

放射免疫測定法

新興保健專門大學 放射線科

慶光顯

The Method of Radioimmunoassay

Kwang Hyon Kyong

Dept. of Radiotechnology, Shin Heung Junior Health College

目次

- I. 緒論
- Ⅰ. 基本原理
- Ⅱ. 標準曲線の作成
- Ⅲ. 必要한 要求事項
- Ⅳ. 臨床的 應用範圍
- Ⅴ. 要約
- 參考文獻

I. 緒論

近來에 免疫學的 測定法은 現代臨床醫學의 分野에서 重要한 位置를 차지하고 있으며 날로 急速한 發展을 이루고 있다. 生體에 存在하고 있는 微量의 호르몬 또는 生理學的으로 重要한 試料의 量을 正確하게 測定한다는 것은 內分泌學的인 側面에서 볼 때 緊要한 手段이 되고 있다. 이러한 研究方法을 爲하여 初期에는 主로 生物學的 測定 (bioassay)이 使用되었으나 所要時間이 많이 消耗되고, 方法이 複雜하기 때문에 많은 試料을 處理하기가 어려움은 물론 特히 測定結果의 敏性 (sensitivity)이 鈍感하는 등의 缺點이 많았다. 이러한 問題들을 解決하기 爲하여 1960年에 Yallow와 Bersson 이¹⁾ 最初로 血清中の 인슈린測定을 放射免疫測定 (Radioimmunoassay, RIA)에 依하여 試圖된

來 단백 호르몬, 비단백호르몬, steroid에 適用됨으로써 內分泌學 研究에 새로운 發展을 가져 왔다. 또한 核醫學的인 立場에서 볼 때 放射免疫測定法은 放射性 同位元素 (radioisotope, RI)를 使用하여 試驗管内測定 (invitroassay)의 大部分을 차지하고 있으며 인슈린, 成長호르몬, 卵胞刺戟호르몬, 黃體 호르몬 등과 같은 peptide 호르몬의 量을 $10^{-9} \sim 10^{-12}$ g의²⁾ 적은 領域까지 定量分析할 수 있는 能力을 가지고 있다. 이와같이 放射免疫測定法은 生體醫學에 널리 應用될 수 있기 때문에 이 方法의 基本原理, 必須事項, 臨床的인 利用範圍에 對하여 充分히 理解하는 것이 매우 重要하다.

Ⅱ. 基本原理^{3,4,5,6)}

放射免疫測定技術의 一般的인 基本原理는 放射性同位元素로 標識된 抗原 (Ag^{*})이 어떤 特定抗體 (Ab)에 對하여 加逆的으로 反應하고 標識된 抗原-抗體 複合體를 形成하는데 根據를 두고 있다. 또한 非標識된 抗原 (Ag)을 添加시키면 特定抗體 (Ab)에 對하여 免疫學的으로 標識된 抗原과 非標識된 抗原間에 競爭的으로 作用하는 것을 利用한 것이다. (그림 1 참조)

이 混合物 ($Ag + Ag^{*} + Ab$)에 非標識抗原의 濃도가 많으면 많을 수록 標識抗原이 特異性있게 準備된 抗體와 結合하여 標識抗原-抗體 複合體를 만들수 있는 確率이 작아진다. 故로 一定量의 抗體에 一定量의 標識

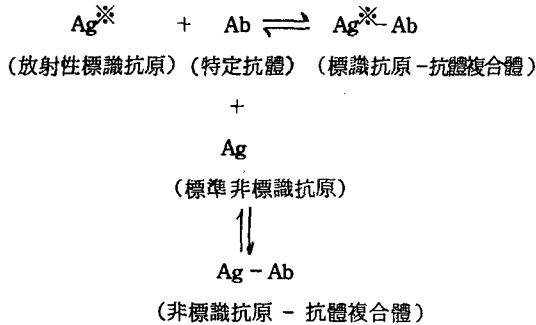


Fig 1. Basic principle of radioimmunoassay

抗原을 넣은 다음에 非標識抗原의 濃度를 各各 다르게 하여 一定한 溫度로 定溫維持시킨다. 이때 競爭의으로 結合한 標識抗原 (bound form)과 結合하지 못한 遊離狀態로 있는 標識抗原 (free form)을 分離하는 것이 必要하는데 그 方法은 電氣泳動法 (electrophoresis)⁷⁾, gel filtration, 固狀抗體法 (solid phase adsorption of antibody)⁸⁾, 二重抗體法 (double antibody method) 등이⁹⁾ 있다. 그 後에 結合된 標識抗原과 遊離狀態로 된 標識抗原을 各各 放射能을 計測하여 그 比를 標準曲線 (standard curve)에서 y 軸에 作成하여 點示한 後 x 軸에는 抗原量을 作成하여 測定하려는 物質의 값을 판독한다¹⁰⁾.

