며, 5 kGy 감마선 조사에 의해 완벽하게 불활화되었다. *C. albicans*는 2.5 kGy 감마선 조사에 의해 1.74×10^7 CFU가 완벽하게 불활화되어 생균이 검출되지 않았다.

산화에틸렌 가스 처리에 의한 바이러스, 세균, 진균 불활화

바이러스에 대한 산화에틸렌 가스 멸균 효과를 조사하였다(Table 6). 산화에틸렌 가스 처리에 의해 HIV-1, BHV, BVDV와 같은 외피 바이러스뿐만 아니라 HAV, PPV 같은 비-외피 바이러스

스 모두 검출한계 이하로 불활화되었다. EO 가스 멸균에 의한 HIV-1, BHV, BVDV, HAV, PPV의 log 바이러스 감소인수는 각각 ≥ 3.58 , ≥ 4.81 , ≥ 4.26 , ≥ 4.16 , ≥ 4.75 이었다.

세균과 진균에 대한 산화에틸렌 가스 멸균 효과를 검증하기 위해 *E. coli*, *B. subtilis*, *C. albicans*를 대상으로 불활화 효과를 비교 검증하였다(Table 7). *E. coli*는 산화에틸렌 가스 처리에 의해 4.11×10^5 CFU가 완벽하게 불활화되어 생균이 검출되지 않았다. *B. subtilis*도 산화에틸렌 가스 처리에 의해 1.67×10^7 CFU가 완벽하게 불활화되어 생균이 검출되지 않았다. *C. albicans*의 경우에도 산화에틸렌 가스 처리에 의해 4.45×10^6 CFU가 완벽하게 불활화되어 생균이 검출되지 않았다.

고 찰

인체조직에서 감염성 위해인자 안전성 검증을 위한 생물학적 지표는 바이러스, 세균, 진균을 모두 포함하여야 한다(15~17). 인체조직은 바이러스뿐만 아니라 세균과 진균에 오염될 수 있으며, 이로 인한 감염 사례가 보고되고 있기 때문이다(2, 3, 6, 21, 22). 소독 및 멸균 공정에서 바이러스, 세균, 진균의 불활화 효과 평가 연구를 위한 생물학적 지표 선택 시 고려하여야만 할 사항은 다음과 같다. 첫째, 검증을 위해 사용될 생물학적 지표는 인체조직에 오염 가능성이 있는 감염성 위해인자 그 자체 또는 가장 유사한 미생물이어야 한다. 또한 다양한 물리·화학적 성질의 생물학적 지표를 선택하여 불활화 효과검증을 함으로 해서 일반적으로 모든 종류의 감염성 위해인자를 불활화할 수 있다는 것을 보여 주어야 한다. 둘째, 선택된 생물학적 지표는 되도록 물리·화학적 처리에 큰 저항성을 나타내는 것이어서 다른 미지의 또는 동정되지 않은 감염성 위해인자의 불활화를 보장할 수 있어야 한다. 셋째, 검증용 생물학적 지표는 되도록 쉽게 분석 가

Table 5. Inactivation of *E. coli*, *B. subtilis*, and *C. albicans* during gamma irradiation

Sample	Total titer (CFU)		
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>
Spiked starting material on amniotic membrane	3.25×10^6	4.75×10^7	1.74×10^7
2.5 kGy Gamma irradiation	4.20×10^2	2.29×10^3	0
5 kGy Gamma irradiation	0	0	0
15 kGy Gamma irradiation	0	0	0
25 kGy Gamma irradiation	0	0	0

Table 6. Inactivation of viruses during ethylene oxide treatment

Sample	Total virus titer (\log_{10} TCID ₅₀)				
	HIV-1	BHV	BVDV	HAV	PPV
Before ethylen oxide treatment	5.67	6.90	6.35	6.25	6.84
After ethylen oxide treatment	ND ^a (≤ 2.09) ^b	ND (≤ 2.09)	ND (≤ 2.09)	ND (≤ 2.09)	ND (≤ 2.09)
Log reduction factor	≥ 3.58	≥ 4.81	≥ 4.26	≥ 4.16	≥ 4.75

^aNo infectious virus was detected.

