

## 월슨병의 조기진단을 위한 Screening법 개발

아주대학교 의과대학 소아과학교실<sup>1</sup>, 면역학교실<sup>2</sup>, 제노백(주)<sup>3</sup>

한시훈<sup>1</sup> · 이수영<sup>1</sup> · 장영주<sup>2</sup> · 신하철<sup>3</sup> · 박선영<sup>3</sup> · 유은선<sup>3</sup>

### 서 론

월슨병은 전 세계적으로 2만 5천-3만 명에 1명 꼴로 발생하는 상염색체 열성질환으로 보인자율은 1/90으로 비교적 흔한 유전질환의 하나이다. 한국인의 월슨병에 대한 유전적 특성이 최근 규명되면서 한국인에서 월슨병의 빈도가 매우 높음이 확인되었고 특히 중국인, 일본인 그리고 한국인간에 공통되는 돌연변이가 많이 있음이 알려지게 되었다. 최근 약 5년간 일본에서는 3-5세 사이에 집단 screening을 통해 조기진단이 월슨병을 예방하는 데 매우 유용함이 증명되고 있으며 곧 전국적인 screening program으로 적용될 가능성이 높아지고 있다. 따라서, 한국인 월슨병의 유전적 특성으로 보아 국내에서도 월슨병의 조기진단을 위한 screening 개발이 절실히 요구되고 있다.

많은 대상을 검사하기 위해서는 종래의 혈청 시료를 이용하는 ceruloplasmin 측정방법으로는 불가능하며, 따라서 한 번에 많은 수의 시료를 측정할 수 있도록 시료의 채취, 운반, 보관이 간편한 filter paper내의 blood spot으로부터 ceruloplasmin을 측정하는 새로운 기술을 필요로 한다. 본 연구에서는 월슨병환자에 매우 낮게 측정되는 holoceruloplasmin 분자의 oxidase 활성에 중요한 epitope와 같은 분자의 다른 epitope를 인지하는 두 개의 단클론 항체 또는 단클론 항체와 다클론 항체 또는 두 개의 다클론 항체를 이용하여 샌드위치 방법(sandwich technique)으로 혈액 내 holoceruloplasmin을 정량 분석하는 키트를 개발함으로써 월슨병의 조기 진단에 있어서 획기적인 계기를 마련하였다. 이 진단기술은 일본에 이어 두 번째로 개발된 것으로 상용화에 성공할 경우 연구개발에서는 뒤졌으나 전 세계적으로 아직 상품화되어 있지 않은 점을 고려할 때 상품화 및 마케팅을 통해 시장우위성을 확보

할 수 있음은 물론 월슨병을 원천적으로 예방함으로써 막대한 사회경제적 효과를 가져올 것으로 기대된다.

### 방 법

Ion exchange chromatography와 gel filtration chromatography 방법을 이용하여 정상인의 혈장으로부터 순수한 ceruloplamsin을 정제하였다. 또한, 비교 분석을 위해 Sigma사 및 Calbiochem사로부터 정제된 ceruloplasmin을 구입하여 사용하였다.

정제된 ceruloplasmin을 이용하여 mouse와 rabbit 으로부터 단클론 및 다클론 항체를 제작하였으며 peroxidase가 결합된 항 ceruloplamsin 항체를 제작하였다.

정제된 ceruloplasmin은 자체적인 oxidase 활성도에 의하여 무색의 p-phenylenediamine을 산화시켜 native polyacrylamide gel상에서 자주색의 밴드를 형성하지만 ceruloplasmin과 ceruloplasmin 특이적 단클론 항체 혼합액은 항체가 ceruloplasmin의 oxidase 활성도에 중요한 epitope에 결합할 경우 oxidase 활성도가 중화되기 때문에 자주색의 밴드가 형성되지 않는 특성을 이용하여 항체를 선정하였다.

Ceruloplasmin이 없는 혈액을 제조하여 standard blood spot과 control blood spot 제조시 이용하였다. Standard blood spot은 표준농도의 범위를 각각 0 mg/dl, 0.5 mg/dl, 1 mg/dl, 2 mg/dl, 5 mg/dl, 10 mg/dl, 20 mg/dl, 50 mg/dl의 8개 범위로 하였다. Control blood spot을 제조하여 검사가 잘 이루어지는지를 확인할 수 있도록 하였다. Blood spot에 있는 ceruloplasmin양을 측정하기 위해 샌드위치 방법에 의한 ELISA방법을 개발하였으며, 450 nm 파장에서 ELISA 판독기로 흡광도를 측정함으로써 혈중 ceruloplasmin의 농도를 판정할 수 있도록 하였다.

## 결 과

### 1. 항-Ceruloplasmin 항체

Ceruloplasmin에 대한 단클론 및 다클론 항체의 특이성을 확인하기 위한 실험결과, holoceruloplasmin 특이적 항체를 분리하는 데 성공하였다. 항체와 항원 혼합액을 37°C에서 30분간 배양하여 전기영동시켰을 때 oxidase 활성도가 없어지는 것이 관찰되었다.

### 2. ELISA를 위한 standard curve 확립

본 연구에서 개발한 혈액여과지의 standard ceruloplasmin을 이용하여 샌드위치 방법에 의한 ELISA를 시행하여 결과적으로 7단계의 standard spot들의 농도 측정을 위한 변별력 있는 검사결과를 얻을 수 있었고, 5회 반복한 intra-laboratory variant는 ±5% 이내이었다.

### 3. 환자 및 정상인의 혈액여과지로부터 추출한 ceruloplasmin 농도

9명의 율슨병 환자와 5명의 정상인으로부터 추출한 혈액여과지를 이용한 본 연구에서 개발한 ELISA kit를 이용하여 ceruloplasmin을 측정한 결과, 9명의 율슨병 환자군에서는 정상인에 비하여 유의하게 낮은 농도로 확인되었으며 정상인과 뚜렷이 비교되었다. 실제로 혈청에서 직접 확인한 ceruloplasmin 농도와도 큰 차이가 없는 것으로 확인되었다.

## 고 찰

율슨병은 전 세계적으로 2만 5천-3만 명에 1명 꼴로 발생하는 상염색체 열성질환으로 보인자율은 1/90으로 비교적 흔한 유전질환의 하나이다. 지금까지 율슨병에서 알려진 가장 중요한 장애는 구리가 ceruloplasmin에 흡수되는 데 이상이 있는 것과 담도로 구리 배출이 감소되어 있다는 점이다. 구리의 간 내 축적이 수년에 걸쳐 서서히 발생되면서 일부환자에게서는 경한 간세포손상이 있기도 하며 8-10세 사이에 이미 심한 간경화증으로 진행되기도 한다. 이어서 nonceruloplasmin copper가 증가되어 혈중에 증가하며 신장으로 배출이 증가되고 여러 다른 장기에 축적되어 가는

데 특히 각막(Kayser-Fleischer ring), 뇌의 basal ganglia (lenticular degeneration), 신장(renal tubular damage), 근육세포, 뼈 및 관절 등에 축적된다.

대부분의 율슨병 환자에게서 혈액내의 ceruloplasmin의 농도가 낮게 측정되는데 특히 정상인에서 ceruloplasmin은 oxidase activity가 있고 구리가 포함된 holoceruloplasmin 형태로 대부분 존재하고 극소수가 oxidase activity가 없고 구리를 포함하지 않는 apoceruloplasmin 형태로 존재한다(3.3±3.1 mg/dl). 그러나 율슨병 환자에게서는 apoceruloplasmin의 양은 정상인과 거의 비슷한 수준(2.7±2.0 mg/dl)으로 존재하나 holoceruloplasmin은 정상인에 비해 매우 낮게 존재한다.

Ceruloplasmin의 검사는 대개 radial immunodiffusion assay를 이용하고 있으나 정상집단에 대한 screening 방법으로는 적합지 않다. 현재 사용중인 방법에는 혈청 내 ceruloplasmin oxidase 활성도 측정방법, 다클론 항체를 이용한 방사면역확산법(Radial immunodiffusion assay), 면역비탁법(Immunturbidimetric assay) 등이 있다. oxidase 활성도 측정법의 경우 ceruloplasmin 특이적 기질이 없어 혈청 내 ceruloplasmin 만을 측정하기 힘들며, 또한 측정 조건 등의 표준화가 어렵기 때문에 민감도가 매우 낮다. 다클론 항체를 사용한 경우 혈청 내의 holoceruloplasmin 뿐만 아니라 apoceruloplasmin도 측정되기 때문에 민감도가 낮다. 이러한 방법들은 모두 혈청 시료를 이용하기 때문에 혈액 채취 후 별도의 원심분리 과정이 필요하고 단백질의 안정성 문제로 저장 및 운반 과정 중에는 항상 동결된 상태로 보관해야 되기 때문에 유아들을 대상으로 다량의 혈액 검체 채취가 근본적으로 불가능할 뿐 아니라 한 번에 측정할 수 있는 시료의 수가 제한적일 수밖에 없다. 이와 같은 이유로 인해 많은 시료를 검사해야 하는 전국적인 집단 screening 검사로는 지금까지 개발되어 있는 ceruloplasmin 측정기술들이 모두 이용될 수 없는 문제점이 있다.

정상집단에 대한 screening 방법으로는 전세계적으로 아직까지 상품화되어 있는 제품이 없으며 1994년 일본 학자에 의해 개발된 ELISA 방법이 pilot study에 이용되고 있다. 1999년 1-6세 사이의 일본유아 2789명에 대한 pilot study에서 평균적으로 12.4±3.95 mg/dl로 측정되었고 2명의 유아에게서 두드러진 ceruloplasmin 농

도의 감소가 관찰되어 이들에 대한 유전자분석을 시행한 결과 월슨병으로 확인되어 문헌 보고된 바 있다.

본 연구에서 개발된 진단시약은 기본적으로 신생아 대사이상 선별검사에서 이용되고 있는 ELISA법과 동일한 방법을 이용하고 있다. 즉, 한 번에 많은 수의 시료를 측정할 수 있도록 시료의 채취, 운반, 보관 등이 간편한 혈액 여과지에 피를 한 두 방울 묻힌 blood spot을 시료를 사용하기 때문에 전국적인 집단 screening이 가능하다. 효소면역 측정법을 채택함으로써 측정 방법의 단순화 및 신속성, 대량의 시료 측정가능, 취급의 용이성, 높은 민감도 획득 등의 장점을 얻을 수 있다. 또한 구리가 포함된 holoceruloplasmin을 대상으로 측정하기 때문에 정상인과 환자를 높은 민감도로 구분할 수 있었다.

유전적 특성이 유사한 일본에서의 pilot study를 통한 경험은 한국에서도 월슨병에 대한 조기진단시스템의 구축이 필요함을 시사하고 있다. 국내에서도 본 연

구개발로 Blood Spot을 이용한 효소면역 측정법으로 집단 screening을 수행함으로써 월슨병을 조기에 진단할 수 있을 것으로 전망되며 조기진단을 통해 간경화증이나 신경질환을 예방함으로써 간이식과 신경치료 등에 소요되는 막대한 의료비절감효과를 가져올 수 있을 것으로 예상된다. 사회경제적으로도 총 인구대비 약 2000여명의 환자가 있을 것으로 추정할 때, 이들 환자를 예방하여 정상적인 사회활동을 유지하게 되는 경우 각 개인의 평생 수입을 10억원으로 산정시 약 2조원 이상의 사회경제적인 이득효과가 발생하게 된다.

현재 국가사업으로 진행중인 페닐케톤뇨증보다도 더 흔한 월슨병에 대한 조기검사체계가 향후 국가 정책사업으로 지정되어야 할 것으로 생각되며 측정 시기로는 신생아 시기의 경우 ceruloplasmin의 농도가 낮게 측정되는 점을 고려하여 ceruloplasmin농도가 정상 성인의 수준에 도달하는 3-5세 정도가 적당할 것으로 보인다.