

Cyclosporine 방사면역측정법의 정도관리

서울대학교병원 핵의학과

정 재 민 · 서 일 택

서울대학교 의과대학 내과학교실

문대혁 · 정준기 · 이명철 · 조보연 · 고창순

= Abstract =

Quality Control for Radioimmunoassay of Cyclosporine

Jae Min Jeong, Ph.D. and Il Tack Seo

Department of Nuclear Meicine, Seoul National University Hospital, Seoul, Korea

Dae Hyuk Moon, M.D., June-Key Chung, M.D., Myung Chul Lee, M.D.

Bo Youn Cho, M.D. and Chang-Soon Koh, M.D.

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

According to the development of monoclonal antibodies against cyclosporine, it became available to replace the conventional polyclonal antibody method with new monoclonal antibody method to measure the blood level of cyclosporine by radioimmunoassay. We compared the results obtained by the two methods: polyclonal antibody and monoclonal antibody method. The results were obtained as follows:

1) We obtained mean value 137.3 ng/ml and CV 16.1% from plasma sample, and mean values 495.7 ng/ml and 1053.8 ng/ml and CVs 19.3% and 17.4% respectively from whole blood sample by polyclonal antibody method.

2) For the two control groups, 100 ng/ml 400 ng/ml each, we obtained that the CVs were 20.2% and 14.0% respectively from plasma sample, and 11.9% and 13.1% respectively from whole blood sample by monoclonal antibody method.

In conclusion, we found that cyclosporine RIA was a relatively reliable method to measure blood or plasma concentration. Especially RIA using monoclonal antibody showed less degree of error in measurement compared to polyclonal antibody method.

서 론

Cyclosporine은 진균 *Tolypocladium inflatum Gams*의 배양액에서 얻은 cyclic peptide로서 포유동물에서 면역억제제로서 작용한다¹⁾.

작용기전은 helper T cell의 여러가지 기능을 저하시키는 것으로서²⁾ 임상적으로는 주로 각종 이식 수술후 거부반응을 억제하기 위하여 사용한다. 이식장기에 대한

거부반응의 억제와 cyclosporine 자체에 의한 독성의 방지를 위하여 적절한 혈중 농도가 유지되어야 하며 이를 위하여 cyclosporine의 혈중농도 측정방법이 필요하다.

Cyclosporine 혈중농도 측정은 기본적으로 2가지의 방법이 있다. 한가지는 high-performance liquid chromatography (HPLC)를 이용한 방법이고^{3~7)}, 또 다른 방법은 방사면역측정법을 이용한 방법이다⁸⁾. HPLC를 이용한 측정방법들은 여러가지가 있지만 그 기본 원리는 동일하다. 또한 방사면역 측정법을 이용한 방법도

Sandoz Products Ltd (Basel, Switzerland)에서 개발한 방사면역측정용 kit를 쓰는 것이 표준으로 되어 있다. HPLC를 측정된 결과와 방사면역측정법으로 측정된 결과에는 근본적인 차이가 있다. HPLC를 이용하여 측정된 결과는 cyclosporine 자체의 농도만 측정되는데 비해 방사면역측정법으로 측정된 결과는 일반적으로 그 대사물질의 양도 함께 측정이 되므로 그 수치가 높아진다^{9,10}.

최근 단세포균 항체를 제조하는 기술을 사용함으로써 cyclosporine에 대한 여러가지 특징적인 단세포균 항체들을 만들게 되어^{11,12} cyclosporine에 대한 특이도가 특히 높은 단세포균 항체와 cyclosporine뿐만이 아니라 그 대사물질에도 결합하는 즉 특이도가 낮은 단세포균 항체를 제조하여 방사면역측정법에 사용할 수 있게 되었다¹³. 그리하여 특이도가 높은 단세포균 항체를 사용하면 HPLC로 측정된 결과와 유사한 결과가 나타나고, 특이도가 낮은 단세포균항체를 사용하면 대사물질의 양도 함께 측정이 됨이 보고되고 있다.

