

방사면역측정법



손 인

지방공사 강남병원 내과

Berson과 Yalow에 의해 개발된 방사면역 측정법(radioimmunoassay ; RIA)은 다양한 체내 미량물질을 검출할 수 있는 광범위한 측정시스템의 기원이 되었다는 점에서 생물학적 측정분야의 중요한 업적이라고 할 수 있다.

특이적으로 결합하는 두 물질중 하나를 리간드(ligand), 다른 하나를 바인더(binder)라 부르며 통상 측정하고자 하는 물질을 리간드로 한다. 리간드와 바인더를 반응시킨 후 결합형과 유리형간의 분포를 조사함으로써 리간드를 측정하는 일반적 방법을 리간드결합측정법(ligand binding assay)이라고 한다.

결합형과 유리형간의 분포를 알기 위하여 흔히 리간드나 바인더중 어느 하나를 표지하여 추적자(tracer)로 사용하는데, 방사성 추적자를 이용하는 리간드결합측정법을 방사리간드측정법(radioligand assay)이라 부른다.

방사리간드측정법에는 바인더로 항체(항체를 측정하는 경우에는 항원)를 사용하는 RIA, 세포수용체를 사용하는 방사수용체 측정법(radioreceptor assay ; RRA), 천연결합 단백을 사용하는 경쟁적 단백질결합측정법(competitive protein binding assay ; CPBA)

이 있다. 이들에서는 표지리간드가 추적자로 이용된다. RIA처럼 바인더가 항체이지만 표지항원대신 표지항체를 사용하는 방법은 면역방사계수측정법(immunoradiometric assay ; IRMA)이라고 한다. 그밖에 포화분석법(Saturation analysis)이라 불리는 검사도 있다. 현재 일상적 검사에서는 거의 대부분의 경우 RIA와 IRMA 두가지가 사용된다.

RIA는 방사성추적자를 사용하는 리간드 측정법중 한가지이지만, 전통적이고 대표적인 방법이기 때문에 방사리간드측정법 전체를 가리키는 말로도 통용되고 있다. 아래에서는 항원, 항체, RIA를 각각 리간드, 바인더, 방사리간드측정법과 동일한 의미로도 사용하였다.

〈RIA의 특징〉

RIA의 특징은 예민성, 특이성, 편리성, 다양성 등이다.

방사능은 미량이라도 정밀한 계측이 가능하기 때문에 다른 화학적방법으로 직접측정이 불가능한 미량물질도 RIA로 검출할 수 있다.

항원과 항체의 결합부위는 마치 열쇠와 자물쇠의 관계처럼 서로 딱들어 맞는 경우에만 결합하는 구조를 가지고 있다. 이러한

특이성 때문에 구조가 비슷한 다양한 물질이 들어 있는 체액에서 특정물질만을 선택적으로 측정해낼 수 있다.

대부분의 경우 RIA는 검사과정이 비교적 간단하고, 일단 시약만 준비되면 소량의 검체를 특별한 전처치없이 직접 검사할 수 있다.

또한 RIA는 일부 특수한 물질의 측정에 국한된 방법이 아니고 이론상 항체를 만들 수 있는 거의 모든 물질에 적용가능한 다양성도 있다.

〈RIA의 구성요소〉

RIA시스템을 만들기 위해서는 측정물질과 특이적으로 결합하는 항체, 방사성 표지 추적자, 결합형과 유리형을 분리하는 방법이 있어야 한다.

1. 항원 및 항체

RIA시스템의 개발에는 고도로 정제된 항원이 필요하다. 합성가능한 물질을 순수하게 얻을 수 있어 표준화, 방사성추적자의 제조, 항체생산 등에 쉽게 이용할 수 있다. 공급이 부족한 천연물질 등은 순도가 낮은 것을 사용하기도 한다.

전통적으로 항체는 동물을 면역하여 얻는다. 생산된 항혈청에는 원래항원에 반응하는 서로 약간 다른 다수의 항체 소위 다클론(polyclonal)항체가 들어 있다. 분자량이 큰 단백질이나 펩티드(peptide)는 좋은 면역원(immunogen)이 된다. 면역원성이 없는 저분자량물질은 알부민(albumin) 등에 접합시킨 것을 면역원으로 사용한다. 생산된 항혈청은 항체의 특이도, 친화도, 역가 등을 조사하여 적당한 것을 선택한다.

전통적 방법으로 면역한 마우스(mouse)의 비장에서 채취한 임파구(lymphocyte)와 동종의 골수종(myeloma) 세포를 융합하여, 무제한 증식하면서 단클론(monoclonal) 항체를 생산하는 하이브리도마(hybridoma) 세포를 만들 수 있다. 하이브리도마세포는 장기간 저장, 분배할 수 있으므로 원하는 단클

론항체의 대량생산이 가능하다. 단세포균항체의 생산에는 정제된 항원이 필요하지 않기 때문에 항원의 순수한 분리가 어려울 때도 유용하다. RIA에서는 단클론항체가 적절히 선택한 다클론항체보다 특별히 우수하지 않지만 IRMA에서는 큰 도움이 된다.

2. 방사성추적자

방사성표지 핵종으로는 거의 대부분 I-125가 사용된다. I-125는 화학반응성이 강하여 많은 종류의 분자에 도입할 수 있다. 에너지스펙트럼은 방사선장해가 문제될 정도로 높지 않으면서 효율적인 측정이 가능하다.

옥소화(iodination)를 위해서는 옥소이온을 반응성이 강한 유리옥소나 옥소라디칼(radical)로 산화시켜야 하고, 표지하려는 물질에 타이로신(tyrosine) 같은 반응기가 있어야 한다.

가장 많이 사용하는 방법이 클로라민T(chloramine-T)법이다. 보다 약한 산화반응을 이용하는 락토포산화효소(lactoperoxidase)법과 요도젠(iodogen)법도 있다. 옥소를 직접 도입할 수 없는 물질이나 옥소화로 인해 면역반응성이 저하될 경우 접합표지(conjugation labelling)법 같은 간접적인 방법을 이용한다. 접합표지법에서는 우선 클로라민T법 등 직접적인 방법으로 I-125를 타이로신같은 작은 분자에 표지한 후, 이것을 Bolton-Hunter시약 등을 사용하여 표지하려는 물질에 접합시킨다.

3. 분리방법

항원·항체반응이 종결된 후 결합분획과 유리분획간의 방사능 분포를 조사하기 위해 양자의 분리가 필수적이다.

항체는 물리화학적 또는 면역학적 방법으로 항원과 분리할 수 있다. 분획침전(fractional precipitation)법, 흡착(adsorption)법, 이중항체(double antibody)법, 고형상(solid phase)법 등과 이들을 병용한 방법이 흔히 이용된다. 효율성면에서 이중항체법과 고형

상법이 가장 좋다.

분획침전법은 결합분획과 유리분획의 용해도 차이를 이용한다. 면역글로블린(immunoglobulin)은 에탄올(ethanol), 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol) 같은 유기용매에서 침전되거나 황산암모늄(ammonium sulfate)에 의해 염석(salting out)된다. 유리분획이 남아 있는 상층액을 버리고 침전물의 결합분획을 계측한다.

흡착법은 작은 단백질의 비특이적 흡착성질을 이용한다. 활성탄(activated charcoal)이나 규산염(silicate) 등 흡착력이 강한 물질을 반응액에 첨가하여 유리분획을 흡착시키고 상층액에 남아 있는 결합분획의 방사능을 계측한다.

이중항체법은 항원에 결합된 항체를 또 다른 항체로 침전시켜 유리분획과 분리한다. 제2항체는 제1항체를 생산한 동물의 면역글로블린과 특이적으로 반응하는 것을 사용한다.

고형상법은 고형상의 항체를 시약으로 사용한다. 항체는 셀룰로스(cellulose), 폴리아크릴아미드(polyacrylamide), 덱스트란중합체(polymerized dextran) 등의 입자에 공유결합시키거나 폴리스티렌(polystyrene), 폴리프로필렌(polypropylene) 구슬이나 시험관 표면에 흡착시킬 수 있다. 반응액을 흡인세척한 후 고형상의 결합분획을 계측한다. 셀룰로스나 폴리아크릴아미드 등에 철성분을 첨가한 고형상법에서는 자석을 사용하여 쉽게 분리한다.

〈RIA의 종류 및 원리〉

1. 경쟁반응을 이용한 측정법

1) RIA

미지량의 항원 즉 측정물질이 들어 있는 검체에 일정량의 표지항원과 항체를 첨가하여 반응시킨다. 항원과 표지항원은 한정된 양의 항체에 경쟁적으로 결합한다. 항원양이 많을수록 표지항원의 결합형이 감소하고 유리형이 증가한다.

적당한 방법으로 결합분획과 유리분획을 분리한 후, 통상 결합분획의 방사능을 계측

한다.

몇가지 다른 농도의 항원 즉 표준물질(standard)을 반응시켜 얻은 결합분획의 방사능을 세로축, 표준물질의 농도를 가로축으로 하여 표준곡선(standard curve)을 그리면 방사능계측치와 농도가 역상관관계를 보인다. 표준곡선으로부터 미지검체의 농도를 구할 수 있다.

2) 기타방법

RRA와 CPBA는 RIA와 측정원리는 같으나 항체대신 각각 세포수용체, 천연결합단백을 사용한다. RIA보다 예민도, 특이도 등이 낮기 때문에 현재는 특수한 경우외에는 별로 이용되지 않는다.

2. 비경합반응을 이용한 측정법

1) IRMA

RIA는 한정된 양의 항체에 대해 항원과 표지항원을 경쟁적으로 반응시키고 결합분획과 유리분획간의 항원분포를 조사하는 반면 IRMA는 다량의 표지항체로 항원을 결합시킨 후 항체의 분포를 조사한다.

표지항체양이 충분히 많으면 검체내 항원이 전부 표지항체에 결합한다. 따라서 표준곡선에서 결합분획 방사능계측치와 항원농도간에 직접적인 비례관계를 보인다.

IRMA는 표지항체를 사용하므로 항원을 표지하기 어려운 경우에도 적용할 수 있다. 일반적으로 동일물질에 대해서는 IRMA가 RIA보다 예민도가 우수하고 전반적인 측정범위도 더 넓다. IRMA는 단클론항체가 개발됨에 따라 각광을 받고 있으며 기존 RIA종목이 IRMA로 대체되는 추세이다.

2) 기타방법

방사알레르겐흡수검사(radioallergosorbent test; RAST)는 IRMA의 일종으로서 특정알레르겐에 대한 특이IgE를 검출하는 검사법이다.

포화분석법은 결합단백의 포화정도를 측정하는 검사이다. 혈액중 일부 물질은 특이결합단백과 결합하여 순환한다. 결합단백의 일부분은 불포화상태로 있으며, 포화정도는

병적, 생리적 상태에 따라 변한다. 따라서 표지물질이 불포화부분을 포화시키는 정도를 조사하므로써 이 물질의 농도를 간접적으로 추정할 수 있다.

〈RIA와 비방사면역측정법의 비교〉

리간드결합측정법에 속하는 비방사면역측정법(non-isotopic immunoassay)은 RIA와 측정원리는 같으나 방사성표지 대신 효소, 형광물질, 발광물질 등 비방사성표지를 추적자로 사용한다. (표.)

RIA와 비교하여 비방사면역측정법은 방사능 위험이 없고, 시약의 유효기간이 길고, 분리과정이 필요없는 시스템을 만들 수 있는 장점이 있다고 알려져 있다.

비방사면역측정법을 선호하는 가장 큰 이유는 방사능 위험이 없다는 것이나 과학적 근거보다는 다분히 정서적인 면이 더 크다. RIA에서 방사능 위험은 실제보다 과장되어 인식되고 있다. 일상적인 RIA검사에서 한번에 사용되는 I-125양은 수 μ Ci를 넘지 않으며 검사도중 방출되는 양도 총사용량의 1% 미만에 불과하므로 방사선장해방어의 기본수칙만 준수하면 전혀 위험이 없다. 검사도중 I-125가 유출되더라도 방사능피폭보다는 측정결과에 미치는 영향이 더 큰 문제가 된다. 비방사면역측정법에도 돌연변이물질

이나 발암물질이 시약으로 사용되지만 취급상의 위험은 방사성핵종과는 달리 잘 알려져 있지 않다. 따라서 RIA가 비방사면역측정법보다 결코 더 위험하지는 않다.

방사성핵종은 원래가 불안정하므로 유효기간이 짧은 것은 당연하다. 그러나 일상검사에서 RIA키트의 유효기간이 문제가 되는 경우는 별로 없다. 비방사면역측정법의 경우 키트의 대량생산과 장기간 저장이 가능하므로 이점이 키트가격에 반영되어야 할 것이지만 현재까지는 통상 RIA키트가 더 저렴하다.

결합분획과 유리분획의 분리과정이 생략되면 검사과정도 간단해지고 자동화시스템의 개발에도 유리하다. 그러나 아직은 일부 저분자량물질의 측정에 제한되어 있다.

감마카운터를 이용한 방사능계측보다 더 간편하고 정밀한 것은 없다. 유일하게 방사성핵종을 투여한 환자의 검체를 제외하고 아무 것도 방사능계측을 방해하지 않는다. 그러나 방사능계측을 방해하지 않는다. 그러나 비방사성표지는 물리화학적 변수의 영향을 받기 쉽고, 또 체액에 정상적으로 존재하는 물질이 배후잡음(background noise)으로 작용하여 측정을 방해할 수 있다. 따라서 정밀도, 예민도 등에서도 비방사면역측정법이 RIA를 능가하지 못한다.

표. RIA와 비방사면역측정법의 관계

표 지 종 류	측 정 원 리	
	경 합 반 응	비 경 합 반 응
radionuclide	RIA (radioimmunoassay)	IRMA (immunoradiometric assay)
enzyme	EIA (enzymimmunoassay)	ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)
fluorescence	FIA (fluoroimmunoassay)	IFMA (immunofluorometric assay)
luminescence	LIA (luminoimmunoassay)	ILMA (immunoluminometric assay)