

## Testosterone 면역측정법의 정립 특성과 응용

윤용달<sup>†</sup> · 이창주 · 이준영<sup>1</sup>

한양대학교 자연대학 생명과학과, <sup>1</sup>충북대학교 자연대학 생물학과

## Characteristics and Applications of the Established Testosterone Immunoassays

Yong-Dal Yoon<sup>†</sup>, Chang-Joo Lee and Joon-Yeoung Lee<sup>1</sup>

Department of Life Sciences, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791,

<sup>1</sup>Department of Biology, College of Natural Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea

**요약** : Testosterone의 radioimmunoassay (RIA)가 1970년대 개발된 이래, 경제적이고, 측정 한계가 낮고, 감도가 높은 호르몬의 측정방법을 개발하여 왔다. 방사면역측정법 (RIA와 IRMA)은 비방사면역측정법 (NIA)로 대체되어 정밀도, 정확도, 특이도와 실용성 등이 크게 발전되었다. 최근 혈액, 타액, 배뇨 등에서 호르몬을 측정하여 남성과 여성의 생기능장애, 심리적 스트레스나 기분의 변화, 폐경 및 남성호르몬 결핍증 등의 노화 현상, 자연 및 소 실험동물의 연구 등에서 적은 시료에서 여러 가지 호르몬의 변화를 측정하기 위해, femtogram의 초감도 측정법의 개발이 요구되고 있다. 본 논문은 저자들이 지난 20여년간 Testosterone의 측정법을 개발하고 응용하던 결과를 토대로, 스테로이드의 측정법을 개발·정립하거나, 기존 방법을 연구에 변형할 때, 측정의 신빙성을 높히려 할 때, 실험을 계획할 때 등에서 고려할 사항을 요약하고자 하였다. 또한 초감도 측정법을 정립하고 측정의 질을 높힐 수 있는 방향을 제시하고자 하였다.

국내에서 대부분의 연구자가 선진 제국의 학자에게 의존하거나, 상업적 kit를 사용하여, 측정의 일관성이 없고, 비교가 어려우며, 외화를 낭비하고 있다. 표준화된 호르몬, 질이 좋은 항체를 생산 공급하고, 측정방법을 국내 실정에 맞추어 표준화하고, 정립하여 평가하고, 실험실간, 연구자간에 서로 신뢰할 수 있는 정보를 교환할 수 있는 정도 관리 계획이 만들어져야 한다. 또한 선진국처럼 후학들을 위하여 매년 학회에서 지원하는 Training programe 매년 실시되어야 하며, 국가적 차원의 자원이 필요하다고 판단된다.

**ABSTRACT** : Since the first radioimmunoassay (RIA) was developed in 1970s, many conventional RIAs and non-isotopic immunoassays (NIA) had been developed in which the degree of precision, accuracy, specificity and practicability have progressively increased. Recently ultrasensitive assay method at femtogram to determine testosterone in serum, saliva and feces is required for the study of sexual dysfunctions in male and female, monitoring the psychological stress and conditions, aging process such as menopause and partial androgen deficiency in aging male, the hormonal changes of small experimental animals etc. This review discussed the recent developments of steroid assay methods, based upon the testosterone assay results of authors for 20 years, and the problems associated the assay set-up, the characterizations and applications of the established procedures, and designs of assay, reliability criteria, and the practical aspects of assay set-up and application, based upon the data of the authors. The present study demonstrates the general problems methods to be consider in order to set up the highly sensitive assay methods and to increase the assay quality and the necessity of assay quality control program. To improve the assay quality of each laboratory and to compare the assay results in homeland, the national QC programs should be organized.

**Key words** : Androgens, Testosterone, Immunoassay, Quality control, Saliva, Feces.

## 서론

스테로이드의 측정방법은 생물학적 방법에서부터 방사면

역측정법 (Radioimmunoassay, RIA)을 거쳐 비방사면역측정법 (N.on-isotopic immunoassay, NIA)으로 발전하여 femto gram 수준까지 측정이 가능해졌다. 항원-항체반응을 이용한 호르몬의 면역측정법 (Immunoassays, IA)은 이미 기초과학은 물론 대부분 임상의학, 약학, 수의, 축산 등 연구의 중심 축을 이루고 있다 (Goslings, 1990; Yallow, 1992; Najjar& Weintraub, 1993). 스테로이드호르몬의 정량분석은 1950~60년대

<sup>†</sup>교신저자: 한양대학교 자연대학 생명과학과. (전) 02-2290-0955, (팩) 02-2294-0955, e-mail: ydyoon@email.hanyang.ac.kr

크로마토그래피 방법과 분광 또는 형광 분석 방법을 이용한 화학측정법 (Chemical assays)과 생물학적 측정법 (Bioassays)이 주종을 이루었으나, 감도는 매우 낮았다. 1970년대부터 steroid RIA가 개발되었다. RIA는 고도의 정밀성, 정확성과 높은 감도를 가지고, 또 특이적인 측정이 가능한 방법으로 생명과학과 임상 응용분야의 연구 방향을 크게 바꾸어 놓았다. 그러나 방사성 동위원소를 사용하는데 따른 방사선 장애, 방어수단의 필요성, 폐기물의 환경오염과 피해 영향, 방사성 표지물질 즉 추적자의 짧은 반감기 및 방사성 분해, 방사선 취급의 제한, 실험실 설비에 많은 경비가 소요되는 등의 문제점들이 계속 노출되었다. 1980년대 이후에는 비방사면역 측정법 (NIA)의 개발이 장족의 발전을 이루어, RIA를 대체할 수 있는 수준에 이르고 있다 (Voller et al., 1980; Albertson & Haseltine, 1988; de Pablo et al., 1993). NIA는 효소면역측정법 (enzyme, EIA), 형광면역측정법 (fluorescent, FIA; time-resolved fluoroimmunoassay, Delfia) 섬광면역측정법 (luminescent or chemiluminescent, LIA or CIA), 입자면역측정법 (particle, PIA), viro (VIA)- or metalloimmunoassay (MIA), 광분산입자계수 측정법 (light-scattering and particle counting, LSIA or PCIA), biosensor method, spin lable immunoassay (SLIA)등의 비방사면역측정법이 개발되고 정립되었으며, 상용화되고 있다 (Voller et al., 1980; Albertson & Haseltine, 1988; de Pablo et al., 1993; Yoon, 1996). 개발된 steroid hormone의 측정법의 감도를 Table 1로 요약하였다.

면역측정법은 1) 특이성이 높은 항체, 2) 측정 시료와 순수도가 같은 표준 시약 (reference standard), 3) 추적자로 표지된 항원 (labeled antigen)으로 구성된다. 대부분의 측정법에서 정해진 양의 항체를 이용하는 제한항체법 (limited reagent method)과 항체를 과량 사용하여 비길항적으로 포화시키는 포화항체법 (reagent excess method)으로 구분한다. 전자는 추적자의 종류 [예, 방사 (radio, R) / 효소 (enzyme, E)] + 면역항체 (immuno, I), 수용체 (receptor, R), ligand or 운반체 (transin, T) + 측정법 [assay, A]으로 구성된다. 즉 RIA, 방사수용체법 (radioreceptorassay, RRA), 방사운반체측정법 (radiotransinassay, RTA)등의 명칭을 사용하고 있다. 한편 후자는 추적자를 중간에 넣어 사용하고 있다. 즉 면역방사측정법 (immunoradiometric assay, IRMA), 면역형광측정법 (immunofluorometric assay, IFMA), 면역효소측정법 (immunoenzymometric assay, IEMA) 등으로 사용하고 있다. 그러나, 항체에 효소를 결합시켜 사용하는 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)의 경우에 EIA와 IEMA에 모두 사용함으로써 방법론의 이해에 혼동을 주고 있다. Testosterone의 경우는 대

Table 1. Sensitivity of testosterone estimation methods

Methods	Sensitivity (ng)
Bioassay	100~10000
UV-absorption and spectrophotometry	100~2000
Fluorescence methods	5~50
Double isotope dilution	0.5~10
Gas liquid chromatography	
- flame ionization	5~20
- electron capture (GCMS)	0.05~1.0
Radioligand assays	
- plasma proteins	1~10
- receptor proteins	0.01~0.1
- antisera	0.005~0.1
Fluorescent immunoassay (FIA)	0.001~0.1
Enzyme immunoassay (EIA)	0.01~0.1
Chemiluminescent immunoassay	0.001~0.1

GCMS: gas-chromatography-mass spectrometry

부분 전자를 택하고 있어, Testosterone (T)-RIA, T-EIA, T-FIA (Delfia), T-CIA 또는 T-LIA 등으로 불린다.