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

Table 7. Inactivation of *E. coli*, *B. subtilis*, and *C. albicans* during ethylene oxide treatment

Sample	Total titer (CFU)		
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>
Before ethylen oxide treatment	4.11×10^5	1.67×10^7	4.45×10^6
After ethylen oxide treatment	0	0	0

능하며 고농도로 배양할 수 있어야 한다. 넷째, 선택된 생물학적 지표는 시험자에게 감염의 위험이 적어야 한다. 본 연구에서는 이 식용 사람 양막 안전성 검증을 위한 지표 바이러스로 HIV와 HTLV의 모델 바이러스인 HIV-1, Herpes virus와 Cytomegalovirus의 모델 바이러스인 BHV, HCV의 모델 바이러스인 BVDV, B19의 모델 바이러스인 PPV, 그리고 HAV를 선정하였다. 이러한 바이러스들은 일반적으로 사람 체액, 혈액 및 조직 유래 바이오의약품 제조공정의 바이러스 안전성 검증을 위해 사용되고 있다(8, 19, 20, 29). 소독 및 멸균공정 검증의 세균성 생물학적 지표로 *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* 등이 사용되고 있으며, 진균성 생물학적 지표로 *C. albicans*가 사용되고 있다(12). 본 연구에서는 다양한 물리·화학적 처리 공정에 강한 저항성을 나타내는 그람 양성 포자 형성 세균인 *B. subtilis*와 그람 음성 세균인 *E. coli*, 진균 *C. albicans*를 지표 미생물로 선정하였다. 일반적으로 세균 또는 진균의 경우 성장이 정체기 때 지수성장기 때보다 물리·화학적 처리에 더 큰 저항성을 나타내기 때문에(5, 7), 먼저 각 시험균주를 배양하면서 성장곡선을 분석하여 정체기의 균주를 가지고 실험을 실시하였다.

일반적으로 소독의 개념은 비교적 약한 살균력을 이용하여 병원미생물의 성장을 억제하거나 파괴하여 감염의 위험성을 없애는 조작으로 소독제에 민감한 미생물만을 사멸시킨다(25). 조직과 조직을 다루는 용기는 주로 알코올을 사용하여 소독하고 있다. 알코올은 인지질을 녹여내고, 단백질을 변성시켜 살균 효과를 나타낸다(28). 양막 조직을 소독하기 위해 70% 에탄올로 20분간 처리하는 공정은 외피 바이러스(HIV-1, BHV, BVDV)에 대해 완벽한 불활화 효과를 나타내지만, 비-외피 바이러스(PPV, BPV)에 대해서는 불활화 효과가 미미하였다. 또한 70% 에탄올 처리 공정은 일반 세균과 진균(*E. coli*와 *C. albicans*)을 불활화시켰지만, 포자를 형성하는 미생물(*B. subtilis*)은 불활화를 시키지 못하였다.

감염조사는 코발트-60 방사성동위원소에서 나오는 단파장 빛인 감마선을 인체조직에 조사하여 치명적인 바이러스, 전염병 세균, 기생충 및 해충들을 사멸시킬 수 있는 유익하고 효과적인 방법이다(12, 26). 감마선은 고(高)침투력을 가진 파장이기 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 2.5 kGy 조사량에 의해서 검출한계 이하로 완벽하게 불활화되었다. 비-외피 바이러스인 HAV의 경우에도 5 kGy 조사량에 의해서 검출한계 이하로 완벽하게 불

활화되었다. 바이러스 중 가장 물리·화학적 처리에 큰 저항성을 나타내는 것으로 알려진 PPV의 경우에는 감마선 조사량이 증가함에 따라 점진적으로 불활화 효과가 크게 나타났으며, 25 kGy 조사량에 의해 검출한계 이하로 불활화되었다. 또한 *E. coli*와 *B. subtilis*는 5 kGy 조사량에 의해서 완벽하게 불활화되었고, *C. albicans*는 2.5 kGy 조사량에 의해 완벽하게 불활화되었다. 이와 같은 결과에서 감마선 조사공정은 바이러스, 세균, 진균을 모두 불활화할 수 있는 공정임을 확인하였다.