본원에서는 지금까지 단세포균 항체를 사용한 방사면역측정법으로 cyclosporine 혈중농도를 측정하였으나 단세포균 항체를 사용한 방사면역측정법이 개발됨에 따라서 그 측정방법을 변경하게 된 바, 저자들은 이들 두 가지 방법에 의한 cyclosporine 혈중 농도 측정치들의 신뢰도를 평가하기 위하여 다음과 같이 검사 결과의 정도 관리를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 혼합대조혈장 및 전혈

단세포균 항체를 이용한 측정에는 cyclosporine 농도 약 140 ng/ml되는 혈장과, 약 500 ng/ml 및 약 1,000 ng/ml되는 전혈을 사용하였다. 단세포균 항체를 이용한 측정에는 Sandoz사에서 제조한 cyclosporine 농도 약 100 ng/ml과 400 ng/ml되는 혈장을 사용하였다.

2. 단세포균 항체를 이용한 Cyclosporine 혈중농도 측정

Sandoz사에서 제공하는 단세포균항체를 이용한 cyclosporine 측정용 kit를 사용하여 다음과 같이 측정하였다. Cyclosporine을 계열 희석하여 50 ng/ml-2,000 ng/ml용의 표준액을 만든 다음 이 표준액 또는 대조군

100 μ l, 삼중수소 표지된 cyclosporine 100 μ l 그리고 다세포균 항체액 100 μ l씩을 시험관에 넣고 실온에서 2시간동안 흔들어서 주었다. 그리고 4 $^{\circ}$ C의 1%활성탄액 500 μ l를 가하여 잘 섞은 다음 12분간 방치하고 2,500 g에서 5분간 원심분리하였다. 상층액 1 ml씩을 취하여 β -counter vial에 넣고 scintillation cocktail 5 ml씩을 가하여 잘 섞은 다음 방사능을 측정하였다.

3. 단세포균 항체를 이용한 Cyclosporine 혈중 농도 측정

Sandoz사에서 제공하는 단세포균항체를 이용한 cyclosporine 측정용 kit를 사용하여 다음과 같이 측정하였다. Cyclosporine을 계열희석하여 25 ng/ml-1,600 ng/ml용의 표준액을 만든 다음 이 표준액 및 대조군용 혈장 혹은 전혈 100 μ l씩을 시험관에 분주하고 900 μ l씩의 methanol을 가하여 잘 섞어서 2,500 g에서 5분간 원심분리하였다. 그 상층액 50 μ l씩과 삼중수소 표지된 cyclosporine 100 μ l, 원층액 500 μ l, 그리고 단세포균항체액 50 μ l씩을 가하고 잘 섞어서 4 $^{\circ}$ C에서 2시간동안 방치하였다. 15분간 얼음물속에 담근 후 활성탄액 500 μ l씩을 가하여 섞어준 다음 12분 후 2,500 g에서 5분간 원심분리하였다. 상층액 1 ml씩을 취하여 단세포균항체를 이용한 방법과 같이 방사능을 측정하였다.

4. 정도관리 계산

각각의 측정 결과를 얻은 표준 정량곡선에 대한 precision profile, 각 혼합 대조 혈장 및 전혈에서의 측정치들의 평균값 및 변동계수, 그리고 측정치들의 편차와 치우침을 알아보기 위한 Shewhart chart등을 IBM-PC 컴퓨터와 WHO Immunoassay Program에 의하여 계산하였다.