### Testosterone의 (비)면역측정법의 특성

#### 1. 스테로이드 호르몬의 분리, 정제기술 Chromatography

최근 특이성이 매우 높은 항체들을 이용하여 RIA나 NIA가 개발되어 왔으나, 대부분의 항체는 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone (DHT), androstenedione (A), progesterone (P) 등의 스테로이드와 교차반응도가 높아 T의 정확한 측정에는 분리 정제과정이 필요하다.

환자의 혈청내 androgen의 추출은 diethylether를 주로 이용하고 있다. 임상적 시료에서는 hexane/ether, ethylether 등의 추출만으로도 충분하나, 혈청 내 소량의 변동이나, 동시에 여러 가지 스테로이드를 측정하거나, 타액 (saliva), 똥 (feces), 오줌 (urine)등의 T 측정에는 추출과정이 필수적이다. 추출 전에 단백질, 특히 testosterone-estrogen binding globulin (TeBG), cortisol binding globulin (CBG) 등의 제거가 필요하다.

측정법 개발의 초기에는 혈액 내 androgen의 순수 분리에 chromatography (chro)가 주로 이용되었다. 1969~1974년 사이에 보고된 약 68개 논문에서 thin-layer chro (17%), alumina column chro (3%), celite column chro (13%), paper chro (13%), 직접적 (no chro, 39%)가 사용되었으나, 현재는 Sephadex LH-20 또는 LH-50-60, HPLC가 주종을 이루고 있다. Paper chro나 TLC는 경제적이고 표준화가 잘 되어 있다. 한편 column chro는 해상력이 좋고, 용매의 노출이 적고, 연속적

사용이 가능하여 근래에는 LH-20이나 Lipidex 5000을 이용한 liquid chro가 주로 사용된다.

## 2. 다가 (polyclonal antibody, PcAb)와 단가 (Monoclonal antibody, McAb) 항체의 생산

1970년대 초부터 대부분 스테로이드의 면역측정에는 다가 항체를 사용하여 측정법을 개발하였다. 최근까지도 스테로이드의 경우 실용성 때문에 다가항체를 주로 사용하고 있다. 항체 생산에는 토끼 (72%), 염소(8%), 양(18%), 기니 피그 (2%), 사람, 말, 소, 돼지, 생쥐, 쥐 등을 사용하였다. 그러나 현재는 토끼, 양, 염소가 주 동물로 이용되고 있다. 그리고 주사는 Booster 주사를 사용하는 경우, 주로 피하주사(46%)를 이용하고, 피하와 진피(6%), 근육(17%), 피하와 발바닥(8%), 진피(6%), 근육과 피하 (3%)주사를 이용하기도 한다. Booster 주사를 하지 않을 경우(14%)는 피하에 주사한다. STP의 경우 본 연구팀은 토끼의 등 부위에 20~50위치에 소량의 항원 (50~100  $\mu\text{g}/\text{rabbit}$ )을 매주 주사하면, 6주 이상에서 적절한 역가의 항체를 얻을 수 있었다.

### 1) Testosterone의 항원 합성

T는 hapten이므로 T를 분자량이 큰 단백질 (carrier protein)에 부착시켜야 항원이 된다. T의 항원은 주로 T의 3 (oxo) 또는 17번 탄소 (hydroxyl)에, 즉 A와 D ring에 부착시킨다. 그러나 이 위치들은 생물학적 작용을 나타내는 부위로 특이성이 높은 항체를 만들지 못한다. 그러므로 7번, 11번, 15번, 19번 위치에 결합시킨 항원을 이용하면 DHT와의 교차반응을 크게 줄인 항체의 생산이 가능하다 (Nieschlag & Wicking, 1975, 1981). 그러나 T-7-BSA, T-11-BSA는 DHT와 교차반응이 큰 항체가 생성된다. T-17-BSA 항체는 progesterone과 deoxycorticosterone과 50% 이상, A와는 30% 이상 교차반응이 생기는 항체들이 생산되어 사용에 제한이 생긴다. 가장 특이성이 좋은 T-15-BSA 이나 T-19-BSA의 항체 역시 DHT와의 교차반응이 3~6%이어서 testosterone을 특이적으로 측정하기는 어려운 실정이다.

### 2) 결합단백질의 종류

스테로이드를 분자량이 큰 단백질에 결합시켜 항체를 만들므로 결합단백질의 영향을 크게 받는다. 결합단백질의 종류, 결합 linker의 종류, 결합항원의 항원성, 항원과 hapten간의 반응 정도, 항원의 분리, 정제, 항원의 특성 등을 잘 연구하여야 우수한 항체가 얻어진다. T와 결합시키는 단백질은 globulin fraction, serum albumin, hemocyanin, ovalbumin, thy-

roglobulin, fibrinogen 등이 있다. Bovine serum albumin (BSA)와 hemocyanin (KLH)이 가장 많이 사용된다. 일반적으로 적정의 epitope density는 BSA에 15~20의 결합이 이루어져야 한다 (Nieschlag & Wicking, 1975, 1981; Anguila et al., 1986; Gosling, 1990; Birch & Lennox, 1995; Yoon, 1996).

### 3) 스테로이드 항원의 합성

결합단백질과 상관없이 스테로이드를 C-terminal (Asp, Glu 등), N-terminal (Lys); imidazo phenolic group (His, Tyr); Cys의 sulfhydryl group 등에 결합시킨다. 좋은 항체는 항원의 작용기에서 멀리 떨어진 위치에 결합시켰을 때 얻어진다. COOH를 가진 스테로이드는 mixed anhydride procedure 또는 N-ethylbenzisoazole로 BSA-NH<sub>2</sub> group에 결합시키고, carbodiimide를 이용하여 N-terminal에 결합시킨다. NH<sub>2</sub> (aromatic or aliphatic)를 가진 경우, nitrous acid를 이용하여 diazonium salts로 바꾸어 His, Tyr, Trp에 결합시킨다. Aliphatic group은 water soluble carbodiimide로 BSA에 결합시킨다. 항원이 OH (alcohol, phenol, sugar, polysaccharides, nucleosides)를 가진 스테로이드 호르몬의 경우는 COOH를 가진 hemisuccinate (HS)나 chlorocarbonate, aminophenyl derivatives, carboxylmethylxime (CMO)등을 결합시킨 후 단백질에 결합하여 항원을 생산한다. 이들 conjugates는 absorbance spectrum을 이용하여 특성을 조사한다 ((Nieschlag & Wicking, 1975, 1981; Anguila et al., 1986; Gosling, 1990; Birch & Lennox, 1995; Yoon, 1996).

### 4) 항체의 생산

항체의 생산은 매주 면역 주사하여 단기간에 항체를 생산하는 Short-term protocol (STP)과 매월 면역 주사하는 Long-term protocol (LTP)로 구분한다. Testosterone을 비롯한 스테로이드의 항체 생산에는 주로 LTP방법을 사용한다. 본 연구팀의 경우 A-3-CMO-BSA와 DHT-3-CMO-BSA를 LTP 방법으로 항체를 얻어 역가와 특성을 평가하여 Table 2에 요약하였다.

### 5) 항체의 역가

liquid-phase RIA를 이용하여 50%의 치환율을 나타내는 희석율로 나타낸다. 일반적으로 1/25,000이상의 역가를 가진 항체를 이용하여 측정법을 정립한다. 역가는 항혈청의 종류, 반응조건, 반응용액량, 완충액, 온도, 반응시간, 결합형과 유리형의 분리방법 등을 조정하여 표준화시켜 사용한다. 본 연구팀이 얻은 항체의 역가는 1/25,000~1/60,000의 수준이다 (Table 2).

**Table 2. Specificity of antisera raised against different testosterone conjugates**

Steroid	T-3-BSA	T-7-BSA	T-11-BSA	T-15-BSA	T-17-BSA	T-19-BSA
Testosterone	100	100	100	100	100	100
5- $\alpha$ -Dihydrotestosterone	60	42	15	3.2	1.8	6.65
5- $\beta$ -Dihydrotestosterone	8	5	n.r.	n.r.	0.7	0.63
Androstenedione	0.3	1	2	19	31	0.90
Androstenediol	1.6	n.r.	0.16	< 0.4	0.05	0.51
Progesterone	0.05	< 0.1	n.r.	0.4	55	0.00
Deoxycorticosterone	< 0.001	< 0.5	n.r.	n.r.	55	0.00
Titre	1/25,000	1/35,000	1/48,000	1/48,000	1/60,000	1/25,000

The data on T-3-BSA, T-17-BSA, T-19-BSA are stemmed from our laboratory and expressed as percentage of cross-reaction. T = testosterone; BSA = bovine serum albumin; nr = not recorded; T-15-BSA = T-15  $\beta$ -thioalkyl-BSA; T-19-BSA = T-19- hemisuccinate BSA; T-3-BSA, T-7-BSA, T-11-BSA = T-3-CMO-BSA, T-7-CMO-BSA, T-11-CMO-BSA; T-17-BSA = T-17  $\beta$ HS-BSA.