산화에틸렌 가스 멸균은 온도에 민감한 기구나 인체조직을 멸균하는데 널리 사용되고 있다. 산화에틸렌 가스는 RNA 또는 DNA에 알킬화(alkylation) 반응을 야기하여 감염성 위해인자들의 유전체를 파괴함으로써 바이러스, 세균, 곰팡이를 불활화시킨다(24, 27). 산화에틸렌 가스 멸균이 효과적으로 이루어지기 위해서는 적절한 노출시간(2~5시간), 산화에틸렌 가스 농도(450~1200 mg/L), 처리 온도(29~65°C), 상대습도(45~85%)가 중요한데, 감염성 위해인자 불활화 검증을 위해 37°C, 상대습도 60% 조건에서 1,000 mg/L의 산화에틸렌 가스 농도로 4시간 동안 처리한 후 바이러스, 세균, 진균의 불활화 효과를 조사하였다. 산화에틸렌 가스 처리에 의해 바이러스, 세균, 진균 모두 검출한계 이하로 불활화되었다. 이와 같은 결과에서 산화에틸렌 가스 공정은 바이러스, 세균, 진균을 모두 불활화할 수 있는 공정임을 확인하였다.

본 연구에서 조사한 70% 에탄올 처리 공정, 감마선조사 공정, 산화에틸렌 가스 공정의 바이러스 및 세균, 진균 불활화 효과는 얼마나 효과적으로 화학물질과 감마선이 양막안으로 침투하는가에 달려 있다. 본 연구에서는 기질층을 제거한 양막을 대상으로 실험을 수행하였는데, 기질층을 제거하지 않은 양막이라 할지라도 침투력이 강한 감마선조사는 동일한 불활화 효과를 나타낼 것으로 판단된다. 하지만 에탄올 처리와 산화에틸렌 가스 공정은 화학물질의 침투력에 따라 그 효과가 달라질 수도 있다고 사료된다.

인체조직 소독 및 멸균 공정은 다양한 물리·화학적 특성을 갖는 광범위한 영역의 바이러스, 세균, 진균에 대하여 효과적인 불활화 공정을 포함하여야 한다. 이식용 사람 양막 조직의 안전한 소독과 멸균을 위해서 최초의 감염성 위해인자 불활화공정에서 남아 있는 감염성 위해인자를 두 번째 공정 단계에서 효과적으로 불활화할 수 있도록 상호보완적인 두 단계 공정을 포함하는 것이 바람직하다. 특정 불활화공정에서 감염성 위해인자 불활화 효과가 매우 크다고 할지라도, 부적절하게 공정이 진행될 수도 있고, 그 공정에 저항성을 갖는 새로운 감염성위해인자가 오염될 수도 있기 때문이다. 따라서 70% 에탄올 소독 공정, 감마선 조사 공정, 산화에틸렌 가스 멸균 공정, 기타 효과가 입증된 불활화 공정을 병행하는 것이 사람 양막 조직의 안전성을 확보하는 조건으로 판단된다.