성 적

단세포균항체를 이용하여 측정된 경우와 단세포균 항체를 이용하여 측정된 경우의 표준 정량 곡선은 각각 Fig. 1과 Fig. 2 와 같이 직선과 곡선으로 나타났다. 이 표준 정량 곡선들에 대한 누적된 precision profile을 구해본 결과 단세포균항체로 측정된 경우 100 ng/ml에서 1,000 ng/ml사이의 범위에서 변동계수 10% 이하 그리고 2,500 ng/ml 이하의 측정 가능한 모든 범위에서 변

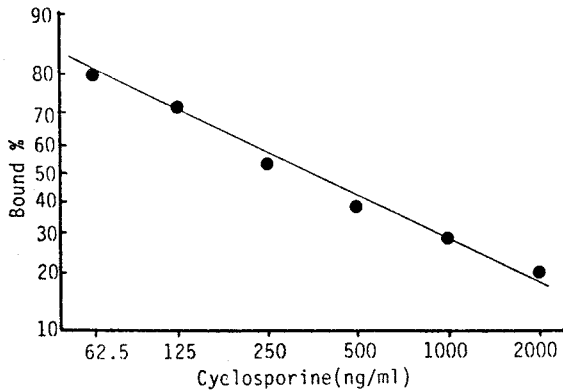


Fig. 1. An example of standard curve for the measurement of cyclosporine concentration obtained by polyclonal antibody kit.

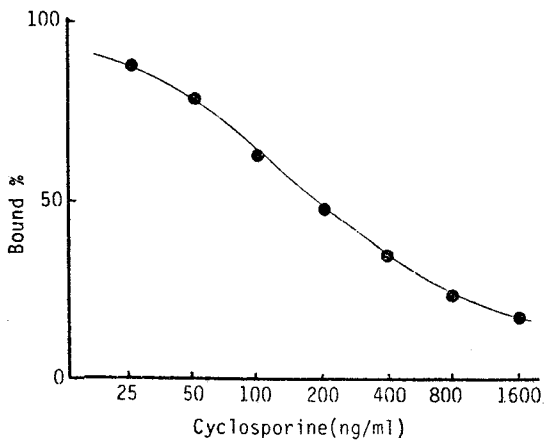


Fig. 2. An example of standard curve for the measurement of cyclosporine concentration obtained by monoclonal antibody kit.

동계수 20% 이하의 결과를 보였고(Fig.3), 단세포항체로 측정된 경우 100 ng/ml에서 1,100 ng/ml사이의 범위에서 변동계수 10% 이하 그리고 30 ng/ml 이상의 측정 가능한 모든 범위에서 변동계수 20% 이하의 결과를 나타내었다(Fig. 4).

다세포항체를 이용하여 측정된 혈장 대조군의 Shewhart chart는 Fig.5와 같고, 단세포항체를 이용하여 측정된 저농도 대조군(100 ng/ml)과 고농도 대조군(400 ng/ml)들의 Schewchart는 각각 Fig.6 과 Fig.7 과 같다. 이 모든 경우 CUSUM은 평균값에 접근하여 systematic 오차는 없는 것으로 나타났다.

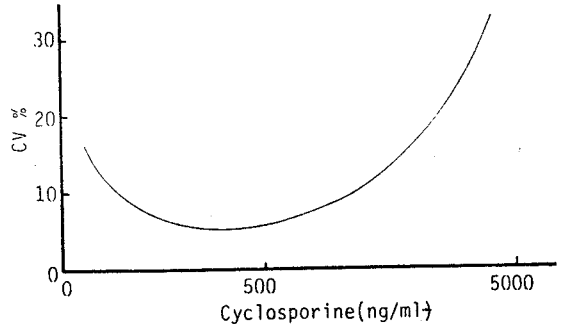


Fig. 3. Cumulative precision profile of the cyclosporine-RIA kit. Polyclonal antibody kit was used.