### 6) 항체의 특성 평가

일반적으로 우수 항체는 ① 높은 역가 (titer), ② 높은 결합력(avidity), ③ 높은 친화력 (affinity)을 가진다. 이러한 항체를 사용하면 측정의 질이 높아진다. 항체의 특성 평가는 측정방법의 정립 부분에서 다룰 것이다.

### 7) 단가항체 (McAb)의 생산

1980년대 이후 면역측정법의 약 50% 이상이 McAb를 생산하여 사용하며, hybridoma technology가 이용된다 (Gosling, 1990). 단가 항체의 생산과 보급은 이미 상업화되었다. 두개의 항체를 생산하는 hybridoma line을 융합시켜 만든 bispecific McAb, anti-idiotypic antibody 등 특이한 항체, 두 종의 교잡항체 (inter-specific chimeric antibody)들은 hybridoma technology에 의해서만 생산이 가능하다. 그러나 steroid의 McAb의 생산은 단가가 높고, 특이성이 PcAb에 비해 상대적으로 높지 않으므로, 아직까지도 우수한 질의 PcAb에 의존하고 있다 (Yoon, 1996). 한편 T-19-BSA를 항원으로 McAb를 생산하려는 시도가 본 연구자에 의해 시도되었다. 그러나 이 경우에도 항체의 특이성은 증진되지 않았고, 이를 EIA, FIA, CIA, RIA등 여러 가지 방법의 변화에도 교차반응도는 증가하지 않았다 (Table 3). 이런 결과는 이미 여러 학자들에 의해 증명되고 있다 (White et al., 1985; Crosby et al., 1986; Kemeny & Chalcombe, 1988).

### 3. 수용체 단백질 이용

항체 대신으로 사용하는 단백질에는 특히 연구용으로 많이 개발되고 있는데, 생리활성물질에 많이 사용된다. 특히 avidin (chicken egg white)등 결합 단백질과 steroid receptor 등이 사용되었다. Cortisol의 측정의 경우, corticosteroid-binding

**Table 3. Cross-reactions of produced T-3-CMO BSA antiserum**

Compound	McAb				PcAb
	EIA	FIA	CIA	RIA	RIA
Testosterone	100	100	100	100	100
5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone	18.7	17.7	16.7	15.0	6.4
5 $\beta$ -Dihydrotestosterone	1.6	1.0	0.8	0.5	15
Epitestosterone	0.6	0.1	0.3	0.2	0.4
Androstenedione	0.9	0.4	0.3	< 0.1	0.2
Estradiol	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.01	< 0.05
Progesterone	2.1	1.9	< 0.1	< 0.1	< 0.001
Cortisol	< 0.2	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.0005

PcAb : polyclonal antibody; McAb : monoclonal antibody; Percentages at a level of 50% replacement for testosterone using polyclonal and monoclonal antibodies in assays.

globulin 즉 transcortin등은 아직도 이용되고 있다. 특히 생물학적 의미성이 있는 작용부위의 조직 내 단백질을 사용함으로써 생물학적 효용도 측정에 좋은 결과를 내고 있다. 특히 생체내 다량 (ug/ml)의 호르몬이 존재할 때는 수용체단백질을 이용함으로써 측정은 물론 생물학적 기작의 연구와 병행할 수 있는 장점이 있다.

### 4. 추적자 (Labels)

면역측정법에서 추적자로 사용되는 물질들은 enzymes, fluorescent, ligands, luminescent, particles, radioisotopes, vesicles등이 사용되어왔다 (Table 1). 추적자 특이도 (specific activity), 표지방법(labeling)의 용이성, endpoint determination의 용이도, 생물학적 유해 (hazard)여부, 측정방법으로 응용가능성, 또는 생체 내 간섭물질의 영향 등 고려 요소에 따라 선택된다. 추적자의 선택 시 중요하게 고려할 사항은 측정의

특이성을 높여서 측정의 한계를 최대한 낮추는 것을 선택한다. 그러므로 측정치로 만드는 주요 분획(fraction for detection)의 증폭 가능성(degree of amplification)이 많은지 또는 측정효율(efficiency of detection)이 높은가에 따라 추적자가 선택된다. 최근 추적자로 사용되는 물질의 종류도 크게 발달하여 10가지 이상이 되고 있다. ① 방사성 동위원소 [radioisotopes (RI) spec. act.;  $^{125}\text{I}$  (1 detectable unit/sec/ $7.5 \times 10^6$  labeled mol)], ② 효소 (spec. act.; amplification factor에 의존), ③ 형광물질 (many detectable unit/labeled mol.), ④ 리간드, ⑤ 섬광물질 (1 detectable unit/labeled mol.), ⑥ 입자 (particle), ⑦ vesicles, ⑧ 박테리아, ⑨ 메탈, ⑩ spin-label, ⑪ laser light scattering, ⑫ free radicals 등을 들 수 있다. 스테로이드 측정에는 주로 RI, enzyme, chemiluminescent dyes, lantanides가 주로 사용된다.

### 1) 방사성 동위원소

T-tracer는 일반적으로 [1,2- $^3\text{H}$ ]T, [1,2,6,7- $^3\text{H}$ ]T를 사용한다. 이들 추적자는 3개월마다 PC, TLC, LC (주로 Sephadex LH-20) 등으로 순수 분리 정제해야 한다. 또한 tritium ( $\beta$ 선) 측정시 liquid scintillation counting은 경제적으로 고가이므로,  $^{125}\text{I}$ -labelled ligand, 즉 T-CMO에  $^{125}\text{I}$ -BSA나,  $^{125}\text{I}$ -HSA를 부착시킨다. 또 T-3-CMO- $^{125}\text{I}$ -histamine등을 이용하면 항체의 역가를 높게 사용할 수 있다. 이 방법은 섬광 측정비를 줄이고, 항체 감도를 높혀 측정법의 질을 높힐 수 있다.

### 2) 효소 추적자 (enzyme as lable)

추적자로 이용되는 효소는 horseradish peroxidase (POX)가 50%선을 넘고 있고, alkaline phosphatase (Alk P)가 약 25% 선을 넘게 사용되고 있다. POX가 많이 사용되는 이유는 장기 보관이 가능하고, turnover number가 높고, 여러 가지 감도가 높은 방법으로 개발할 수 있고, 부착시키기 용이한 때문이다 (Kemeny & Chalcombe, 1988; Ishikawa et al., 1990; Yoon et al., 2000).

### 3) 형광물질 (fluorescent dyes)

Fluorescent isothiocyanate (FITC), rhodamine 등을 추적자로 사용하여 형광분석기로 측정한다. 효소를 추적자와 결합시킨 형광항체를 사용하거나, bispecific McAb를 이용하여 형광물질과 POX를 양쪽에 부착시키기도 한다 (Smith et al., 1981). 형광면역측정법 (FIA)에는 자연섬광 또는 발광 (luminescence, L)현상을 이용한다. 섬광은 에너지원에 따라 여러 가지로 나뉜다. 즉 방사선 ( $\beta$  또는  $\gamma$ 선)에 의한 방사섬광

(radio-L), 화학반응에 의한 화학섬광 (chemi-L), 생체계의 효소에 의한 생물섬광 (bio-L), 열섬광 (thermal L), neon 빛 등과 같은 전기섬광 (electro-L), 적외선·가시광선. 자외선의 형광 (fluorescence, short-life time emission) 또는 광섬광 (photo-L, long-life time emssion)등이 있으나, 화학, 생물섬광 및 형광이 면역측정법에 주로 사용되고 있다. 특히 FIA는 europium등 lantanide계열의 희귀 원소를 이용하는 Delfia 방법이 개발되어 RIA수준의 측정법으로 개발되었다 (Diamandis, 1988).

### 4) 화학 (chemil-C) 및 자연섬광 (bio-luminescent (L) tracers)

luminol, isoluminol, amino butyl-ethyl isoluminol (ABEI) 등 많은 화학섬광 추적자가 찾아지고 또 화학적으로 합성되어 왔다. 이를 이용한 섬광면역측정법 (CIA or LIA 또는 BIA) 방법들이 개발되어 왔다 (Weeks & Seitz, 1984; Yoon & Kim, 1987). 이들은 이미 RIA를 대체할 수 있는 정도로 발전되었고, 실제로 상업화되었다.

### 5) 측정물질의 유해성

비방사면역측정법 (NIA)은 방사선 장애는 없으나 다른 위험이 내포되어 있음을 숙지 해야한다. 즉 NIA의 표지물질들은 암 유발원 (carcinogenicity)이거나 기형 유발원 (teratogenicity)인 동시에 일반적인 독성 (general toxicity)을 나타낸다 (Albertson & Haseltine, 1988; Ekins, 1989).

### 5. 결합형과 유리형의 분리 (separation system)

일반적으로 결합형과 유리형을 분리하는 방법은 수용성계 흡착형 [liquid phase: anion resin, dextran-coated charcol (DCC), florilil]; 수용성계 침전형 [ammonium sulfate, polyethylene glycol (PEG), second antibody (2nd Ab), 2nd Ab + PEG]; 고형계 흡착형 (solid phase, SP: glass fibre membrane, large bead, microtitre plate, nylon membrane, tube); 고형계 침전형 (magnetized bead + Ab, microbead + Ab, microbead + 2nd Ab, protein A); 고형계 간접 흡착형 (biotin + Ab / SP-avidin, FITC Ab / SP-anti-FITC, microtitre + 2nd Ab) 등 많은 물질계가 사용되었다 (Nieschlag & Wicking, 1975; 1981; Gosling, 1990; Yoon, 1996).

RIA에서 결합형 (antibody-bound form)과 유리형 (free form)의 분리에는 DCC로 유리형을 흡착 (absorbing)시키거나, 2차 항체를 이용하여 결합형을 침전시키고, 원심분리시키는 방법을 써왔다. 아직까지도 DCC방법이 경제적 이유로 가장 많이 사용되고 있으나, ligands나 항체를 고형지지체 (solid

phase, SP)에 부착시켜 사용하는 방법이 측정의 질을 높이기로 주종을 이루고 있다. 최근 분리하지 않는 직접측정법(direct or homologous IA)이 29% 이상으로 증가하는 추세이다. 특히 pmol 수준의 측정법에는 70% 이상이 solid phase 방법을 주로 사용하고 있다. 가장 많이 발달한 방법은 96-well microtitre로 1980년 초에는 약 15%, 1990년에는 80%에 이르고 있다. 최근에 precision molded plastic ball이나 plastic stick에 부착시키는 방법이 약 15% 이상 늘고 있으며, 매우 유용한 방법으로 평가받고 있다 (Kemeny & Challcombe, 1988; Ishikawa et al., 1990).

## 6. 직 · 간접면역측정법

결합형과 유리형을 분리하는 기법 (heterogeneous assay system, Heta)은 통상적인 면역측정법에서 사용되고 있으나, 측정시간이 길어지고, 분리용 기기 · 장비가 고가이고, 자동화가 어려워진다. 또한 이로 인한 측정오차가 많이 생기게 된다. 이에 반하여 homogeneous assay system (Homa)는 추적자-항원 및 항체가 결합되었을 때, 추적자 시그널(signal)이 변화하며 결합형만이 측정되도록 만든 기술이다. Homa는 간단하고, 빠르고, 보다 정확하며, 자동화가 가능해져 직접측정법(direct assay) 개발이 가능해진다. 그러나 측정범위가 nmol/L ~  $\mu$ mol/L로서, 생체 내 비교적 다량의 분석물질이 존재할 때, 즉 치료용 약품을 모니터링할 때 이용하나 정확한 정량시에는 사용이 어려운 단점이 있다.

## 면역측정법의 평가와 정립

일반적으로 항원-항체 반응은 화학 동력학적 법칙(chemical kinetics)과 질량작용의 법칙(mass action equations)에 따른다. 항체의 친화력(antibody affinity) 산정, standard curve fitting, assay의 정립(optimization), 새로운 측정법의 개발 등에도 측정법의 평가는 필수적이다. 한편 측정의 질을 높이고, 우수한 결과를 유지하고, 측정치의 타당성을 검증받기 위해서는 측정결과 처리의 합리성과 정도관리의 적절한 사용이 필수적이다 (Seth et al., 1989). 새로운 면역측정법을 응용하기 위해서는 각 방법의 한계와 장단점을 잘 알고 사용하는 것이 필수적이다. 감도가 매우 높은 방법이라 하여도 IRMA는 분자량이 적은 호르몬이나, 단백질성이 아닌 호르몬 측정에는 사용이 어렵다. 또한 kit 사용시에 Lot No. 변화에 따른 변화, kit-to-kit variation, company-to-company variation 등이 규칙적으로 조정되어야 한

다. 항시 같은 방법을 사용하여도 정밀도, 정확도, 특이도 또는 교차도, 감도가 평가되어야 하며 정도관리(quality control, QC) 시료를 이용하여 측정오차를 줄이는 노력이 계속되어야 한다.

### 1. 방사면역 측정법의 정립

스테로이드 호르몬의 측정 방법은 통상적으로 RIA방법을 변형하여 정립한다. 본 연구팀이 개발한 RIA의 정립 과정을 androgens을 중심으로 소개하면, 응용 전에 우선 측정의 감도, 정확도, 교차반응도, 정밀도등을 조사하고, 실험내 변이계수(Intraassay variation, with-assay variation, WAV)와 실험간 변이계수(Interassay variation, between-assay variation, BAV)를 산출하여 측정오차 범위를 확정한다. 일반적으로 세 개의 QC 시료를 매 다른 assay batch내에 삽입하여 20회 정량한 후 나온 값을 이용한다. 본 저자들의 연구실에서 testosterone 측정시 사용한 여러 면역측정법의 정립 결과를 Table 4로 나타내었다.

### 2. 측정의 한계 (Detection limit):

#### 1) 길항적 측정방법 (competitive assays)

$^{125}$ I-competitive RIA의 경우 평형 계수는  $10^{10}$ L/mol로 이론적인 측정의 최소치(theoretical minimum detection limit, TMDL)은  $10^{12}$ mol/L (2 pmol/L)이다. 그러나 측정의 특이도가 높은 NIA를 이용할 경우, 또 매우 친화력이 높은 항체( $K=10^{12}$ L/mol)를 사용할 경우는 100배 이상 측정signal을 높일 수 있어 약  $10^{10}$ mol/L (20 fmol/L)까지 측정의 한계를 낮출 수 있다. 그러므로 androgens (A, T, DHT)의 동적 변화를 측정할 때 MDL은 혈청 내 1~100 nmol/L, 타액 내 10~1000 pmol/L 수준을 측정할 수 있어서, 50  $\mu$ l의 혈청 내에서는 50 fmol/tube (15 pg/tube), 타액 내 (<1 fmol/tube, 300 fg/tube) 수준의 측정 역시 가능해진다.

#### 2) 과포화적 측정법 (reagent-excess assays)

이론적으로 가장 낮은 측정한계를 만들 수 있다. 대개의 경우 atto moles (0.4 amol/100  $\mu$ L well; 0.02 amol/tube) 수준이나 실질적인 측정한계는 측정법에 따라 차이가 있다. 일반적으로 SP-ovalbumin-androgens 에 PcAb + 2nd Ab - biotin + avidin- chemiluminescent dye를 이용 시 측정한계를 100배 낮출 수 있다. MDL은 표준 곡선의 표준시약 0 상태에서 여러 번 측정하여 평균값-2SD (표준편차)의 값을 측정의 한계로

**Table 4. Performance data of the measurements of testosterone in serum by immunoassays**

Factors	EIA (n=27)	FIA (n=18)	CIA (n=24)	RIA (n=45)
Slope (b)	2.11±0.1	2.48±0.2	2.41±0.6	2.34±0.3
Correlation (r)	0.96±0.003	0.98±0.004	0.98±0.03	0.99±0.007
Intercept (y,nmol/l)	5.3±0.7	5.6±0.7	6.7±0.4	5.5±0.9
Sensitivity (pg/tube)	1.7±0.1	3.5±0.3	1.9±0.1	3.9±0.0
Accuracy				
a.	2.9±0.4	3.1±0.5	2.7±0.1	2.8±0.1
b.	9.8±0.9	9.6±0.6	9.6±0.4	9.5±0.7
c.	14.3±2.8	15.7±3.1	17.8±2.7	16.1±2.1
WAV (nmol/l)	7.3±0.5	4.5±1.1	6.3±1.1	4.7±0.7
CV (%)	6.8±1.2	6.1±0.7	6.0±0.8	5.1±1.1
BAV (nmol/l)	7.8±1.2	6.8±0.6	6.2±1.2	5.1±0.4
CV (%)	15.4±3.1	8.8±0.9	19.4±2.1	7.8±1.3

Accuracy were tested with charcoal-stripped serum pool with a (3.0 nmol/l), b (10.9 nmol/l), and c (16.5 nmol/l). WAV: Within-assay variation. BAV: Between-assay variation.

