

## 리포솜을 이용한 생리활성물질의 면역학적 분석법

김종국<sup>†</sup> · 박경미

서울대학교 약학대학

(1994년 9월 10일 접수)

### Liposome Immunoassay for Bioactive Substances

Chong-Kook Kim<sup>†</sup> and Kyung-Mi Park

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul, 151-742, Korea

(Received September 10, 1994)

Recent development in the immunochemical technique has resulted in a new ultrasensitive analytical method known as liposome immunoassay (LIA). Liposome is a key element in performing liposome immunoassays, specifically designed to participate in immune reactions. A variety of markers can be encapsulated in liposomes and used as quantitative indicators of reactions. Liposome immunoassay based on agglutination, complement-mediated lysis, cytolysin-mediated lysis, detergent-mediated lysis or destabilization of the liposomal membrane have been reviewed. The quantity of markers released from liposomes should be proportional to the concentration of the analytes. Therefore, liposomal agglutination and lysis which are essential to liposomal lysis are critically reviewed to provide a better understanding of liposome immunoassay. Based on the literature review of recent advances in liposome immunoassay for bioactive substances, this assay method may provide a convenient, specific and highly sensitive method for detecting and measuring trace amount of clinically relevant substances in the future.

**Keywords**—Liposome immunoassay, Liposome, Marker, Agglutination, Lysis

최근 항원성 물질에 의한 질병을 진단하기 위하여 생체시료 중에 극미량 함유된 항원성 물질이나 항체들을 간편하게 분리 정량할 수 있는 새로운 검사 방법의 개발에 많은 연구자들이 관심을 가지고 있다. 지금까지 기체 크로마토그래피, 질량분석법, 액체 크로마토그래피 및 여러가지 생물학적 방법이 생체시료 분석에 이용되어 왔으나, 이러한 방법은 측정 감도 면에서 아직까지 만족스럽지 못할 뿐만 아니라 시간이 오래 걸리고, 비용이 많이 들며, 다량의 시료를 신속하게 검사하고자 하는 경우에는 적용하기가 힘들기 때문에 실제로 임상시험에 활용하는데는 한계가 있다. 따라서 최근에는 감도와 선택성이 매우 큰, 면역반응을 이용한 검사방법의 개발에 관심이 집중되고 있다.

생체시료 중에 함유되어 있는 약물, 비타민, 펩타

이드, 단백질 등을 임상적으로 쉽게 분석할 수 있는 여러가지 면역학적 분석법은 조작의 단순성, 면역 반응의 선택성, 안전성 등의 조건을 갖추어야 하며 쉽게 자동화가 가능해야 하고 비용이 적게 들어야 한다. 이러한 목적에 가장 부합되는 방법은 방사성 동위원소를 이용한 면역학적 분석법 (radioimmunoassay) 이다. 그러나 이 방법은 항체에 결합되어 있는 표지 화합물 (항원-항체 반응의 표시)과 결합되어 있지 않은 표지 화합물의 분리 조작을 거쳐야 한다. 분리방법으로는 항원-항체 복합체의 크로마토그래피, 초원심분리, solid phase 분리법, 전해질을 이용한 침강법, 분배법 등이 있다. 그러나 이러한 방법들은 모두 시간이 오래 걸리고 비교적 고가이며 오차의 가능성이 높다. 그 밖에도 다량의 분석에는 적합하지 못하고 특별한 처리가 필요할 뿐만 아니라

<sup>†</sup>본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

**Table I**—Mechanism and Analytes Used in Liposome Immunoassays

Mechanism	Analyte	References
Complement	Thyroxin	Tan <i>et al.</i> (1981), <sup>2)</sup>
		Nomura <i>et al.</i> (1987) <sup>3)</sup>
	Mycotoxin T-2	Ligler <i>et al.</i> (1987) <sup>4)</sup>
	Theophylline	Glagasigu <i>et al.</i> (1987), <sup>5)</sup>
		Canova-Davis <i>et al.</i> (1986), <sup>6)</sup>
	BSA <sup>a)</sup>	Yu <i>et al.</i> (1987), <sup>7)</sup>
		Kim and Lim (1993) <sup>8)</sup>
	$\alpha_2$ plasmin inhibitor	Hosoda and Yasuda (1989) <sup>9)</sup>
	Human IgG	Ishmori <i>et al.</i> (1984) <sup>10)</sup>
	C-Reactive Protein	Umeda <i>et al.</i> (1986) <sup>11)</sup>
Polysaccharide antigens <sup>b)</sup>	Vistnes <i>et al.</i> (1983) <sup>12)</sup>	
Cytolysin	Melittin	Nakamura <i>et al.</i> (1989), <sup>13)</sup>
		Freytag and Litchfield (1984) <sup>14)</sup>
	Litchfield <i>et al.</i> (1984) <sup>15)</sup>	
	Biotin	Litchfield <i>et al.</i> (1984) <sup>15)</sup>
Phospholipase C	Gentamicin	Kim and Park (1994) <sup>16)</sup>
Destabilization (stabilizer)		
Asialoganglioside (G <sub>M1</sub> )	Digoxin	Pinnaduwege and Huang (1988) <sup>17)</sup>
DNP-cap-PE <sup>c)</sup>	Glycophorin A	Ho and Huang (1985) <sup>18)</sup>

<sup>a)</sup>Bovine Serum Albumin<sup>b)</sup>*Neisseria meningitidis* capsula antigens<sup>c)</sup>n-(dinitrophenylaminocaproyl)-phosphatidylethanolamine

방사선 동위원소는 위험하여 취급자가 한정되어 있고 고가의 비용이 드는 단점을 지니고 있다. 형광 물질을 이용하는 면역학적 분석법 (fluorescent immunoassay)이나 효소를 이용하는 면역학적 분석법 (enzyme immunoassay)은 방사성 동위원소를 이용한 면역학적 분석법과 달리 사용시 제한이 없다는 장점이 있으나 역시 한외여과, 초원심분리와 같은 번거로운 분리 과정을 거쳐야 하는 단점이 있다. 최근에는 분리 조작을 거치지 않으면서, 효소를 이용한 면역분석법 (homogeneous enzymatic immunoassay)이 개발되어 많이 실용화되고 있다.

앞에서 언급한 바와 같은 종래의 면역학적 분석

법이 일반적으로 갖고 있는 단점을 개선하고, 단일 조작으로 미량 존재하는 물질을 간편하게 분리 정향하기 위한 새로운 시도로서 liposome immunoassay가 Kinsky<sup>1)</sup>에 의해 처음 소개되었다. 그 이후, 많은 연구자들에게 관심의 대상이 되었으며, 다양한 각도에서 연구되고 있다 (Table 1). 이 liposome immunoassay는 내부에 수상을 갖는 단일 또는 다중막으로 이루어져 있으며, 내부에 검출이 용이한 고감도의 표식인자를 봉입할 수 있는 vesicle이 항원-항체 반응의 정도에 따라 파괴되면서 표식인자 (marker)를 방출하여 신호 (signal)를 나타내는 작용기전을 이용한 것이다.

Liposome immunoassay를 수행하는데 있어서 필수 요소는 리포솜, 표식인자 그리고 리포솜막의 lysis 또는 응집 등 세가지이다. 리포솜은 면역반응에 관여할 수 있도록 특별히 설계되고 목적에 합당하도록 적절한 조성 물질로 제조되어야 한다. 표식인자는 리포솜 내부에 봉입될 수 있어야 하며, 반응이 일어난 정도를 정량적으로 나타낼 수 있어야 한다. 리포솜의 응집과 lysis 또한 중요한 요소이다. Liposome immunoassay가 이용하는 기전 즉, 응집을 이용하는지 또는 lysis를 이용하는지 그리고 lysis를 일으키는 물질이 무엇인지에 따라 세가지 요소가 갖추어야 할 조건이 달라진다. 그러므로 본 종설은 리포솜을 이용한 면역학적 분석법에 이용되는 리포솜, 봉입물질, 응집 또는 lysis의 기전 및 그 종류에 대하여 검토하고자 한다. 또한 system의 문제점과 최근의 연구추세를 분석함으로써 전반적인 liposome immunoassay의 특징을 고찰하고자 한다.

#### Liposome Immunoassay의 구성요소

리포솜-리포솜은 내부에 수상을 갖는 인지질의 단일 또는 다중막으로 이루어져 있다. phosphatidylcholine(PC) 또는 sphingomyelin(SPH)와 같은 큰 극성기를 갖고 있는 인지질은 리포솜의 이중막 구조에서 외부면에 주로 분포되어 있으며, phosphatidylserine(PS)이나 phosphatidylethanolamine(PE)와 같이 극성기가 작은 인지질은 리포솜 지질막의 내부면에 분포한다.<sup>19)</sup> 그러나 이 배열이 모든 리포솜에서 공통된 것은 아니다.