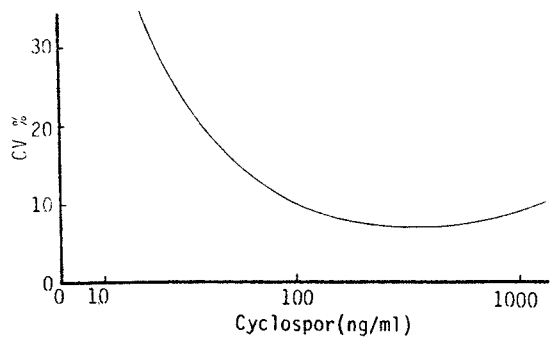


Fig. 4. Cumulative precision profile of the cyclosporine-RIA kit. Monoclonal antibody kit was used.

다세포항체를 이용하여 측정된 결과의 inter-assay 정도관리 결과는 혈장시료에 대하여 평균값 137.3 ng/ml 변동계수 16.1%로 나타났고, 전혈 시료들에 대하여는 평균값이 각각 495.7 ng/ml, 1,153.8 ng/ml 그리고 변동계수는 각각 19.3%와 17.4%로 나타났 다(Table 1).

단세포항체를 이용하여 혈장 시료를 측정된 결과의 intra-assay 정도관리 결과는 Table 2와 같이 나타났는데 150 ng/ml정도의 대조군이 변동계수가 10.3%로서 다른 대조군들에 비하여 비교적 낮은 변동계수를 나타내었다.

단세포항체를 이용하여 측정된 결과의 inter-assay 정도관리 결과는 Table 3과 같이 나타났는데 고농도와 저농도의 대조군 모두에서 전혈중의 농도를 측정된 결과의 변동계수가 각각 11.9%와 13.1%로서 혈장에서의

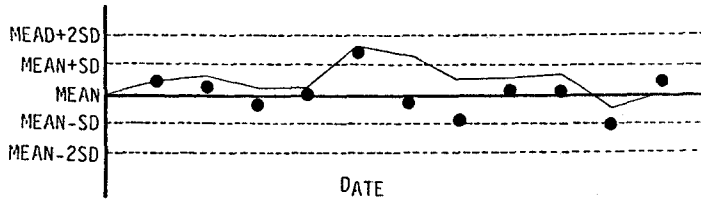


Fig. 5. Shewhart chart of the control group measured by polyclonal antibody kit. Broken line shows the CUSUM.

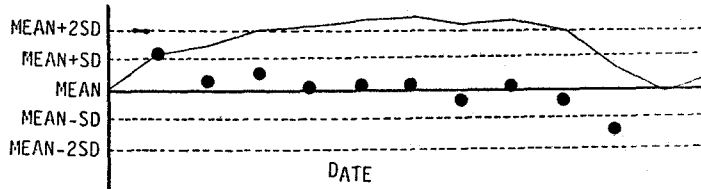


Fig. 6. Shewhart chart of the low dose control group measured by monoclonal antibody kit. Broken line shows the CUSUM.

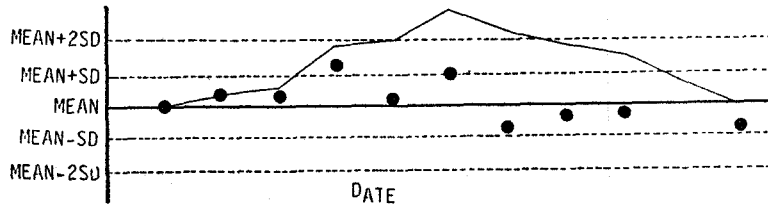


Fig. 7. Shewhart chart of the high dose control group measured by polyclonal antibody kit. Broken line shows the CUSUM.

Table 1. Precision Values of the Cyclosporine-RIA Measured in SNUH by Polyclonal Antibody Kit

Control	Plasma		Whole blood	
	Mean (ng/ml)	CV (%)	Mean (ng/ml)	CV (%)
C1	137.3	16.1		
C2			495.7	19.3
C3			1035.8	17.4

Table 2. Intra-assay Precision Values of the Cyclosporine RIA Measured in SNUH by Monoclonal Antibody Kit.