설정한다. 또 MDL은 Bo와 통계적으로 유의성 있게 식별되는 농도와, 측정간 변이계수 (BAV)에서 결정되는 가장 낮은 농도를 측정내 정밀도 (WAV)에 적용하여 산정한다.

### 3) 간섭 (Interference)

면역측정법이 개발된 후 계속하여 측정의 효용성 문제가 제기되어왔다. 측정원리와 상업적 kit에 대해서도 문제가 제기되어 왔으나, 어떠한 방법도 면역측정방법만큼 타당성을 검증 받은 방법도 없었다. 그러함에도 스스로 정도관리를 가장 신빙성 있게 이용한 In-house immunoassay의 정립이 무엇보다 중요하다. 아무리 매우 우수한 상업용 kit라도 특수한 시약과 조건에 영향을 주는 요소가 많고, 측정 방법의 변형이 매우 많다는 점을 유의해야 한다. 일반적으로 측정 결과에 영향을 미치는 요소는 측정용 완충용액에 들어 있는 matrix protein의 간섭효과, ionic strength, pH 등이다. Heterophilic antibody는 시료 내 또는 환자의 혈청-혈장 내 면역글로블린과 반응하며, 보체, 지질, lysozyme 등 효소가 시료 내 존재하면 측정의 질을 나빠진다. 즉 간섭효과를 나타낸다는 점을 고려해야 한다.

## 신빙성 (Reliability) 평가

스테로이드의 측정방법의 평가시 높은 감도 때문에 측정의 신빙성 (reliability)에 대해 의구심을 가진다. 그러나 잘 조건화시킨 경우에 정밀하고, 정확하며, 신빙성이 높은 분석 결과를 제공할 수 있다.

### 1. 신빙성 평가의 개념

시료 분석시 반복적으로 측정하여, 항상 같은 결과를 얻을 때 분석방법은 신빙성을 얻는다. 정밀성과 정확성은 신빙성의 기본 요소이다. 반복된 측정치는 실제값에 접근하며, 평균값 주위에 분포하고, 산발적 크기가 좁으면 정확도는 높아진다. 절대값과 측정값이 비슷하면 분석의 정확도는 높아진다. 분석의 높은 정확성은 정밀도가 높은 측정방법이 정립되어야 가능하다. 동일 시료의 측정시 변이 (WAV)와 시공간적 변동 (BAV)로 결과의 신빙성이 표현된다. 표준시료의 최소 실 측정값 변이는 감도를 결정한다. 표준시료의 측정 정확성이 높다면, 환자 시료에서 낮은 농도도 측정된다. 매우 정확한 분석은 항체가 고도의 특이성을 가질 때 얻을 수 있다. 그러나 체계적 오류 (systematic error), 즉 추출용매 (extraction solvent), pipetting 순서, 시험관의 비 균질성, 추적자의 비 평형적 분포 등과 개인간 편차 (biases), 규칙적인 오류, 또 계산 방법의 편차 등 때문에 정확성이 감소된다.

### 2. 표준 곡선 (standard curve)

방사면역측정에서의 표준 곡선은 호르몬의 농도와 항체에 대한 추적자의 결합 정도 사이의 관계를 나타낸다. 항체의 결합정도는 단순하게 cpm bound, 백분을 결합, 특이 함수로 농도는 단순농도에서부터 log농도로 표현된다. 또 결합과 농도 사이의 곡선 관계를 curve-fitting하는 다수의 프로그램이 개발되었다. Logit-log transformation은 농도 당 결합을 logit로 전환하고 농도 (dose)는 log로 전환하여 표준 곡선을 직선화 함으로 매우 쉽게 결과를 산출할 수 있다. Logit-log trans-

formation은 편차가 없는 측정 계산이 가능하고, program용 계산기로 계산할 수 있어, 작고 영세한 규모의 연구실에서 매우 실용적이다.

### 1) 기울기

Logit-log transformation의 기울기 (b)는 방사성 혹은 비방사성 T가 항체에 같은 친화성을 가지고, 계가 포화상태일 때, 상수는 -2.303이 된다. 실제로, 면역측정법은 포화상태가 정확하지 않아서, 값 -2.303에 근사한 값을 가진다. 직선화된 회귀 직선도 경사가  $b - t.999sb \geq 2.303 \geq b + t.999sb$ 의 신뢰 한계 안으로 떨어지지 않는 경우에 측정법은 철저히 재평가되어야 한다.

### 2) 측정값의 표준 오차

직선화된 표준 곡선의 유효성 기준으로 사용되는 다른 매개변수는 측정값의 표준 오차이다 (Syx). 이 매개변수는 “회귀로부터 표준 표준편차”와 동일하다. 최적 회귀 직선으로부터 개개의 측정 표준 오차로, 여러 androgen에 대한 Syx의 평균값은 0.161 (SD = 0.089)이었다. 정밀도 λ지표 ( $\lambda = s/b$ )는 일반적으로  $\lambda < 0.1$ 은 정확한 분석을 가리키고  $\lambda > 0.4$ 는 부정확한 분석이라고 정의한다.

### 3) F-value

직선화된 표준 곡선의 유효성은 F-test에서 F-value가 95% 신뢰도 보다 낮으면, 회귀선은 직선으로 간주된다. 비직선시에는 직선화된 표준 곡선의 한 점을 제외하기도 한다. 제외된 점이 제일 높거나 낮은 값이면 측정값의 유효 범위가 좁아진다. F-value는 직선화된 표준 곡선의 유효성에 대한 지표이다.

### 4) 수정된 가능 추정값의 계산

직선화된 표준 곡선의 유효성이 확인되면, 유효 추정값이 계산된다. 가능 추정값 (X)의 계산은 식  $\log X = (\logit Y - a)/b$  으로 한다. 이 식은 T를 추출한 후에 직접적으로 측정될 때만 유효하다.

### 5) logit-log 전환의 문제

표준 곡선의 logit-log 전환으로 직선화하면 많은 장점을 가진다. androgen의 RIA에서는 전부 직선화되나, 추적자와 항체 농도의 현저한 불균형 또는 항체의 이질성이 있을 때에는 직선화가 되지 않는다. Logit-log 회귀선에 가중된 회귀 분석을 더 많이 이용한다. 본 연구팀은 직선화된 표준 곡선의 범위 ( $2.0 > \logit Y > -2.0$ , 즉  $12\% < Y < 88\%$ )내에만 판독

한다. 한편 logit-log 직선화는 모든 측정에서 두 고정값 B0와 N에 의존적이다. 즉 모든 측정값은 B0로 나누고, NSB가 뺀다 ( $Y = 100 (B - N)/(B0 - N)$ ). 직선화된 표준 곡선의 체계적인 오류는 4 parameter logistic equation으로 바꾸면 해결된다.

### 3. 분석 정밀성 (assay precision)

정확성은 개개 표본의 판독 가능한 측정값에서 오류가 나타난다. 본 연구실에서 정립된 EIA 및 RIA의 정밀도는 정상 남성 또는 여성의 혈청을 모아 다량의 동일 혈청을 만들고, 20개 이상을 정립된 EIA 및 RIA로 측정하여, 결과가 오차범위 내에 있을 때 정밀도가 높다고 평가한다.

### 4. 분석 감도 (sensitivity) - 측정 한계 (minimum detection limit)

분석계의 감도를 측정하기 위하여 2가지 방법을 사용한다. 즉 평균 농도에서 항체 결합력 (binding affinity)의 역수 값 ( $s = 0.1/ka$ )을 사용하거나, 각각의 표준곡선에서 최대 결합치 (BO)의 -2SD의 값에 해당하는 표준농도의 값을 감도로 이용한다. 본 연구실의 T 분석 시, EIA의 경우는 약 25pg/tube, liquid-phase RIA는 5pg/tube, solid-phase는 15pg/tube를 나타내었다. 방사면역측정의 감도 (분석 측정 한계)는 항체의 결합력 (평형 상수)이 높을 때, MDL은 낮아지고, 반대의 경우는 높아진다. 통계학적으로 0 농도와 구별되는 최소의 낮은 농도를 민감도라 한다. 그러나 logit-log 회귀선이 사용될 때는 실제적 의미를 가지지 않는다. 만일 표준 곡선의 정밀성이 높다면, log 농도 축 위의 가능 추정값의 신뢰 한계는 좁고, 반대의 경우에는 한계가 넓어진다. 그러므로 표준 곡선에 기초한 신뢰 구간은 혈장 측정값의 실제 오류를 과소 평가하고 분석의 구별력을 과대 평가한다.

Blank는 정확성에 심각하게 영향을 줄 수도 있다. 즉 표준 시료와 항체 결합을 저해하거나, 과대 반응을 일으키거나, 항체와 결합의 변화를 일으킬 수 있는 chromatographic material (blank), 용매잔기, 완충액, BSA,  $\gamma$  globulin gelatin, 추출된 지질 등 기타 화합물 모두를 말한다. 또 Blank가 있으면, blank 값을 빼서 결과를 수정해야 한다. Blank 측정값의 평균은 최소 검출 농도 아래이며, blank는 측정 불가능할 때 무시된다. 최소 검출 농도를 넘으면, 분석계에 blank의 효과를 억제하기 위하여 blank를 모든 tube에 넣어야 한다. 항원-항체의 평형은 T-NIA에서 1~4시간내 이루어지고, 다양한 pH에서 안정하였다.

### 5. 분석 정확성 (accuracy)

스테로이드를 제거한 혈청에 15ng/ml, 7.5ng/ml, 3.75ng/ml



의 testosterone을 첨가한 후 EIA 및 liquid-phase RIA, 각종 측정방법으로 10회 이상 측정하여 분석한다. 이때 분석 후 얻은 값이 첨가한 양에 근접할 때 정확성이 높다고 표현한다, 기대치 (X)와 관측치 (Y)사이의 상관관계를 보면 EIA에 의한 측정의 경우는 관측치 (Y) = 0.96X - 0.89, (r = 0.985), RIA의 경우는 (Y) = 0.77X + 3.49, (r = 0.941)의 값을 나타내었다. T-CIA는 (Y) = 0.89X + 0.44 (r = 0.986), 위의 결과로 보아 RIA에 비해 EIA의 경우는 높은 농도에서는 약간 높게, 낮은 농도에서는 약간 낮게 측정되는 경향을 나타내었으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다. 정확성을 저해하는 요소는 표준시료, 개인간의 오류, 표준 곡선의 오류, 특이성과 blank가 고려되어야 한다.

#### 6. 특이성 (specificity) 또는 교차반응 (cross-reaction)

면역측정에서 항체의 높은 특이성은 높은 정확성을 갖추는 필수 요건이다. 특이성을 얻기 위하여, 면역학적 반응을 저해하는 유사 androgens과 분리시키는 것이 필요하다. 예로 항혈청의 특이성은 교차 반응, 즉 testosterone과 구조적으로 비슷한 dihydrotestosterone을 분리하는 능력이다. 일반적으로 항체와 50% 결합을 나타내는 testosterone의 양과 유사 androgens의 농도 비율 X 100로 교차 반응도로 계산한다.

### 정도 관리 (Quality Control)

본 연구자의 연구실의 T측정의 정도관리 결과를 Table 4에 나타내었다.

#### 1. Within-assay variation (Intra-assay variation, WAV)

하나의 분석에 동일한 QC을 20개 넣어 측정하여 추정할 수 있다. 이때 오류는 주로 변이 계수 (SD =  $\Sigma d^2/SD$ )로 나타낸다. QC의 수 (n)가 30이상으로 늘리면, WAV는 확실해진다. 본 연구실의 결과에 따르면, 평균과 표준편차는 함께 변한다. 예로, 남성 타액내 T의 측정시 WAV는 EIA에서 265.65 ± 15.80 pmol/l (n = 20, CV = 5.9%)이었고, RIA에서는 274.22 ± 14.09 pmol/l (n = 24, CV = 5.1%)로 나타났다. CIA는 267.54 ± 15.2 pmol/l (n = 30, CV = 5.7%)이었고, Delfia는 284.33 ± 17.5 pmol/l (n = 28, CV = 6.2%)로 모든 방법에서 CV는 10% 이내로 측정의 질이 우수함을 나타내었다. 각각의 assay중 동일시료의 측정치 변화를 알아보기 위하여, 일반적으로 표준곡선상의 두 변곡점과 최중양치를 기준으로 3개의 QC sample을 선정한다. 이를 한 분석 내에 3번 이상의 측정하여 CV값이 허용범위(CV = 5~10%)내에 있을 때 분석의

질이 높다고 평가한다.

#### 2. Between-assay variation (Inter-assay variation, BAV)

시료의 측정이 몇 일, 몇 주, 또는 몇 달 이상 반복적으로 수행될 때, 세 개의 QC를 측정한 결과의 변동을 BAV로 나타낸다. BAV는 WAV보다 매우 더 높은 수준이고 변이 계수값이 26%로 높은 경우가 나타난다. WAV와 비교하면, 분석의 조건에 있어서 내적 변화 외에 실험할 사람의 변경, 시약 상태, 온도, 실험조건, 기기상태 등 외적 변화의 영향등이 더 많은 오류를 범할 가능성이 생기기 때문이다.

본 연구실의 testosterone의 측정 결과에 따르면, BAV도 평균과 표준편차가 함께 변한다. 예로 남성 타액의 BAV는 EIA에서 287.55 ± 26.82 pmol/l (n = 14, CV = 9.3%)로 RIA에서는 279.43 ± 24.49 pmol/l (n = 24, CV = 8.8%)로 나타났다. CIA는 265.34 ± 29.52 pmol/l (n = 40, CV = 11.1%)이었고, Delfia는 277.84 ± 29.79 pmol/l (n = 13, CV = 10.7%)로 모든 방법에서 CV는 15% 이내로 측정의 질이 우수함을 나타내었다.

면역측정의 정밀성과 정확성은 도중에 저하될 수 있으므로, 정도 관리가 사용되어야 한다. 정도 관리는 표준 곡선, WAV, BAV 변이와 blank의 매개변수 등 일정한 검사가 포함되어야 한다. 유사성 검증이, 적어도 분석 조건이 변화했을 때, 포함되어야 한다. 1980~1988년간 영국의 Univ. Edinburgh가 UKEAS에 의해 실시한 혈청 내 pituitary gonadotropin (GTH) 측정의 정도관리 연구 결과와 본 연구실에서 연속적으로 행하는 정도관리 방법을 요약하면 내정도 관리는 적어도 3개 이상의 미지 시료를 매회 측정시마다 첨가하는 방법을 사용한다. 외정도 관리는 UKEAS (영국 내 177개 호르몬 실험실)처럼 미지의 동일 시료를 전 실험실에 공급하여 각각의 연구실이 측정하여 종합함으로써 측정의 질을 평가하는 것이다. UKEAS는 IRMA방법이 RIA에 비하여 17% 높은 값을 나타내고, LH의 경우 33%의 낮은 측정치를 나타낸다고 보고하였다 (Seth et al., 1989). 이 결과는 측정의 방법보다도 IRMA가 사용하는 McAb가 GTH의 isoform을 측정한 때문으로 보고하였다. 이들의 결과에서도 WAV의 geometric CV (GCV)는 10% 정도인데 비하여, BAV의 GCV는 20~30%로 높은 값을 나타낸다. 그러므로 실험실 내 정도관리가 매우 중요하다는 것을 알 수 있다. 즉 between-laboratory result를 비교하는데 큰 문제점이 있다는 것을 알 수 있다.

WHO가 주관한 QC program은 한 국가의 결과를 서로 믿고 전 세계적으로 통용될 수 있는 측정 결과를 얻어내려는 노력의 일환이었다. 즉 각종 측정법의 시약과 추적자의

labeling 방법을 통일하여 균일화하고, 각 실험실의 측정기기의 측정오차를 줄이고, 세계적으로 공통인 표준시약을 제공하여 표준 방법과 비교하여 정도관리를 유지시키는 방법과 routine assay에서 변이가 큰 것을 조절하는 방법상의 노력이었다. 실험실상의 몇 가지 문제점은 측정 기기의 정밀도와 측정 효율의 유지노력, 측정치의 계산 (computer programming & method), 기록상의 clerical error, specimen의 기록상 문제점과 시료의 바뀜, 그리고 측정용 시약의 준비과정의 잘못 등을 들 수 있다. 또 실험실의 문제점으로는, 첫째 시료 즉 혈청 등을 채취하고, 보관하고 이를 실험실로 운반하는 과정에서, 혈액의 수분이 증발되거나 습기에 노출되거나, 측정물질 흡착시키거나, 파괴시키는 용기에 보관하기도 하고, 온도가 상승되어 측정물질이 생체액에서 자연 분해되거나, 오염물질 또는 평균 침입으로 변질되는 것 등을 들 수 있다. 아울러 강한 빛이나 형광, UV에 노출시키는 일도 허다하다. 그러므로 면역측정법의 정도관리 계획이 잘 조정되고 유지되지 않는 한 WAV와 BAV 등은 높아지고, 측정치의 질은 저하될 수밖에 없다. 그러나 국내에서는 QC program이 전무함으로 이를 전담할 수 있는 과학자를 교육하고, 실험실에서 항상 정도관리를 주관하게 하는 것이 필요하다.

## 호르몬 측정방법의 응용

### 1. 시료내 testosterone의 안정성

일반적으로 혈청은 채혈 후 가장 빨리 분리하여  $-70^{\circ}\text{C}$ 나  $-20^{\circ}\text{C}$ 로 냉동 보관해야 한다. Testosterone은 상온에서 24시간 혈청을 보관하였을 경우나, haemolysis가 일어났을 경우에도 안정하다. 본 연구팀은 상온에서 혈청을 분리하지 않고 24시간 방치하여도, T의 농도에 변화가 없는 것을 관찰하였다. 또한 5회 정도의 freezing thawing에도 농도의 변화는 없는 것으로 보아 testosterone은 다른 steroid에 비해 매우 안정성이 높다고 판단된다. 그러나 이때, 혈청의 체적 변화나 썩는 경우에는 현저히 농도를 변화시킨다. 타액이나 변의 경우 이물질의 침투에 의한 영향이 많으므로 냉동하거나 lyophilizing하는 것이 바람직하다.

### 2. Bioavailable testosterone

Androgenicity를 연구하기 위하여 일반적으로 혈청내의 T 농도를 측정하였다. 남성의 혈청내 testosterone은 sex hormone binding globulin (SHBG)에 약 44% 정도가 부착되어 혈관을 돌고 있다. 나머지 54% 정도는 혈청 albumin에 얹혀서 체순환을 하며, free testosterone은 약 2~3% 정도로 존재한다.

이들 free T (fT)와 albumin bound T (albumin T)를 bioavailable T (bio T)라고 한다. 여성의 경우는 78%가 SHBG에, 20%는 albumin-bound form이다. Free T는 equilibrium dialysis, gel filtration, ultrafiltration을 이용하거나, RIA 등을 이용하여 측정한다 (Yoon and Kim, 1987). 최근 bioavailable T, 즉 non-SHBG-bound fraction (nSHBG)이 생물학적으로 T의 작용을 대변한다고 알려지고 있다 (Swinkels et al., 1991; Yoon et al., 2000). 최근에는 이 bio T를 생물학적 의미가 있는 분획으로 보고 있다. 그러므로 이 bio T 즉 nSHBG가 androgenicity의 임상적 biomarker라는 것이 확실시되고 있다. 생체내 bio T (nSHBG)와 SHBG bound T (SHBG)를 합친 전체량은 total T라고 한다. 한국인 성인의 혈액내 각 분획을 측정된 결과를 Table 5로 나타내었다.

### 3. 타액 (Saliva)내 testosterone

1980년대부터 생체의 임상적 지표로 타액내 T가 측정되어 왔다. Saliva내 T는보다 잘 생체 내 T의 변동을 반영하며, 혈청 내 fTsk bio T의 변동과도 일치된다는 연구 결과들이 보고되었다 (Howard et al., 1989; Padridge & Demers, 1991; Swinkels et al., 1991). 그러므로 salivary T는 혈청 내 total T보다 더 oligospermia나 azoospermia 환자의 불임, androgenic alopecia, prostatic carcinoma, psychological test situation에서 androgenicity의 좋은 지표로 이용되고 있다 (Granger et al., 1999; van Honk et al., 1999). 이러한 사실은 free T, bio T보다 salivary T가 보다 임상적으로 유용하다는 것을 의미한다. 즉 타액은 쉽게 얻을 수 있고, 스트레스를 주지 않고, 반복적인

Table 5. Concentration of bioavailable (free + albumin-bound) and SHBG-bound androgens in serum

Hormones	Male(n=75)	Female(n=95)
Total testosterone (nmol/l)	21.50±5.1	1.1±0.3
Albumin-bound T (nmol/l)	6.71±1.65	0.26±0.04
SHBG-bound T (nmol/l)	14.62±0.86	0.82±0.05
Bioavailable T (nmol/l) (free + albumin-bound)	7.10±1.48	0.28±0.05
Albumin-bound DHT (pmol/l)	570.52±101.5	50.11±11.60
SHBG-bound DHT (pmol/l)	1201.00±58.1	148.92±18.56
Bioavailable DHT (pmol/l) (free + albumin-bound)	601.74±85.8	52.44±19.9

All values of the female sample were significantly lower than of male sample ( $p < 0.001$ , by student's t-test). The bioavailable androgens were determined in the supernatant after treatment of ammonium sulfate (at final concentration of 50%) to precipitate the SHBG fraction (Yoon & Kim).

**Table 6. Values of salivary T and serum free T or DHT in men and women**

Samples	Male(n=90)	Female(n=90)
Salivary T (pmol/l)	290.0±65.1 (70~415)	33.0±15.4 (20~62)
Serum FT (pmol/l)	585.0±19.8 (245~710)	26.1±2.4 (16~30)
Total T (nmol/l)	21.5±5.1 (10.5~33.6)	1.1±0.3 (0.4~2.3)
Serum FDHT (pmol/l)	19.9±1.2 (10.5~36)	ND
Total DHT (nmol/l)	1.8±0.3 (0.7~9.7)	0.2±0.03 (0.2~1.4)

ND; not detectable, FT: free testosterone, FDHT: free dihydrotestosterone. Serum FT and FDHT were determined, using a centrifugal ultrafiltration through YMB membranes of MPS-1 devices.

로 다량의 채취가 가능할 분 아니라, 환자에게 얻은 타액을 농축시켜 사용할 수 있기 때문이다. Salivary T는 소아, 체질이 어려운 환자, 심리적 상태변화에 따른 호르몬의 변동 monitoring 할 수 있는 좋은 재료라고 알려지고 있다 (Granger et al., 1999; van Honk et al., 1999). 본 연구자는 1985년 이래 타액 내 steroid hormone의 동태를 파악하여 왔으며, 이 중 T의 결과 일부를 Table 6으로 요약하였다.

#### 4. 분뇨 내 testosterone

최근 사람과 동물의 똥 (feces)내 testosterone은 혈청 내 T의 농도와 parallel하게 배설된다고 알려지기 시작하였다. 아직까지 fecal T가 완벽하게 bio T, free T를 대치할 수는 없다 하더라도, 야생동물이나 시료의 채취가 제한적인 사람에게서 fecal T의 측정은 효용성이 높다고 사료된다, 특히 fecal testosterone conjugates가 nSHBG나 bio T의 용도를 대체할 가능성이 야생동물들, 생쥐 (Billitti et al., 1998), 코끼리 (Fiess et al., 1999), 거위나 새 종류 (Hirschenhauser et al., 1999), 하이에나, 사자 등에서 보고되고 있다. 특히 포획이 어렵고, 야생생활을 하거나, 스트레스에 약한 동물의 경우, 연중 계절적 T의 변화 등이 잘 측정되고 있는 점에서 fecal T는 매우 흥미 있는 재료라고 할 수 있다. 본 연구자는 생쥐와 흰쥐의 분내 호르몬의 농도를 측정하고 있으며, fecal steroid는 수용성인 T-conjugates를 효소 처리한 후 다시 추출하고, solvent 추출물을 정제하여 정량한 값을 모두 합친 값으로 해석하고 있다.

#### 5. 여성 성기능장애를 모니터링하기위한 T의 측정

Lauman et al. (1999)은 1749명의 미국 여성중 43%가 여성 성기능장애 (Female Sexual dysfunction, FSD)를 가지고 있으며, 여성의 성기능, 성적반응, 성적 충동 및 욕구, 흥미에도 남성호르몬이 관여한다고 보고되고 있다. 그러나 여성 혈청 및 혈액내 fT의 농도는 1~2pg/ml 수준으로, 매우 감도 높은 측정방법이 요구되어진다. 그러나 현재의 측정법으로는 대처가 어려우므로 계속적인 측정법의 개발이 이루어져야 한다. 또한 남성의 성기능을 모니터링하는 경우 estradiol의 중요성이 대두되고 있으며 이러한 측정에도 상황은 비슷하게 된다.

### 요약 및 제언

최근 각 나라가 경제적이고, 측정 한계가 낮고, 감도가 높은 호르몬의 측정방법을 개발하여 왔다. 이미 over-the-counter kit가 개발되고 상업화되는 시점에 있다. 방사면역측정법 (RIA와 IRMA)은 비방사면역측정법 (NIA)로 대체된 상황이다. 항체는 특이성이 높은 단가로 대체되고 있고, 추적자는 효소와 luminescence 물질을 결합시킨 enhanced non-isotopic method로 대체되고 있다. 또한 assay formulation에는 solid-phase method가 주로 사용되고, 새로운 측정 방법이 날로 발전하고 있다. 그러나 국내에서는 측정방법 개발에 주의를 기울이는 과학자는 거의 전무하고, 측정을 평가할 수 있는 과학자조차 전무한 실정이다. 국내에서 대부분의 연구자가 선진 제국의 학자에게 의존하거나, 상업적 kit를 사용하여 정도 관리가 힘든 실정이다. 그리고 측정의 일관성이 없고, 비교가 어려우며, 외화를 낭비하고 있음에도 연구비의 지원이나 훈련 계획은 전무한 상태이다. 또 상업성이 결여되어, 측정방법 개발은 불가능해지고 있다. 그러므로 작은 동물이나, 곤충, 수산동물 등, 특이동물의 생식을 조절하는 호르몬의 연구는 거의 불가능해진다.

