

호르몬 측정법의 발달 제 2세대: 비방사면역측정법

이창주 · 김상수 · 윤용달[†]

한양대학교 자연과학대학 생명과학과

Developments of Hormone Assays, Second Generation: Non-Isotopic Immunoassays

Chang Joo Lee, Sang Soo Kim and Yong-Dal Yoon[†]

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

ABSTRACT : The three important phases in the development of ligand immunoassays are identified and summarized. The competitive radiolabelled hormone measurement had been developed in the first and early in the second generations(1950s to 1960s), such as radioimmunoassays(RIA) or immunoradiometric(saturation) assays(IRMA), and used in all most of the hormone and also analyte in biological samples. In the second generation, ultrasensitive non-isotopic immunoassays(NIA) were developed using monoclonal antibodies(McAb), labelling the McAb and high specific activity non-isotopic labels. After their usefulness, advantages and disadvantages has been evaluated and non-competitive methods are discussed. The chip/microarray based multianalyte ligand assays(microspot or genechip methods) are developed and known as alternative ones in the third generation. We summarize the developments of NIAs and its usefulness, and then introduce briefly the new ligand assays.

Key words : non-isotopic immunoassay, chip-based microarray, multi-analyte immunoassay, immunoassay.

요 약 : 면역측정법의 주요 발전 단계를 3가지로 구분한다. 즉 첫 발전 단계(제 1세대)는 방사성 호르몬(방사선 추적자, radiolabeled analyte marker)을 이용한 길항적 측정방법의 개발과 보급이다. 두 번째(제 2세대)는 단가 항체(monoclonal antibody, McAb)를 추적자로 만들고, 비방사성 표지자를 이용하여 비경쟁적 초감도의 측정방법이 면역진단 분야에 적용되는 단계이다. 세 번째(제 3세대)의 발전은 최소량화, 칩을 이용하는(chip-based) microarray의 방법을 응용하여, 한 시료에서 여러 가지 생리활성물질 즉 호르몬의 동태를 파악하는 초감도 다변량분석법(simultaneous ultrasensitive measurement)이 개발되고 보급되는 단계라 할 수 있다. 제 1세대의 방사면역측정법(radioimmunoassay, RIA)을 거쳐 제 2세대 비방사면역측정법(non-isotopic immunoassay methods, NIA)이 모두 장·단점이 비교되고, 각각의 특수성을 가진 측정법이 정립되고, 시장에서의 우열이 정리되고 있는 시점이다. 이미 제 3세대(Chip/microarray-based multianalyte ligand assays)가 매우 빠르게 개발되고 있어 새로운 전환기를 맞고 있다고 판단된다. 그러나 본 종설에서는 일차로 제 2세대를 정리하고, 이어 새로운 전환점의 측정법을 소개하고자 한다.

서 론

리간드 측정법(Ligand assays)은 1950년대 길항적 방사리간드 측정법(competitive radioligand assay, CRA)의 발달에서 시작되었다. 즉, 분석물 호르몬이나 방사성 표지자(radiolabeled ligand)가 특이 결합단백질과 경쟁적으로 결합하는 원리를 이용하였다. 생물측정법(bioassay)은 호르몬과 세

포 및 조직 내 수용체와 경쟁적 결합을 측정하는 방법을 사용하였다. 이 시기에는 고성능의 비활성도(high specific activity, spec act)를 가진 방사성 호르몬을 개발하여 측정의 감도(sensitivity)를 높이는 방법을 이용하였다.

리간드 측정법의 개발 변화를 요약하여 세 가지 세대로 구분하고 있다. 1950년대 Yalow와 Berson(1960)의 길항적 방사면역측정법(competitive radioimmunoassay, CRIA)으로 인슐린 측정이 시작되고, Ekins(1960)가 갑상선호르몬(thyroxine, T4)의 측정을 saturation assay로 개발하면서 첫 단계(제 1세대)가 시작되었다(Table 1). CRIA는 고도의 정밀성, 정확성 및 감도를 가지고, 또 특이적 측정 방법이라는 특징으로 생물학과 임상화학, 임상의학 분야의 연구 방법을 크게 바꾸어 놓았다. 항체의 생산기술이 크게 발달하고, 방사성 표지자

이 논문은 2005년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행되었음(KRF-2003-ABRL-C00051).

[†] 교신저자: 서울특별시 성동구 행당동 17번지, 한양대학교 자연과학대학 생명과학과. (우) 133-791, (전) 02-2220-0955, (팩) 02-2294-0955, E-mail: ydyoon@hanyang.ac.kr

Table 1. Major milestones in five decades of ligand assay development

1. Development of competitive radioligand assays (first generation: 1950 to early 1970s)
Radioimmunoassay(RIA) /Immunoassay(IRMA) Yalow and Berson (1960); Insulin RIA Ekins (1960, 1963); Thyroxine 'Saturation assay'/ IRMA Wide <i>et al.</i> , (1967); Allergen Ab's "RAST" Miles and Hales (1968); Insulin IRMA Rubenstein <i>et al.</i> , (1972); Homogeneous drug assays "EMIT"
2. Development of ultrasensitive immunoassays using high specific activity non-isotopic labels (Second generation: Middle 1970s to early 1990s)
Kohler and Milestone (1975); Monoclonal antibodies Ekins/Amersham (1976); Free hormone assays Marshall <i>et al.</i> , (1981); Time-resolved FIA (DELFLIA)
3. Development of chip/microarray-based multianalyte ligand assay: ultimate transformation of ligand assays (Third generation: late 1990s to present)
Ekins <i>et al.</i> , (1989, 1991); microspot, multi-analyte radiometric immunoassay US genosensor Project established (1992); DNA/RNA analysis Ekins (1998); Miniatured microarrays, microspot assays Silzel <i>et al.</i> , (1998); Mass-sensing multianalyte microarray immunoassay Schweitzer <i>et al.</i> , (2000); Immunoassay with rolling circle DNA amplification Wiese <i>et al.</i> , (2001); Simultaneous multianalyte ELISA

를 측정하는 고성능 측정기기의 개발, 원심분리기, 피펫, 카운터 등이 고성능화되거나 자동화되고, 컴퓨터 이용 가능성이 높아지면서 약 30여 년간의 방사면역측정법(radioimmunoassay, RIA)이 주 호르몬 및 analyte의 측정 방법이 되었다(Chard, 1987, 참고문헌 A24; Yalow, 1992, 참고문헌 A18).

항원-항체 반응을 이용한 정량분석법은 아직도 대부분 임상, 약학 또는 기초과학 연구의 중심축을 이루고 있다. 따라서 호르몬, 지질단백, 종양단백(oncoprotein), 병원성 항원, 특이항체 등 단백질이나 펩티드의 임상적 측정방법은 면역학적 측정방법 외에는 대안이 없을 정도이다. 생리활성물질의 검정법에는 여러 가지 크로마토그래피 방법, 분광 또는 형광분석 방법이 이용되고 있으나 면역학적 정량 분석법은

속도가 빠르고, 쉽게 측정할 수 있는 다양한 키트(kit)가 상업화되고, 경비가 적은 장점 때문에 거의 모든 임상 연구실에서 분석방법의 주종을 이루고 있다(Jaffe & Behrman, 1979; Chard, 1987, 참고문헌 A24).

그러나 방사성 동위원소를 사용하는데 따른 방사선 장애, 방사선 방어수단의 필요성, 방사선 폐기물의 환경오염, 방사성 표지물질 즉 추적자(tracer)의 짧은 반감기 및 방사성 분해(radiolysis) 등의 문제점들이 계속 노출됨에 따라 비방사면역측정법(non-isotopic immunoassay, NIA)의 개발이 요구되었다. 1980년대 이후 NIA 방법이 장족의 발전을 이루어 RIA를 대체할 수 있는 수준에 이르러 제 2세대를 형성하였다(참고문헌 A1-8). 제 2단계 초기에는 항체에 방사선을 표지하여 측정의 질을 높이는 immunoradiometric assay(IRMA)가 1960년대 후반에 개발되었다. 그리고 다음 시기에는 단가 항체를 이용하여 매우 감도가 높은 방법들이 개발되었다.

1980년대부터 개발된 NIA는 효소면역측정법(enzyme immunoassay, EIA; 참고문헌 A9~14, A25~28), 형광면역측정법(fluorescent immunoassay, FIA; 참고문헌 A29~31), 섬광면역측정법(chemiluminescent immunoassay, CIA or LIA; 참고문헌 A32~34), 입자면역측정법(particle immunoassay, PIA), viroimmunoassay(VIA), metalloimmunoassay(MIA), 광분산입자계수측정법(light-scattering immunoassays, LSIA; particle counting immunoassays, PCIA; 참고문헌 A35), biosensor method(참고문헌 A36~40), spin lable immunoassay (SLIA) 등으로 상용화되었다(참고문헌 A16~24). 그리고 이러한 NIA 방법들은 분자생물학적 기법들에 큰 영향을 주어 방사성물질의 사용을 줄이고 비방사성 물질 특히 chemiluminescent dye 또는 europium 등 lanthanide 계열의 물질 등이 대안으로 등장하였다.(많은 책들과 주요 논문집에서 각각 특성에 따른 방법별로 정리됨: 참고문헌 A8~40). 특히 EIA와 time resolved fluorescent immunoassay(TRFIA)가 1980년대 후반부터 개발되어 호르몬 및 생체 물질의 측정과 개발 연구의 주종을 이루었다.

제 3세대의 NIA는 한 시료 내에서 다양한 호르몬의 측정을 시도하는 microspot, multianalyte radiometric immunoassay(MMRIA)가 Ekins 연구팀(1989, 참고문헌 A40; 1991)에 의해 보고되었다. 이 microspot assay는 꾸준한 발전을 해왔고, 분자생물학적 기법들에서 이미 많이 다루어져, 이미 호르몬의 측정법 개발에 역류해 오고 있고, 2000년대 측정법의 개발 연구의 주종을 이루고 있다. 즉 단가 항체 기술(Kohler & Milstein, 1975)과 항체조작기술의 발달, oligonucleotide microarray technology의 방법들이 원용되면서

다양한 호르몬들의 동시 측정이 이루어지고 있다(Ekins, 1989, 참고문헌 A40; Ekins, 1998). 이로써 높은 특이성, 높은 측정 감도, 측정 시간과 과정의 단축 등 혁신적 전환을 이룰 것이라 기대된다. 그러나 개발 시간, 개발 비용이 많이 들고, 측정기기 및 signal의 분석과 고성능의 컴퓨터 요구성 등등이 장애 요인이 되고 있다. 그러나 miniaturized microassay technology(MMT)는 이미 transfusion blood screening, allergy testing 등에 잘 이용되어 차세대의 주 측정방법이 될 가능성이 매우 높다.

본 종설에서는 우선 최근의 면역학적 측정법의 변화를 분석하고, 연구방법으로서의 장·단점을 제시하고 또한 분석방법을 요약 정리하고자 한다. 그 다음 제 3세대의 새로운 측정방법을 소개하고자 한다. 이들 방법의 논문들이 매우 많아 우선 참고할 수 있고 손쉽게 읽을 수 있는 서적을 중심으로 열거하였다. 여기서 인용된 논문이 반드시 중요 논문이 아님을 밝혀두고, 가능한 한 논문의 열거를 줄이고자하여 그 중요도에 이견이 있을 수 있음을 밝혀둔다. 그리고 국내외의 임상 연구와 기초 의학 연구자들이 대처해야 할 문제점을 도출하고자 하였다.

면역측정법의 구성과 명칭(Immunoassay Systems and Nomenclature)

면역측정법은 1) 특이성이 높은 항체, 2) 측정 시료와 순도가 같은 표준 시약, 3) 추적자로 표지된 항원으로 구성된다. 대부분의 면역학적 측정법에서 경쟁적 또는 길항적 결합을 일으키기 위하여 정해진 양의 항체를 이용하는 “limited reagent method”와 항체를 과량 사용하여 비길항적으로 포화시키는 reagent excess method로 구분한다(Ekins, 1960; Yalow & Berson, 1960; Wide *et al.*, 1967). 면역학적 측정법의 명칭은 측정 방법이 다양하게 개발되면서, 약간씩의 차이를 가지게 되었으며, 지나치게 자기 방법의 선전 및 상업화에 치중하여 각종 명칭이 사용되고 있다. 그러나 길항적 측정법의 명칭을 단순화시키면, 항체 이용 시에 사용하는 추적자의 종류(예, radio or enzyme)+면역항체(immuno)+측정법(assay)으로 구성되어 RIA, EIA 등이 사용된다. 수용체를 사용할 때는 추적자+수용체(receptor)+측정법(assay)으로 RRA로 사용하고, 분석방법 개발 초기에 혈액 내의 결합단백질을 이용하던 길항적 단백질결합측정법(competitive protein-binding assay, CPA)은 추적자+운반체(transin)+측정법(assay)으로 명칭을 사용하고 있다. 특히 추적자로서 방사성 동위원소 사용 시에는 RIA, 방사수용체법(radioreceptorassay, RRA), 방사운반체측정법(radiotransinassay, RTA) 등으로 사용하고 있다.

한편 비길항적 포화방법은 추적자를 중간에 넣어 사용하고 있다. 즉 면역방사측정법(immunospectrometric assay, IRMA), 면역형광측정법(immunofluorometric assay, IFMA), 면역효소측정법(immunoenzymometric assay, IEMA) 등으로 사용하고 있다(Freitag *et al.*, 1984). 그러나 때로는 항체에 추적자를 결합시켜 사용하는 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)의 경우에는 EIA와 IEMA에 모두 사용함으로써 명칭으로 인한 방법론의 이해에 혼동을 주고 있다.

면역측정법의 구성 시약(Immunoassay Reagents)

면역측정법(immunoassay methodology)에서 사용하는 주요 구성은 결합단백질(항체, 수용체, 결합단백질), 추적자, 그리고 결합형과 유리형을 분리하는 시약 등이다.

1. 결합단백질

주요 결합단백질과 그 기원을 Table 2에 나타내었다.

1) 생체 내 결합단백질: 면역 글로불린이 아닌 결합단백질은 코티졸 결합단백질(cortisol-binding protein, CBP), 수용체, 렉틴(lectin) 등이다. 최근에는 이들을 거의 사용되지 않고, 면역글로불린 G(immunoglobulin G, IgG)를 주로 결합단백질로 사용한다. IgG는 다양하고, 역가가 높으며 매우 안정된 구조를 가지고 있고, 추출이 쉬우며 구조가 잘 알려졌다. 또 다량으로 생산되어 시판되고 있어 이용하기 쉽다.

Table 2. Binding proteins used in immunoassays and related assays

Binding protein type or class	Source
<i>Binding proteins</i>	
Avidin	Chicken egg whites
B12 intrinsic factor	Porcine gastric mucosa
Lectin	Lotus tetragynolobus
Transcortin	Equine
<i>Immunoglobulins</i>	
IgG polyclonal	Rabbit, Chicken egg yolk
IgG, F(ab') ₂	Rabbit
IgG, Fab'	Rabbit
IgG monoclonal	Mouse, Rat
IgM monoclonal	Mouse
<i>Receptors</i>	
Acyl-D-alanyl-D-alanine (binds vancomycin class antibiotics)	(synthetic)
Receptor to γ -aminobutyric acid	Rat brain membrane
Receptor to 1,25-dihydroxyvitamin D	Calf thymus

IgG는 항원성이 약하거나, 거의 없는 150kDa 이상 분자량의 단백질에 대하여도 운반 단백질을 결합시켜 항체를 생산하기도 한다.

2) 다가 항체(polyclonal antibody, PcAb): 1980년 이후 주로 사용되는 1차 면역항체를 구분하여 Fig. 1에 나타내었다. 1980년대 초에는 거의 대부분 다가 항체를 사용하였으나, 1990년대에는 약 60% 이상이 단가 항체를 사용하고 있다. 다가 항체 생산에는 주로 토끼를 사용하고 있다. 많은 키트 공급 회사들이 아직도 염소나 양을 사용하여 항체를 생산하며, 기니 피그(guinea pig), 사람, 말, 소, 돼지 등을 사용하는 경우는 이제 거의 없다. 새 종류의 다가 항체 생산은 아직도 유용한데, 비교적 순수한 특이성이 높은 항체가 난황에 축적되어 다량 생산이 가능하기 때문이다.

항체의 특성과 질을 평가하는 방법으로 몇 가지 특성이 이용된다. 첫째로 항체의 역가는 정해진 양의 표지물질과 50% 결합하는 항혈청의 희석도를 말한다. 항혈청의 종류, 반응조건, 반응 용액량, 완충액, 온도, 반응시간, 결합형과 유리형의 분리방법 등을 조정하여 표준화시켜 사용한다. 항체의 역가는 항체의 농도를 의미하며, 면역측정법의 개발에 높은 역가의 항체가 좋다. 항체의 결합력(avidity)은 면역측정법의 정밀도 및 측정한계의 지표가 되며, 좋은 면역 측정법의 확립을 위해서는 높은 결합력, 즉 해리되지 않는 힘이 필요하다. 항체의 친화력이 높은 것은 항원과 항체가 평형상태에서 결합하고 분리되는 힘이 강한 것을 의미한다. 일반적으로 결합력을 친화력 상수로 이용하여 사용한다.

3) 단가 항체(monoclonal antibody, McAb): McAb의

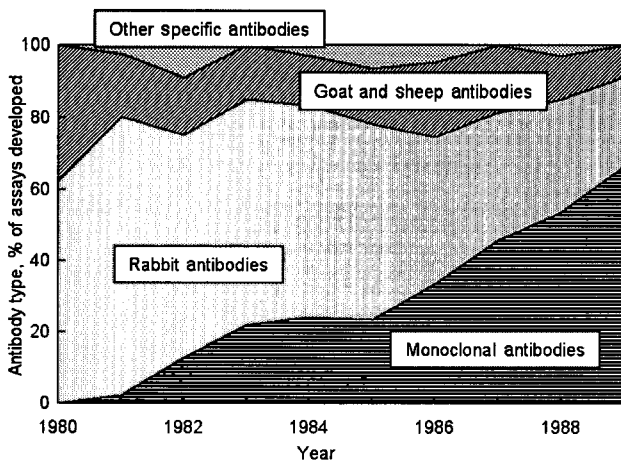


Fig. 1. Trends in new immunoassays regarding use of monoclonal antibodies and polyclonal antibodies raised in different species.

생산에는 hybridoma technology가 사용된다(Miles & Hales, 1968a, b; Samoilovich *et al.*, 1987; Birch & Lennox, 1995). 단가 항체의 생산과 보급은 크게 늘었으며, 상호교차도 역시 크게 개선되고 있다. 두 개의 항체를 생산하는 hybridoma line을 융합시켜 만든 bispecific McAb, anti-idiotypic antibody 등 특이한 항체, 두 종의 교잡항체(interspecific chimeric antibody)들은 hybridoma technology에 의해서만 가능함으로 최근에는 McAb 생산이 주를 이루고 있다. 최근 recombinant DNA technology가 크게 발달하여, 단구역 항체(single-domain Ab), Fab-like protein, hybrid protein, Ag-binding site와 특이한 효소 활성도를 동시에 갖고 있는 hybrid protein 등의 항체 생산이 가능하게 되었다(Aguila *et al.*, 1986; Moore, 1989; Gosling, 1990). 단가 항체를 생산하는 동물로는 생쥐와 생쥐의 암세포 주가 사용되고 있으나, 흰쥐를 사용하기도 한다(Bazin *et al.*, 1984; Hirano *et al.*, 1989). 때로는 이종간에 사용되기도 하는데 이미 reterohybridoma cell line(양×생쥐)을 antibody-producing mortal cell과 역융합시켜 만든 McAb도 매우 높은 효용성이 있는 것으로 알려지고 있다(Groves *et al.*, 1987).

4) 항체 절편 및 복합체(antibody fragments and complex): Ig들은 보체와 Fc 결합을 하고, 식세포 Fc 수용체, 포도상구균 단백질 A(staphylococcal protein A), 박테리아 등과 Fc 부위가 결합하며, 류마티스 인자와 결합하는 기능이 다양한 단백질이다. IgG의 이런 특성을 면역측정법에 이용하여 Fc binding site를 immobilization하여 사용하고 있다. 또 Ishikawa 등(1989)은 Fab의 free SH기에 maleimide를 이용하여 효소를 부착시켜 특이반응을 크게 높여, 비특이적 반응을 감소시킴으로서 0.02amole/tube의 고감도 측정방법을 개발하였다. 최근에 papain-free F(ab')₂나 Fab' fragment를 사용하는 기법이 쓰이고 있다(Boguslawski *et al.*, 1989).

5) 수용체 단백질: 항체 대신으로 사용하는 단백질들은 연구용으로 많이 개발되었다. lectin-antibody sandwich IA는 haptoglobulin이나 α -fetoprotein의 여러 가지 glycosylated form의 측정에 이용된다. Oncomycin들은 박테리아의 acyl-D-alanyl-D-alanine과 결합함으로써 길항적 수용체 측정법, 또 수용체-항체 샌드위치측정법으로 개발하여 사용하고 있다. 또, 소의 흉선에서 얻은 1,25-dihydroxy vitamin D 수용체는 스테롤의 측정에 이용되고, 쥐의 뇌에서 뽑은 막 성분은 뇌척수액의 γ -aminobutyric acid(GABA)의 측정에 사용된다.

1960~1970년경에 개발된 corticosteroid-binding globulin 등은 아직도 cortisol의 측정에 이용되고 있다. 특히 이들은 생물학적으로 의미성이 있는 작용부위의 조직 내 단백질을 사용함으로 생물학적 효용도 측정에 좋은 결과를 내고 있다.

2. 추적자(labels)

면역측정법에서 추적자로 사용되는 물질들을 Table 3에 요약하였다. 어떤 추적자를 사용하는가는 특이도, 표지방법의 이용성, endpoint determination의 용이, 생물학적 유해, 측정방법으로 개발 용이성, 또는 생체 내 간섭물질의 영향은 없는가 등에 따라 좌우된다.

1) 측정의 특이도(specific activity): 추적자로 이용하는데 중요하게 고려할 사항은 측정의 특이성을 높여서 측정의 한계를 최대한 낮추는 것이다. 그러므로 측정 주요 분획, 증폭 용이성, 또는 측정 효율이 높은가에 따라 적절한 추적자가 사용되어 왔다. 최근 추적자로 사용되는 물질이 10가지 이상 되고 있다(Table 3). 이들은 1) 방사성 동위원소(radioisotopes); ^{125}I (1 detectable unit/sec/ 7.5×10^6 labeled molecule), 2) 효소(spec. act. amplification factor에 의존), 3) 형광물질(many detectable unit/labeled molecule), 4) 리간드, 5) 섬광

Table 3. Development of non-isotopic immunoassays(NIA)

Assay method	Labelling substance
<i>Enzyme immunoassay(EIA)</i>	
<i>Enzymes:</i> Alkaline phosphatase; β -D-Galactosidase; Glucose-6-phosphate dehydrogenase; Horseradish peroxidase; β -Lactamase; Melittin, Urease	
<i>Enzyme related</i> Cholinesterase inhibitor; FAD prosthetic group, β -D-Galactosidase fragment	
<i>Fluorescent immunoassay(FIA) and Time-resolved(TRFIA)</i>	
<i>FIA:</i> Coumarin derivative, Fluorescein, Phycoerythrin	
<i>TRFIA:</i> Europium(Eu^{3+}), Eu^{3+} chelator; Samarium(Sm^{3+}); Terbium(Tb^{3+})	
<i>Luminescent immunoassay(LLA or CIA):</i> Acridinium ester, Isoluminol derivatives	
<i>Particle immunoassay(PIA):</i> Latex; Stained bacteria	
<i>Radioisotopic immunoassay(RIA or IRMA):</i> ^{57}Co ; ^{125}I	
<i>Vesicle immunoassay(VPIA)</i>	
<i>Bioluminescence immunoassay(BIA)</i>	
<i>Metallo-immunoassay(MIA)</i>	
<i>Viroimmunoimmunoassay(VIA)</i>	
<i>Particle counting immunoassay(PCIA)</i>	
<i>Chemiluminescent immunoassay(LIA)</i>	
<i>Spin lable immunoassays</i>	

물질(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.

효소는 측정효율이 떨어지나 응용면에서 우수하고, 형광 물질은 측정하기 쉽고, 또 시그널을 증폭하기 쉽다. 화학적 광물질은 단 한번만 측정이 되고, 측정 효율도 매우 낮으나, 측정이 매우 용이하여 방사성 동위원소의 대체 물질로 널리 쓰이고 있다. 예를 들어, isoluminol의 chemiluminescent photoefficiency는 거대 단백질 분자에 추적자로 부착시키면 측정 효율이 매우 떨어진다. 그러나 acridinium ester는 고도의 섬광감도를 유지할 수 있고, Eu^{3+} 나 lanthanide ion chelator 등은 time-resolved fluorescent IA(TR-FIA)로 크게 각광받고 있다. 그러나 이들 lanthanide계 물질이 생체에 미치는 영향을 알 수 없고, 이들이 실험실에 오염되면 제거하기 힘들고, 일반적인 측정기기를 사용할 수 없는 문제점을 가지고 있다(Hammila, 1985, 참고문헌 A30; Diamandis, 1988, 참고문헌 A31). 일반적으로 Non-isotopic immunoassay(NIA)는 방사선 장해를 줄일 수 있고, 측정기기가 대체로 얇고, 표지된 리간드가 화학적으로 안정하며, 자동화할 수 있는 가능성이 있으나 아직까지는 단점도 많다. 즉 감도가 높지 않고, 생물학적 검체의 간섭이 많고, 또 특이도가 떨어지고, 정도 관리(quality control, QC)가 어려운 단점들도 많아 지속적인 개선 노력이 이루어지고 있다.

Fig. 2는 1980년대 추적자로 사용되는 물질의 사용빈도 변화와 아울러 효소면역측정법에 사용되는 효소의 사용빈도 변화를 보여주고 있다. 1960~1980년대 초 방사성동위원소는 약 60%가 이용되었으나, 1990년대에는 약 25% 이하로 줄었다. RIA와 IRMA에서 RI의 사용은 방사선 붕괴이론이 잘 정립되어 ^{125}I 의 감마카운터가 주로 사용되어 왔다. 형광이나 섬광 추적자는 약 5~15% 정도 사용되어 왔으나 최근 lanthanide ion-chelator, acridinium ester가 EIA와 접목되어 측정감도를 높임으로서 25~35% 선을 유지하며, 1990년대에는 크게 신장되고 있다.

2) 효소: EIA에 사용할 효소의 선택에는 1) 효소의 turnover number, 2) 효소의 순수도, 3) 검체에서의 간접 효과가 없는 것, 4) 결합 시 유리한 작용기의 분포, 5) 측정감도가 높은 것, 6) 효소의 값이 싼 것, 7) homogeneous assay에 이용하기 쉬운 것 등이 고려 대상이 된다(Tijssen, 1985, 참고문헌 A23). 한편 추적자로 이용되는 효소는 horseradish peroxidase(hrPOX)가 50% 선을 넘고 있고 alkaline phosphatase(alkP)가 약 25% 선을 넘게 사용되고 있다. POX가 많이 사

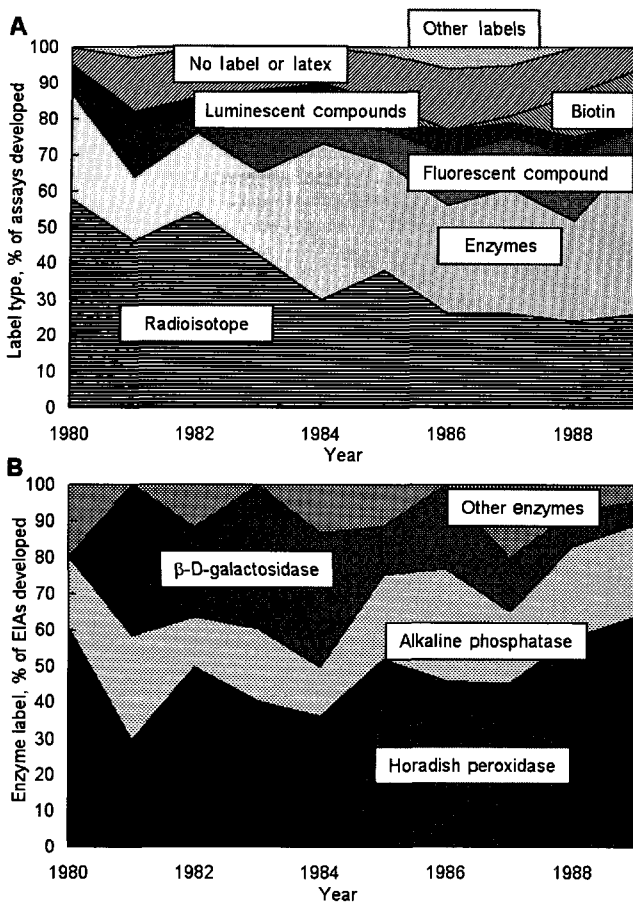


Fig. 2. Trends over the past decade with respect to the use of different labels in new immunoassays: (A) the five most important types of labeling substances as well as other labels and "no label" or latex assays (nephelometric, turbidometric, latex agglutination, and particle-counting assays); (B) the three major enzymes used for labeling.

용되는 이유는 turnover number가 높고, 여러 가지 감도가 높은 방법으로 개발할 수 있으며, 이를 부착시키기 용이할 뿐만 아니라, AlkP가 100k~500kDa의 큰 분자량인데 비해 peroxidase는 40kDa의 작은 단백질이기 때문이다.

효소면역측정법은 혈장이나, 타액, 양수, 소변 등 생물학적 시료에서 분자량이 작은 호르몬이나 생리활성물질, 의약품 대사물 측정 등에 이용할 때 문제점이 야기될 수 있는 단점이 있다. 즉 방사성 동위원소 대신 분자량이 큰 효소를 사용함으로써, bridge effect, steric hindrance 등으로 인하여 리간드-항체 결합을 저해할 수 있다. 또한 결합시킨 효소의 활성도가 변하거나, 항체 결합능력이 변형될 수 있다. 그리고 생체 내 물질이 효소의 작용을 억제하거나 촉진시켜 비특이적 반응을 높이는 경우가 많다. 아울러 효소와 기질의 반응을 종결시켜 반응생성물을 일정하게 유지시키는 방법의

정립이 어렵다. 측정방법 개발 시에도 항체와 결합한 결합형과 유리형의 분리가 어려운 단점이 있다.

그러나 EIA의 단점을 극복시키기 위하여 1) 리간드에 효소를 부착시키는 방법이 크게 향상되고 있고, 2) 활성도가 높고 안정적 구조를 가지는 효소를 찾고 있으며, 3) EIA를 자동화하기 위한 노력, 그리고 dip-stick처럼 야외에서 특별한 측정기기 없이 측정하는 방법에 EIA 원리가 사용되고 있다. 아울러 FIA, LIA 등 비방사성 시그널과 biotin-streptavidin과의 동시 사용으로 크게 측정의 질이 향상되고 있다(참고문헌 A25~28).

3) 효소활성의 증폭측정법(amplification methods of enzymic assays): 다양한 효소가 추적자로 이용되어 왔다(Fig. 2). 대부분 비색계(colorimetry)가 signal로 수치화되는 범위가 좁아 측정감도가 매우 낮다. 그러나 형광분석기, 섬광분석기를 사용하면 정밀하고 감도가 높은 측정방법이 개발될 수 있다. 예로, 비색계를 사용시 POX는 25amol, β-galactosidase(β-gal)는 1,000amol, alkP는 10,000amol을 측정할 수 있으나, 형광분석기를 사용시 0.2, 5, 10amol 측정이 가능해진다. 비색계를 사용할 때에도 효소활성도를 증폭시키면, 예를 들어 alkP에 NADP⁺를 사용 시 충분한 양의 탈수소효소(dehydrogenase, DH)를 첨가하면 생산된 NAD⁺의 측정감도는 thyrotropin의 경우 1.3μIU(2.46amol)까지 측정이 가능해진다(참고문헌 A25~28).

4) 간접표지법(indirect labeling): 1차 특이항체를 사용하지 않고 제 2차 항체에 표지하여 사용하는 경우를 들 수 있다. 분석물질 또는 호르몬을 지지체에 부착시킨 양의 항체(SAb)와 결합시키고 다시 토끼의 항체(RAb)로 재결합(sp SAb-Ag-RAb)시킨 후, 토끼의 IgG와 Fc부위에 대한 염소의 항체(GAb)를 표지하여 반응시킨다(sp-SAb-Ag-RAb-GAb-¹²⁵I). 또는 sp-Ab-hPTH(1-84)-Ab-hPTH(53-84)-¹²⁵I 결합 등 1차 또는 2차 표지항체를 이용하여 sandwich 방법으로 개발함으로써 측정의 질을 높이고 있다(Blind *et al.*, 1987). 최근 가장 주목할 만한 발전은 리간드 또는 항체에 biotin을 결합시키고 표지된 avidin이나 streptavidin을 사용하는 기법이 크게 발달하였다(Brien & Stewart, 1986; Reis *et al.*, 1988). Streptavidin은 낮은 pI(5.5~6.5)를 가지고 glycosylation되지 않아 비특이성 결합이 적어 측정법의 질을 높이는 데 주로 이용된다(Guesdon *et al.*, 1979). 또 biotin을 단백질에 부착시킬 때 sulfosuccinidyl 6-(biotin-amido)-hexanoate 등을 이용하여 쉽게 결합시킬 수 있으며 biotin에 대한

항체에 추적자를 붙이면 우수한 측정법을 개발할 수 있다. 이 방법은 전술한 바와 같이 EIA와 혼합사용으로 측정의 질을 크게 높이고 있다.

5) 형광물질: 형광물질, 즉 fluorescent isothiocyanate (FTC), rhodamine, umbelliferon 등을 추적자로 사용하여 형광분석기로 측정한다. 효소를 추적자로 결합시킨 FTC항체를 사용하거나, bispecific McAb를 이용하여 FTC와 hrPOX를 양쪽에 부착시키기도 한다(Karawajew *et al.*, 1988). 형광면역측정법(FIA)에 사용되는 형광은 자연섬광 또는 발광(luminescence, L)의 한 종류이다. 통칭하의 섬광은 전기적 여기상태에서 에너지 발산으로 빛이 생기는 현상으로 에너지원에 따라 여러 가지로 나뉜다. 즉 방사선(β 또는 γ 선)에 의해 여기되는 방사성 섬광(radio-L), 화학반응에 의한 화학섬광(chemi-L), 생체계의 효소에 의한 생물섬광(bio-L), 열에 의한 열섬광(thermal-L), neon 빛 등과 같은 전기섬광(electro-L), 적외선·가시광선 또는 자외선에 의해 광양자 여기에서 오는 형광(short-life time emission) 또는 광섬광(photo-L , long-life time emission) 등이 있으나, 화학, 생물섬광이 면역측정법에 주로 사용되고 있다. FIA 역시 생물의 검체 안에는 형광 시그널을 증폭시키거나 또는 간섭하는 물질이 많아 사용에 제약을 받는다. 이러한 문제점을 개선하기 위한 노력이 많이 진행되고 있으며 생체액 내 1ng/ml 이하의 호르몬 등 측정에 유용하게 사용하고 있다. 측정의 감도를 높이기 위하여 형광물질의 간섭을 없애려고 노력하고 있다. 또한 생체 내 형광물질보다 훨씬 더 형광의 시간을 연장시켜 구분하여, time-resolved FIA(TRFIA)가 개발되어 사용되고 있다.

6) 화학섬광물질 및 자연섬광물질(chemiluminescent and bioluminescent tracers): 최근 luminol, isoluminol, amino butyl- ethyl isoluminol(ABEI) 등 많은 화학섬광 추적자가 합성되어 왔다. 최근 20 여년간 섬광 또는 발광원리가 밝혀지고, 섬광면역측정법(CIA or LIA 또는 bioluminescent IA, BIA) 방법들이 개발(참고문헌 A32~34)되어 RIA를 대체할 수 있는 정도로 발전되었고, 실제로 상업화되었다. 그러나 화학섬광측정 시, 물 등에 섬광을 일으키는 물질이 존재하고, 완충액이나 생체의 검체에 섬광을 간섭하는 물질이 존재하는 것도 알려지고 있다. 또 섬광을 일으킬 때 첨가하는 hydrogen peroxide 등의 주입 및 혼합의 문제점, 측정 시 섬광의 보호, 효율 등의 문제점 등이 노출되었다. 그리고 생체 내 단백질성 물질의 측정에서 간섭효과가 크다는 것이 알려져 왔다. 이러한 문제점은 최근 많은 회사

들의 상업화 노력에 따라 매우 개선되고 있다.

7) 기타: 고형물질, 합성 vesicle을 1차 표지 항체로 이용하기도 한다. 최근에는 이러한 방법들이 널리 사용되지 않는다 하더라도 연구할 가치는 충분하다. 예를 들어 slide pregnancy test 등 latex particle을 이용한 방법 등이다. Particle counting immunoassay(PACIA)는 polystyrene latex particle을 이용하여 리간드나 항체를 부착시켜 사용하는 방법으로, hCG, α -fetoprotein, thyroxine 등의 측정에 사용되며, 자동화가 가능하여 생체에 다량으로 존재하는 물질의 측정에 용이하게 이용된다. Sol particle로 gold or silver sol를 이용한 sol particle immunoassay(SPLA) 등도 개발되어 있다. 여기에 원자 흡수 스펙트로메타(atomic absorption spectrometer, AAS)를 이용하여 측정의 감도를 높이고 있다. 또한 bacteriophage를 이용하여 ligand-bacteriophage를 결합시키고 이들이 바이러스에 의해 용해되지 않으므로 plague를 형성하는 원리를 이용한 VIA, iron, mercury, chromium, gold 등의 metal을 추적자로 사용하고 AAS로 측정하는 MIA 등도 개발되어 있다. 또 stable free radical을 이용한 SLIA 등 다양한 방법이 개발되었으나 상업적인 효용도는 크게 부각되지 않고 있다.

8) 시그널의 증폭(enhanced method of signal): 최종 시그널의 측정도가 높은 물질을 이용하는데, 최종복합체(sp-Ab-Ag-biotin-streptavidin)에 acridinium ester를 부착시키면 서너배의 높은 시그널을 얻게 된다. 여기에 biotin이 많이 부착된 항체를 만들면 시그널 증폭은 매우 커진다. 즉 sp-Ab-Ag-Ab-(biotin)_n-(streptavidin-[Eu³⁺ chelate]_m)_n을 부착시키면 매우 증폭도가 커져 측정의 질을 높인다. 더욱 증폭시키기 위하여 sp-Ab-Ag-biotin-avidin-(biotin-enzyme)₃ 상태를 만들어 감도를 높이는 기법을 enhanced assay로 명칭한다. 결국 signal을 증폭시켜 감도를 높이고 측정한계를 낮춤으로 측정의 질을 높인다.

9) 측정물질의 유해성: 방사면역측정법에 비하여 비방사면역측정법(NIA)은 방사선 장애는 없지만 다른 위험이 내포되어 있다. 즉 NIA의 표지물질들은 암유발원(carcinogenicity), 또는 기형유발원(teratogenicity), 일반적인 독성(general toxicity) 등을 나타낸다는 점을 유의해야 한다.

3. 결합형과 유리형의 분리용 시약

일반적으로 결합형과 유리형을 분리하는 방법과 여기에

사용되는 물질을 Table 4에 나타내었다. RIA에서 결합형(antibody-bound form)과 유리형(free form)의 분리에는 dextran-coated charcoal(DCC)로 유리형을 흡착시키거나, 2차 항체를 이용하여 결합형을 침전시키고, 원심분리하는 방법을 써왔다. 이 방법은 경제적인 방법으로 많이 사용되고 있다(Bourque *et al.*, 1986). 그러나 리간드나 항체를 고정 지지체(solid phase, sp-)에 부착시켜 사용하는 방법이 주종을 이루고 있다(Fig. 3). 최근 분리하지 않는 직접측정법(direct or homologous IA, Homa)이 20% 이상으로 증가하는 추세이나, pmol 수준의 측정법에는 70% 이상이 solid phase 방법이 주로 사용되고 있다.

지지체는 최근 많이 개발되어 1차 또는 2차 항체를 tube나 microcellulose particle(microbead)에 부착시킨 방법이 주종을 이루었으나, 원심분리를 해야 함으로 최근 사용이 줄고 있다. Magnetized microbead는 1990년대 발달되었으나, 원심분리를 사용하지 않는 반면 자석을 사용함으로 실험실의 컴퓨터 사용에 제한을 주어 사용이 떨어지고 있다. 시험관에 부착시키는 방법도 근래에는 크게 줄고 있다. 가장 많이 발달한 방법은 96-well microtitre를 이용하는 방법이다(Schwarz *et al.*, 1985). 1980년 초에는 약 15%의 측정법이 이용하였으나 1990년에는 80%에 이르고 있다. 최근에 항체를 plastic 구형 입자나 봉상형에 부착시키는 방법이 약 5% 이상 늘고 있으며, 매우 유용한 방법으로 평가 받고 있다. 또한 항체를 막에 부착시켜 사용하는 방법은 field assay 또는 환자가 집

Table 4. Some separation methods and used reagent/solidphase

Liquid-phase adsorption

Anion resin; Dextran-coated charcoal; Florisil

Liquid-phase precipitation

Ammonium sulfate; Polyethylene glycol; Second antibody; Second antibody with polyethylene glycol

Solid-phase adsorption

Glass fiber membrane; Glass fiber membrane-latex; Large bead; Tube; Microtiter plate; Microtiter plate-antigen/hapten; Nylon membrane

Solid-phase indirect: adsorption

Biotin-antibody; Solid phase-avidin; FITC-antibody, Solid phase-anti-FITC; Microtiter plate-second antibody

Solid-phase precipitation: Magnetizable bead-antibody

Microbeads-antibody; Microbeads-second antibody; *S. aureus* protein A

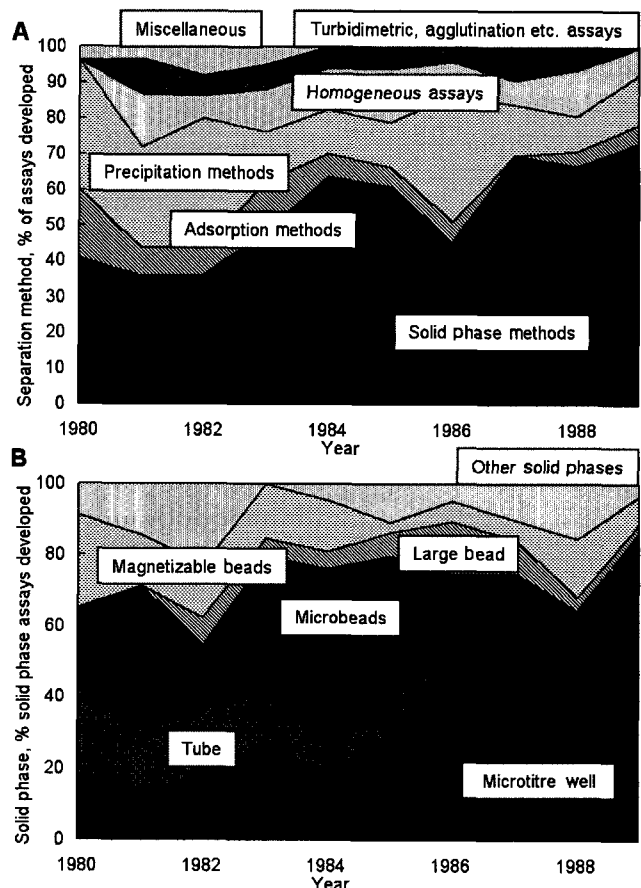


Fig. 3. Trends over the past decade with respect to the use of different separation methods or no separation step (homogeneous turbidimetric assays, etc.) in new immunoassays: (A) all separation methods; (B) all solid-phase separation methods.

에서 직접 측정할 수 있는 가정용 측정법의 개발에 사용될 가능성이 많아 매우 중요한 방법이 될 것으로 기대된다.

1980년대 개발된 면역측정법의 종류

면역측정법을 구분하는 주요 기준은 몇 가지로 요약된다.

1) 항체를 일정량 정해진 만큼만 사용하는가 또는 과량을 사용하는가, 2) 추적자를 항체에 부착시켰는가 또는 항원 즉 표지물질에 부착시켰는가, 3) 반응종결을 측정하는가, 4) 항체와 결합한 결합형과 유리형을 분리하는가 안 하는가 등에 의한 구분이다(Gosling, 1990).

결합형과 유리형을 분리하는 기법(heterogeneous assay system, Heta)은 통상적인 면역측정법에서 사용되고 있으며, 이로 인하여 측정시간이 길어지고, 분리용 원심분리기가 구비되어야 하고, 자동화가 어려워진다. 또한 측정 오차가 많이 생기게 된다. 반면 측정 시간을 단축하고 자동화하기 위

하여 분리하지 않고 측정하는 방법을 homogeneous assay (Homa) system이라 한다. 이 비분리측정법은 추적자-항원 및 항체가 결합하였을 때, 추적자 시그날이 변화하며 결합형만이 측정되도록 만든 기술이다. 이것으로 간단하고, 빠르고, 보다 정확하며, 자동화가 가능해져 직접측정법 개발이 가능해진다. 그러나 측정범위가 nmol/L~μmol/L로서 생체 내 비교적 다량의 분석물질이 존재할 때, 즉 치료용 약품의 모니터링 등에 이용하고 있으나 정확한 정량 시에는 사용이 어려운 단점이 있다.

Gosling(1990)은 측정법을 6 가지로 구분하였다(Table 5).

1) 제 1군 측정법 : 항원이나 합텐, 즉 분석물질을 표지물질로 만들어 사용하는 경우로 RIA 방법과 동일한 원리를 이용한다. 이 방법은 항체의 양을 일정하게 정하고, 표준물질과 표지물질이 길항적으로 결합하게 한다. 이때 표준물질과 표지물질은 화학적으로 동일하게 항체에 결합한다고 가정하였으나, 표지물질을 만들 때 요오드(*radioiodine*), 형광물질, 섬광물질, 효소 등 추적자를 표준물질에 연결물질(*linker*) 등으로 부착시킴으로 항체와의 경쟁적 결합을 저해하는 경우가 많다. 감도 또는 측정한계를 낮추기 위하여 분석물질과 항체 또는 고정지지체에 부착한 항체를 섞은 후에 표지물질을 반응시키고 있다. RIA에서는 방사성 표지물질을 소량 사용하며 측정한계를 낮추고 있다. 항체와 결합한 표지물질 (*Ab-RI* 또는 *sp-Ab-Ag-enzyme*)과 유리형 표지물질(*RI* or *Ag-enzyme*)을 깨끗하게 분리시키는 것이 분석의 질을 높이는 방법이다. 또 측정효율이 높은 추적자를 사용하면 측정한계를 크게 낮출 수 있다. 측정 가능한 최소량은 항체의 친화력에 따라 제한을 받으나, 대부분 1fmol 이하의 분석물질의 측정이 가능하므로 시료 내 농도가 매우 적을 경우 주로 제 1군 측정법을 사용한다.

2) 제 2군 측정법 : 항체에 방사선 물질 또는 추적자를 표

지시킨 후 합텐이나 항원을 경쟁적으로 결합시킨다(*labeled-antibody reagent-limited assay*). 이 방법의 장점은 합텐이나 항원이 완충용액에 잘 용해되지 않을 때 사용할 수 있다는 것이다. 최근 스테로이드 등의 측정에 사용하며 추적자로는 *acridinium ester(AE)*, 또는 Eu^{3+} or Eu^{3+} -chelate를 이용한 방법이 많이 쓰이고 있다(Table 6). 분석물질을 지지체에 부착시켜 일정량의 제한된 양을 사용한다. 일반적으로 분석물질이나 합텐을 단백질, *microtitre well* 표면, 고정체면 등에 부착시킨다. 그리고 *sp-hapten(Ha)-Ab-acridinium ester(bound form)*와 *Ha-Ab-AE(free form)*을 분리하여 측정한다. 이 방법은 순수 분리 정제된 단가 항체나 다가 항체가 손쉽게 얻을 수 있을 때 사용할 수 있다. 이론적인 측정의 한계는 항체의 친화력에 따라 다르다.

3) 제 3군 측정법 : 입자응집면역측정법(*particle agglutination IA*), 입자계수면역측정법(*particle-counting IA*), 혼탁도면역측정법(*turbidimetric IA*) 또는 비탁도면역측정법

Table 6. Immunoassays(IA) arranged in groups with labelled-antibody reagent limited assays(group 2)

Assay name	Acronym	Labels used	Analytes
Chemiluminescent-labeled-antibody IA		Chemiluminescent	Unrestricted
"Enzyme-linked immunosorbent assay"	ELISA	Enzymes	Unrestricted
"FluoroIA"	FIA	Fluorescent	Unrestricted

Advantages: Labelled Ag or Ab with undesirable properties may be avoided(ex. acridinium, Europium or its chelates etc). Disadvantages: immobilized present in constant, limited amount in vessel. System: analyte conjugated to protein, using to coat on the surface of microtitre well or alternative solid phase(ex. *sp-Ha-Ab-acridinium*). Group 2 IAs work well with highly purified McAb or affinity-purified PcAb.

Table 5. Immunoassay(IA) by labeling methods(group 1)

Assay name	Acronym	Labels used	Analytes
ChemiluminoIA	CLIA	Chemiluminescent	Unrestricted
EnzymoIA	EIA	Enzymes	Unrestricted
FluoroIA	FIA	Fluorescent	Unrestricted
Liposome-entrapped dye IA		Vesicles+sulforhodamine B	Digoxin
RadiolA	RIA	Radioisotopes	Unrestricted

Group 1 includes IAs of antigens or haptens. Characteristics: 1) labelled analytes; 2) limited concentrations of antibodies. To lower the detection limits, high-specific-activity label tracers were added after Ag or Ab added. Detection limits: <1fmol of hormones.

(nephelometric IA), 침전면역측정법(precipitation IA) 등을 들 수 있다. 일반적으로 반응 후 면역복합체 $[Ab-Ag]_n$ 또는 $[Ab-Ag]_n$ 를 정량하는 방법으로 추적자를 결합시키기 어려운 경우에 이용된다(Table 7). 고전적 액상면역침전측정법(liquid-phase immunoprecipitation assay)의 경우 항원-항체 복합물의 무게를 측정하거나, 단백질을 정량하여 사용하였고, 면역확산법이나 면역전기영동법 등에서처럼 겔 상에서 침전시켜 측정한다. 조금 더 발달된 방법으로는 항원-항체 복합체를 비탁계나 혼탁계로 측정하는 방법을 써 왔다(Butt, 1984, 참고문헌 A3; Collins, 1988, 참고문헌 A16). 일반적으로 PcAb 또는 McAb 혼탁액을 사용하여 왔으며 항원-항체 복합체를 침전시키기 위하여 polyethylene glycol(PEG) 4000, PEG 6000, PEG 8000을 사용한다. 또 복합체가 최대로 형성되는 양, 복합체 결합률이 최대일 때를 측정하여 정량하기도 한다. 최근에는 자동비탁계(automatic nephelometer)를 이용하여 혈청 및 소변 내 단백질 측정시 $10^{-4}g/L(10^{-8}mol/L)$ 까지 측정된다. 최근에는 항체나 항원을 소형입자(예, latex particle), inorganic colloidal particle, 적혈구 등에 부착시켜 응집, 입자 계수(PACIA)로 개발하여 사용하고 있다. 그러므로 야외에서 특수한 장비가 없이 정성적인 방법으로(임신 진단 및 배란 진단을 할 경우) latex agglutination

test를 사용하고 있으며, 비탁계나 혼탁도계를 이용하면 $10^{-7}g/L(10^{-11}mol/L)$ 수준의 특수 단백질이나 합텐의 반정량적 측정이 가능하다. 입자계수면역측정법 등에서는 특수한 크기의 입자만 측정하는 자동화 장치가 개발되었다. 이때 항체를 $F(ab)_2'$ 절편으로 분리하여 사용하면 비특이적 간섭을 줄일 수 있다. 특히 갑상선자극호르몬을 PACIA로 측정하면 $30\mu IU/L(ca 2 \times 10^{-13}mol/L)$ 의 농도 측정이 가능하다(Wilkins *et al.*, 1988). 최근에는 반정량적 RIA로 autoradiographic immunoassay (ARIA)가 선보이기도 하였다. 즉 항원-항체(sp-Ag-Ab- tracer(RI)) 반응 후 항체에 부착된 방사선을 감광시켜 반정량적으로 사용하던 방법이 야외용으로 임신 진단이나 배란기 측정에 바로 사용할 수 있도록 추적자에 화학섬광 또는 자연섬광 추적자를 부착시키고 감광기로 폴라로이드 필름을 사용하여 즉석에서 검정하는 방법 등이 주목을 받고 있다.

4) 제 4군 측정법 : 이 방법은 주 시약 중 하나를 과량으로 사용한다. 즉 샌드위치 측정법으로 불리는 IRMA, IFMA, ICMA와 대부분의 ELISA 방법들이다(Table 8). 이들은 항체의 친화력이 약한 경우에도 사용할 수 있는 장점이 있으므로 측정 시그널/간섭(noise)의 비율을 크게 높여 매우 낮은

Table 7. Immunoassays(IA) for direct detections of immune complex(group 3)

Assay name	Acronym	Lable used	Analyte(antigen)
Immunonephelometric		None	Large
Immunoturbidimetric		None	Large
Latex agglutination test	LAT	Colored latex particles	Large
Particle counting	PACIA	Estapor K150 particles	Large & haptens
Particle-enhanced turbidimetric inhibition	PETINIA	Latex particles	Large

System : 1) Direct detection of immune complex, 2) Lack of any labelled tracers by weighing, protein assays, immunodiffusion, immunoelectrophoresis, nephrometric, and turbidimetric detection, 3) Requirement of special automated instruments, 4) Ag or Ab labeled by small particle; latex or colloidal particle, RBC etc. Disadvantages: 1) Unsuitable for the quantitation of haptens, 2) Limited range and requirement of control. 3) Underestimation caused by antigen excess. Detection limits: $10^{-4}g/L(10^{-8}mol/L)$, PACIA; $30\mu IU/L$.

Table 8. Some important immunoassays(IA) with reagent excess(group 4)

Assay name	Acronym	Labels used	Analytes
Affinity-column-mediated IEMA	ACMIA	β -Galactosidase	Digoxin
Enzyme-linked immunosorbent A	ELISA	Enzymes	Large antigens
Immunochemi-luminometric A	ICLMA	Chemiluminescent	Large antigens
Immunofluoro-metric A	IFMA	Fluorescent	Large antigens
Immumunoradio metric A	IRMA	^{125}I	Large antigens

Systems: Including two-site sandwich assays: 1) Use of excess reagents. 2) Not lead to high NSB. 3) Degradation of assay specificity, 4) Interferences from heterophilic antibodies etc. Advantages: more specific. Detection limits: less than 1amol/L

농도의 시료도 측정 가능하게 된다(Jackson & Ekins, 1986). 그러나 과량의 주요 시약을 사용한다하여도 추적자의 비특이적 결합을 억제시키거나, 측정의 특이성을 좁히거나, 이중친화성(heterophilic) 항체의 결합 등을 제거시키지는 못한다.

일반적으로는 항체에 추적자를 붙이는 방법을 사용하는데, 유리형과 결합형(Ag-Ab-¹²⁵I)의 분리에는 흡착법이나 침전법을 사용한다. 그리고 항원 또는 호르몬이 두 개의 epitope을 가졌을 때, 두 개의 항체가 호르몬에 부착되는 샌드위치 방법(sp-Ab-Ag-Ab'-¹²⁵I), 즉 two-site assay 방법으로 다른 방법보다 비교적 특이성이 높다(Schwarz *et al.*, 1985; Seth *et al.*, 1989). 그리고 호르몬이 2개의 항원 결정자를 가질 경우 1amol 이하의 감도를 나타내어 가장 좋은 방법이 된다. 그러나 스테로이드나 15~20 아미노산 서열을 가진 펩티드들, 대부분의 약의 측정은 불가능한 단점을 가지고 있다. Two-site sandwich assay는 다양하게 발전되고 있다. 추적자의 다양한 이용, 비특이적 항체 결합을 줄이기 위한 항체 조각의 사용, 이차적인 추적자 사용, 호르몬의 “anchor” 기법의 개발과 더불어, 변화 폭이 넓은 호르몬의 정량 분석, 실험실 외에서 사용 가능한 측정법의 개발 등을 들 수 있다. 근래에는 one-site IRMA 방법도 장족의 발전을 하고 있다. 즉 분석 물질을 과량의 추적자-결합-항체(Fab' or F(ab)₂)를 일정량 사용한다. 결합되지 않은 항체는 추가의 sp-Ag로 제거시킨다. 길항적 면역측정법이 400 amol의 분석물질 측정이 가장 감도가 높은 반면, 위의 방법으로 약 100 amol의 분석 감도가 유지되고 있다(Collins, 1988).

5) 제 5군 측정법 : 특수한 항체나 수용체의 정량에 쓰이는 방법들이다(Table 9). 대개의 경우 호르몬을 고정지지체에 부착시키고 검사용 혈청을 희석하여 반응시킨다. 그리고 부착된 또는 포획된 항체 [sp-Ag-Ab]를 결합시켜 재반응시킴으로써 [sp-Ag-Ig1-Ab-enzyme]을 만든다. 즉 항체 포획 원리를 이용하여 비특이적 항체의 간섭 효과를 감소시키고 있다. 이 방법을 항체포획법(antibody capture)이라 하고 항원 포획(antigen capture) 방법도 개발되고 있다. 즉 고정지

지체에 anti-IgG-class 항체를 흡착시키고 호르몬 및 분석물질을 첨가하여 호르몬을 포획시킨 후 호르몬 양을 측정하는 방법이다. sp-Ab-Ag-Ab-label을 결합시키거나, IgG에 대한 항체의 F(ab)₂ 절편을 지지체에 고착시키고 sp-F(ab)₂-IgG1-Ag-Ab-peroxidase를 만든다. 또는 biotin을 부착시킨 후 sp-Ab-IgE-biotin-streptavidin-enzyme으로 만드는 방법들로 Ag-specific Ab를 정량하는 방법으로 사용한다. 항원 포획측정법은 주로 소량의 IgG 항체 측정에 이용되어 왔다.

6) 제 6군 측정법 : 추적자가 부착된 호르몬을 사용하고, 결합된 호르몬에 의한 시그널을 측정함으로써 결합형과 유리형을 분리하지 않아도 된다. 그러므로 비분리- 또는 동질-면역측정법(Homa)이라 칭한다(Table 10). 이 방법은 매우 간단하고, 쉽게 많은 시료들을 처리할 수 있어서, 혈액이나 오줌 내 투여 약이나 남용되는 약의 변동을 측정하는데 사용된다. 특히 이 방법은 10μmol/L 수준의 측정 한계만 가지고도 사용할 수 있다. 이 때 호르몬은 결합작용에 의해 활성이 감소하거나 증가하는데 EMITTM의 경우 lysozyme 또는 glucose-6-phosphate dehydrogenase(G-6-PDH)는 효소 활성도가 감소하고, malate dehydrogenase(MDH)는 증가한다. 효소 외에도 효소의 보조군, 효소 활성 억제제, 효소 절편, 형광-부착 효소기질 등의 측정에 이용되고 있다. 추적자 물질은 형광, 편광, quenched, protected, activated된 것을 이용한다. 가장 이상적인 동질측정법은(Homa) 추적자로부터 신호가 100% 조정되게 만드나 면역측정법보다는 감도가 훨씬 나쁘다.

면역 측정법의 개발 동향

위의 6가지 구분 이외에도 다음과 같은 측정방법들이 개발되었다.

1) 이중측정법(dual assays) : 두 가지 이상의 성분을 동시에 검출할 수 있는 측정법은 임상적으로 유용할 것이 자명하다. 특히 multichannel scintillation counter를 이용하여 두

Table 9. Immunoassays(IA) for quantifying specific antibodies(group 5)

Assay name	Acronym	Labels used	Analytes
Enzyme-linked immunosorbent A	ELISA	Enzymes	Specific antibodies
Radioallergosorbent test	RAST	¹²⁵ I	Allergen-specific IgE

System: Quantifying specific antibodies. Excess antigen immobilized on a solid phase. Antibody capture, a complex, sequential, double solid phase assay. Antigen capture, immobilized Ig G-class.

Table 10. Immunoassays(IA) grouped by use of labelled reagents and modulation of signal from the label by the binding reaction(group 6)

Assay name	Acronym	Labels used	Analytes
Chemiluminescence fluorescence energy transfer IA	CLETIA	Isoluminol and fluorescein	Progesterone
Combined enzyme donor IA	CEDIA	β -Galactosidase fragment	Digoxin
Enzyme-monitored IA technique	EMIT	G6PDH, MDH, lysozyme	Drugs and other haptens
Homogeneous luminescence IA	HOMALIA	Isoluminol	Haptens
Homogeneous enzyme inhibitor IA		Inhibitor of acetylcholinesterase	Thyroxin
Fluorescence energy Immunotransfer IA	FETIA	2-Fluorescein derivatives	IgG
Fluorescence polarization IA	PFIA	Fluorescein	Drugs and other haptens
Fluorescence quenching IA	FQIA	Europium chelate	Estrone-3-glucuronide
Liposome lysis IA		Melirrin	Ouabain
Micelle quenching fluorescence IA	MQFIA	Fluorescein	Amphetamine
Prosthetic-group-label IA	PGLIA	FAD	Drugs
Substrate-labeled fluorescence IA	SLFIA	Umbelliferone	Theophyllin

These homogeneous assays(Homa) are widely used to monitor concentration of therapeutic drugs and drugs of abuse in blood and urine when low detection limits($<10\mu\text{mol/L}$) are not required. Disadvantages: 1) Difficulty to get 100 % modulation of signals, 2) Less sensitive.

가지 방사선을 측정하는 방법을 예로 들면, ^{125}I 과 ^{131}I 을 이용하여 triiodothyronine(T3)와 thyroxin(T4)을 측정하는 방법이 있다(Haynes & Goldie, 1977). 또한 FSH나 LH를 ^{125}I 와 ^{57}Co 을 이용하여 동시에 측정하는 방법도 한 예가 된다. 서로 다른 추적자, ^{125}I 와 alkP를 이용하여 총량 및 IgA-conjugated $\alpha 1$ -microglobulin을 측정하기도 한다(DeMars *et al.*, 1989). 또는 두 가지 다른 효소, β -gal과 alkP를 이용하거나 Eu^{3+} 와 Tb^{3+} 를 동시에 사용하기도 한다(Hadfield *et al.*, 1987).

2) 측정기술의 형식 변형(advanced assay formulation) : **Formulation**은 측정하는 방법상, 순서상의 조성을 말한다. 이는 측정 물질의 특성, 상태, 농도 등에 따라 바뀌게 된다. Microtitre well을 사용할 때 가장 효과적으로 빨리 많은 시료를 처리할 수 있다. 그러므로 상업성을 고려할 때 측정의 재연성이 높은 것, 사용자가 쉽고 간편하게 사용할 수 있고, 시간을 단축할 수 있고, 자동화하기 쉽고, 또 가격이 저렴한 일반적인 기구를 사용하도록 개발한다.

Radial partition IA가 바로 자동화가 가능하게 개발된 것이고, glass-fiber paper도 항체의 지지체로 개발되었다(Giegel *et al.*, 1982; Rugg *et al.*, 1988). 가장 각광받고 있는 방법 하나는 over-the-counter kit 기술로 임신진단용이다. 즉 hCG 항체를 nylon 막의 원형구역에 부착시키고, 표준 지역과 비교하여 발색 정도로 비교하게 하는 방법인데, micro-particle-capture 막을 이용하거나, 항체를 입힌 polystyrene

미세입자를 이용하는 방법들이다(Anderson *et al.*, 1986). Particle concentration fluorescence immunoassays(PCFIA)들은 IFMA 형식을 96-well plate에 응용한 형식이다. Well의 저부에 다공성 막을 만들고 고품지지체로 작은 입자의 polystyrene에 부착된 형광물질의 양을 측정하는 방식이다.

3) 새로운 직접측정법(Homa system) : Homa system은 치료용 약품 및 비단백질성 호르몬이 $\mu\text{mol/L}$ 로 변동할 때 측정하는 방법이다. 최근에는 측정한계를 낮추면서 단백질 호르몬에도 응용하며, 보다 쉽게 그리고 자동화시키는 방법들이 속속 발표되고 있다. 방사선 동위원소를 사용하는 Homa RIA에서는 결합형과 유리형이 원심분리에 의해 dense oil layer를 통해 수 mm 떨어지게 하고, 미세입자로 결합형만을 분리하고 측정기기로 계수한다. 반대로 scintillation proximity(immuno)assay(SPA)는 항체를 형광 미세입자에 부착시키고, RI로 표지한 항원이나 리간드가 부착되면 측정치가 증폭되는 점을 이용한 것이다. 이 경우는 마치 원심분리에 의해 결합형과 유리형이 분리된 것과 같은 효과를 나타낸다(Baldwin & Hargreaves, 1987).

Enzyme immunocapillary migration, immunochromatographic homogeneous immunoassay에서는 분석물질의 농도가 비색의 농도나 발색 정도보다는 분리된 거리에 의해 측정된다(Glad & Grubb, 1981; Zuk *et al.*, 1985; Chen *et al.*, 1987). 즉 cellulose strip에 항체를 붙이고, hrPOX를 추적자로 부친 분석물을 사용하며, 이동한 부위에서 strip을 현상액

에 넣어 발생시키는 경우를 들 수 있다. Homa EIA는 크게 발달하고 있다(Khanna *et al.*, 1989). Enzyme donor IA와 유전자 재조합을 융합시켜, *E. coli*에서 활성이 없는 β -gal의 불활성 대분자를 enzyme acceptor로 사용하고, 또 β -gal의 소분자를 enzyme donor로 사용할 수 있는 분자를 합성케 한다. 이들이 각각 합성되어 자연 상태에서 결합하면 활성적 β -gal의 활성을 띄게 만들어 사용하는 것이다. EIA에서 hrPOX가 가장 많이 쓰이고 있으나 Homa에는 많이 사용되지 않는다.

또한 효소의 활성에 표지물질이 결합되면 활성도를 높이기 하는 방법을 개발하여 사용하고 있다(Ashihara *et al.*, 1987). Propionyl-CoA carboxylase처럼 효소에 biotin을 붙이면 유리형의 avidin-antigen conjugate(avidin-IgG or avidin-analyte)가 있을 때는 효소가 작용하지 않지만 항체와 결합시키면 활성화되는 원리를 이용하는 것이다. 한편 (anti-enzyme)-(anti-analyte) antibody를 만든 후에 분자량이 큰 분석물(예, IgM) 등이 G-6-PDH를 억제시키게 만든다. 대부분의 경우 효소, 조효소, 억제제, 기질 등을 사용하는 방법 등이 개발되고 있다(Smith *et al.*, 1981, 참고문헌 A29; Ngo & Lenhoff, 1985, 참고문헌 A13). 효소 외에 Homa에 가장 많이 쓰이는 방법은 fluorescence polarization IA이다. Homa에서의 전제 조건은 결합형이 추적자에서 빛을 발하는데 영향을 주는 것이다. 예를 들어 비단백질 결합 형광물질에서 여기되는 광양자가 detergent miscell에 의해 간섭되는 경우로 수용액 내 형광을 발하는 europium을 리간드에 부착시키고, 항체와 결합시키면 형광이 90% 이상 간섭되는 특성을 이용하는 것이다. Total estrogen 정량에서 isoluminol-17 β estradiol이 항체에 결합한 후 isoluminol의 산화에 의한 섬광이 5배 증가하는 현상을 이용하기도 한다(Messeri *et al.*, 1984). 새로운 Homa를 개발하는 주목적은 측정을 손쉽게 그리고 빨리 다량의 검체에서 측정하는데 있다. 비록 이런 장점을 이용할 수 없다 하더라도 또 다른 방법으로 이용할 수 있다.

4) Immunosensor : Analytical sensor를 사용하면 여러 가지 장점이 있는 측정법이 개발된다(Wehmeyer *et al.*, 1985; Ngo, 1987, 참고문헌 A15; Stanley *et al.*, 1988). 체외나 체내 농도의 동력학적 변화를 알 수 있고, 장기간에 걸쳐 측정이 가능하며, 검체가 혼탁하거나 색소를 많이 가지고 있는 경우에도 가능하고, 비용을 적게 들여 간편하게 측정할 수 있는 장점이 있다. 그러나 immunosensor 사용 시 ion-selective electrode의 개발이 어렵고, 비특이적 반응이 높아

상업적 효용은 아직 적은 편이다.

5) Free analyte assays : 생체 내 호르몬은 대부분 결합단백질에 얹혀 있고 유리형만이 생물학적 활성을 갖는다고 잘 알려져 왔다. 그러므로 이들을 측정하는 방법의 개발이 임상적으로 중요하다. 유리형 호르몬을 측정하는 가장 일반적인 방법은 투석법, 초여과법, 레진흡착법 등이다(Ekins, 1983; Nelson & Tomeri, 1988). 최근에는 one-step labeled-hormone-analogue가 개발되었다.

면역측정법의 평가와 정립(Immunoassay Optimization and Validation)

1) 일반적인 고려 사항: 일반적으로 항원-항체 반응은 화학 동력학적 법칙과 질량작용 법칙에 따른다. 또한 standard curve fitting assay의 적정화(optimization), 새로운 측정법의 개발 등에도 필수적으로 이용된다. 한편 측정의 질을 높이고, 우수한 결과를 유지하고, 측정치의 타당성을 검증받기 위해서는 측정 결과 처리의 합리성과 정도 관리의 적절한 사용이 필수적이다(Walker & Keane, 1977).

새로운 면역 측정법을 개발하고 연구에 응용하기 위해서는 각 방법의 한계와 장단점을 잘 알고 사용하는 것이 필수적이며, 감도가 매우 높은 방법이라 하여도 IRMA는 분자량이 적은 호르몬이나 단백질성이 아닌 호르몬 측정에 사용이 어렵다. 그러므로 항상 실험실에서 각자의 신빙성있는 측정법 평가(validation)와 정도 관리 계획이 유지되어야 한다. 또한 kit 사용 시에 Lot No. 변화에 따른 변화, kit-to-kit variation, company-to-company variation 등이 규칙적으로 조정되어야 한다. 항시 같은 방법을 사용하여도 정밀도, 정확도, 특이도 또는 교차도, 감도가 평가되어야 하며 QC 시료를 이용하여 측정 오차를 줄이는 노력이 계속되어야 한다.

2) 측정의 한계(detection limit): 측정의 한계는 길항적 또는 과포화적 측정 시 다르다.

(1) 길항적 측정방법(competitive assays): Jackson과 Ekins(1986)에 의하면 ^{125}I -competitive RIA의 경우 평형 계수는 10^{-10} mol/L로 이론적인 측정의 최소치(theoretical minimum detection limit, TMDL)는 2×10^{-12} mol/L(2pmol/L)이다. 그러나 측정의 특이도가 높은 비방사면역추적자를 이용할 경우 또는 매우 친화력이 높은 항체($K=10^{-12}$ mol/L)를 사용할 경우 100배 이상 감도를 높일 수 있으므로 약 2×10^{-14}

mol/L (20fmol/L)까지 측정의 한계를 낮출 수 있다. 그러므로 progesterone(P₄)과 estradiol 17β(E₂)의 동적 변화를 측정할 때 P₄는 비임신 여성의 경우 혈청 내 1~100nmol/L, 타액 내 10~1,000pmol/L 수준을 측정할 수 있어서, 50μL의 혈청 내에서는 50fmol/tube(15pg/tube), 타액 내(<1fmol/tube, 300 fg/ tube) 수준의 측정 역시 가능하다.

현재까지 스테로이드 호르몬의 면역측정법은 ¹²⁵I 및 hrPOX 사용 시 가장 감도가 높고, microtiter plate(790amol/well), solid-phase EIA(1300amol/well) 등을 사용 시 측정한계를 충분히 낮출 수 있다. 가장 감도가 높은 E₂ 측정법은 hrPOX-steroid conjugate를 사용하고 microreader로 측정하면 370amol, enhanced CIA로는 1,800amol까지 감도를 낮출 수 있다. Colorimetric EIA로 testosterone을 측정 시에는 800 amol/well로 이들은 거의 이론적 측정한계 400amol/tube (2pmol/L)에 가깝게 나타나고 있다. 그러나 McAb 및 친화력이 높은 항체를 사용하여 측정법의 개발로 더 낮은 수준까지 접근 가능하다.

(2) 과포화적 측정법(reagent-excess assays) : 이론적으로 가장 낮은 측정한계를 만들 수 있다. 대개의 경우 attomol (0.4amol/100μL well, 0.02amol/tube) 수준이나 실질적인 측정한계는 측정법에 따라 차이가 있다. 일반적으로 표준 곡선의 표준시약 0 상태에서 여러 번 측정하여 평균값-2SD(표준편차)의 값을 측정의 한계로 설정한다. 또 최소 측정한계(minimum detection limit, MDL)는 Bo와 통계적으로 유의성 있게 식별되는 농도와, 측정간 변이계수(between-assay CV)에서 결정되는 가장 낮은 농도를 측정 내 정밀도(intra-assay precision profile)에 적용하여 산정한다. 예를 들어 약 10회의 측정 중 적어도 500 duplicate 분석을 했을 때 CV가 22%이면 측정한계는 <0.02mIU/L 이하가 된다. 다른 kit를 10회 이상 측정한 zero standard에 의해 산출하여도 비슷한 값에 도달한다.

3) 간섭(interference) : 면역측정법이 개발된 후 현재에 이르기까지 계속되고 있는 측정의 효용성 문제는 임상가들에 의해 제기되었다. 또 이러한 결과는 측정원리와 상업적 kit에 대해서도 제기되어 왔으나, 어떠한 방법도 면역측정방법만큼 타당성을 검증받은 방법은 없었다. 그러므로 실험결과는 자기 스스로 정도 관리를 가장 신빙성 있게 이용해야 한다. 또 측정방법을 보다 정확히 평가하고, 충분히 장·단점을 파악한 후 사용해야 한다. 이런 이유로 in-house immunoassay 즉, 각 실험실이 만든 측정법이 가장 신빙성이

있다고 하겠다. 매우 유명한, 잘 조정된 상업용 kit라도 특수한 시약과 조건에 영향을 주는 요소를 발견할 가능성을 피할 수 없다는 것이다. 그리고 상업적 kit의 경우 측정 방법의 변형이 매우 많다는 점을 유의해야 한다. 그러므로 각 연구실은 각자의 측정방법을 정립시키고, 항시 타 방법과 비교 평가를 실시하여 측정의 질을 높이고, 최적의 측정환경을 유지해야 한다.

일반적으로 측정 결과에 영향을 미치는 요소를 몇 가지 들어보면; 첫째로 측정용 완충용액에 들어 있는 matrix protein의 간섭효과이다. 그리고 ionic strength나 pH가 호르몬-항체 결합에 영향을 줌으로 protective protein이나 detergent를 처리하면 혈청단백질에 의한 간섭효과를 줄일 수 있다. 또한 Fc 부분이 없는 항체를 만들어 사용하면 비특이적 반응을 크게 줄일 수 있다. 일반적으로 bovine serum albumin(BSA) 같은 불활성 단백질이 첨가되어야 하는 것으로 알고 있으나, 본 연구실의 경우 이러한 단백질이 불필요하며, 때로는 측정의 질을 떨어뜨리는 결과를 가져온다. BSA 등이 항체를 결합시킨 solid-phase surface의 unoccupied site를 block시키지 않는다는 보고로 보아 이들이 불필요하다는 것이 타당성을 입증 받고 있다(Mohammad & Esen, 1989). 이중친화성 항체는 시료 내 또는 환자의 혈청 및 혈장 내 면역글로불린과 반응하며, 다른 동물의 항체도 같은 효과가 있음이 알려져 있다. 치료에 생쥐의 McAb를 사용할 때 환자의 혈청 내 쥐의 항체가 생겨 항원-항체반응을 억제하거나 약화시킨다. 또 시료 내 보체나 rheumatoid factors, lysozyme 등 효소가 측정의 질을 나쁘게, 즉 간섭효과를 나타낸다는 점을 항시 고려해야 한다.

정도 관리(Quality Control)

1980~1988년간 영국 Edinburgh 대학이 UK external quality assesment schedule(UKEQAS)의 정도 관리를 실시한 결과(Fig. 4), 즉 혈청 내 pituitary gonadotropin(GTH) 측정을 177개 호르몬 실험실이 동시에 각자의 방법으로 실시한 결과, IRMA 방법이 RIA에 비하여 17% 높은 값을 나타내었고, LH의 경우 33%의 낮은 측정치를 나타냈다고 보고하였다(Seth *et al.*, 1989). 이 결과는 측정의 방법보다도 IRMA가 사용하는 McAb가 GTH의 isoform을 측정할 때 때문으로 보고하였다. 이들 결과에서 within-method의 geometric CV(GCV)는 10% 정도인데 비하여, between-laboratory의 GCV는 20~30%라고 보고하였다. 즉 실험실 내 정도 관리가 매우 중요하다는 것을 알 수 있다. 위의 결과에서 상

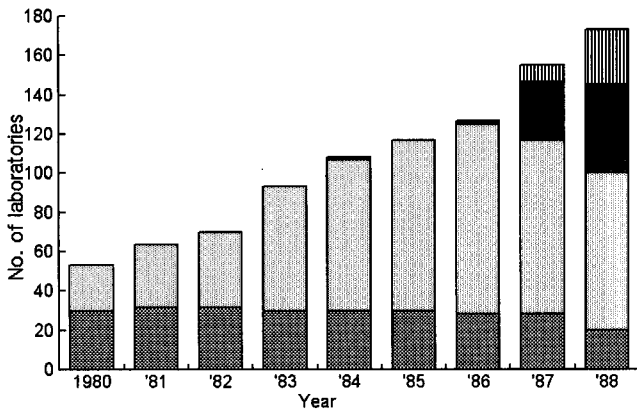


Fig. 4. Trends in the number of laboratories participating in the UKEQAS for LH and FSH, and in the types of method used.

'in-house RIA;
 kit RIA;
 kit IRMA;
 kit non-isotopic IMA

위와 하위 5%에 있는 결과를 제외시킨 결과인 점을 고려하면, between-laboratory result를 비교하는데 큰 문제점이 있다는 것을 알 수 있다.

WHO가 주관한 QC program과 WHO matched reagent 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 실험실 측정기기의 측정 오차를 줄이고, 세계적으로 공통인 표준시약(reference and calibration material)을 제공하여 표준 방법과 비교하여 정도 관리를 유지시키는 방법과 routine assay에서 변이가 큰 것을 조절하는 방법상의 노력 등이다. 실험실상의 문제점 몇 가지는 측정기기의 정밀도와 측정 효율의 유지노력, 측정치의 계산, 시료의 기록상 문제점과 시료의 바뀔, 측정용 시약의 준비과정 잘못 등등을 들 수 있다(Whitehead, 1976). 실험실 외의 문제점 몇 가지만을 지적하고자 한다. 첫째로는 시료, 즉 혈청 등을 채취하고 보관하고, 이를 실험실로 운반하는 과정에서 문제점이 측정의 질을 낮춘다. 즉 측정 전까지 혈액의 수분이 증발되거나 습기에 노출되거나, 측정물질을 흡착시키거나 파괴시키는 용기에 보관하기도 하고, 온도가 상승되어 측정물질이 생체액에서 자연 분해되거나, 오염물질 또는 병원 침입으로 변질되는 것들을 들 수 있다. 또 강한 빛이나 형광, UV에 노출시키는 일도 허다하다. 이와 같은 것들은 예들든 것일 뿐 면역측정법의 정도 관리 계획이 잘 조정되고 유지되지 않는 한 within-laboratory CV와 between-laboratory CV 등은 높아지고, 측정치의 질은 저하될 수밖에 없다. 이러한 호르몬 연구실에서의 QC의 문제점과 고려사항을

WHO가 1976년에 정리하여 보급한 일이 있으며 아직까지 중요한 지침서가 되고 있다.

측정법의 정립은 일종의 적정화로 측정법을 연구실 실정에 맞게 동일화하고 항시 동일한 시료의 측정값이 항시 일정하게 보고되도록 조정하는 방법을 뜻한다. 각각의 방법은 kit를 사용하거나 in-house method를 사용하거나, 또는 측정방법의 질이 다소 나쁘더라도 항시 동일한 측정치를 내도록 내·외 정도 관리를 하여 사용하고 있음을 뜻한다. 특히 선진국의 유명 제품을 사용하고 있다는 과신과 kit가 제공하는 정도 관리용 시료의 측정치를 과신하는 것은 측정의 질을 낮춘다. 더욱이 부정기적으로 측정하거나 측정을 의뢰하는 경우에는 각기 다른 시기의 측정이 같은 kit 방법에 의해 이루어지지 않을 가능성이 크므로, 측정값을 신뢰하기 어렵고, 측정 결과를 통합 처리하는 미숙한 과정이 측정의 신뢰를 부정하는 경우를 직면하게 된다. 그러므로 잘 보관 처리된, 예로 동결 건조된 동일 시료를 각 측정에 무작위적으로 첨가하여 측정하고 비교하여 측정의 신뢰도를 각자가 유지해야 한다. 또 정도 관리 체계를 전담할 수 있는 과학자의 교육과 자원이 필요하다. 또한 거의 모든 선진국이 자신들의 연구 결과의 질을 향상시키기 위하여 매년 학회에서 지원하는 training program을 실시하고 있다는 점을 참고하여 국내에서도 적어도 1주일 이상의 훈련 과정이 매년 실시되어야 한다고 사료된다.

결론 및 제언

최근 각 나라가 경제적이면서도 더욱 측정 한계가 낮고, 감도가 높은 측정방법을 개발하고 있다. 또한 이미 over-the-counter kit가 개발되고 상업화되고 있다. 보다 질이 좋은 측정방법으로 F(ab)' fragment를 이용하여 분석물질과 1 : 1 결합을 유도하는 방법이 이용된다. 이미 RIA와 IRMA 등 방사면역측정법은 비방사면역측정법으로 대체된 상황이다. 항체는 특이성이 높은 McAb로 대체되고 있으며, 추적자는 효소와 luminescence 물질을 결합시킨 enhanced method로 대체되고 있다. 또한 assay formulation에는 solid-phase method가 주로 사용되고 있으며, 새로운 측정 방법이 날로 발전하고 있다. 그러나 국내의 측정방법 개발에 주의를 기울이는 과학자는 거의 전무하다. 영국이 UKEQAS에 177개 실험실이 참여하고 있는 점을 보아 국내에도 호르몬 측정실은 계속 늘고 있으나 아직은 미약한 상태이다. 국내의 실정에 비추어 측정기술을 훈련하는 과정을 학회 주관으로 개설하여야 하고 표준화된 호르몬 및 질이 좋은 항체를 생산 공급

하고, 측정방법을 국내 실정에 맞추어 표준화하고 또 각 측정법을 적정화하고 평가하여 실험실간, 연구자 간에 서로 신뢰할 수 있는 정도 관리 계획을 실시한 후 측정법을 정립시켜야 한다. 이를 위한 국가적 차원의 자원이 필요하다고 판단된다.

한편 가까운 시일 내에 multianalyte, microspot immunoassay와 genechip 방법들은 chip/microarray technology를 이용하여, 한 시료에서 다양한 호르몬 및 분석 항목을 다량으로 측정함으로써 환자 및 시료의 생리적 환경 정보를 제공하게 될 것이다. 이들이 방사성 추적자를 이용하는 개발 단계에서 비방사성 측정방법으로 전환되는 실용화 단계로 발전하여 호르몬 및 생체활성물질의 동태 연구에 이용되는 제3세대가 열릴 것이라 판단된다.

참고문헌

- A. 1980년대 면역측정법을 소개하는 책과 Review
 1. Voller A, Bartlett A, Bidwell D (1981) Immunoassays for the 80s. Lancaster, UK: MTP Press Ltd.
 2. Hunter WM, Corrie JET (1983) Immunoassays for Clinical Chemistry. Edinburgh: Churchill Livingstone.
 3. Butt WR (1984) Practical Immunoassay. The State of the Art. New York: Marcel Dekker, Inc.
 4. Pal SB (1987) Immunoassay Technology, Vol. 2. Berlin: Walter de Gruyter.
 5. Morris BA, Clifford MN, Jackman R (1987) Immunoassays for Veterinary and Food Analysis-1. London: Elsevier.
 6. Chan D, Perlstein MT (1987) Immunoassay. A Practical Guide. New York: Academic Press.
 7. Albertson BD, Haseltine FP (1988) Non-radiometric Assays. Technology and Application in Polypeptide and Steroid Hormone Detection. New York: Alan R Liss.
 8. Pablo F, Scanes CG, Weintraub BD (1983) Handbook of Endocrine Research Techniques. Academic Press, Inc.
 9. Malvano R (1980) Immunoenzymatic Assay Techniques. The Hague: Martinus Nijhoff.
 10. Maggio ET (1980) Enzyme-immunoassay. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc.
11. Ishikawa E, Kawai T, Miyai K (1981) Enzyme Immunoassay. Tokyo: Igaku-Shoin.
12. Avrameas SP, Dreut P, Masseyeff R, Feldman G (1983) Immunoenzymatic Techniques. Amsterdam: Elsevier.
13. Ngo TT, Lenhoff HM (1985) Enzyme-mediate Immunoassay. New York: Plenum Press.
14. Kemeny DM, Challcombe SJ (1988) ELISA and Other Solid Phase Immunoassays: Theoretical and Practical Aspects. Chichester: John Wiley & Sons.
15. Ngo TT (1987) Electrochemical Sensors in Immunological Analysis. New York: Plenum Press, 1987.
16. Collins WP (1988) Alternative Immunoassays. Chichester: John Wiley & Sons.
17. Collins WP (1988) Complementary Immunoassays. Chichester: John Wiley & Sons.
18. Yalow RS (1992) Radioimmunoassay of hormones. In: Textbook of Endocrinology. (eds) Wilson JD, Foster DW 8th ed. W.B. Saunders Co. Chap36 pp 1635-1646.
19. Rebar RW (1988) Practical evaluation of hormonal status. In: Reproductive Endocrinology. (eds) Yen SSC, Jaffe RB, 3rd ed. WB Saunders Co. Chap24.
20. Gorden P, Weintraub BD (1989) Radioreceptor and Other Functional Hormone Assays. Chap37 pp 1647-1662.
21. Langone JJ, van Vunakis H (1982) Immunochemical Technology. Part D. Selected Immunoassays. Methods Enzymol, 84.
22. Langone JJ, van Vunakis H (1982) Immunichemical Technology. Part. E. Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods. Methods Enzymol, 92.
23. Tijssen P (1985) Practice and Theory of Enzyme Immunoassays. Amsterdam: Elsevier.
24. Chard T (1987) An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques. Amsterdam: Elsevier.
25. Wisdam GB (1981) Recent progress in the development of enzyme immunoassays [Review]. Ligand Rev, 3:44-49.
26. Oellerich M (1984) Enzyme-immunoassay: A review. J Clin Chem Clin Biochem 22:895-904.
27. Ishikawa E (1987) Development and clinical application of sensitive enzyme immunoassay for macro-

- molecular antigens - A review. *Clin Biochem* 20:375-385.
28. Ishikawa E, Hashide S, Kohno T, Hirota K (1990) Ultrasensitive enzyme immunoassay. [Review] *Clin Chem Acta* 194:51-72.
 29. Smith DS, Al-Hakim MHH, Landon J (1981) A review of fluoroimmunoassays and immunofluorometric assay. *Ann Clin Biochem* 18:253-274.
 30. Hammila I (1985) Fluoroimmunoassays and immunofluorometric Assays [Review]. *Clin Chem* 31:359-370.
 31. Diamandis EP (1988) Immunoassays with time-resolved fluorescence spectroscopy: principles and applications [Review]. *Clin Biochem* 21:139-350.
 32. Kricka LJ, Thorpe GHG (1981) Luminescent immunoassays [Review]. *Ligand Rev* 3:17-24.
 33. Seitz WR (1983) Immunoassay labels based on chemiluminescence and bioluminescence [Review]. *Clin Biochem* 20:1-14.
 34. Weeks I, Woodhead JS (1984) Chemiluminescence immunoassays [Review]. *J Clin Immunoassay* 7:82-89.
 35. Price CP, Spencer K, Whicher J (1983) Light-scattering immunoassay of specific proteins: A review. *Ann Clin Biochem* 20:1-14.
 36. Place JF, Sutherland RM, Dahne C (1985) Opto-electronic immunosensors: A review of optical immunoassays at continuous surfaces [Review]. *Biosensors* 1: 321-353.
 37. Green MJ (1987) Electrochemical immunoassays [Review]. *Philos Trans R Soc London Ser B* 316:135-142.
 38. Schall RF Jr, Tenoso HJ (1981) Alternatives to radioimmunoassay: Labels and methods [Review]. *Clin Chem* 27:1157-1164.
 39. Howanitz JH (1988) Immunoassay. Innovations in label technology [Review]. *Arch Pathol Lab Med* 112: 775-779.
 40. Ekins R (1989) A shadow over immunoassay. *Nature (London)* 340:256-258.
- 인용문헌**
- Aguila HL, Pollock RA, Spira G, Scharff MD (1986) *The production of more useful monoclonal antibodies. Immunol Today* 7:380-383.
- Anderson RR, Lee TT, Saewart DC, Soden KM, Valkirs GE (1986) Internally referenced immuno concentration assays. *Clin Chem* 32:1692-1695.
- Ashihara Y, Nishizono I, Miyagawa E, Kasahara Y (1987) Homogeneous enzyme immunoassay for macromolecular antigens using avidin biotin enzyme. *J Clin Lab Anal* 1:80-82.
- Baldwin J, Hargreaves WR (1987) BioMAT™: a rapid, self-washing immunoassay system with a microparticulate solid phase. *Clin Chem* 33:1566-1567.
- Bazin H, Xhurdebise L-M, Burtonboy G, Lebacq AM, DeClerq L, Commont F (1984) Rat monoclonal antibodies. I. Rapid purification from *in vitro* culture supernatants. *J Immunol Methods* 66:261-269.
- Birch JR, Lennox ES (1995) *Monoclonal Antibodies, Principles and Applications*, Wiley-Liss.
- Blind E, Schmidt-Gayk H, Armbruster FP, Stadler A (1987) Measurement of intact human parathyrin by an extracting two-site immunoradiometric assay. *Clin Chem* 33:1376-1381.
- Boguslawski SJ, Ledden DJ, Fredrickson RA (1989) Improved procedure for preparation of F(ab')₂ fragments of mouse IgGs by papain digestion. *J Immunol Methods* 120:51-52.
- Bourque J, Sulon J, Demey-Ponsart E, Sodoyez JC, Gaspard U (1986) A simple, direct radioimmunoassay for salivary progesterone determination during the menstrual cycle. *Clin Chem* 32:948-951.
- Brien WF, Stewart MW (1986) A competitive ELISA technique for the measurement of von Willebrand factor antigen (vWF:Ag) using staphylococcal protein A peroxidase. *Clin Biochem* 19:179-182.
- Chen R, Li TM, Merrick H, Parrish RF, Bruno V, Kwong A; Stiso C, Litman DJ (1987) An internal clock reaction used in a one-step enzyme immunochromatographic assay of theophylline in whole blood. *Clin Chem* 33: 1521-1525.
- Collins WP (1988) Preface. *Op. cit.* (참고문헌 A16): xi-xvi.
- DeMars DD, Katzmann JA, Kimlinger TK, Calore JD, Tracy RP (1989) Simultaneous measurement of total

- and IgA-conjugated α 1-microglobulin by a combined immunoenzyme/immunoradiometric assay technique. *Clin Chem* 35:766-772.
- Ekens R, Chu FW, Biggart E (1989) Development of microspot, multi-analyte ratiometric immunoassay using dual fluorescent-labelled antibodies. *Anal Chim Acta* 227:73-96.
- Ekens RP (1960) The estimation of thyroxine in human plasma by an electrophoretic technique. *Clin Chim Acta* 5:453-459.
- Ekens RP (1983) The Precision profile: Its use in assay design, assessment and quality control. *Op. cit.* (참고문헌 A2):76-105.
- Ekens RP, Chu FW (1991) Multianalyte microspot immunoassay: Microanalytical "compact disk" of the future. *Clin Chem* 37:1955-1967.
- Ekens RP (1998) Ligand assays: from electrophoresis to miniaturized microarrays. *Clin Chem* 44:2015-2030.
- Freitag JW, Lau HP, Wadshey JJ (1984) Affinity-column-mediated immunoenzymometric assay: Influence of affinity-column ligand and valency of antibody-enzyme conjugates. *Clin Chem* 30:1494-1498.
- Giegel JL, Brotherton MM, Cronin P, D'Aquino M, Evans S, Heller ZH, Wright WS, Knight WS, Krishnan K, Sheiman M (1982) Radial partition immunoassay. *Clin Chem* 28:1894-1898.
- Glad C, Grubb AO (1981) Immunocapillary migration with enzyme-labeled antibodies: rapid quantification of C-reactive protein in human plasma. *Anal Biochem* 116:335-340.
- Gosling JP (1990) A Decade of development in immunoassay methodology. *Clin Chem* 36:1408-1427.
- Groves DJ, Morris BA, Tan K (1987) Production of an ovine monoclonal antibody to testosterone by an interspecies fusion. *Hybridoma* 6:71-76.
- Guesdon J-L, TERNYCK T, Avrameas S (1979) The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem* 27:1131-1139.
- Hadfield SG, Lane A, