

放射免疫測定에서 放射性同位元素 標識法 개발에 관한 研究*

—第2編 새로운 標識法을 이용한 血清 甲狀腺刺戟 ホルモン 測定—

서울대학교 科醫大學 內科學敎室

趙普衍 · 徐正憲** · 朴英子*** · 金柄國 · 高昌舜

= Abstract =

A study on Radiolabelling Method in Radioimmunoassay

—Part 2. Determination of Serum Thyrotropin using new Radiolabelling Method—

Bo Yeon Cho, M.D., Byung-Kook Kim, M.D. and Chang-Soon Koh, M.D.

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Seoul National University

Junghun, Suh, Ph. D.

Depart. of Chemistry, Seoul National University

Yong Ja Park

Depart. of Nuclear Medicine, Seoul National Univ. Hosp.

The radioimmunoassay of human thyrtropin was performed in various thyroid diseases, using the antin-h-TSH antibody(Daiichi, Japan) and purified h-TSH(Biodata, Italy). ¹²⁵I labelling of h-TSH was performed using a small amount(1.8 μg) of chloramin-T as an oxidant at room temperature. This new method facilitated uniform labelling and reduced to damage of h-TSH by chloramin-T, and satisfactory radioimmunoasasy results were obtained with ¹²⁵I-TSH prepared by the new method until at least 7 weeks after preparation.

The assay sensitivity was 1.0 μu/ml.

The coefficient of variances in within assay and interrurn assay were all less than 10% among the range of 1.25 μu/ml and 160 μu/ml. The serum TSH values by this new method were colselly related to those by commercial kit(r=0.996).

緒 論

放射免疫測定法은 Yalow 와 Berson¹⁾이 처음 개발한 이후 각종 ฮอร์โมน을 비롯하여 약물의 혈중농도, 抗原 및 抗體, 각종 단백질성분 등 體液內의 미량성분을 가장 정확하게 측정할 수 있는 방법으로서 臨床 및 研究의 각 분야에서 널리 이용되고 있다^{2~6)}. 1970年代에 放射免疫測定用 키트가 개발되고 상품화되면서 부터 측정방법이 매우 간편해져서 일상검사로써 그 이용도가 날로

급증하고 있다.

그러나 우리나라와 같이 放射免疫測定 키트를 외국에서 수입하는 경우에는 그 키트의 가격이 비싸고 키트의 수입, 사용 및 보관에 있어서 환자의 증가 및 감소에 따른 키트양의 조절이 어렵고, 또한 標識된 放射性同位元素의 반감기로 인한 자연소실로 키트의 손실이 많아 여러가지 문제점이 있다. 이러한 문제들을 해결하기 위해 著者들은 chloramin-T 法으로 h-TSH 에 ¹²⁵I 를 標識하여 血清 TSH 의 放射免疫測定을 시도하여 성공한 바 있으나⁷⁾ 종래의 방법은 chloramin-T 를 다량 첨가하여 단시간에 반응시키므로 chloramin-T 의 강력한 산화작용으로 TSH 구조에 영향을 미쳐 免疫學的 성상을 변화시킬 우려가 높고 또한 균일한 標識가 어렵고 재현성이 좋지 않은 단점이 있어 일상검사

* 본 논문은 서울대학교병원 연구비의 보조로 이루어졌음.

** 서울대학교 化學科

*** 서울대학교병원 핵의학과

로서 사용하는데 어려운 점이 많았다.

이에 著者들은 소량의 chloramin-T를 사용하고 ^{125}I 의 TSH에 대한 標識反應 시간을 달리하는 변형된 chloramin-T法을⁹⁾ 이용하여 正常人 및 甲狀腺疾患患者에서 血清 TSH 측정을 시도하였으며 이를 상품화된 키트에 의한 측정치와 비교하고 정확도와 재현성을 검토하여 그 결과를 보고하는 바이다.

對象 및 方法

對 象

본 연구의 對象은 甲狀腺疾患患者群으로 正常甲狀腺機能患者 8名, 甲狀腺機能亢進症患者 8名, 甲狀腺機能低下症 患者 7名 등 23名과 正常對照群으로 甲狀腺疾患이 없는 正常人 100名이었다. 正常人 100名の 血清을 모두 섞어서 一定量씩 분배하여 正當對照 血清으로 사용하였다. 모든 試料는 血液을 채취한 뒤 원심분리하여 血清을 측정시까지 -20°C 에 보관하였다.

材 料

본 연구에서 사용한 材料는 다음과 같다.

1. 標準 甲狀腺刺戟ホルモン(Std. TSH): 日本 Daiichi 社의 KSH 키트 중에 포함된 thyrotropin 8 standard vial을 사용하였으며 $320\ \mu\text{U}/\text{ml}$ 농도의 용액이었다.
2. 標識用 순수 甲狀腺刺戟ホルモン(h'TSH): Italy Biodata 社의 human thyrotropin을 사용하였으며 $6\ \text{U}/\text{mg}$ 의 순도이었다.
3. 抗-甲狀腺刺戟ホルモン rabbit serum(I-Ab): 日本 Daiichi 社의 제품을 공급받았다.
4. 抗-rabbit gamma globulin goat serum(II-Ab): 日本 Daiichi 社의 제품을 공급받았다.
5. $\text{Na}\ ^{125}\text{I}$: 英國 Radiochemical center, Amersham의 제품을 사용했으며 IMS 30이었다.
6. Normal rabbit serum: Italy Biodata 社의 제품을 사용하였다.
7. Sephadex G-75: Sweden pharmacia fine chemicals의 제품을 사용하였다.
8. Bovine serum albumin: Sigma 社 제품을 사용하였다.

方 法

1. h-TSH의 ^{125}I 標識: h-TSH의 ^{125}I 標識는 Greenwood 등⁹⁾의 chloramin-T法을 다음과 같이 변형하여 실시하였다.

시험관에 $0.3\ \text{M}$ sodium phosphate buffer ($\text{pH}=7.5$) $10\ \mu\text{l}$, h-TSH $5\ \mu\text{g}$, Na^{125}I $0.5\ \text{mCi}$ 를 넣고 당일 제조한 chloramin-T $1.8\ \mu\text{g}$ 을 넣어준 후 잘 섞어서 12분간 반응시켰다. 다시 sodium metabisulfite $5\ \mu\text{g}$ 을 넣어 반응을 중지시키고 반응액을 4°C 에서 sephadex G-75 column으로 chromatography를 수행하였다. 이때 유출액을 2% BSA $0.1\ \text{ml}$ 를 함유하는 plastic tube에 $1\ \text{ml}$ 씩 받았다. 이 유출액을 gamma counter에 count하여 첫번째 peak 주위의 세 tube를 혼합하여 일정량씩 나누어 -20°C 에 저장하고 필요시에 사용하였다.

2. TSH의 放射免疫測定

TSH의 測定은 Daiichi 社 키트와 동일한 방법으로 二重抗體分離法을 이용하였다. 標準 TSH를 $0.03\ \text{m}$ 인산나트륨 완충액으로 ($\text{pH}\ 7.5$) $320, 160, 80, 40, 20, 5, 2.5, 1.25\ \mu\text{U}/\text{ml}$ 이 되도록 희석하고 患者 血清과 함께 각각 2회 반복측정하였으며 測定 순서는 다음과 같다.

- ① Plastic 시험관 ($1.0 \times 7.5\ \text{cm}$)에 표준 TSH와 患者 血清을 각각 $0.1\ \text{ml}$ 씩 취한다.
- ② ^{125}I -TSH를 시험관당 $10000\ \text{cpm}$ 이 되도록 희석하여 $0.1\ \text{ml}$ 씩 넣는다.
- ③ I-Ab를 $0.1\ \text{ml}$ 씩 넣는다.
- ④ Normal rabbit serum을 $500:1$ 로 함유하고 있는 인산나트륨 완충액을 $0.1\ \text{ml}$ 씩 넣은 후 혼합하고 실온에서 20시간 동안 incubate 한다.
- ⑤ II-Ab를 $0.1\ \text{ml}$ 씩 넣고 실온에서 5시간 동안 incubate 한다.
- ⑥ 실온에서 15분간 $3000\ \text{rpm}$ 으로 원심분리하고 상층액을 제거하고 gamma counter로 측정한다(Bound form).
- ⑦ Total activity용 시험관의 방사능을 측정하여 total count로 한다.
- ⑧ Bound form을 total count로 나누고 $\frac{1}{100}$ 을 곱한 것(B/T%)과 표준 TSH의 농도 관계를 semilog graph에 plot하고 그 표준곡선으로부터 患者 血清중의 TSH양을 구한다.

成 績

1. h-TSH의 標識

h-TSH를 ^{125}I 로 標識하여 얻어진 radiochromatograph는 Fig. 1과 같다. 첫번째 peak는 標識된 TSH

Table 1. Serum TSH levels in Hyperthyroidism, euthyroidism and Hypothyroidism patients

Name	T ₃ RU(%)	T ₄ RIA (μg/dl)	T ₃ RIA (nf/dl)	TSH(μu/ml)
P.S.J.	37.8	20.4	24.6	1.0↓
K.J.M.	50.8	25.0↓	600↑	1.0↓
A.J.S.	—	16.1	33.6	1.0
K.S.K.	—	25.0↓	525	1.0
L.K.J.	—	23.4	581	1.0↓
C.S.R.	—	13.6	215	1.0↓
H.Y.C.	—	13.7	192	1.0↓
K.K.Y.	60.2	25.0↓	600↑	1.0↓
O.H.S.	—	2.3	—	250
T.Y.S.	—	0.1	—	320↑
Y.S.H.	—	3.5	87	30
L.Y.J.	22.3	0.1	33	72
L.J.Y.	17.0	0.8	—	240
C.K.S.	23.6	1.4	90	110
O.J.M.	—	1.6	95	61
L.S.K.	35.1	9.0	80	1.4
K.H.S.	26.2	13.3	117	1.1
K.S.R.	28.2	6.6	106	1.8
Y.S.H.	28.2	8.6	134	1.6
C.H.J.	27.4	13.3	146	1.6
K.C.H.	32.6	8.4	99	3.3
H.Y.H.	30.7	9.2	105	1.8
J.K.S.	21.8	8.7	66	2.8

Table 2. Within and Between Assay of Serum TSH by New Labelling Method

Concentration of TSH	Within Assay			Concentration of TSH	Between Assay		
	5.0(μu/ml)	20(μu/ml)	80(μu/ml)		1.25(μu/ml)	5.0(μu/ml)	160(μu/ml)
	4.1	20.0	80.0		1.30	4.7	160
	5.0	19.0	74.0		1.00	4.4	158
	5.2	20.0	77.0		1.20	4.8	155
	5.4	21.0	90.0		1.30	4.6	165
	5.3	21.0	82.0		1.25	6.2	145
					1.30	4.8	145
					1.40	4.5	140
					1.25	4.3	180
\bar{x}	5.0	20.2	80.6	\bar{x}	1.25	4.8	156
SD	0.47	0.75	5.6	SD	0.10	0.5	11.1
C.V.(%)	9.4	3.7	7.0		8.0	10.4	7.1

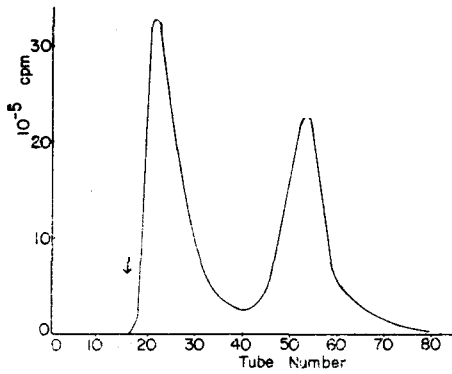


Fig. 1. Ellusion pattern of radioactivity from sephadex G-75 column chromatography. Each tube contains 1.0 ml of aliquots. The arrow indicates the void volume (blue dextran).

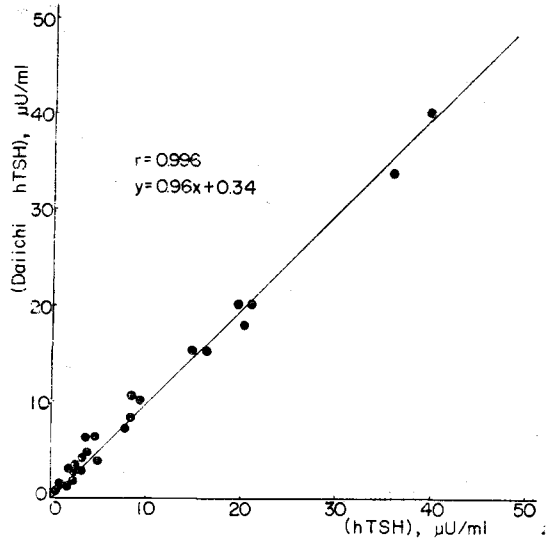


Fig. 3. Correlation between the serum TSH levels by new labelling method and those by Daiichi kit.

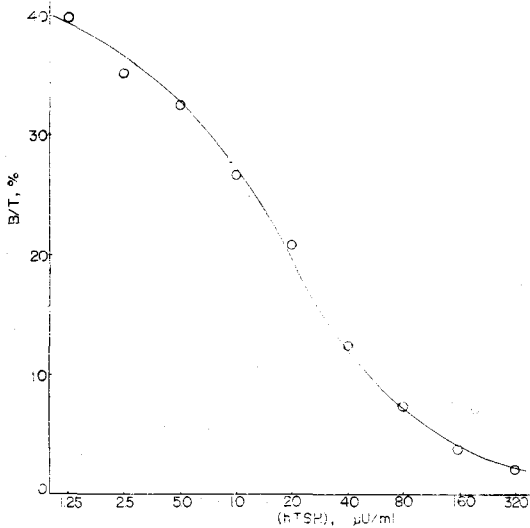


Fig. 2. Standard dose response curve for h-TSH radioimmunoassay. The spots of 9 replicates

(h-TSH*)이고 두번째 peak는 홀몬에 결합하지 못한 無機 ¹²⁵I로서 양 peak가 명확히 구별되어 標識된 TSH를 쉽게 얻을 수 있었다.

한번 만들어 둔 ¹²⁵I-TSH는 시간이 경과됨에 따라서 파괴되어 ¹²⁵I가 유리되는데 著者들의 경우 7주까지 유효하게 사용할 수 있었다.

2. 標準曲線

著者들이 얻은 標準曲線의 하나는 Fig. 2에서 보는 바와 같다. 이 標準曲線의 측정한계는 1.0 μU/ml이었으며 1.0 μU/ml 이하에서도 측정은 가능하나 오차가 커서 정밀도가 떨어져 의미가 없었다. 최고 측정치의 한계는 320.0 μU/ml이었고 그 이상에서는 曲線이 완만하여 오차가 증가하므로 측정범위는 2.0 μU/ml에서 320 μU/ml 사이가 가장 좋았다.

3. 甲狀腺疾患에서의 血清 TSH 值

甲狀腺機能亢進症 8例에서 血清 TSH 値는 6例에서 1.0 μU/ml 이하 2例에서 1.0 μU/ml로서 모두 억제되어 있었으며 Daiichi社 키트로 측정한 결과와 거의 同一하였다. 甲狀腺機能低下症 7例에서는 血清 TSH 値가 모두 30 μU/ml 이상이었으며 正常 甲狀腺機能 상태인 8例에서는 1.1~3.3 μU/ml 사이로 모두 정상범위에 있었으며 Daiichi社 키트로 측정한 것과 거의 동일하였다 (Table 1).

4. 키트와의 비교

著者들이 사용한 標識法에 의한 血清 TSH 値와 Daiichi社 TSH 측정키트로 측정한 결과를 26例에서 비교하여 보면 Fig. 3에서 보는 바와 같이 상관계수 0.996의 직선적인 상관관계를 보였다.

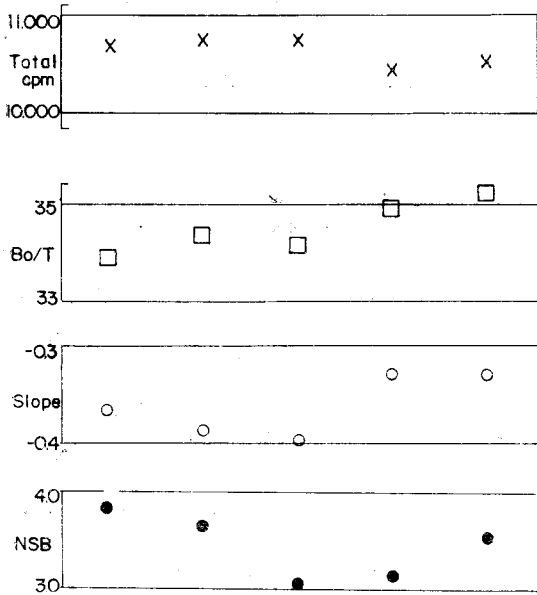


Fig. 4. Quality control chart for 5 h-TSH assays. Total CPM is the amount of tracer present, Bo/T is the bound percent of zero dose level, slope is determined graphically by plotting the dose response curve on logit-log paper, and NSB is the percent of non specific binding background counts.

5. 精密度 및 再現性

본 연구에서 사용한 TSH 放射免疫測定法の 精密度 및 再現性등을 알아보기 위한 total cpm, nonspecific back ground counts, slope(B/T), intrarun assay 및 interrurn assay 의 결과는 Fig. 4와 Table 2에서 보는 바와 같다 .

同一 試料를 5회 측정시 totabl cpm 의 평균은 10612 ±126.9, Bo/T 의 평균치는 34.5±0.5%, nonspecific back-ground count 의 백분율은 3.4±0.3%이었다.

각 放射免疫測定의 標準曲線을 logit-log 그래프에 도식하고 그 기울기를 구한 평균치는 -0.36±0.03이었다.

TSH 농도가 5.0 μU/ml, 20 μU/ml 및 80 μU/ml 인 control serum 을 5회 동시 측정시 그 평균치는 각각 5.0±0.47, 20.2±0.75, 80.6±5.6 μU/ml 이며 變異系數 (coefficient of variance) 는 각각 9.4%, 3.7%, 7.0%이었다. TSH 농도가 1.25 μU/ml, 5.0 μU/ml, 160 μU/ml 인 control serum 을 10회에 걸쳐 1주 간격

으로 연속 측정시 그 평균치는 각각 1.25±0.1, 4.8 ±0.5, 156±11.1 μU/ml 이었으며 그 變異系數는 각각 8.0%, 10.4% 7.1%이었다 (Table 2).

考 按

放射免疫測定에서 抗原의 ¹²⁵I 標識方法에는 Chloramin-T 法⁹⁾, 효소法^{10,11)} ¹²⁵I 함유 acylating agent 사용법¹²⁾, electrolytic 法¹³⁾ 등 여러 방법이 개발되어 있으나 이중 chloramin-T 法이 가장 널리 이용되고 있다. Chloramin-T 法은 Greenwood⁹⁾ 등이 처음 개발시킨 방법으로 放射性 沃素 (¹²⁵I⁻) 이온을 산화제인 chloramin-T 를 이용하여 ¹²⁵I⁺ 이온으로 산화시킨후 tyrosyl 기에 標識시키는 방법이다. 종래에 많이 활용하던 이 방법은 다량의 chloramin-T 를 사용하여 20~30초 동안의 비교적 짧은 기간에 반응시키므로서 재현성과 균일한 標識가 어렵다는 단점이 있었다. 특히 chloramin-T 를 다량 사용하므로서 단백질의 polymerization 이 일어나고^{14,15)} 혈문의 구조중 일부가 화학적으로 산화되어 免疫學的 성상이 변할 우려가 많다^{16,17)}. 이러한 사실들은 본 교실에서 이미 발표된⁷⁾ TSH 標識나 본 연구와 같이 진행한 실험적 연구⁸⁾에서도 확인된 바 있다. 즉 TSH 에 ¹²⁵I 標識후 그 ellusion 曲線을 보면 ¹²⁵I-TSH 의 주 peak 후에 fragmented 또는 손상된 TSH 들에 의한 작은 peaks 들이 뒤따라 나타나고 있다^{7,8)}. 이런 문제들로 인하여 종래의 방법대로 할 경우 그 반응시간 조절에 따라 TSH 손상이 좌우되는데, 반응시간이 20~30초에 불과하므로 이를 적절히 조절한다는 것은 실제적으로 불가능하여 결국 ¹²⁵I-TSH 標識의 재현성이 不良해진다.