감사의 말

이 논문은 2009년도 한남대학교 교비학술연구구성비 지원과 식품의약품안전청 용역연구개발사업에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. 이은영. 2005. 조직은행에서 채취한 동종조직의 세균 배양 평가. 대한구강악안면외과학회지 31, 31-38.
2. 이은영, 김경원, 엄인웅. 2006. 동종조직이식술시 전염성 질환의 이환가능성에 대한 고찰 I: 동종골조직. 대한악안면성형재건외과학회지 28, 365-370.
3. 이은영, 김경원, 엄인웅. 2006. 동종조직이식술시 전염성 질환의 이환가능성에 대한 고찰 II: 동종연조직. 대한악안면성형재건외과학회지 29, 262-267.
4. Adds, P.J., C. Hunt, and S. Hartley. 2001. Bacterial contamination of amniotic membrane. *Br. J. Ophthalmol.* 85, 228-230.
5. Beggs, W.H. 1989. Development of phenotypic resistance to direct lethal miconazole action by *Candida albicans* entering stationary phase. *Mycopathol.* 108, 201-206.
6. Bohatyrewicz, A., R. Bohatyrewicz, R. Klek, A. Kaminski, K. Dobiecki, P. Bialecki, M. Kedzierski, M. Zienkiewicz, and A. Dziedzic-Goclawska. 2006. Factors determining the contamination of bone tissue procured from cadaveric and multiorgan donors. *Transplant. Proc.* 38, 301-304.
7. Cebrián, G., N. Sagarzazu, R. Pagán, S. Condón, and P. Mañas. 2007. Heat and pulsed electric field resistance of pigmented and non-pigmented enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* in exponential and stationary phase of growth. *Int. J. Food Microbiol.* 118, 304-311.
8. Choi, Y.W. and I.S. Kim. 2008. Viral clearance during the manufacture of urokinase from human urine. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 13, 25-32.
9. Eastlund, T. 1995. Infectious disease transmission through cell, tissue, and organ transplantation: reducing the risk through donor selection. *Cell Transplant.* 4, 455-477.
10. Gomes, J.A., A. Roman, M.S. Santos, and H.S. Dua. 2005. Amniotic membrane use in ophthalmology. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 16, 233-240.
11. 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.
12. Grieb, T.A., R.Y. Forng, 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.
13. Hilmy, N., A. Febrida, and A. Basril. 2000. Validation of radiation sterilization dose for lyophilized amnion and bone grafts. *Cell Tissue Bank* 1, 143-148.
14. Hornicek, F.J., J.E. Woll, and D. Kasprisin. 2002. Standards for tissue banking, pp. 31-45. American Association of Tissue Banks, Bethesda, Maryland, USA.
15. International Organization for Standardization. 1994. Medical devices - Validation and routine control of ethylene oxide sterilization. Geneva, Switzerland.
16. 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.
17. 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.
18. Kärber, J. 1931. Beitrag zur kollektiven behandlung pharmakologische reihenversuche. *Arch. Exp. Path. Pharmacol.* 162, 480-483.
19. 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.
20. 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.
21. Lambrecht, J.T., B. Glaser, and J. Meyer. 2006. Bacterial contamination of filtered intraoral bone chips. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 35, 996-1000.
22. Lavanchy, D. 2008. Hepatitis B virus transmission in organ, tissue, and cell transplantation. *Gastroenterol.* 135, 1041-1043.
23. Lee, S.H. and S.C. Tseng. 1997. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am. J. Ophthalmol.* 123, 303-312.
24. Maillard, J.Y. and A.D. Russell. 1997. Virucidal activity and mechanism of action of biocides. *Sci. Prog.* 30, 287-315.
25. McDonnell, G.E. 2007. Antisepsis, disinfection, and sterilization, pp. 32-54. ASM Press, American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA.
26. McDonnell, G.E. 2007. Antisepsis, disinfection, and sterilization, pp. 62-63. ASM Press, American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA.
27. McDonnell, G.E. 2007. Antisepsis, disinfection, and sterilization, pp. 191-197. ASM Press, American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA.
28. McDonnell, G. and A.D. Russell. 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 147-179.
29. Moore, T.M., E. Gendler, and E. Gendler. 2004. Viruses adsorbed on musculoskeletal allografts are inactivated by terminal ethylene oxide disinfection. *J. Orthop. Res.* 22, 1358-1361.
30. Nakamura, T., M. Yoshitani, H. Rigby, N.J. Fullwood, W. Ito, T. Inatomi, C. Sotozono, T. Nakamura, Y. Shimizu, and S. Kinoshita. 2004. Sterilized, freeze-dried amniotic membrane: a useful substrate for ocular surface reconstruction. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 93-99.
31. Nakamura, T., T. Inatomi, E. Sekiyama, L.P. Ang, N. Yokoi, and S. Kinoshita. 2006. Novel clinical application of sterilized, freeze-dried amniotic membrane to treat patients with pterygium. *Acta Ophthalmol Scand.* 84, 401-405.
32. 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.
33. Pires, R.T., S.C. Tseng, P. Prabhasawat, V. Puangsricharer, S.L. Maskin, J.C. Kim, and D.T.H. Tan. 1999. Amniotic membrane transplantation for symptomatic bullous keratopathy. *Arch. Ophthalmol.* 117, 1291-1297.
34. 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.
35. Riau, A.K., R.W. Beuerman, L.S. Lim, and J.S. Mehta. 2010. Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. *Biomaterials*