리포솜은 sonication, extrusion, detergent dialysis technique 등<sup>20)</sup>으로 제조할 수 있는데, 방법에 따라 small unilamellar vesicle (SUV), large uni-

**Table II**—Basic Lipid Composition Used for Liposome Preparation

Basic Lipid Composition (ratio)	Membrane	Membrane Sensitizer	Reference
DPPC, Chol, DPPE (1:1:0.06)	ML	Human IgG	Ishimori <i>et al.</i> , 1984 <sup>101</sup>
PC, Chol (2:1)	ML	None	Nakamura <i>et al.</i> , 1989 <sup>133</sup>
DMPC, Chol (3:1)	UL	None	Kim and Park, 1994 <sup>165</sup>
DPPC, DPPG, Chol (10:1:10)	UL	Digoxigenin	O'Connell <i>et al.</i> , 1985 <sup>241</sup>
DMPC, Chol, DCP, MPB-PE (5:4:1:0.1)	UL	Fab' fragment	Gaber <i>et al.</i> , 1988 <sup>251</sup>
DMPC, Chol, DCP (5:4:1)	UL	Mycotoxin T-2	Liger <i>et al.</i> , 1987 <sup>1</sup>
SM, Chol, DCP (1:0.5:0.03)	ML	Ganglioside Ag	Zemmour <i>et al.</i> , 1984 <sup>261</sup>
PC, Chol (1:1)	ML	None	Kubotsu <i>et al.</i> , 1990 <sup>271</sup>
SM, Chol, SA, DPPE (47.25:47.25:5:0.5)	UL	Digoxigenin	Fiechtner <i>et al.</i> , 1989 <sup>281</sup>
PC, Chol, TP-PE (1:1:0.01)	UL	Theophylline	Glagasigij <i>et al.</i> , 1988 <sup>51</sup>

## Abbreviations:

Chol, cholesterol; DMPC, dimyristoylphosphatidylcholine; DPPC, dipalmitoylphosphatidylcholine; DPPE, dipalmitoylphosphatidylethanolamine; DTP-DPPE, 3-(2-pyridyldithio)propionate derivative of DPPE; ML, multilamellar; MPB-PE, maleimidobenzoyl-phosphatidylethanolamine; SA, stearic acid; SM, sphingomyelin; T-2-PE, T-2 mycotoxin dimyristoylphosphatidylethanolamine conjugate; TP-PE, theophylline-phosphatidylethanolamine conjugate; UL, unilamellar

**Table III.** Marker

Type	Marker	Detection Methods	References
Chelating Agent	TAMSMB	Spectrophotometer	3
Spin Label	Tempocholine Chloride	ESR spectrometer	2, 12
Dye	Arsenazo III	Spectrophotometer	29
	Calcein	Spectrophotometer	5, 18
	Carboxyfluorescein	Spectrophotometer	11, 30, 31, 32, 33, 34
	Sulforhadamine B	Spectrophotometer	24, 35
	Erioglucine	Microscopy	36
	4-Methylumbelliferone Phosphate	Spectrophotometer	26
Enzyme	Alkaline Phosphate	Spectrophotometer	7, 27, 37
	Glucose-6-Phosphate	Spectrophotometer	6, 17, 38
	Dehydrogenase		
	Glucose Oxidase	Spectrophotometer	13
Prosthetic Group	Flavin Adenine Dinucleotide (FAD)	Chemiluminescence	39

## Abbreviations:

TAMSMB, 2-(2-thiazolylazo)-4-methyl-5-(sulfomethylamino)benzoic acid ESR, electron spin resonance

lamellar vesicle(LUV), multilamellar vesicle (MLV) 등이 만들어지며 이들 모두 liposome immunoassay에 이용될 수 있다. 리포솜 표면을 수식하는 방법<sup>21-23)</sup>은 몇가지 시약을 사용함으로써 가능하다. Liposome immunoassay의 종류에 따라 표면 수식된 리포솜과 표면이 수식되지 않은 리포솜 모두 사용될 수 있다.

리포솜을 이용한 면역학적 분석법에 필요한 리포솜을 제조하는데 있어서 각 system에 따라 사용되는 인지질의 조성이 다르다. 몇가지의 예를 Table II에 나타내었다. 리포솜의 안정성에 영향을 미치는 요인으로는 인지질의 조성, 봉입된 물질, 리포솜 표면의 수식 정도와 수식 방법, 리포솜의 제조법을 들 수 있다. 리포솜막의 안정성에 영향을 미치는 콜레

스테롤의 함량과 양이온성이나 음이온성 인지질에 의한 표면의 전기적 성질 등과 같은 몇가지 일반적인 사항을 제외하고는 리포솜 제조에 특별히 고려할 사항은 없으며 각 시스템마다 예민한 반응을 나타낼 수 있도록 그 구성요소들의 물리적 특성에 가장 합당한 자기 다른 조성의 리포솜이 필요하다. 리포솜 조성에 대한 전체적인 연구가 리포솜을 이용한 면역학적 분석법의 발전에 중요한 요인이 될 것으로 생각된다.

**표식인자 (Marker)**— 표식인자는 리포솜 내부에 봉입되는 물질로서 면역반응시 signal을 나타내는 매우 중요한 구성요소이다. 이들은 신호제로 작용할 뿐만 아니라 면역반응의 증폭제로 작용하기도 한다. Liposome immunoassay가 감도는 면역복합체가 형성되는 동안 신호를 내는 물질이 증가할수록 상대적으로 증가된다. 그러므로 적절한 표식인자의 선택은 새로운 liposome immunoassay system 개발시 우선적으로 연구해야 될 항목이다. 이제까지 표식인자로 사용된 물질로는 chelating agent,<sup>3)</sup> electron spin molecules,<sup>2, 12)</sup> 염료, 효소 등이 있는 그 중 가장 많이 사용된 물질은 염료와 효소이다. 이들을 Table III에 요약하면 나타내었다.

표식인자로 염료를 사용하는 경우 형광을 나타내는 염료를 많이 사용한다. 특히, carboxyfluorescein<sup>11, 30-33)</sup>과 calcein<sup>5, 18)</sup>은 리포솜에 잘 봉입되고, 화학적으로 안정하며, 넓은 pH 범위에서 완충용액이나 물에 잘 용해된다. 이들은 리포솜에 봉입되면 차폐되며, 리포솜이 깨어져서 완충용액으로 희석되어 나오면 차폐효과가 감소되어 형광을 발하므로 항원이나 항체의 titrating시 유용하게 사용될 수 있다. 형광을 발하지 않는 염료인 경우 간단한 분광기나 육안으로 쉽게 관찰이 가능하다. Arsenazo III<sup>29)</sup>는 리포솜 내에 존재할 때는 붉은 색을 나타내다가 리포솜이 깨어져서 완충용액으로 유리되면  $Mg^{+2}$ 과 신속하게 반응하여 안정한 푸른 색의 복합체를 형성한다. 이 반응은 육안으로 관찰이 가능하고 또 분광기로 정량이 가능하다.

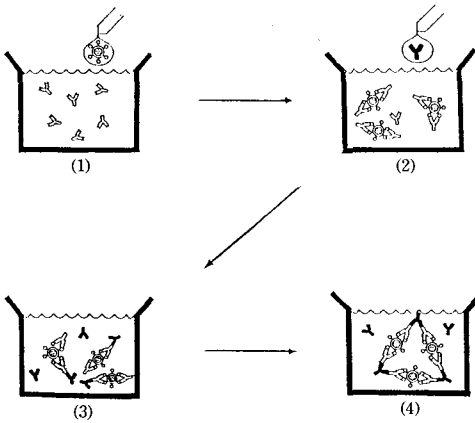
리포솜 내에 봉입물질로 효소를 사용하면 리포솜이 lysis 되었을 때 효소가 유리되고 이는 즉시 많은 양의 기질과 반응하게 되어 색의 변화 또는 electronic response가 변하여 signal로 검출 가능하게 된다. 이때 측정법은 enzyme immunoassay

(EIA)와 같으나 리포솜 내에 봉입분자수, vesicle의 크기, 그리고 효소의 전환속도 (turnover rate)가 클수록 신호증폭효과가 커진다. 따라서 liposome immunoassay와 enzyme immunoassay 두 방법을 결합시킴으로써 감도를 개선시킬 수 있다. Liposome immunoassay에 사용되는 효소로는 horseradish peroxidase,<sup>40)</sup> alkaline phosphatase,<sup>7, 27, 37)</sup> glucose-6-phosphate dehydrogenase<sup>6, 17, 38)</sup> 그리고 glucose oxidase<sup>13)</sup> 등이 있다. Alkaline phosphatase를 표식인자로 리포솜에 봉입시켰을 경우, 봉입된 alkaline phosphatase가 리포솜에서 유리되면 기질인 무색의 p-nitrophenyl-phosphate를 노란색의 p-nitrophenol로 전환시켜 410 nm에서 검출할 수 있다. 또, horseradish peroxidase는 과산화수소 존재하에서 5-aminosalicylic acid를 460 nm 즉 육안으로 확인 가능한 붉은 갈색의 물질로 전환시킨다.