이러한 문제들을 해결하기 위하여 저자들은 chloramin-T 0.5~1.8 μg/40 μl 의 소량을 사용하고 25°C 에서 12~15분간 반응시킨 결과 우수한 성적을 얻을 수 있었다. Fig. 1에서 보는바와 같이 ¹²⁵I-TSH peak 에 뒤따르는 손상된 TSH 에 의한 작은 peak 들이 나타나지 않았으며 반응시간이 길고 천천히 일어나므로서 균일한 標識 성적을 얻을 수 있었다.

放射性同位元素로 標識된 단백질은 放射性同位元素 자체의 붕괴뿐만 아니라 放射能에 의한 구조손상으로⁸⁾ 그 免疫學的 성상을 시간경과에 따라 잃게된다. 따라서 종래의 방법으로 標識하였을 경우 ¹²⁵I-TSH 의 사용기간은 4~5주에 불과하였다. 그러나 저자들의 성적은 7주까지 사용이 가능하였다.

著者들이 개발한 방법에 의한 TSH 측정 결과는

Table 1에서 보는 바와 같이 甲状腺機能의 亢進, 正常 및 低下에 따라 血清 TSH 値는 감소, 정상, 증가를 보여 甲状腺機能 상태를 잘 반영하여 주었으며 동시에 측정한 Daiichi 社 키트를 이용한 성적과 거의 동일하였다.

한편 본 연구에서 새로 시도한 방법의 精密度는 5.0 $\mu\text{U/ml}$, 20 $\mu\text{U/ml}$, 80 $\mu\text{U/ml}$ 의 농도에서 그 變異系數(coefficient of variation)가 각각 9.4%, 3.7%, 7.0%로서 모두 10%미만으로 精密度가 매우 높았다.

再現性은 1.25 $\mu\text{U/ml}$, 5.0 $\mu\text{U/ml}$, 160 $\mu\text{U/ml}$ 의 농도에서 그 變異系數가 각각 8.0%, 10.4% 7.1%로서 역시 모두 再現性이 우수하였으며 이는 Daiichi 社 키트 제품과 비슷하였다.

結 論

放射免疫測定法の 개발을 위하여 變形된 chloramin-T 法을 개발하고 이 방법을 이용하여 甲状腺疾患에서 血清 TSH 値의 측정을 시도하고 이를 商品화된 키트와 비교하였으며 精密度 및 再現性을 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. h-TSH의 ^{125}I 標識는 ^{125}I -TSH peak와 無機 ^{125}I 가 쉽게 구별되었고 손상된 TSH에 의한 peak는 없었으며 7주까지 사용 가능하였다.

2. 血清TSH 측정의 예민도는 1.0 $\mu\text{U/ml}$ 이었으며 측정범위는 2~320 $\mu\text{U/ml}$ 사이에서 가장 좋았다.

3. 甲状腺機能 상태를 잘 반영하여 주었다.

4. Daiichi 社 TSH 측정 키트를 이용한 측정치와는 상관계수 0.996으로 거의 동일하였다.

5. 精密度는 5.0 $\mu\text{U/ml}$, 20 $\mu\text{U/ml}$, 80 $\mu\text{U/ml}$ 의 농도에서 變異系數가 각각 9.4%, 3.7%, 7.0%로 매우 우수하였으며 再現性은 1.25 $\mu\text{U/ml}$, 5.0 $\mu\text{U/ml}$, 160 $\mu\text{U/ml}$ 의 농도에서 變異系數가 각각 59.8%, 10.4%, 7.1%로서 역시 매우 우수하였다.

이상의 결과로 보아 소량의 chloramin-T를 사용한 새로운 標識法은 血清 TSH 측정에 있어 精密度 및 再現性이 우수하였으며 甲状腺機能 상태를 정확히 반영하여 상품화된 키트를 대신하여 사용할 수 있다고 생각되었다.

(본 연구를 진행함에 있어 기술적인 협조를 아끼지 않은 서울대학교병원 핵의학과의 서일택, 장철수 선생에게 심심한 감사를 드린다.)

REFERENCES

- 1) Yalow R.S. and Berson S.A.: *Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. J. Clin Invest. 39:1157, 1960.*
- 2) Utiger R.D.: *Radioimmunoassay of human plasma thyrotropin. J. Clin. Invest. 44:1277, 1965.*
- 3) Wherry F.E., Pennington L.L., Bates R.W., Garrison M.M., Ehle A.L. and Mason J.W.: *Immunological crossreactivity between monkey and human thyroid stimulating hormone as determined by radioimmunoassay. Endocrinol. 86:769, 1970.*
- 4) Adams D.D., Kennedy T.H. and Utiger R.D.: *Comparison of bioassay and immunoassay measurements of serum thyrotropin and study of TSH levels by immunoassay of serum concentrates. J. Clin Endocrinol metab. 34:1074, 1972.*
- 5) Caro R.A., Ciscato V.A., De Giacomini S.M., V. and Quiroga S.: *Labeling of proteins with ^{125}I and experimental determination of its specific activity. Inter J. App. Rad. Isop. 26:527, 1975.*
- 6) Spncer C.A. and Challand G.S.: *Interference in a radioimmunoassay for human thyrotropin. Clin. chem. 23:584, 1977.*
- 7) 高昌舜, 李弘揆, 盧興圭, 李文鎬: 甲状腺刺戟ホルモンの放射免疫測定. 大韓核醫學會雜誌, 6:41, 1972.
- 8) Suh, J., Cho, B.Y., Park, Y.J., Kim, B-K. and Koh, C-S: *A study on radiolabelling method in radioimmunoassay-a new method for the ^{125}I -labelling of human thyrotropin under mild conditions. Korean J. Nucl. Med., 15(2): 1981.*
- 9) Hunter, W.M. and Greenwood, F.G.: *Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. Nature 194: 495, 1962.*
- 10) Marchalonis, J.J., Cone, R.E. and Santer, V.: *Engymic iodination. Biochem. J., 124:921, 1971.*
- 11) David, G.S. and Reisfeld, R.A.: *Protein iodination with solid state lactoperoxidase. Bioche-*

- mistry*. 13:1014, 1974.
- 12) Bolton, A.E. and Hunter, W.M.: *The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugating to a ^{125}I -containing acylating agent*. *Biochem. J.*, 133:529, 1973.
 - 13) Teare, F.W. and Rosenberg, R.A.: *Micro-electrolytic radioiodination of polypeptide hormones to high specific activity*. *Int. J. App. Rad. Isotop.* 29:567, 1978.
 - 14) Golaire, J.G. and Vanhaelst, L.: *Influence of the purification of ^{125}I -iodinated thyrotropin on the isensitivity of the radioimmunoassay*. *Int. J. App. Rad. & Isotop.*, 21:17, 1970.
 - 15) Sherman, L.A., Harwig, S. and Hayne, D.A.: *Macromolecular complexes formed as the result of chloramine-T radioiodination of proteins*. *Int. J. App. Rad. Isotop.*, 25:81, 1974.
 - 16) Buckle, R.M.: *In Radioimmunoassay methods: European workshop* (Kirkham, K.E. and Hunter, W.M. eds) 42-54. Churchill Living stone, Edinburgh and London, 1971.
 - 17) Moser, R.J. and Hollingsworth, D.R.: *Examination of some factors affecting sensitivity and reproducibility in radioimmunoassay of thyrotropin*. *Clin. chem.*, 21:347, 1975.
 - 18) Hotte, C.E. and Ice, R.D.: *The in vitro stability of ^{131}I -o-Iodohippurate*. *J. Nucl Med*, 20: 441, 1979.