

## 스테로이드호르몬의 항체생산과 측정방법 개발 (Production of Antibodies of Steroid Hormones and Establishments of Immunoassays)

윤 용 달

한양대학교 자연과학대학 생물학과

### 서 론

방사면역측정법(Radioimmunoassays,RIA)은 기초과학은 물론 임상의학, 약학, 수의.축산등 연구의 중심축을 이루고 있다. 스테로이드의 정량분석은 1950-60년대 화학측정법과 생물학적측정법이 주종을 이루었으나, 1970년대부터 방사면역측정법이 개발되어, 고도의 정밀성, 정확성, 감도를 가지고, 또 특이적(specific) 측정 방법으로 알려졌다. 그러나 방사성 동위원소를 사용하는 문제점들이 계속 노출됨에 따라 1980년대 이후 비방사면역측정법(non- isotopic immunoassay, NIA)의 개발이 장족의 발전을 이루어 RIA를 대체할 수 있는 수준에 이르고 있다(1,6,8,9). NIA는 효소면역측정법 (enzyme immunoassay EIA), 형광(FIA), 섬광(CIA, LIA), 입자(particle, PIA), viro- (VIA), metallo-(MIA), 광분산입자계수측정법(LSIA or PCIA), biosensor, spin lable (SLIA) 면역측정법 등이 개발-정립되어 상용화되고 있다 (9).

본 강연은 면역학적 측정법의 변화를 분석하고, 스테로이드호르몬 특히 androgen의 항체를 생산하여 RIA 및 NIA를 개발.정립한 경험을 소개하고, 정리하여 특히 국내의 임상연구와 기초 의학 연구자들의 대처해야 할 문제점을 도출하고자 하였다.

### 면역측정법의 구성과 명칭

면역측정법의 주요 구성은 1) 특이성이 높은 항체, 2) 측정 시료와 순수도가 같은 표준 시약(reference standard), 3) 추적자로 표지된 항원(labeled antigen)이다. 대부분의 측정법에서 정해진 양의 항체를 이용하는 "limited reagent method"와 항체를 과량 사용하여 비경쟁적으로 포화시키는 reagent excess method로 구분한다. 전자는 추적자의 종류 + 면역항체, 수용체 + 측정법으로 구성된다. 즉 RIA, radioreceptorassay(RRA), radiotransinassay( RTA)등으로 사용한다. 후자는 추적자를 중간에 넣어 사용하고 있다. 즉 Immunoradiometric assay (IRMA), immunofluorometric assay (IFMA), Immunoenzymometric assay (IEMA) 등으로 사용하고 있다 (4). 그러나 항체에 효소를 결합시켜 사용하는 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)의 경우에 EIA와 IEMA에 모두 사용함으로써 명칭으로 인한 방법론의 이해에 혼동을 주고 있다.

### 스테로이드 호르몬의 항체생산과 결합단백질

주요 결합단백질을 이용하여왔으나, 근래에는 항체를 주로 사용하고있다.

A. 다가항체(polyclonal antibody, PcAb)의 생산 :

1970년대 초부터 대부분 다가항체를 사용하여 스테로이드호르몬을 측정하였다. 최근까지 이를 주로 사용하고 있다. 스테로이드는 분자량이 1,000이하로 면역항원이 아니므로 분자량이 큰 단백질에 결합시켜야한다. 결합단백질의 종류, 결합linker의 종류, 결합항원의 항원성, 항원과 hapten간의 반응 정도, 항원의 분리.정제, 항원가의 특성 등을 잘 연구하여야 우수한 항체가 얻어진다.

1. 결합단백질의 종류: 스테로이드와 결합은 globulin fraction, serum albumin, hemocyanin, ovalbumin, thyroglobulin, fibrinogen등을 이용한다. bovine serum albumin (BSA), 와 hemocyanin (KLH)이 가장 많이 사용된다. 일반적으로 적정의 epitope density는 BSA 에 15-20의 결합이 이루어져야한다 (3).

2. 스테로이드 호르몬 면역 항원의 합성: 결합단백질의 C-terminal, Asp, Glu등의 carboxyl group; N-terminal, Lys의 amino group; His, Tyr의 imidazo phenolic group; Cys의 sulfhydryl group등에 결합시킨다.