- 31, 216-225.
36. Sangwan, V.S., S. Burman, S. Tejawani, 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.
37. Singh, R., S. Purohit, M.P. Chacharkar, P.S. Bhandari, and A.S. Bath. 2007. Microbiological safety and clinical efficacy of radiation sterilized amniotic membranes for treatment of second-degree. *Burns* 33, 505-510.
38. von Versen-Hoeynck, F., A.P. Steinfeld, J. Becker, M. Hermel, W. Rath, and U. Hesselbarth. 2008. Sterilization and preservation influence the biophysical properties of human amnion grafts. *Biologicals* 36, 248-255.
39. von Versen-Höynck, F., U. Hesselbarth, and D.E. Möller. 2004. Application of sterilised human amnion for reconstruction of the ocular surface. *Cell Tissue Bank* 5, 57-65.
40. Wang, S., C. Zinderman, R. Wise, and M. Braun. 2007. Infections and human tissue transplants: review of FDA MedWatch reports 2001-2004. *Cell Tissue Bank* 8, 211-219.

(Received November 6, 2009/Accepted December 7, 2009)

ABSTRACT: Inactivation of Infectious Microorganisms by Disinfection and Sterilization Processes for Human Amniotic Membrane Grafts

Jung Eun Bae, Chan Kyung Kim, and In Seop Kim* (Department of Biological Sciences, Hannam University, Daejeon 305-811, Republic of Korea)

Viral, bacterial, and fungal infection can be transmitted from donor to recipient via transplantation of human amniotic membrane. Therefore human amniotic membrane for transplantation should be disinfected and sterilized before use. The purpose of this study was to examine the efficacy of the disinfection process and sterilization processes used at human tissue bank in the inactivation of viruses, bacteria, and fungi. A variety of experimental model viruses, bacteria, and fungus for human pathogens, including the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), bovine herpes virus (BHV), bovine viral diarrhoea virus (BVDV), hepatitis A virus (HAV), porcine parvovirus (PPV), *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Candida albicans* were all selected for this study. Enveloped viruses such as HIV-1, BHV, and BVDV were effectively inactivated to undetectable levels by 70% ethanol treatment, gamma irradiation process, and ethylene oxide (EO) gas sterilization process. Also non-enveloped viruses such as HAV and PPV were effectively inactivated to undetectable levels by gamma irradiation and EO gas treatment. However HAV and PPV showed high resistance to 70% ethanol treatment. *E. coli* and *C. albicans* were effectively inactivated to undetectable levels by 70% ethanol treatment, gamma irradiation process, and EO gas treatment. Also *B. subtilis* was effectively inactivated to undetectable levels by gamma irradiation process and EO gas treatment. However it showed high resistance to 70% ethanol treatment.