Spin label은 electron spin resonance (ESR) spin-labeling technique에 기초를 두고 있으며 ESR spectrometer를 사용한다.<sup>2, 12)</sup> 리포솜에 봉입된 spin marker들 사이에 일어나는 electron spin exchange interaction은 ESR 스펙트럼에 나타난다. 리포솜에 봉입되어 있는 spin label marker (Tempocholine chloride : N,N-dimethyl-N(2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidimyl-1-oxy)-2-hydroxyethyl ammonium chloride)의 ESR 스펙트럼은 넓고 약한 signal을 나타낸다. Spin label의 농도가 높을 때는 signal amplitude가 감소 또는 차폐되어 나타난다. 리포솜이 깨어져서 spin label이 유리되면 이것이 희석되어 국소 농도가 나타난다. 결과적으로 ESR amplitude는 날카롭고 강한 signal을 나타내게 된다. ESR 스펙트럼에서 signal의 크기는 리포솜에서 유리된 spin label 분자의 수에 직접 비례한다. 그러므로 signal의 강도 변화를 측정함으로써 lysis 정도를 정확하게 측정하게 된다.

기전—Liposome immunoassay는 방법적 측면에서 다음과 같이 크게 두가지로 구분할 수 있다. 즉, (1) 항체와 결합한 라벨과 결합하지 않은 라벨을 분리하지 않는 homogeneous assay, (2) 항체와 결합하지 않은 라벨을 분리하는 heterogeneous assay로 나눌 수 있다.

Homogeneous assay는 다시 두가지로 나눌 수 있는데 첫번째 형태는 표면 수식된 리포솜을 사용



**Figure 1** – Coprecipitation of immune-complexed liposomes for antibody measurements. (1) Addition of antigen-sensitized liposome to sample antibody. (2) Addition of second antibody to immune-complexed liposomes. (3) Second antibody binding to immune-complexed liposomes. (4) Lattice formation and co-precipitation of liposomes.

Key : , marker-filled antigen (○)-sensitized liposome; , antibody detected; , second antibody specific for that detected.

하는 것으로 리포솜 표면에서 면역반응에 의해 면역복합체가 형성됨으로써 latex의 응집이 증가되든지, 형성된 면역복합체에 보체를 첨가함으로써 리포솜이 lysis 되는 것이고, 두번째 형태는 표면 수식되지 않은 리포솜을 사용하는 것으로 면역반응이 일어남으로써 antigens (hapten)-cytolysin 공유결합체의 활성이 저하되어 liposome의 lysis가 감소되는 것을 이용한다.

항원으로 수식된 리포솜과 항혈청을 혼합하면 면역복합체가 형성되는데 만약 리포솜 내부에 육안 또는 현미경으로 관찰 가능한 염료가 봉입되어 있다면 응집으로 판별할 수 있고, 면역복합체에 보체를 가하여 리포솜을 lysis 시켜 signal을 측정할 수 있다. 리포솜 막의 lysis는 앞에서 언급한 보체,<sup>2,4,7,25</sup> cytolysin<sup>13-15</sup> 외에 detergent,<sup>38</sup> 또는 2가 양이온<sup>41</sup> 등에 의해 일어날 수 있는데 이는 어떤 liposome immunoassay system을 고안하느냐에 따라, 리포솜의 종류에 따라, 또는 분석하고자 하는 물질의 특성에 따라 선택될 수 있다.

**응집을 이용한 Liposome Immunoassay**

항원으로 표면이 수식된 리포솜 용액과 항혈청을 혼합하면 vesicle이 뭉쳐진다. 이는 리포솜 외부에

**Table IV.** Evaluation of 42 Serum Samples from Patients with Rheumatoid Arthritis using the Liposome-Enhanced Agglutination Format and a Commercial Test Kit (Ref. 42)

	No. of Patients					
	Negative	1+w	1+	2+	3+	4+
Liposome-Latex	11	2	1	1	10	17
Commercial Test	17	2	1	1	7	3

노출되어 있는 항원의 인지부분에 type-specific immunoglobulin이 결합하여 재빨리 면역복합체를 형성하기 때문이다. 그런데 여기에 항원과 반응한 항체에 대한 2차 항체가 존재하면 인접한 리포솜 사이에 bridge 또는 lattice가 형성되어 응집 또는 공침반응이 일어나, 현미경으로 쉽게 관찰할 수 있게 된다 (Fig. 1). 만약 리포솜 내에 형광 물질이 봉입되어 있다면 형광 현미경에 의해서도 관찰이 가능하다. 이 기전을 이용한 Liposome Immunoassay의 실례로 매독의 혈청학적 검사를 들 수 있다.<sup>36</sup> Treponema pallidum의 조직 침투에 의해 매독 환자의 혈청에서 reagin (리아진)이라는 복합항체가 나타난다. 리아진이 cardiolipin과 결합하는 능력이 있는 것을 이용하여 매독의 혈청학적 검사시에 cardiolipin이 항원으로 이용되어 왔다. 이 점을 이용하여 cardiolipin, lecithin, cholesterol로 구성된 리포솜에 표식인자를 봉입시키고 슬라이드 글래스나 플라스틱 카드에서 매독환자의 혈청과 혼합하게 되면 3~5분 정도에 현미경 없이 육안으로 관찰가능한 응집이 일어나게 된다. 응집이 일어난 정도에 따라 negative, 1+w, 1+, 2+, 3+, 4+로 판별한다.

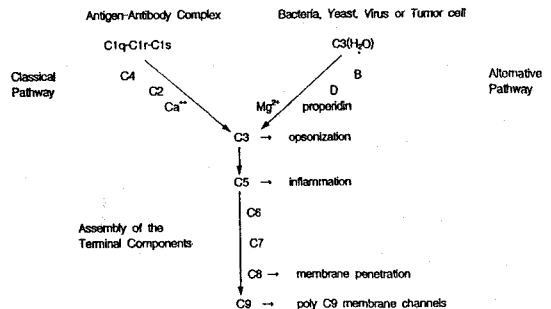
항원으로 수식된 리포솜 대신 항체로 수식된 리포솜도 응집반응을 이용한 liposome immunoassay에 이용될 수 있다.<sup>42,43</sup> Rheumatoid factor (RF)와 결합하는 immunoglobulin을 latex sphere에 공유 결합시키고, 리포솜에는 RF와 결합할 수 있는 anti-human IgM Fab' fragment를 공유결합시킨다. 환자의 혈청에 존재하는 RF가 latex 입자에 결합된 IgG와 반응하고 차례로 리포솜이 second ligand를 통하여 latex에 빨리 반응하여 육안으로 확인가능한 latex aggregate를 형성한다. 이 분석 방법을 이용하여 Kung 등<sup>42</sup>이 실험한 결과에 의하면 Table IV에 나타낸 것처럼 commercial test kit와 비교시 감도가 뛰어나고, 간편하며, 판정도 용이하다.

**Table V.** Comparison of Cytolytic and Complement-Mediated LIAs (Ref. 55)

Complement	Cytolytic
Native complement in sample must be removed before assay by preheating to 56°C for 30 min.	Small amounts of cytolysin needed help to lower test cost.
Liposome composition, sensitized surface and complement levels affect the percentage of lysis and assay sensitivity. Complete lysis is slow, requiring several activated molecule in the complement cascade. ≥160 min for assay completion.	Cytolysins interact with unsensitized liposomal phospholipids for complete lysis. Instantaneous lysis with single molecule. ≥10 min for assay completion.
Guinea pig complement may contain unknown components that cause nonspecific lysis.	Liposome composition, sensitized surface and complement levels affect the percentage of lysis and assay sensitivity.
Guinea pig complement may contain unknown components that cause nonspecific lysis.	Liposomal membrane integrity remains stable since surface-bound antigens are not required.
Alternative pathway must be eliminated while immune liposome lysis is directed through classical pathway.	Assay reproducibility is excellent. Direct action of cytolysin on vesicle membrane without interference avoids nonspecific lysis.
Assays are usually restricted to a homogeneous procedure.	Homogeneous and heterogeneous assays are available.

**Lysis를 이용한 Liposome Immunoassay**

보체를 매개로 하는 liposome immunoassay의 경우 시간이 많이 걸리고, 표면을 수식한 리포솜이 필요하며, cytotoxin을 매개로 하는 liposome immunoassay와 비교시 감도에 한계가 있다. Cytotoxin을 매개로 한 liposome immunoassay는 빠른 시간 내에 가능하고, 리포솜의 표면을 수식할 필요가 없는 등 여러가지 장점을 가지고 있다. 그러나 bee mellitin이나 cobra venom과 같은 cytotoxin은 사용시 세심한 주의가 필요하다. 보체를 매개로 한 liposome immunoassay와 cytolysin에 의한 liposome immunoassay의 장 단점을 Table V에 나타내었다. Octyl glycoside, triton X-100 또는 deoxycholate 등의 detergent에 의한 lysis를 이용한 liposome immunoassay는 위험하지 않은 장점을 가지고 있다. detergent에 의해 리포솜이 깨어지는 정도와 속도는 detergent의 농도와 리포솜 입자의 크기에 따라 달라진다. 이온에 의한 lysis는 이온 첨가시 분자배열이 변하는 특별한 조성의 리포솜이 필요하다. 이는 항체가 존재하면 막이 안정화되어 구조변화와 표식인자의 유리를 막는 성질을 이용한 것이다. 이와 유사한 방법으로 단독으로는 이중막 구조를 만들 수 없는 phosphatidylethanolamine에



**Figure 2**—The classical and alternative pathways of complement activation (Ref 45).

ganglioside,<sup>17)</sup> acylated antibody,<sup>44)</sup> 또는 haptanated lipid<sup>18)</sup> 등의 성분을 혼합하여 안정한 리포솜을 제조하면, liposome immunoassay 시 세포표면과 같은 solid phase의 특정 성분과 stabilizer의 결합으로 리포솜막의 일부에서 국소적으로 phosphatidylethanolamine만 존재하게 되어 막이 불안정화되어 리포솜이 깨어지게 된다.