COOH를 가진 스테로이드 호르몬은 Mixed anhydride procedure 또는 N-ethylbenzisoazole로 BSA-NH<sub>2</sub> group에 결합시키고, carbodiimide를 이용하여 N-terminal에 결합시킨다. NH<sub>2</sub> (aromatic or aliphatic)를 가진 경우 nitrous acid로 diazonium salts로 바꾸어 His, Tyr, Trp에 결합시킨다. aliphatic group은 water soluble carbodiimide로 BSA에 결합시킨다. OH (alcohol, phenol, sugar, polysaccharides, nucleosides)을 가진 경우는 COOH를 가진 hemisuccinate (HS)나 chlorocarbonate, aminophenyl derivatives, carboxylmethyloxime (CMO)등을 결합시켜 단백질과 합성한다.

3. 항체의 생산: 항체의 생산은 매주 면역주사하여 단기간에 생산하는 Short-term protocol (STP)과 매월 면역주사하는 Long-term protocol (LTP)로 구분한다. 스테로이드 호르몬의 생산에는 주로 LTP방법을 사용한다.

4.항체의 역가: liquid-phase RIA를 이용하여 50%의 치환율을 나타내는 희석율로 나타낸다. 일반적으로 1: 25,000이상의 역가를 가진 항체를 이용하여 측정법을 정립한다. 역가는 항혈청의 종류, 반응조건, 반응용액량, 완충액, 온도, 반응시간, 결합형과 유리형의 분리방법등을 조정하여 표준화시켜 사용한다.

5.항체의 특성과 질 평가: 일반적으로 우수 항체는 1)높은 역가(titer), 2) 높은 결합력 (avidity), 3) 높은 친화력(affinity)을 가진다. 이러한 항체를 사용하면 측정의 질이 높아진다.

#### B. 단가항체(Monoclonal antibody,McAb)의 생산:

1980년대 부터 약 50%이상 이 McAb를 생산하여 사용하며, hybridoma technology가 사용된다(2). 두개의 항체를 생산하는 hybridoma line을 융합시켜 만든 bispecific McAb, anti-idiotypic Ab등 특이한 항체, 두 종의 교잡항체 (inter-specific chimeric Ab)등은 이 방법에 의해서만 가능함으로 최근에는 McAb 생산이 주를 이루고 있다. 이러한 장점에도 불구하고 McAb생산단가가 높아 스테로이드의 측정은 아직 까지도 우수한 질의 PcAb에 의존하고 있다.

#### **추적자(Labels)**

면역측정법에서 추적자로 사용되는 물질들은 enzymes, fluorescent, ligands,

luminescent, particles, radioisotopes, vesicles 등이 사용되어왔다. 추적자 특이도 (specific activity), 표지방법(labeling)의 용이성, endpoint determination의 용이도, 생물학적 유해(hazard)여부, 측정방법으로 응용 가능성, 또는 생체 내 간섭물질의 영향등 고려 요소에 따라 선택된다.

1. 측정의 특이도(specific activity) : 추적자로 이용되는데 있어서 중요하게 고려할 사항은 측정의 특이성을 높여서 측정의 한계를 최대한 낮추는 것이다. 최근 추적자로 사용되는 물질은 주로 RI, enzyme, lanthanides (Eu,Sm), chemiluminescent dyes, 등이다.

2. 효소 추적자 (enzyme as label): EIA/ELISA 추적자로 이용되는 효소는 horseradish peroxidase (POX) 가 50%, alkaline phosphatase 가 약 25%선을 넘게 사용되고 있다. POX는 turnover number가 높고, 여러 가지 감도가 높은 방법으로 개발할 수 있고, 부착시키기 용이한 때문이다.

3. 형광물질 (fluorescent dyes): FITC, rhodamine 등을 추적자로 사용하여 형광분석기로 측정한다. 형광면역측정법(FIA)에는 자연섬광 또는 발광(luminescence, L)현상을 이용한다.

4. 화학 (chemil-,C)및 자연섬광(bio-luminescent (L) tracers): luminol, isoluminol, amino butyl-ethyl isoluminol(ABEI), acridinium ester 등 많은 화학섬광 추적자가 찾아지고 또 화학적으로 합성되어 왔다. 이를 이용한 섬광면역측정법( CIA or LIA 또는 BIA) 방법들이 개발되어 왔다. 이들은 이미 RIA를 대체할 수 있는 정도로 발전되었고, 실제로 상업화되었다.

5. 측정물질의 유해성 : NIA는 방사선 장애는 없지만 표지물질들은 암유발원 (carcinogenicity), 기형유발원 (teratogenicity), 일반적인 독성을 나타낸다는 것을 유의해야 한다.