선진국에서 미래의 남성호르몬의 측정법은 매우 감도가 높고, 실험실에 기초를 둔 면역측정법과 판매되는 Kits가 서로 보완적으로 평가되고, 보다 표준화된 실험 공식화와 면역시약의 공급, 비방사면역측정법의 보급이 증가할 것이다. 그리고 동형면역측정법으로 검출 한계가 높아지고, 정량분석력이 증진될 것이다. 그리고 항원-항체 결합이 표지물질로부터의 신호를 100% 변형, 검출한계가 높은 항체생산, 포화 분석방법의 실용화, 새로운 추적자의 개발, 단가항체를 DNA 재조합 기술로 생산할 것으로 기대된다. 컴퓨터의 발달로 측정의 오차는 줄고, 계산은 편리해질 것이며, 분자 모델링 기술은 항체의 아미노산 서열을 분석하여 특이성과 친화력이

높은 항체를 생산할 것이다. 이러한 발달로 호르몬의 측정법은 전환기를 맞이할 것이며 automation화가 이루어질 것이라 판단된다.

영국은 국내의 호르몬 측정의 결과를 상호 비교하고, 국가적인 기초자료의 공유를 위하여 거국적인 정도관리계획(UKEQAS)을 실시하고 있고, 약 177개 실험실이 참여하고 있는데 비하여, 정도관리를 실행할 수 있는 연구실은 극소수이다. 이런 국내의 실정에 비추어 표준화된 호르몬 및 질이 좋은 항체를 생산 공급하고, 측정방법을 국내 실정에 맞추어 표준화하고, 또 각 측정법을 적정화하고 평가하여 실험실간, 연구자간에 서로 신뢰할 수 있는 정보를 교환할 수 있는 정도 관리 계획이 만들어져야 한다. 또한 거의 모든 선진국이 자신들의 연구 결과의 질을 향상시키기 위하여 매년 학회에서 지원하는 Training programe을 실시하고 있다는 점을 참고하여 국내에서도 적어도 1주일 이상의 훈련 과정이 매년 실시되어야 하며, 국가적 차원의 자원이 필요하다고 판단된다.

## 인용문헌

- Aguila HL, Pollock RA, Spira G, Scharff MD (1986) The production of more useful monoclonal antibodies. *Immunol Today* 7: 380-3.
- Albertson BD, Haseltine FP (1988) editors. Non-radiometric assays: technology and application in polypeptide and steroid hormone detection. New York: Alan R Liss.
- Billitti JE, Lasley BL, Wilson BW (1998) Developmental and validation of a fecal testosterone biomarker in *Mus musculus* and *Peromyscus maniculatus*. *Biol Reprod* 59: 1023-28.
- Birch JR, Lennox ES (1995) Monoclonal antibodies: principles and applications, Wiley-Liss.
- Crosby SR, Ratcliffe WA, Smith GN, White A (1986) Characterization of monoclonal and polyclonal antibodies to 19-linked conjugates of testosterone with corresponding radioligands. *J Steroid Biochem.* 957-62.
- de Pablo F, Scanes CG, Weintraub BD (1993) editors. Handbook of endocrine research techniques. Academic Press, Inc.
- Diamandis EP. (1988) Immunoassays with timeresolved fluorescence spectroscopy: principles and applications. *Clin Biochem* 21: 139-350.
- Ekins RA (1989) shadow over immunoassay. *Nature (London)* 340: 256-258.
- Fiess M, Heistermann M, Hodges JK (1999) Patterns of urinary and fecal steroid excretion during the ovarian cycle and pregnancy in the African elephant (*Loxodonta africana*). *Gen Comp Endo* 115: 76-89.
- Gosling JP (1990) A decade of development in immunoassay: methodology. *Clin Chem* 36: 1408-27.
- Granger DA, Schwartz EB, Booth A, Arentz M (1999) Salivary testosterone determination in studies of child health and development. *Horm Behavior* 35: 18-27.
- Hirschenhauser K, Moeser E, Kotrschal K (1999) Seasonal patterns of sex steroids determined from feces in different social categories of Greylag geese (*Anser anser*). *Gen Comp Endocr* 114: 67-79.
- Howard K, Kane M, Madden A, Gosling JP, Fottrell PF (1989) Direct solid-phase enzymeimmunoassay of testosterone in saliva. *Clin Chem* 35: 2044-47.
- Ishikawa E, Hashide S, Kohno T, Hirota K. (1990) Ultrasensitive enzyme immunoassay. *Clin Chem. Acta* 194: 51-72.
- Kemeny DM, Chalcombe SJ. (1988) editors. ELISA and other solid phase immunoassays: theoretical and practical aspects. Chichester: John Wiley & Sons.
- Laumann EO, Paik AMA, Rosen RC (1999) Sexual dysfunction in the United States: Prevalence and predictors. *JAMA* 281: 537-544.
- Najjar SM, Weintraub BD (1993) Radioimmunoassay and radio-receptor assay: past, present, and future. In: de Pablo F, Scanes CG, Weintraub BD, editors. Handbook of endocrine research techniques. Academic Press. 3-23.
- Nieschlag E, Wicking EJ (1975) A review of radioimmunoassay for steroids. *Z Klin Chem Klin Biochem.* 13: 261-71.
- Nieschlag E, Wickings EJ (1981) The role of testosterone in the evaluation of testicular function. In: Abraham GE. editor, Radioassay system in clinical endocrinology. Marcel Dekker Inc., 169-96.
- Pardridge WM, Demers LM (1991) Bioavailable testosterone in salivary glands. *Clin Chem* 37: 139-40.
- Seth J, Hanning I, Bacon RRA, Hunter WM (1989) Progress and problems in immunoassays for serum pituitary gonadotropins: evidence from the UK external quality assessment schemes (EQAS), 1980-1988. *Clin Chim Acta* 186: 67-82.
- Smith DS, Al-Hakim MHH, Landon JA (1981) Review of fluoroimmunoassays and immunofluorometric assay. *Ann Clin Biochem* 18: 253-274.

- Swinkels LMJW, van Hoof HJC, Foss HA, Smals AGH, Bernard ThJ (1991) Concentration of salivary testosterone and plasma total, non-sex-hormone-binding-globulin-bound, and free testosterone in normal and hirsute women during administration of dexamethasone /synthetic corticotropin. *Clin Chem.* 37: 180-5.
- van Honk J, Tuiten A, Verbaten R, van den Hout M, Koppelschaar H, Thijssen J, de Haan E (1999) Correlation among salivary testosterone, mood, and selective attention to threat in humans. *Horm Behavior* 36: 17-24.
- Voller A, Bartlett A, Bidwell D (1981) editors. *Immunoassays for the 80s*. Lancaster, U. K.: MTP Press Ltd.
- Weeks I, Seitz WR (1984) Immunoassay labels based on chemiluminescence and bioluminescence. *J Clin Immunoassay* 7: 82-89.
- White A, Gray C, Corrie JET (1985) Monoclonal antibodies to testosterone: the effect of immunogen structure on specificity. *J steroid Biochem.* 22: 169-75.
- Yalow RS (1992) Radioimmunoassay of hormones. In: Wilson JD, Foster DW, editors. *Textbook of endocrinology*. WB Saunders Co., 8th Ed. 1635-46.
- Yoon YD, Chun EH, Lee CJ, Do BR, Lee JY (2000) Ultra-sensitive enzyme immunoassay for testosterone in human saliva. *Dev Reprod* 4:115-123.
- Yoon YD, Kim SR (1987) Luminescence immunoassays and their applications for dihydrotestosterone and testosterone (I) establishment of LIA. *Kor J Fertil Steril* 14: 138-148.
- Yoon YD (1996) Recent development in immunoassays. *Proc. 31st Ann Congress Korean Soc Fertil Steril*, June, Seoul. pp 3-11.
- Yoon YD, Kim EI, Suh PG, Han JH, Tschai BS (1981) Testosterone immunoassay and serum levels in Korean children and adult males. *Seoul J Med.* 22: 490-502.