**보체를 이용한 Liposome Immunoassay**

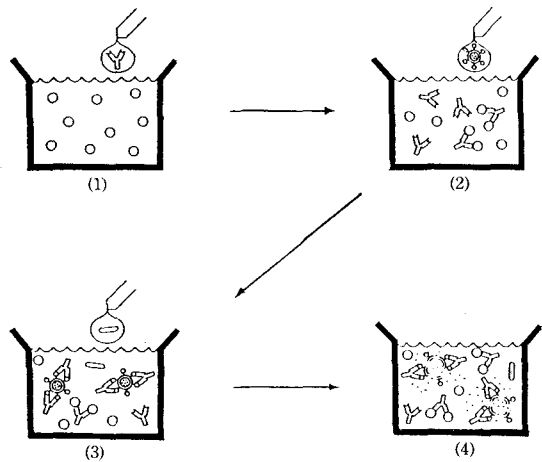
보체-보체는 혈액에 포함된 당단백질로 외부 물질 침입시 방어기전에 관여하는 주요계로서 세가지 기전에 의해 수행된다. 1) 특정 보체 단백질(C3, C4)이 입자에 고정화됨으로써 세균 및 다른 세포가

C3/C4 수용체가 있는 macrophages의 식작용을 받게 된다 (opsonization, 오프소닌작용). 2) 세포 (polymorph, macrophage, lymphocyte, antigen-presenting cell 등) 표면의 receptor와 보체에서 유리된 리간드의 상호작용으로 chemotaxis 또는 특정 면역반응이 잘 일어나게 해 준다. 3) membrane attack complex (MAC)라고 불리는 polymerized C9 분자가 지질이중막에 끼어 들어 구멍을 만들어서 세포 내부로 물과 염을 유입시킴으로써 내부 부피를 확장시켜 지질이중막을 lysis 시킨다. 이 과정은 별개의 두 경로 (classical pathway와 alternative pathway)에 의해 개시된다. 두 경로의 모식도를 Fig. 2에 나타내었다.

Classical pathway는 다섯 분자 (C1, C2, C3, C4, C5)에 의해 수행되며 이는 모두 불활성화된 형태로 혈장에 존재한다. C3는 alternative pathway에도 관여하며, C5는 MAC를 이루게 하는 terminal pathway에도 관여한다. C1은 C1q, C1r, C1s의 세 subunit으로 이루어져 있고 그 이외에도 모두 단 분자이다. Classical pathway의 첫 단계인 C1의 활성화를 위해서는 표면 항원과 항체의 결합이 선행되어야 하고, 항원-항체 복합체가 표면에 쌓여 있을 때만 C1이 활성화된다. 일단 개시된 반응은 autocatalytic, cascade 방식으로 진행된다.

Alternative pathway에는 6개의 혈장단백질 (C3, factor B, D, H, I, properidin)이 관여한다. 이 중 factor H와 factor I는 alternative pathway의 증폭 과정을 조절하는 과정에 관여한다. Alternative pathway의 활성화에 관여하는 물질로는 bacteria, fungi, virus와 virus로 감염된 세포 등을 들 수 있다. C3b는 자기세포를 포함한 모든 입자에 결합한다. 이 중 자기세포는 세포막에 존재하는 단백질에 의해 C3b 분자를 불활성화시키고, 외부 물질인 경우 factor B와 factor D에 의해 활성화되어 더 많은 C3b가 외부 물질의 세포막에 결합한다. 이 과정은 표면이 완전히 C3b로 뒤덮히든지, 결합할 보체가 없을 때까지 계속된다. Alternative pathway는 classical pathway와 같이 MAC를 이루게 하는 terminal pathway를 활성화시킨다.

Terminal pathway는 5개의 전구 단백질 (C5b, C6, C7, C8, C9)의 집합에 의해 세포나 이물질의 막 기능을 파괴시킨다. C5b, C6, C7의 복합체에 C8, C



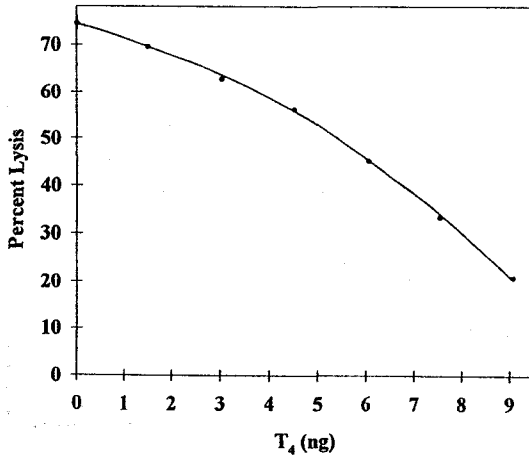
**Figure 3**—Homogeneous complement-mediated antigen competitive inhibition liposome immunoassay. (1) Addition of antibody to sample antigen. (2) Antigen-sensitized liposomes added. (3) Complement added. (4) Liposome lysis with marker release.

Key: Marker-filled antigen-sensitized liposome; antigen detected; antibody; complement.

9의 연속적인 결합으로 MAC를 이룬다. MAC는 C5b-8(C9)<sub>n</sub>의 구조를 가지며 C9의 C말단 소수성 부분을 세포막에 끼워 넣어 transmembrane channel을 형성하여 target cell을 파괴한다.

원리—보체를 이용한 liposome immunoassay에서는 리포솜 내에 봉입된 표식인자가 유리되어 신호의 증폭효과를 가져온다. Lytic assay는 응집이나 침강반응을 이용한 liposome immunoassay보다 특이적이고 정량적이며 감도가 높다. Guinea pig complement는 손쉽게 구할 수 있으나 lot가 바뀔 때에는 사용하는 적절한 농도를 결정하기 위하여 반드시 미리 titration 해야 한다. 또, 사용하는 완충 용액에 반드시 0.15 mM CaCl<sub>2</sub>와 1 mM MgCl<sub>2</sub>가 첨가되어야 한다. Ca<sup>2+</sup>와 Mg<sup>2+</sup> 이온이 없으면 보체가 활성화되지 않는다.

시료 중의 항원의 농도를 측정하고자 할 때에는 항원이 함유된 시료에 항체를 가한 뒤 동일한 항원으로 표면 수식된 리포솜을 가한다. 그러면 분석하고자 하는 시료에 포함된 항원과 리포솜 표면에 결합된 항원이 가해준 항체에 대해 경쟁적으로 결합하여 결과적으로 리포솜 막에 보체 고정으로 막에 채널이 형성되어 내부에 봉입된 표식인자가 유리된다 (Fig. 3). 시료 중 항체의 농도도 항체로 표면 수



**Figure 4**—Standard curve for thyroxine ( $T_4$ ) obtained by liposome immunoassay methods. Assays were performed by the standard procedure with  $3 \mu\text{l}$  of guinea pig serum,  $3 \mu\text{l}$  of antiserum, and various amounts of thyroxine (Ref. 2).

식한 리포솜을 이용하면 위와 비슷한 양식으로 수행할 수 있다. 효소가 봉입된 리포솜을 사용한 경우 표식인자가 유리된 양, 리포솜 lysis 정도, 면역반응이 일어난 정도에 따라 기질이 흡광도 변화를 일으킨다. 색의 강도로써 분석하고자 하는 항원의 존재량을 결정할 수 있다.

Tan 등<sup>2)</sup>은 thyroxine으로 표면 수식한 리포솜과  $T_4$  항혈청, guinea pig serum 및 thyroxine을 함유한 시료를 순차적으로 혼합하여 1시간 incubation 한 후 lysis 정도를 측정한 결과 Fig. 4에 나타낸 바와 같이  $20 \mu\text{l}$ 의 시료에서 thyroxine 1~9 ng까지 정량가능하였다. 이는 RIA의 감도에 필적할 만하며, 분리 과정이 없고, 방사성 동위원소로 인한 위험성이 없으며, 간단하고, 필요한 시료의 용적이 작으며, RIA와 비교시 경제적인 장점이 있다.

#### 리포솜의 조성

보체를 이용한 liposome immunoassay를 수행할 때 리포솜의 조성과 유동성은 매우 중요한 인자이다. DPPC나 DSPC로 제조된 리포솜보다 DLPC나 DMPC로 제조된 리포솜을 사용했을 경우 면역반응이 더 잘 일어난다. 유동성이 있는 인지질 즉, 전이온도가 낮은 인지질로 제조된 리포솜에서 lateral mobility가 크기 때문에 항체와 보체의 고정화가 쉽게 일어난다. 보통 분석을 실시하는 온도인  $25^\circ\text{C}$ 에서 DLPC와 DMPC는 유동상태로 존재한다. 그

러므로 DLPC나 DMPC로 제조된 리포솜에서 hapten의 lateral mobility가 크므로 항체와 결합하기가 쉬워 복합체를 잘 형성한다. 또 다른 이유는 DLPC나 DMPC와 같이 지방산의 길이가 짧은 인지질을 이용하여 리포솜을 제조한 경우 상대적으로 hapten의 노출이 증가한다는 것이다. Shin 등<sup>46)</sup> Forssmann 항원으로 표면수식한 리포솜에 항체와 보체를 가했을 때 유리되어 나오는 표식인자의 양이 인지질의 지방산 길이와 반비례함을 밝혔다. 그러므로 인지질에 hapten을 수식할 때 spacer arm을 도입하는 것이 항체와 결합시 입체장애를 감소시킬 수 있다. Spacer arm의 길이는 너무 짧거나 너무 긴 것보다 중간길이인 것이 효과적이다.

리포솜 막에 hapten이나 항원이 수식된 정도도 리포솜의 lysis 정도에 영향을 미친다. 수식된 hapten의 양이 과다한 경우 입체적 장애로 인하여 동일한 조건에서 리포솜이 깨어지는 정도가 작아지게 된다. 그러므로 적당한 수식비의 결정이 필요하다.<sup>5)</sup> 리포솜 막의 안정성은 리포솜 조성 특히 콜레스테롤의 함량과 밀접한 관계가 있다. 콜레스테롤의 함량이 높을수록 리포솜은 안정하다. 특히 DPPC와 CH이 1:1의 몰비로 구성된 리포솜이 가장 안정하다고 알려져 있다.<sup>31)</sup> 콜레스테롤이 50 mol% 이상 함유된 경우 리포솜은 만들어지지 않는다. 또한 콜레스테롤은 리포솜의 permeability를 감소시키고 혈청에서의 안정성을 증가시키는 것으로 알려져 있다.<sup>47)</sup>

Alternative pathway는 앞에서 설명한 바와 같이 항원-항체의 면역반응에 의해 개시되는 것이 아니라 bacteria, virus 등의 다른 입자에 의해 개시되는 반응이므로 liposome immunoassay 시행시 noise를 증가시켜 S/N ratio를 감소시키는 결과를 초래한다. 그러므로 alternative pathway를 억제할 수 있는 리포솜의 조성을 찾는 것이 중요하다. 리포솜의 표면 저하가 양성일수록, 지방산의 길이가 짧을수록, 불포화도가 클수록 alternative pathway가 많이 일어나므로 이를 고려하여 리포솜을 제조하여야 한다. 또한 리포솜의 조성 외에 alternative pathway에 의한 비특이적 lysis를 방지하는 방법으로 보체를 다른 리포솜과 미리 incubation 하는 전처리 과정을 실시한 후에 분석에 사용하는 것을 들 수 있다.<sup>34)</sup> 다른 리포솜과 보체를 incubation 함으로써 alter-



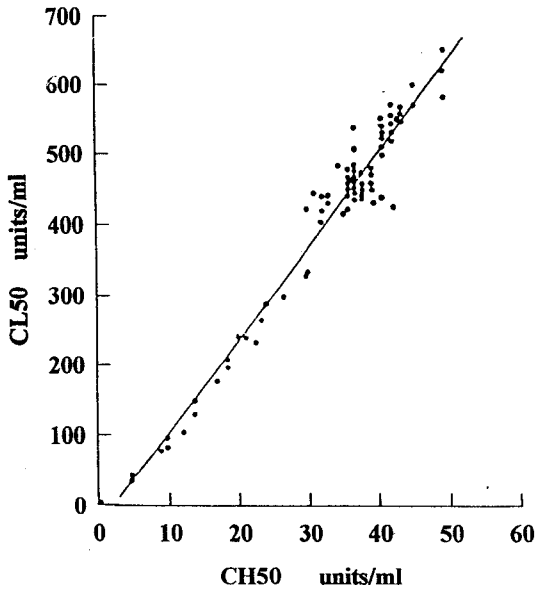


Figure 5—Correlation of complement-mediated liposome lysis (CL50) with CH50 test results for 77 human serum samples. CL=13.2 (CH50)–31.8 (r=0.98) (Ref. 32).

native pathway를 일으키는 보체 혈청에 포함된 serum factor가 리포솜에 흡착됨으로써 비특이적 lysis에 의한 noise를 감소시킬 수 있다.

**Complement activity 측정의 응용**

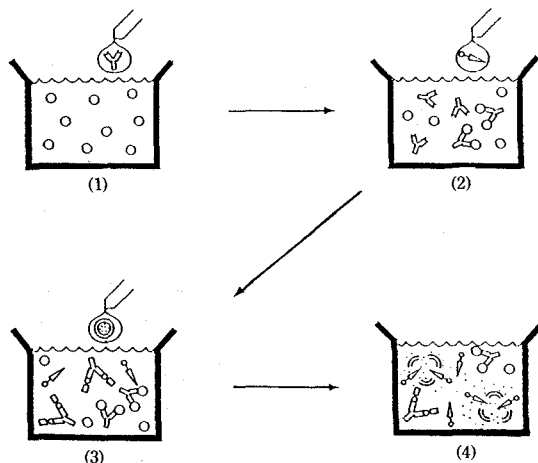
사람의 혈청에서 보체의 활성도는 면역 혹은 자가면역질환의 진단시 중요한 기준이다. 급성 전신성 홍반성 낭창, 류마티스성 관절염, 저온성 글로불린 혈증-혈관염, 신장염 그리고 보체계의 유전적 결함시 혈청에서 보체의 농도가 낮다. 보체는 앞에서 기술한 바와 같이 두가지 방식에 의해 활성화된다. 일반적으로 classic pathway의 활성을 측정하기 위해서는 표면 감작된 양 적혈구의 용혈반응을 이용하고,<sup>48)</sup> alternative pathway의 활성은 토끼 적혈구의 용혈반응을 이용하여 CH50(감작 양 적혈구의 50%가 용혈되는데 소모되는 보체의 역가)으로 측정된다.<sup>49)</sup>

리포솜을 사용하는 보체활성 측정법은 2,4,6-trinitrophenylaminocaproyl-dipalmitoylphosphatidyl ethanolamine (TNP-cap-DPPE)으로 제조된 리포솜 (TNP-cap-liposomes)을 이용한다. TNP-cap-liposomes은 guinea pig의 교대적 보체 경로를 활성화시키지만, 사람의 보체에 의해 lysis 되려면 TNP에 대한 항체가 필요하다.<sup>32)</sup> Carboxyfluorescein을 봉입시키고 TNP에 대한 항체로 표면감작시킨 TNP-

cap-liposome과 인혈청의 희석액을 혼합하여 37°C에서 한시간 incubation 한 후 적당한 buffer를 가하여 형광강도를 측정한다. 이때 사용하는 완충용액에 따라 전형적 경로와 교대적 경로의 활성을 각각 측정할 수 있다. 리포솜을 이용하여 측정된 보체의 역가는 CL50 (리포솜의 50%가 lysis 되는데 소모되는 보체의 역가)으로 표시된다. Masaki 등<sup>32)</sup>이 77개의 인혈청 시료를 가지고 CL50과 CH50 (Mayer 48) 방법에 따른 commercial EA에 의한 역가)을 비교한 결과가 Fig. 5에 나타나 있다. 상관계수가 0.98로 좋은 상관관계를 나타내고 있었다. 용혈 반응을 이용한 방법은 신선한 적혈구가 필요하나, TNP에 대한 항체로 표면감작된 TNP-cap-liposome은 4°C에서 6개월간 보관가능하며, TNP-cap-liposome은 일정한 항체 결합력을 유지한다. 적혈구와 보체의 반응시 적혈구의 침전을 방지하기 위해 흔들어 주어야 하지만, 리포솜을 이용한 경우 부피가 작으므로 (250 μl) 흔들어 줄 필요가 없다. 또 용혈을 측정하기 위해서는 용혈되지 않은 cell을 제거해 주는 과정이 필요하나, carboxyfluorescein이 봉입된 리포솜을 사용한 경우는 분리과정이 필요없다. 따라서 이 방법은 시약의 안정성, 정확도, 간편함, 속도 등의 장점이 있다.

**Cytolysin을 이용한 Liposome Immunoassay**

Cytolysin의 종류—Cytolytic marine worm protein, Cerebratulus laeteus toxin A-III,<sup>50)</sup> Central Asia cobra venom<sup>51)</sup> 그리고 bee venom melittin<sup>13-15, 39)</sup>이 흔히 사용되는 강력한 cytoxin이다. 그러나 cytolysin은 사용하기 전에 glutaraldehyde나 carbodiimide 등의 합성시약을 이용하여 항원 또는 항체와 결합시켜야 하며, 공유결합 후 cytolysin의 cytotoxicity와 immunologic activity는 계속 유지되어야 한다. Melittin은 26개의 아미노산으로 구성된 polypeptide이며, N-terminal에 하나, C-terminal에 2개의 lysine 잔기를 가지고 있다. 13개의 잔기로 구성된 소수성 segment는 지질이중막을 관통 또는 disrupt 하는 역할을 갖고 있다. Melittin과 분석하고자 하는 hapten의 공유결합체를 합성하기 위해 lysine E-amino group을 schiff-base chemistry를 이용하여 유도체화 한다. Melittin의 lytic activity는 소수성 부분에 존재하므로 lysine 잔기의 유도체화는 polypeptide의 lytic activity를 저하시

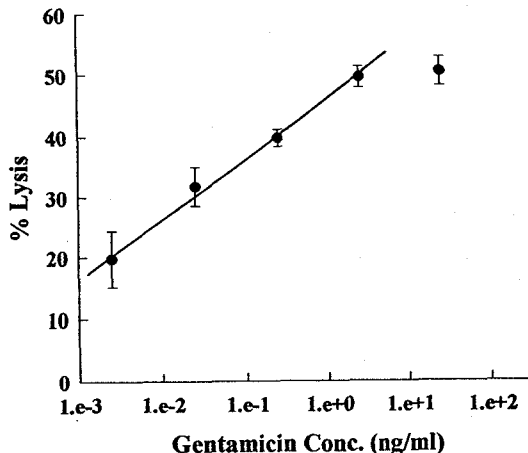


**Figure 6**—Homogeneous cytolysis-dependent antigen-competitive inhibition Liposome Immunoassay. (1) Antibody addition to sample antigen. (2) Addition of antigen-cytolysin conjugate. (3) Marker-filled unsensitized liposome added. (4) Liposome lysis with marker release.

Key : ●, Marker-filled unsensitized liposomes; ♀, antibody; ○, antigen detected; ⇄, antigen-cytolysin conjugate.

키지 않는다. Freytag와 Litchfield<sup>14)</sup>의 연구에 따르면 melittin과 ouabain의 공유결합체는 melittin 자체의 lytic activity보다 오히려 더 증가되었다. 이는 ouabain 분자의 공유결합으로 분자의 소수성이 증가되었기 때문이라 사료된다.  $2 \times 10^{-8}$  M ouabain-melittin 공유결합체의 lytic action은  $7.8 \times 10^{-8}$  M 항체 농도에서 100% 차단되었다.

Phospholipase,<sup>52)</sup> apolipoproteins,<sup>53)</sup> lipid bilayer channel former 등도 사용될 수 있다. 예를 들면 phospholipase는 phosphatidylcholine, phosphatidyl-ethanolamine과 sphingomyelin과 같은 인지질에 작용하여 glycerol과 phosphate 사이의 에스테르결합을 가수분해하는데 촉매역할을 한다. 인지질은 적혈구막의 주요성분이므로 인지질의 가수분해로 적혈구막의 고유성질이 없어져 세포내용물이 유리된다. Phospholipase C의 용혈작용은 Miles와 Miles<sup>54)</sup>에 의해 보고되었다. Phospholipase의 활성 저하를 일으키지 않고 hapten이나 항원을 수식하는 방법이 확립된 바는 없으나 Kim과 Park의 보고<sup>16)</sup>에 따르면 N-hydroxysuccinimide와 EDC를 이용하여 합성한 겐타마이신과 phospholipase C의 공유결합체는 활성이 약 30% 저하되기는 하였으나 항 gen-



**Figure 7**—Construction of standard calibration curve for gentamicin. Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n=3) (Ref. 16).

tamicin 혈청에 의한 저해 효과가 정량적으로 일어났으며 liposome immunoassay에 이용하는 것이 가능하였다.

원리-보체를 이용하지 않는 cytolysis liposome immunoassay는 수행하기가 쉽고, 시간을 단축할 수 있으므로 훨씬 편리하다. 이 방법은 리포솜 표면을 수식할 필요가 없으며, 보체 대신 cytolysin의 작용으로 리포솜이 깨어진다. 항원을 분석하는 경우 시료에 존재하는 항원과 항원-cytolysin 공유결합체가 기지 농도의 항체에 대해 서로 경쟁한다. 공유결합체가 항체와 결합하게 되면 cytolysis activity가 저해를 받아 리포솜의 lysis가 억제된다. 항체와 결합하지 않고 남아 있는 공유결합체가 리포솜을 lysis시켜 봉입된 표식인자를 유리시킨다 (Fig. 6). 결과적으로 표식인자가 유리되거나 기질이 변화를 일으켜 시료내 항원의 농도를 계산할 수 있다.

이 방법을 이용하여 Kim과 Park<sup>16)</sup>이 cytolysin으로는 phospholipase C를 이용하고 겐타마이신을 모델약물로 하여 분석한 결과 Fig. 7에 나타난 것과 같이 2.5 pg~2.5 ng까지 분석 가능하였다. 이 분석법에 의한 감도는 단지 항체의 affinity와 cytolysis potency에 의해 제한을 받는다.

**그 밖의 Liposome Immunoassay**

항체로 수식된 리포솜이 cell에 의해 깨지는 것을 이용하여 새로운 liposome immunoassay system을 만들 수 있다. 이 때 사용되는 리포솜은 PE를 주성

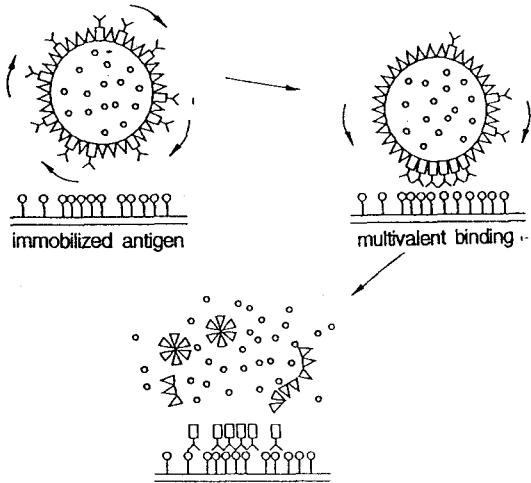


Figure 8—Schematic representation of the solid-phase immunoliposome.

분으로 하고 있어야 한다. PE는 생리적 pH, 온도에서 hexagonal phase를 이루는데 여기에 ganglioside,<sup>17)</sup> acylated antibody,<sup>44)</sup> 또는 haptened lipid<sup>18)</sup> 등의 stabilizer를 첨가하여 제조하면 PE가 bilayer form으로 배열하게 된다.

Target-sensitive immunoliposome이라 이름 붙여진 antibody-stabilized PE liposome은 특정 목표물에 결합하여 리포솜 내부에 봉입된 표식인자를 유리한다(Fig. 8). 이 때의 liposome lysis는 어떤 lytic agent의 보체를 필요로 하지 않는다. 이 경우 사용되는 항체는 multivalent antibody이어야 한다. Bivalent antibody는 PE liposome의 aggregation만을 유도할 뿐 lateral phase separation에 기인하는 lysis는 일으키지 못한다.<sup>18)</sup> 이 방법은 intact bacteria, virus 그리고 다른 병소와 같은 multivalent antigen을 직접적으로 정량하는데 이용가능하다.

이온에 의한 liposome immunoassay는 cardiolipin 함량이 높은 리포솜을 사용해야 한다. Cardiolipin은 2가 양이온의 존재유무에 의해 lamellar hexagonal transition이 결정된다. Cardiolipin 40%를 함유하고 있는 리포솜에 2가 양이온(Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>)을 가하면 1-2분 이내에 보체의 존재 유무에 관계없이 리포솜이 깨어진다. 전신성 홍반 낭창(systemic lupus erythematosus; SLE) 환자의 혈청에 있는 자가항체는 cardiolipin 분자와 결합하여 리포솜 막을 안정화시킨다. 결합한 항체에 의해 cardiolipin의 상

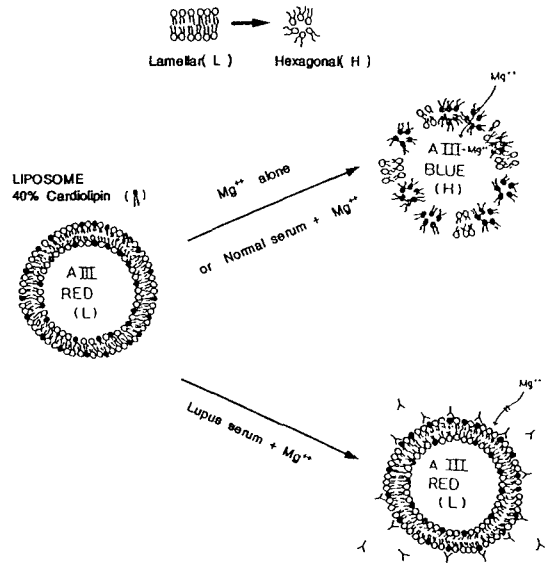
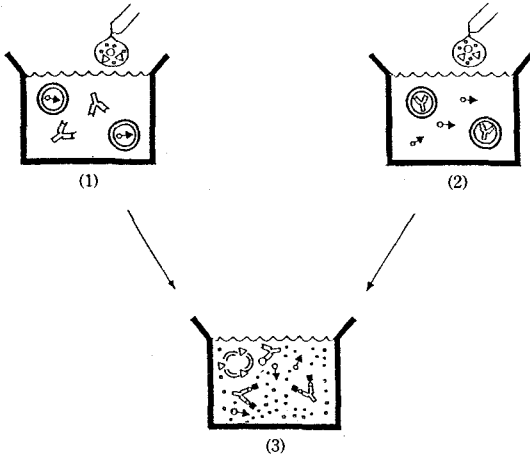


Figure 9—Schematic representation of the cardiolipin-based liposome immunoassay.

Key: Y, anti-DNA antibody;  $\mathbb{L}$ , cardiolipin (Ref. 41).

전이 억제되므로 내부에 봉입된 표식인자의 유출이 일어나지 않는다(Fig. 9). 그러므로 SLE를 확인하는데 cardiolipin으로 수식된 liposome을 이용하여 ion-dependent liposome immunoassay colorimetric method가 개발되었다.<sup>41)</sup>

Detergent를 이용한 liposome immunoassay의 경우 cytotoxin에 비해 안전하고 경제적이다. 이 방법은 반응 전에 premature 과정없이 시약을 한번에 용액에 혼합하는 것이 가능하다. 즉 detergent를 제외한 모든 시약을 혼합해서 하나의 시약으로 사용하는 것이 가능하다. 이 시약내에 혼합된 성분들은 detergent 용액이 가해지기 전까지는 리포솜 내에 봉입된 성분과 반응하지 않는다. 여기에 detergent를 가하면 지질막의 비가역적 파괴가 일어나 내부에 봉입된 표식인자가 유리된다.<sup>38)</sup> 여기에서 항원을 측정하고자 하는 경우에는 항체를 봉입시킨 리포솜이 사용되고, 항체를 측정하고자 하는 경우에는 효소-항원 공유결합체가 봉입된 리포솜이 사용된다(Fig. 10). 이 때 리포솜은 항상 일정한 양의 항원 또는 효소-항원 공유결합체를 봉입하고 있어야 한다. 항체를 봉입하고 있는 리포솜은 효소-항원 공유결합체가 있는 Tris buffer에 분산시키고, 효소-항원 공유결합체를 내부에 봉입하고 있는 리포솜은 항체가



**Figure 10**—Homogeneous detergent antigen and antibody-competitive inhibition Liposome Immunoassay. (1) Antibody assay : Antigen/detergent/substrate reagent added to sample antibody analyte diluted in buffer with enzyme-antigen conjugate-filled liposomes. (2) Antigen assay : Sample antigen analyte diluted in detergent/substrate reagent added to solution of antibody-filled liposomes and enzyme-antigen conjugate. (3) Liposome lysis with chemically changed substrate for detecting sample analyte of either antibody or antigen.

Key : ○, unsensitized liposome; △, detergent; ➔, enzyme-antigen conjugate; ●, antigen; ♪, antibody; □, substrate; ■, chemically changed substrate.

있는 Tris buffer에 현탁시킨다. 항원과 항체가 리포솜 막에 의해 분리되어 있는 것이다.

분석을 할 때에는 효소의 기질을 함유하고 있는 detergent 용액으로 희석된 검체를 리포솜 현탁액에 떨어뜨리면 된다. 몇 초 이내에 리포솜 lysis가 일어나고 이에 따라 시약들이 혼합되고, 경쟁 및 저해 반응과 면역복합체가 형성되면서 항체와 결합하지 않은 효소-항원 공유결합체가 기질을 화학적으로 변화시킨다. 일어난 반응에 따라 색깔이 변하여 검체내의 항원 또는 항체를 정량할 수 있다.

이 방법은 재현성이 뛰어나고 간단하지만 detergent의 lytic activity가 detergent의 종류, 농도, vesicle 막의 통과속도, 리포솜의 크기 등에 의해 크게 좌우된다. 사용하는 detergent를 CMC (critical micelle concentration)의 2배 농도로 첨가하면 리포솜에서 80~100%의 표식인자가 유리된다. 그러나 detergent의 종류에 따라 vesicle lysis가 느리거나 불완전하게 일어나는 경우도 있다.

## 결 론

이상에서 면역학적 분석법에서 리포솜의 응용에 관한 최근의 경향에 대해 간략히 알아보았다. 리포솜을 이용한 면역학적 분석법은 방사성 동위원소를 쓰지 않으며, hapten이나 고분자 모두 homogeneous type으로 분석이 가능하고, signal의 증폭이 쉽게 일어나며, 다른 분석법과 비교시 간편하고, 신속하며, 감도가 뛰어나다. 그러나 아직 liposome immunoassay는 리포솜 안정성의 문제와 제조시 재현성 결여라는 리포솜 자체의 문제점이 있으므로 이런 문제가 해결된다면 liposome immunoassay는 이상적인 면역학적 분석법으로 널리 사용될 수 있으리라 사료된다.

## 문 헌

- 1) S.C. Kinsky, Antibody-complement interaction with lipid model membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, **265**, 1-23 (1972).
- 2) C.T. Tan, S.W. Chan and J.C. Hsia, Membrane Immunoassay: A spin membrane immunoassay for thyroxine, *Methods in Enzymology*, **74**, 152-161 (1981).
- 3) Y. Nomura, K. Imai, M. Suzuki and K. Okuda, Development of a liposome-based colorimetric immunoassay of serum thyroxine, *Clin. Chem.*, **33**, 1565-1567 (1987).
- 4) F.S. Liger, R. Bredehorst, A. Talebian, L.C. Shriver, C.F. Hammer, J.P. Sheridan, C.W. Vogel and B.P. Gaber, A homogeneous immunoassay for the mycotoxin T-2 utilizing liposomes, monoclonal antibodies, and complement, *Anal. Biochem.*, **163**, 369-375 (1987).
- 5) U. Glagasigu, Y. Sato and Y. Suzuki, Highly sensitive immunoliposome assay of theophylline, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**(3), 1086-1094 (1988).
- 6) E. Canova-Davis, C.T. Redemann, Y.P. Vollmer and V.T. Kung, Use of a reversed-phase evaporation vesicle formulation for a homogeneous liposome immunoassay, *Clin. Chem.*, **32**(9), 1687-1691 (1986).
- 7) B.S. Yu, Y.K. Choi and H. Chung, Development of immunoassay methods by use of li-

- posomes, *Biotech. Appl. Biochem.*, **9**, 209-216 (1987).
- 8) C.K. Kim and S.J. Lim, Liposome immunoassay(LIA) with antigen-coupled liposomes containing alkaline phosphatase, *J. Immunol. Methods*, **159**, 101-106 (1993).
  - 9) K. Hosoda and T. Yasuda, Homogeneous immunoassay for  $\alpha_2$  plasma inhibitor ( $\alpha_2$  PI) and  $\alpha_2$  PI-plasmin complex, *J. Immunol. Methods*, **121**, 121-128 (1989).
  - 10) Y. Ishimori, T. Yasuda, T. Tsumita, M. Notsuki, M. Koyama and T. Tadakuma, Liposome immune lysis assay(LILA): a simple method to measure anti-protein antibody using protein antigen-bearing liposomes, *J. Immunol. Methods*, **75**, 351-360 (1984).
  - 11) M. Umeda, Y. Ishimori, K. Yoshikawa, M. Takada and T. Yasuda, Homogeneous determination of C-reactive protein in serum using liposome immune lysis assay (LILA), *Japan. J. Exp. Med.*, **56**(1), 35-42 (1986).
  - 12) A. Vistnes, E. Rosenqvist and L.O. Frøholm, Spin membrane immunoassay for use in meningococcal serology, *J. Clin. Microbiol.*, **18**(4), 905-911 (1983).
  - 13) T. Nakamura, S. Hoshino, N. Hazemoto, M. Haga, Y. Kato and Y. Suzuki, A liposome immunoassay based on a chemiluminescence reaction, *Chem. Pharm. Bull.*, **37**(6), 1629-1631 (1989).
  - 14) J.W. Freytag and W.J. Litchfield, Liposome-mediated immunoassays for small haptens (digoxin) independent of complement, *J. Immunol. Methods*, **70**, 133-140 (1984).
  - 15) W.J. Litchfield, J.W. Freytag and M. Adamich, Highly sensitive immunoassays based on use of liposomes without complement, *Clin. Chem.*, **39**(9), 1442-1445 (1984).
  - 16) C.K. Kim and K.M. Park, Liposome immunoassay for gentamicin using phospholipase C, *J. Immunol. Methods*, **170**, 225-231 (1994).
  - 17) P. Pinnaduwege and L. Huang, A homogeneous, liposome-based signal amplification for assays involving enzymes, *Clin. Chem.*, **34**(2), 268-272 (1988).
  - 18) R.J.Y. Ho and L. Huang, Interactions of antigen-sensitized liposomes with immobilized antibody: A homogeneous solid-phase immunoliposome assay, *J. Immunol.*, **134**(6), 4035-4040 (1985).
  - 19) B.H. Tom, An overview: liposome and immunobiology-macrophages, liposomes and tailored immunity, In; Tom, B.H., Six, H.R.(Eds.) Liposome and immunobiology, Amsterdam, Elsevier North Holland, vol. **1**, 3-22.
  - 20) R.R.C. New, Preparation of liposomes, In: New, R.R.C (Ed) Liposomes a practical approach, Oxford, UK, 33-104.
  - 21) P. Afzelius, E.J.F. Demant, G.H. Hansen and P.B. Jensen, covalent modification of serum transferrin with phospholipid and incorporation into liposomal membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **979**, 231-238 (1989).
  - 22) R.A. Schwendener, T. Trub, H. Schott, H. Anghals, R.F. Barth, P. Groscurth and H. Hengartner, Comparative studies of the preparation of immunoliposomes with the use of two bifunctional coupling agents and investigation of in vitro immunoliposome-target cell binding by cytofluorometry and electron microscopy, *Biochim. Biophys. Acta*, **1026**, 69-79 (1990).
  - 23) F.J. Martin and D. Papahadjopoulos, Irreversible coupling of immunoglobulin fragments to preformed vesicle, *J. Biol. Chem.*, **257**, 286-288 (1982).
  - 24) J.P. O'Connell, R.L. Campbell, B.M. Fleming, T.J. Mercolino, M.D. Johnson and D.A. McLaurin, A highly sensitive immunoassay system involving antibody-coated tubes and liposome-entrapped dye, *Clin. Chem.*, **31**(9), 1424-1426 (1985).
  - 25) B.P. Gaber, F.S. Ligler and R. Bredehorst, Liposome-based immunoassay for detection of small and large molecules, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **238**, 209-214 (1990).
  - 26) J. Zemmour, J. Portoukalian and J.F. Dore, Serological specificity of the liposome lysis test for measurement of anti-ganglioside antibodies. A comparison with hemagglutination inhibition, *J. Immunol. Methods*, **66**, 331-340 (1984).

- 27) K. Kubotsu, I. Ushio, K. Yoshikawa, M. Kida, K. Ishikawa, S. Matura and I. Sakurabayashi, Colorimetric liposome lysis for assay of anti-Streptolysin O antibody, *Clin. Chem.*, **36**, 1747-1749 (1990)
- 28) M. Fiechtner, M. Wong, C. Bieniarz and M.T. Shipchandler, Hydrophylic fluorescein derivatives: useful reagents for liposome immunolytic assays, *Anal. Biochem.*, **180**, 140-146 (1989).
- 29) A.S. Janoff, S.C. Green, A.L. Weiner, J. Seibold, G. Weissman and M.J. Ostro, Novel liposome composition for rapid colorimetric test for systemic lupus erythematosus, *Clin. Chem.*, **29**, 1587-1592 (1983).
- 30) A.L. Plant, M.V. Brizgys, L. Locasio-Brown and R.A. Durst, Generic liposome reagent for immunoassays, *Anal. Chem.*, **176**, 420-426 (1989).
- 31) M. Umeda, Y. Ishimori, K. Yoshikawa, M. Takada and T. Yasuda, Liposome immune lysis assay (LILA): Application of sandwich method to determine a serum protein component with antibody-bearing liposomes, *J. Immunol. Methods*, **95**, 15-21 (1986).
- 32) T. Masaki, N. Okada, R. Yasuda and H. Okada, Assay of complement activity in human serum using large unilamellar liposomes, *J. Immunol. Methods*, **123**, 19-24 (1989).
- 33) M. Umeda, T. Tomita, H. Shibata, M. Seki and T. Yasuda, Homogeneous liposome lysis assay for determination of anti-Streptolysin O antibody titer in serum, *J. Clin. Microbiol.*, **26**(5), 804-807 (1988).
- 34) H. Schreier, K. Valentino, B.P. Heath and V.T. Kung, Prevention of nonspecific lysis in liposomal and erythrocyte immunoassay systems by small lipid vesicles and erythrocyte ghosts, *Life Sciences*, **45**, 1919-1930 (1989).
- 35) S.J. Frost, G.B. Firth and J. Chakraborty, Antibody-coated liposomes as a particulate solid phase for immunoassays: Measurement of urinary micro-albumin, *J. Immunol. Methods*, **134**, 207-213 (1990).
- 36) V.T. Kung, Y.P. Villmer and F.J. Martin, Large liposome agglutination technique for the serological detection of syphilis, *J. Immunol. Methods*, **90**, 189-196 (1986).
- 37) D.W. Bowden, M. Rising, G. Akots, A. Myles and R.J. Broeze, Homogeneous liposome-based assay for total complement activity in serum, *Clin. Chem.*, **32**(2), 275-278 (1986).
- 38) E.F. Ullman, T. Tarnowski, P. Felgner and L. Gibbons, Use of liposome encapsulation in a combined single-liquid reagent for homogeneous enzyme immunoassay, *Clin. Chem.*, **33**(9), 1579-1584 (1987).
- 39) M. Haga, S. Hoshino, H. Okada, N. Hazemoto, Y. Kato and Y. Suzuki, An improved chemiluminescence-based liposome immunoassay involving apoenzyme, *Chem. Pharm. Bull.* **38**(1), 252-254 (1990).
- 40) M. Haga, H. Itagaki, S. Sugawara and T. Okano, Liposome immunosensor for theophylline, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **95**, 187-188 (1980).
- 41) A.S. Janoff, S. Carpenter-Green, A.L. Weiner, J. Seibold, G. Weissmann and M.J. Ostro, Novel liposome composition for a rapid colorimetric test for systemic Lupus erythematosus, *Clin. Chem.*, **29**, 1587-1592 (1983).
- 42) V.T. Kung, P.E. Maxim, R.W. Veltri and F.J. Martin, Antibody-bearing liposomes improve agglutination of latex particles used in clinical diagnostic assays, *Biochim. Biophys. Acta*, **839**, 105-109 (1985).
- 43) V.T. Kung, F.J. Martin, P.E. Maxim and R.W. Veltri, Liposome-enhanced agglutination procedure for rheumatoid factors (LEAP-RF), *Clin. Chem.*, **30**, 989 (1984).
- 44) R.J.Y. Ho, B.T. Rouse and L. Huang, Destabilization of target-sensitive immunoliposomes by antigen binding—a rapid assay for virus, *Biotech. Biophys. Res. Comm.*, **138**, 931-932 (1986).
- 45) M.L. Shin, W.A. Paznekas and M.M. Mayer, On the mechanism of membrane damage by complement: The effect of length and unsaturation of the acyl chains in liposomal bilayers and the effect of cholesterol concentration in sheep erythrocyte and liposomal membranes, *J. Immunol.*, **120**(6), 1996-2002 (1978).

- 47) T.M. Allen and L.G. Cleland, Serum-induced leakage of liposome contents, *Biochim. Biophys. Acta*, **597**, 418 (1980).
- 48) M. Mayer, Complement and complement fixation. In; E. Kabat and M. Mayer (Eds.), *Experimental Immunochemistry*. C.C. Thomas, Springfield, IL, 133 (1961).
- 49) J.D. Coonrod and S.D. Jenkins, Evaluation of a hemolytic assay of the alternative complement pathway in human serum, *Am. J. Clin. Pathol.*, **74**, 167 (1980).
- 50) K.M. Blumenthal, Release of liposomal markers by Cerebratulus toxin A-III, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **121**, 14-18 (1984).
- 51) T.F. Aripov, B.A. Salakhutdinov, Z.T. Salikhova, A.S. Sadykov and B.A. Tashmukhamedov, Structural changes of liposomes phospholipid packing induced by cytotoxin of the central Asia cobra venom, *Gen. Physiol. Biophys.*, **3**, 489-496 (1984).
- 52) R.A. Demel, W.S.M. geurts va Kessel, R.F.A. Zwaal, B. Roelifsen and L.L.M. Van deenen, Relation between various phospholipase actions on human red cell membranes and the interfacial phospholipid pressure in monolayers, *Biochim. Biophys. Acta*, **406**, 97-107 (1975).
- 53) L.S.S. Guo, R.L. Hamilton, J. Goerke, J.N. Weinstein and R.J. Havel, Interaction of unilamellar liposomes with serum lipoprotein and apolipoprotein, *J. Lipid Res.*, **21**, 993-1003 (1980).
- 54) E.M. Miles and A.A. Miles, The lecithinase of *Clostridium bifermentans* and its relation to the  $\alpha$ -toxin of *Clostridium weichii*, *J. Gen. Microbiol.*, **1**, 385 (1947).
- 55) D. Monroe, Novel liposome immunoassays for detecting antigens, antibodies, and haptens, *J. Liposome Res.*, **1**, 339-377 (1989-90).