### **결합형과 유리형의 분리(separation system)**

일반적으로 결합형과 유리형을 분리하는 방법은 수용성계 흡착형 (liquid phase); 수용성계 침전형 (liquid precipitates); 고형계 흡착형 (solid phase, SP); 고형계 침전형 (solid ppt) 고형계 간접 흡착형 (solid indirect ppt)등 많은 물질계가 사용되었다.

RIA에서 결합형(antibody-bound form)과 유리형(free form)의 분리에는 DCC로 유리형을 흡착(adsorbing)시키거나, 2차 항체를 이용하여 결합형을 침전시키고, 원심분리시키는 방법을 써왔다. 리간드나 항체를 고형지지체(solid phase, SP)에 부착시켜 사용하는 방법이 측정의 질을 높히므로, pmol수준의 측정법에는 70%이상 SP방법을 주로 사용하고 있다. 가장 많이 발달한 방법은 96-well microtitre로 80년대초에는 약 15%, 90년대에는 80%에 이르고 있다. 최근 plastic ball이나 stick에 부착시키는 방법이 약 5%이상 늘고 있으며, 매우 유용한 방법으로 평가 받고 있다.

### **직.간접면역측정법**

결합형과 유리형을 분리하는 간접측정기법(heterogeneous assay system, Heta)은 통상적인 면역측정법이나, 측정시간이 길어지고, 분리용 기기.장비 필요하고, 자동화가 어

려워진다. 또한 측정오차가 많이 생기게 된다. 이에 반하여 homogeneous assay system (Homa)는 추적자-항원 및 항체가 결합되었을 때 추적자 시그널(signal)이 변화하며 결합 형만이 측정되도록 만든 기술이다. Homa는 간단하고, 빠르고, 보다 정확하며, 자동화가 가능해져 직접측정법(direct assay) 개발이 가능해진다. 그러나 측정범위가 nmol/L ~  $\mu$  mol/L로서 생체내 비교적 다량의 분석물질이 존재할 때, 즉 치료용 약품의 모니터링할 때 이용하고 있으나 정확한 정량시에는 사용이 어려운 단점이 있다.

### 면역측정법의 평가와 정립

A. 일반적인 고려 사항: 일반적으로 측정의 질을 높이고, 우수한 결과를 유지하고, 측정치의 타당성을 검증받기 위해서는 측정결과 처리의 합리성과 정도관리의 적절한 사용이 필수적이다 (7). 측정법을 연구에 응용하기 위해서는 각 방법의 한계와 장단점을 잘 알고 사용하는 것이 필수적이다. 또한 kit 사용시에 제품간 (Lot No.변화), Kit-to-Kit변이, 회사간변이 등이 많아 규칙적으로 조정되어야 한다. 항시 같은 방법을 사용하여도 정밀도, 정확도, 특이도 또는 교차도, 감도가 평가되어야 하며 QC 시료를 이용하여 측정오차를 줄이는 노력이 계속되어야 한다.

B. 방사면역 측정법의 정립: 스테로이드 호르몬의 측정 방법은 통상적으로 RIA방법을 변형하여 정립한다. 본 연구팀이 개발한 RIA의 정립을 과정을 androgens을 중심으로 소개하면, 응용전에 우선 측정의 감도 (sensitivity), 정확도 (accuracy), 교차반응도 (Cross reactivity), 정밀도 (precision) 등을 조사하고 실험내 변이계수 (Intraassay variation, with-assay variation, WAV)를 측정하고, 실험간 변이계수 (Interassay variation, between-assay variation, BAV)를 산출하여 측정오차 범위를 확정한다. 일반적으로 세 개의 QC 시료를 매 다른 assay batch내에 삽입하여 20회 정량한 후 나온 값을 이용한다..

### C. 측정의 한계(Detection limit):

1. 길항적 측정방법(competitive assays):  $^{125}$ I-competitive RIA의 경우 평형 계수는  $10^{10}$ L/mol로 이론적인 측정의 최소치(theoretical minimum detection limit, TMDL)은  $10^{12}$ mol/L(2pmol/L)이다. 그러나 측정의 특이도가 높은 비방사면역추적자를 이용하거나, 매우 친화력이 높은 항체를 사용할 경우, 100배 이상 TMDL을 높일 수 있으므로 약  $10^{10}$ mol/L (20 fmol/L)까지 측정의 한계를 낮출 수 있다.

2) 과포화적 측정법(reagent-excess assays): 이론적으로 가장 낮은 측정한계를 만들 수 있다. 대개의 경우 amole ( $0.4$  amol/ $100 \mu$ L well,  $0.02$  amol/tube) 수준이나 실질적인 측정한계는 측정법에 따라 차이가 있다. 본 연구팀은 SP-ovalbumin-androgens 에 PcAb + 2nd Ab - biotin + avidin- chemiluminescent dye를 이용시 TMDL을 100배 낮출 수 있었다.

### 정도관리(Quality Control)

1980-1988년간 영국의 Univ. Edinburgh가 UKEAS에 의해 실시한 혈청내 gonadotropin 측정의 정도관리 연구 결과에 의하면, 영국내 177개 호르몬 실험실의 결과에서 IRMA방법이 RIA에 비하여 17% 높은 값을 나타내었고, LH의 경우 33%의 낮은

측정치를 나타낸다고 보고하였다(2). 이 결과는 측정의 방법보다도 IRMA가 사용하는 McAb가 GTH의 isoform을 측정한 때문으로 알려졌다. 이들의 결과에서도 실험실내의 변이(GCV)는 10%정도인데 비하여, 타 실험실간 GCV는 20-30%라고 하였다. 즉 실험실내 정도관리가 매우 중요하다는 것을 알 수 있다. 즉 국가적 기준이 마련되어야 한다.

## 결론 및 제언

최근 각 나라가 경제적이고, 측정 한계가 낮고, 감도가 높은 측정방법을 개발하고 있다. 또한 이미 over-the-counter kit가 개발되고 상업화되는 시점에 있다. 이미 RIA 와 IRMA 등 방사면역측정법은 비방사면역측정법 (NIA)로 대체된 상황이다. 항체는 특이성이 높은 McAb로 대체되고 있으며, 추적자는 효소와 liminescence 물질을 결합시킨 enhanced method로 대체되고 있다. 또한 assay formulation에는 solid-phase method가 주로 사용되고, 새로운 측정 방법이 날로 발전하고 있다. 그러나 국내의 측정방법 개발에 주의를 기울이는 과학자는 거의 전무하다. 대부분의 연구자가 선진 제국의 학자에게 의존하거나, 상업적 kit를 사용하여 측정의 일관성이 없고, 비교가 어렵고, 외화를 낭비하고 있음에도 연구비의 지원은 전무한 상태이다. 또 상업성이 결여된 호르몬의 측정방법은 사용 불가능 해지고, 특히 소동물이나, 곤충,수산동물의경우처럼 특이 동물의 생식을 조절하는 호르몬의 연구는 거의 불가능해진다. 영국이 UKEQAS에 177개 실험실이 참여하고 있는 점을 보아 국내에도 호르몬 측정실은 계속 늘고 있으나 아직은 미약한 상태이다. 국내의 실정에 비추어 측정기술을 훈련하는 과정을 학회 주관으로 개설하여야 하고, 표준화된 호르몬 및 질이 좋은 항체를 생산 공급하고, 측정방법을 국내 실정에 맞추어 표준화하고 또 각 측정법을 optimization하고 validation하여 실험실간, 연구자간에 서로 신뢰할 수 있는 정도 관리 scheme이 만들어져야 하며 이를 위한 국가적 차원의 자원이 필요하다고 판단된다.

※ 본 발표에서 제시된 스테로이드 항체는 KOSEF/HRC-95, 96-0401의 연구비 지원으로 생산하였으므로, 일부는 500 tube 로 분주되어 호르몬연구센터의 규정에 따라 국내의 호르몬 연구자에게 무상 공급될 예정입니다.

## 참고문헌

- Albertson BD, Haseltine FP (1988): Non-radiometric Assays. New York: Alan R Liss,  
Birch JR, Lennox ES (1995): Monoclonal Antibodies, Principles and Applications, Wiley-Liss.  
Erlanger BF (1980): Methods Enzymol 70:85-103.  
Freitag JW, Lau HP, Wadshey JJ (1984): Clin Chem 30:1494-98.  
Gosling JP (1990): Clin Chem 36:1408-1427.  
Pablo F, Scanes CG, Weintraub BD (1993): Handbook of Endocrine Research Techniques. Academic Press, Inc.  
Seth J, Hanning I, Bacon RRA, Hunter WM (1989): Clin Chim Acta 186:67-82.

Yalow RS (1992): In: Textbook of Endocrinology. Wilson JD & Foster DW, WB Saunders Co., 8th Ed. Chap.36 pp 1635-1646.

Yoon YD (1996): Proc. 31st Ann Congress, Korean Soc. Fertil. Steril. 1996 Jun 7.