III. 標準曲線의 作成^{2,3,4,10)}

非標識抗原의 量의 함수로서 放射能의 分布를 묘사한 것을 標準曲線 (standard curve 또는 dose response curve)이라 한다. 標準曲線은 여러가지 方法에 따라서 作成되나 가장 널리 使用되고 있는 曲線은 結合型-遊離型의 比 (B/F), 遊離型-結合型의 比 (F/B), 또는 結合型의 百分比 (B%), 遊離型의 百分比 (F%)等을 y 軸에 잡고 x 軸에는 抗原의 量을 標示하여 semilog 紙에 옮기거나 또는 logit 變換으로 한다¹⁰⁾. (表 1. 그림 2 참조) 특히 抗原의 濃度가 작은 領域에서 는 더 正確한 量을 判讀하기 爲하여 y 軸에는 logit (y), x 軸은 log 抗原量을 表示하는 境遇도 있다.

$$\text{Logit}(y) = \ln \frac{y}{1-y}$$

$$y = B/Bo \text{ 또는 } (B/F) / (Bo/Fo)$$

Bo : 非標識抗原이 없을때 結合型比

Fo : 非標識抗原이 없을때 遊離型比

이때에 B/F, F/B, B%, F%를 計算하기 爲해서 各 試料에 對한 放射能을 well scintillation counter 에 依하여 測定하는데 반드시 試料은 各各 2個씩으로 하여 測定하며 그 誤差는 10% 以內가^{9,10,11)} 되어야 믿을 만한 것으로 받아 질수 있다.

Table 1. The percentage of bound form for standard curve preparation in duplicated samples.¹⁰⁾

Amount of standard Hormone (μg/ml)	Bound form % (B%)	
	A sample	B sample
0	51.21	50.47
0.23	51.36	50.41
0.65	48.71	47.67
1.25	43.48	45.39
2.5	36.07	39.98
5	31.83	30.78
10	18.06	16.84
20	8.70	9.16
40	6.37	4.48
80	4.05	1.46

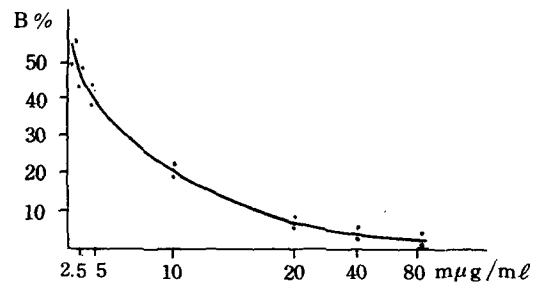


Fig2. A standard curve for radioimmunoassay.¹⁰⁾

IV. 必要한 要求事項⁴⁾

放射免疫測定은 純粹한 抗原, 放射性標識抗原, 抗

體와 같은 3가지 要素가 있어야 이루어 지며 그리고 遊離型과 結合型에 對한 放射能의 分布를 測定하기 爲해서는 適當한 分離技術이 必須인 要求事項들이다. 測定(assay)의 sensitivity는 3가지의 要素에 對한 量과 質, 또는 分離技術의 選擇에 따라 依存되기에 試藥의 準備나 分離技術에 關한 內容을 잘 알고 있어야 된다.

1. 純粹한 抗原

標準 및 標識抗原의 準備와 抗體生成은 純粹한 抗原의 使用與否에 따라 달라진다.

電氣泳動法(electrophoresis), 크로마토 電氣泳動法 chromatoelectrophoresis), gel filtration, 이온교환 크로마토그래피(ion exchange chromatography)와 같은 方法들이 力價(titer)가 높으면 純粹한 抗原을 biologic sample 로 부터 추출하는데 使用되고 있다.

2. 放射性標識抗原

特定抗體와 加逆인 反應을 가지는 放射性標識抗原은 放射免疫測定檢査에 있어서 必須인 要素中의 하나이다. 測定の 예민성(Sensitivity)은 抗原과 關聯된 두가지 因子에 依存하는데 첫째는 放射性標識抗原은 非標識抗原이 抗體와 加逆反應하는 것과 같은 形態의 性質을 가진 것이라야 한다. 둘째 因子는 放射性標識抗原의 比放射能이 計測할 程度로 커야한다. 그러나 너무 컸을 境遇는 標識抗原을 準備하는 동안과 저장시 分子의 損傷을 招來하여 特異性(specificity)이 잃게 된다.

標識目的을 爲한 放射性核種의 選擇은 半感期, 使用 가능한 比放射能, 標識方法, 그리고 價格을 考慮해야 한다. ^3H (tritium)이나 ^{14}C (carbon)과 같은 核種들은 分子의 사슬(ring)部分에 標識하는데 便利하여 steroid 分析에 應用되지만 半減기가 긴 β 放射體라는 것이 短點으로 되어 있다. ^{57}Co 은 vitamin B₁₂ 放射免疫測定에 理想인 放射性核種이다. peptide 호르몬, 바이러스抗原, 藥品類等의 測定에 있어서 가장 많이 사용되는 放射性核種은 ^{125}I 또는 ^{131}I 을 利用한 沃素標識法이다. 단백질과 沃素사이의 反應은 Hughes에¹²⁾ 依하여 잘 研究되어 沃素가 단백질의 tyrosine 分子에 附着이 쉽게 이루어 지는 것으로 되어 있다. 여러가지의 沃素標識法은 모두 요오드化合物을 酸化시켜 沃素로 轉換시키고, 이를 단백질分子內의 tyrosine 과 結合되는 것이 다른 放射性核種 보다 쉽게 이루어 지기 때

문에 比放射能이 높은 標識抗原이 될 수 있다. Iodine의 同位元素中에서도 ^{131}I 보다 ^{125}I 가 더 많이 使用되고 있는 그 理由로서는 다음과 같다.

첫째, ^{131}I 의 同位元素存在比는 約 15~20% 로서 ^{127}I 이 80%程度 包含되어 있어 摻體로 存在하나 ^{125}I 는 同位元素存在比가 96%以上으로 거의 無摻體로 使用할 수 있기 때문이다. 둘째는 높은 에너지에 對한 γ counter의 計數效率(count efficiency)이 ^{131}I 은 約 40%이나 ^{125}I 는 約 70%에 該當된다. 셋째 理由로서는 ^{125}I 의 半感期가 60일이어서 한번 만든 標識抗原은 約 1個月間 계속 使用할 수 있다는 點이다.

가. 抗原의 放射性요오드化

예민성(sensitivity)이 좋은 放射免疫測定을 하기 爲해서는 放射性沃素標識化合物의 比放射能은 100~300 mCi/mg 이어야 한다. 보통 많이 使用되고 있는 放射性요오드化의 技術은 1960년에 Hunter와 Greenwood에¹³⁾ 依해 開發된 方法으로 chloramine-T method 라고 부른다. 이 方法은 Na ^{125}I 용액에 단백질과 chloramine-T를 添加시키는 것으로 이에 對한 反應은 잘 알려져 있지 않으나 chloramine-T는 酸化劑로서 作用하여 沃素가 단백질分子內에서 tryrosine 과 잘

Table 2. The most commonly adopted routine Iodination procedure¹⁾

^{125}I , approximately 1 mCi (0.5 to 2 mCi)	10 $\mu\ell$
Sodium phosphate, pH 7.5, 0.5 M	10 $\mu\ell$
Hormone, 5 μg (2.5~5 μg) in 0.01 M phosphate buffer	10 $\mu\ell$
Chloramine-T, 50 μg (30 μg) in 0.01 M phosphate buffer	10 $\mu\ell$
Total Volume	40 $\mu\ell$

附着이 되고 餘分の 沃素를 Na-metabisulfite 로 還元시켜 높은 比放射能의 標識抗原을 얻을 수 있다. 가장 많이 使用되고 있는 抗原의 放射性沃素의 標識法의 例는 表 2와 같다. 卽 試藥들을 신속하게 添加시키고 約 30~45秒 동안 연하게 흔들면서 混合시킨 後에 還元劑로서 0.01 M buffer의 50 $\mu\ell$ 안에 있는 Na-metabisulfite 50mg 을 添加시켜서 反應을 中止시킨다. 이때에 要求되는 환원제의 量은 chloramine-T 量과의 化學的인 平衡을 이루어야 한다. 그리고 標識反應後

에는 sephadex 와 같은 체 (sieve)로 되어 있는 small column 을 통하여 通過시킴으로 標識抗原을 分離시킨다. 分離方法은 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 전기영동법, gel filtration 등이 있다.

3. 抗體^{4,6)}

抗體는 gamma globulins 또는 immunoglobulins라고 부르는 혈청단백의 무리들이다. 放射免疫測定에서 높은 力價, 特異性, 그리고 親和性을 갖는 抗體가 準備되어야 한다.

가. 抗體生成

抗原을 動物에게 注射하여 抗體를 生産한다. 抗體를 만들기 위하여 抗原의 條件으로서 分子量이 4,000 ~ 6,000 以上인 단백질화합물이어야 한다. 이것은 또한 免疫原이 될 수 있다. 그러나 分子量이 작은 甲狀腺호르몬, steroid 호르몬, 環狀의 뉴클레오티드(nucleotides), 藥品과 비단백질들은 albumin 이나 thyroglobulin 과 같은 分子量이 큰 단백질담체의 結合시켜야만 抗原이 되며 免疫原이 될 수 있다. 이때에 結合以前의 작은 分子를 합텐(hapten), 結合된 後의 것을 콘주게이트(conjugate)라고 한다. 抗體生成을 誘導하는 一般적인 方法으로서 純粹한 抗原과 아쥬반트(Freund's adjuvant)를 混合하여 動物에게 注射하여 얻어지고 있다. 動物의 選擇은 토끼, guinea 돼지, 양염소, 닭, 원숭이 중에서 하나 흔히 토끼가 많이 사용되는데 그 理由는 작은 動物로서 抗原의 投與量이 적어도 되고 많은 量의 血液을 採取할 수 있기 때문이다. 또한 부스터(Booster) 注射할 때는 วัคซีน(pertussis vaccine)이 안들어 있는 아쥬반트를 섞어서 動物에게 注射하는 것이 좋다. 注射하는 部位는 두 어깨사이나 groin 부근에 있는 彬巴節에 피하주사하면 效果의이다. 첫번째 免疫에 依해 一次의으로 生成된 抗體는 質이 서서히 增加되다가 6 주후에는 最高值에 達하고 있으나 一般적인 方法에 따라 2 個月간격으로 부스터면역하고 나서 2 주마다 採血한 後 血清에 對해 抗體生成 여부를 檢査하는데 이 期間前後에 動物로부터 採血하여 特異성과 力價가 높은 抗體를 얻고 있다. 이러한 過程에 依해 生成된 抗體는 凍結乾燥形態(lyophilized form)으로 貯藏하는 것이 理想的이다.

4. 分離技術^{3,4,6)}

放射免疫測定에 있어 마지막으로 매우 重要한 것은 競爭의으로 結合한 標識抗原(B)과 結合하지 못한 遊

離抗原(F)을 신속, 正確하게 分離하는 것이라 본다. 分離方法은 電氣泳動法, gel filtration, 固床抗體法, 二重抗體法, DCC (Dextran Coated Charcoal) 法等이 있으나 가장 많이 사용되고 있는 方法만을 說明하면 다음과 같다.

가. 二重抗體法

非標識抗原, 標識抗原, 第一抗體와 buffer 容液의 混合物들을 4°C에서 24~72 時間동안 定溫維持시켜 平衡을 이루게 한다. 그 後에 第二抗體를 다시 添加시키고 複合體가 100% 結合될 때까지 다시 4°C에서 16~24 時間동안 充分하게 定溫維持시킨 다음 各 試驗管을 3,000 rpm 으로 30 分 동안 遠心沈澱시켜 分離한다. 여기서 遊離抗原이 含有한 上澄液을 버리고 沈澱物을 다시 깨끗한 물로 씻은 後에 다시 遠心分離하여 上澄液은 버리고 沈澱物에 對한 放射能을 計測한다. (그림 3 참조)

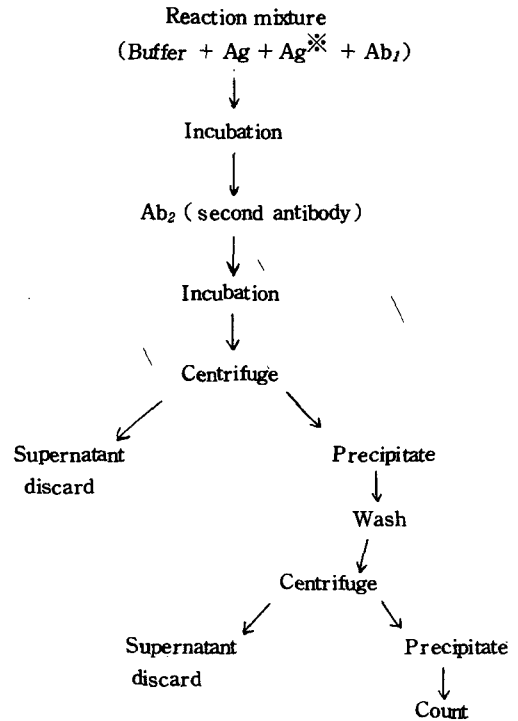


Fig 3. RIA sequence with double antibody separation.⁴⁾

第二抗體의 生成은 第一抗體를 만들기 爲하여 選擇된 動物의 γ -globulins 을 比較的 큰 動物에 注射하여 얻어 지고 있다. 토끼의 γ -globulins 을 염소에 注射하여 만들어진 염소혈청 (antirabbit γ -globulins, goat serum), guinea 돼지인 경우는 guinea pig 血清 등이 第二抗體로 될 수 있다. 이 方法의 長點은 遊離抗原과 結合抗原을 신속, 正確하게 分離할 수 있고 많은 量의 試料를 取扱할 수 있으나 第二抗體의 價格이 너무 비싸고 誤差가 많은 것이 短點으로 되어 있다.

나. DCC 法

抗體와 結合하지 않는 抗原은 炭(charcoal), 滑石末(talc), 음이온 교환수지, 섬유소분말 등에 잘 吸着된다. 이 中에서 普通 使用되고 있는 吸着劑는 活性炭素가루를 맥스트란으로 coating 된 현탄액이다. 이 方法은 맥스트란은 체(sieve)처럼 作用하여 分子量이 작은 抗原은 이 층을 透過하여 炭素가루에 吸着되나 分子量이 큰 것은 透過하지 못하여 炭素가루에 吸着되지 않는다. 일단 吸着된 것은 再次 遊離되지 않고 있으나 이 方法은 分子量이 크지 않은 抗原의 吸着에만 使用될 수 있다.

다. 固床抗體法

이 方法은 結合된 抗原으로부터 遊離抗原을 分離하는데 固體物質에 吸着된 抗體를 使用하는 것이다. 抗體를 不容性的 重合體(polymer)에 피복시키고 標識抗原과 非標識抗原을 添加시킨 後에 定溫維持 시킨다. 그 後에 遊離抗原은 버리고 結合된 抗原의 放射能을 計測한다. Catt 등¹⁴⁾은 抗體의 吸着劑로서 polymer 대신에 프라스티박 또는 한번 쓰고 버리는 튜브를 使用하였다. (그림 4 참조)

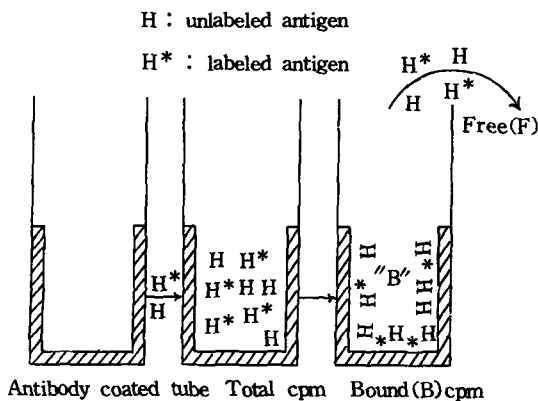


Fig.4. Solid phase antibody separation.³⁾

라. 電氣泳動法

簡單한 電氣泳動法은 電場下에서 結合된 抗原과 遊離된 抗原의 不均等한 이온移動에 根據를 둔 方法이다. 이 方法의 短點은 完全히 分離되지 않고 所要時間이 많이 걸린다는 것이다.

V. 臨床的 応用範圍

放射免疫測定에 依하여 測定할 수 있는 物質은 그림 5와 같다. 體內的 微量으로 存在하고 있는 vitamin B₁₂ 을 測定하여 惡性貧血여부를 檢査하고 스테로이드 호르몬인 cortisol, testosterone 의 量을 測定함으로써 副腎機能, 不妊症에 對한 正確한 資料를 주고 있다. 또한 digoxin 과 digitoxin 의 量을 測定하여 不整脈, peptide 호르몬系統인 甲状腺刺戟호르몬(甲状腺機能低下症), T₃, 成長호르몬, 인슈린, 副甲状腺호르몬, gastrin, FSH 등을 定量分析함으로써 매우 精確하게 情報를 주기에 臨床的으로 診斷價値에 도움을 주고 있다.

VI. 要約

이상 放射免疫測定의 基本原理, 純粹한 抗原, 標識抗原, 抗體生成, 表準曲線의 作成, 抗原抗體複合體의 分離方法에 對하여 說明하였다. 生物學的方法, 化學的方法, 機械的인 測定方法에 依해 生體內的 微量으로 存在하고 있는 物質들을 正確하게 測定할 수 없다. 그러나 放射免疫測定法에 依해 쉽게 測定되어 器管의 機能檢査는 勿論 各 器管과의 相關關係를 分析하여 疾病의 診斷, 治療經過를 評價하는데 매우 重要한 情報를 提供해 주고 있다. 이러한 點을 考慮하여 이 方法을 잘 習得하고 診療의 手段으로 널리 利用되어 醫療技術發展에 土臺가 되기를 바란다.

參考文獻

1. Yalow, R. S. and Berson, S. A. : Immunoassay of endogenous plasma insulin in man, J. Invest. 39, 1157, 1960.
2. Robert C. Lange : Radioimmunoassay, Nuclear Medicine for Technicians, Year Book Medical Publisher, Inc. 136, 1972.

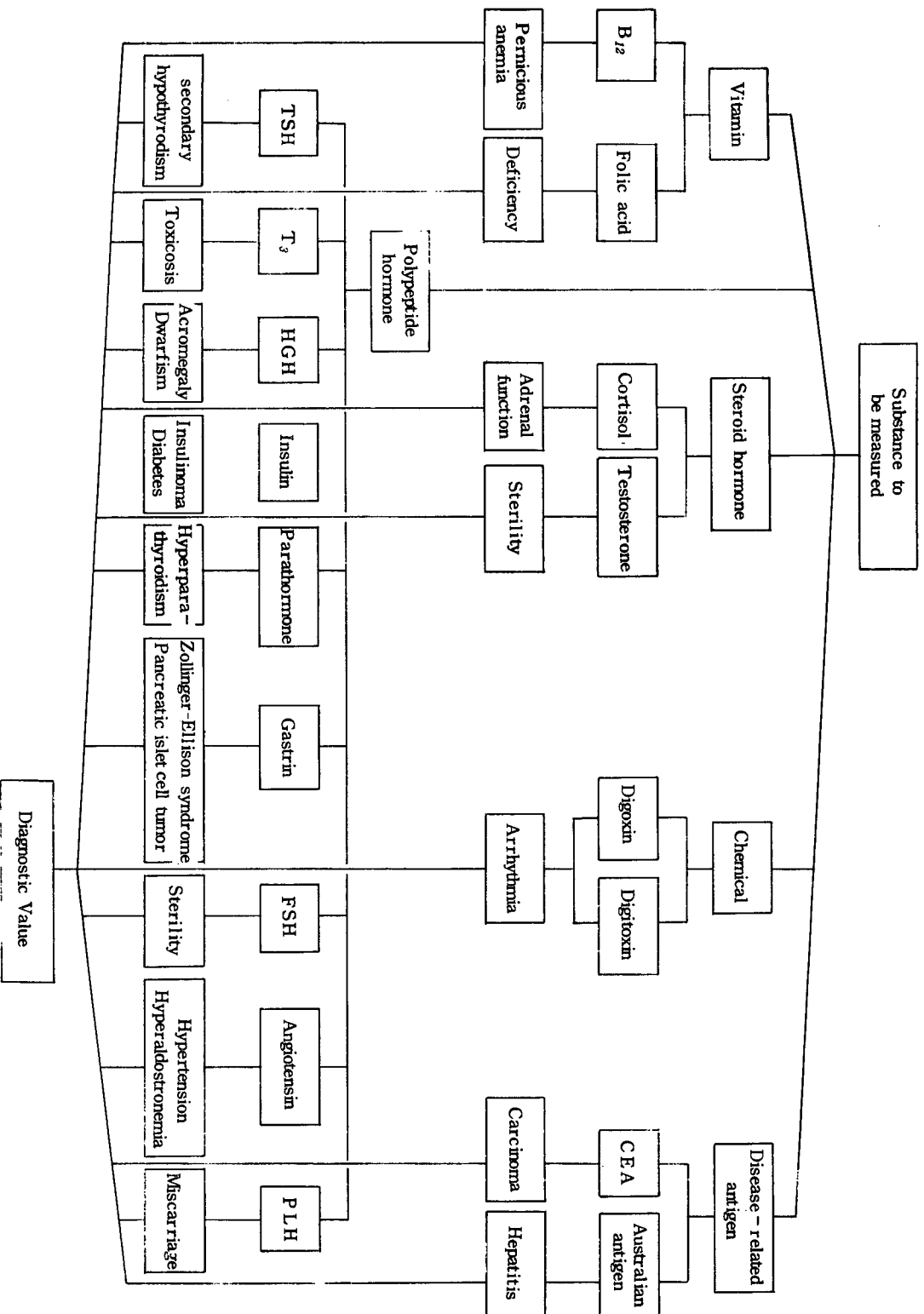


Fig.5. Diagnostic applications in radioimmunoassay 4)

3. Kurata, K : The principle and the Method of the Radioimmunoassay, 大韓核醫學會雜誌, 4 (1), 11, 1970.
4. Paul J. Early, Muhammad Abdel Razzak, D. Bruce Sodee : Radioimmunoassay, Textbook of Nuclear Medicine Technology, The C. V. Mosby Co. 295, 1975.
5. J. T. Andrews, M. Jeanmilne : Radioassay, Nuclear Medicine, A Wiley Medical Publication, 453, 1977.
6. 김재록 : 방사면역측정의 방법과 응용, 人間科學, 1 (4), 5, 1977.
7. Berson, S. A. et al : J. Clin. Invest. 35 : 170, 1956. 9. Hales, C. N. and Randle, P. J. : Lancet, 1, 200, 1960.
8. Grodsky, G. M. and Forsham, P. H. : J. Clin. Invest. 39. 1070, 1960.
9. Frantz., A. G, Rabkin, M. T. and H. Friesen : Effect of estrogen and sex differences on secretion of human growth hormone, J. clin.
10. 李玲雨, 李弘揆, 高昌舜, 李文鎬 : 사람成長 ฮอร์โมน의 放射免疫測定에 관한 研究, 大學核醫學會雜誌, 6 (1), 17, 1972. Endocr. 15, 1136, 1965.
11. Yallow, R. S. and S. A. Berson : "General aspects of radioimmunoassay procedures." in In vitro procedures with radioisotopes in Medicine, I. A. E. A. Vienna. 1970.
12. Hughes, W. L. : The chemistry of iodination. Ann. N. Y. Sci. 70. 3, 1957.
13. Greenwood, E. C., Hunter, W. M. and J. S. Glover : The preparation of ¹³¹I-labeled human growth hormone of high specific activity. Biochem. J. 89. 114, 1963.
14. Catt, K. and Tregear, G. W. : Science, 158. 1570, 1967.