Control	Mean (ng/ml)	SD	CV (%)
C1	43.3	5.3	13.0
C2	149.2	15.5	10.3
C3	597	96	16

Table 3. Precision Values of the Cyclosporine-RIA Measured in SNUH by Monoclonal Antibody Kit.

Control	Plasma		Whole blood	
	Mean	CV	Mean	CV
C1	94.8	20.2	101.6	11.9
C2	396.1	14.0	395.3	13.1

변동계수 20.2%와 14.0%보다 더 낮았다.

고 안

이식 환자에서 획기적인 면역억제제로 쓰이는 cyclosporine은 그 독성이 임상 이용에서 큰 제약이 되어왔다. Cyclosporine의 혈중 농도를 조절함으로써 이러한 독성을 피할 수 있으며, Cyclosporine의 혈중농도측정

은 여러가지 이유로 방사면역측정법이 가장 보편화 되어 널리 쓰이고 있다. 그러나 이 방법도 삼중수소로 표지된 cyclosporine을 사용하므로 quenching 등에 의한 오차가 큰 것으로 되어 있고, 또한 활성탄을 첨가하여 결합형과 비결합형을 원심분리에 의해 분리하여 그 상층액을 취하여 측정하므로 방법이 복잡할 뿐만 아니라 오차도 큰 단점이 있다. 저자들의 결과에서도 모든 측정치에서 변동계수가 10% 이상이 나왔으므로 정확한 측정이라고는 볼수가 없으나, 단세포균항체를 이용한 방사면역측정법에서는 2,500 ng/ml 이하에서, 단세포균항체를 이용한 측정법에서는 모든 범위에서 20% 미만의 변동계수를 보여 임상에서 용인되어 사용할 수 있는 정도의 오차를 보이고 있다.

단세포균항체를 사용하는 방사면역측정법의 경우 methanol로 추출하는 과정을 거치므로 전혈을 시료로 하여 측정을 하여도 혈액속의 hemoglobin이 추출되어 나오지 않아 β -counter로 측정시 색깔에 의한 quenching이 사라져서 오차가 줄어들게 된다. 따라서 단세포균 항체를 쓴 경우보다 변동계수가 줄어든 결과를 얻을 수 있다. 본 실험에서도 400-500 ng/ml의 농도 범위의 cyclosporine 함유 전혈에서 단세포균항체법에 비하여 단세포균항체법에서 낮은 오차를 보였다. 그러나 색깔에 의한 quenching이 문제가 되지 않는 혈장중의 농도 측정시는 오히려 단세포균 항체를 쓴 경우가 변동계수가 작은 경향이 나타났는데 이는 단세포균항체 이용시 methanol 추출과정에서의 추출률에 의한 오차와 methanol을 pipetting 하는 과정에서의 오차에 기인한 것으로 생각된다. 그런데 실제에 있어서 혈장중의 cyclosporine 측정시에는 혈장중의 lipoprotein에 대한 cyclosporine의 결합¹⁴⁾ 및 온도에 따른 Cyclosporine의 혈장과 혈구 사이의 분배계수의 변화등^{15,16)}에 의하여 전혈중의 농도측정이 강력히 추천되고 있다.

한편 임상적으로는 50 ng/ml 이하의 범위에서도 정확도가 높은 값을 요구하나 precision profile을 볼 때 단세포균항체를 쓴 방법은 50 ng/ml 이하의 범위에서는 변동계수가 급속히 높아지므로 혈중농도 측정에는 부적절함을 알 수 있다.

따라서 본 실험결과로 보아 방사면역측정법에 의한 혈중 cyclosporine 측정법은 비교적 적은 오차를 보이는 신뢰성 있는 검사법으로 사료되었고, 특히 전혈에서는 단세포균항체를 이용한 측정법이 더욱 좋은 방법으로 생각

되었다.

결 론

Cyclosporine 혈중농도 측정의 정도관리를 위하여 단세포균 항체를 이용한 방사면역측정법과 단세포균항체를 이용한 방사면역측정법으로 전혈과 혈장에서의 여러 가지 농도의 대조군들을 측정하여 본 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 단세포균 항체를 이용한 정도관리 결과는 혈장시료에 대하여 평균값 137.3 ng/ml 변동계수 16.1%로 나타났고, 전혈 시료들에 대하여는 평균값이 각각 495.7 ng/ml, 1,053.8 ng/ml 그리고 변동계수는 각각 19.3%와 17.4%로 나타났다.

2) 단세포균 항체를 이용한 정도관리 결과는 100 ng/ml 및 400 ng/ml의 두 가지 혼합 대조 시료에 대해 혈장 시료 쪽은 변동계수가 각각 20.2%와 14.0%이고, 전혈 시료쪽은 변동계수가 각각 11.9%와 13.1%로서 전혈쪽이 변동계수가 더 낮은 것으로 나타났다.

이상에서 cyclosporine의 방사면역측정법은 비교적 적은 오차를 보이는 신뢰성 있는 검사법으로 생각되었고 특히 단세포균항체법이 좋은 방법으로 사료되었다.

REFERENCES

- 1) Borel J F: *Cyclosporin A—Present experimental status. Transplant Proc 13:343, 1981*
- 2) Dos Reis GA, Shevach EM: *Effect of cyclosporin A on T cell function in vitro. J Immunol 129:2360, 1982*
- 3) Sawchuk RJ, Cartier LL: *Liquid chromatographic determination of cyclosporin A in blood and plasma. Clin Chem 27:1368, 1981*
- 4) Smith HT, Robinson WT: *Semi-automated high-performance liquid chromatographic method for the determination of cyclosporine in plasma and blood using column switching. J Chromatogr 305:353, 1984*
- 5) Carruthers SG, Freeman DJ, Koegler JC, et al: *Simplified liquid-chromatographic analysis for cyclosporin A, and comparison with radioimmunoassay. Clin Chem 29:180, 1983*
- 6) Kates RE, Latini R: *Simple and rapid high-performance liquid chromatographic analysis of*

- cyclosporine in human blood and serum. J Chromatogr* 309:441, 1984
- 7) Lensmeyer GL, Fields BL: *Improved liquid-chromatographic determination of cyclosporine, with concomitant detection of a cell-bound metabolite. Clin Chem* 31:196, 1985
 - 8) Donatsch P, Abisch E, Homberger M, et al: *A radioimmunoassay to measure cyclosporin A in plasma and serum samples. J Immunoassay* 2:19, 1981
 - 9) Bowers LD, Canafax DM: *Cyclosporine: experience with therapeutic monitoring. Ther Drug Monitoring* 6:142, 1984
 - 10) Robinson WT, Schran HF, Barry EP: *Methods to measure cyclosporine levels-high-pressure liquid chromatography, radioimmunoassay and correlation. Transplant Proc* 15(4, Suppl 1/2):2403, 1983
 - 11) Quesniaux V, Himmelspach K, Van Regen mortel MHV: *Immunol Lett* 9:99, 1985
 - 12) Quesniaux V, Tees R, Schreier MH, et al: *Ciclosporin: Progress in Allergy, vol 38, Basel, Karger, 1986*
 - 13) Quesniaux V: *The use of monoclonal antibodies to probe the surface of cyclosporines. Transplant Proc.* 18:1111, 1986
 - 14) Lemair M, Tillement J P: *Role of lipoproteins and erythrocytes in the in vitro binding and distribution of cyclosporin A in the blood. J Pharm Pparmacol* 34:715, 1982
 - 15) Niederberger W, et al: *Distribution and binding of cyclosporine in blood and tissues. Transplant Proc* 15(Suppl 1):2419, 1983
 - 16) Wenk E, Follath F, Abisch E: *Temperature depending of apparent cyclosporin A concentrations in plasma. Clin Chem* 29:1865, 1983
-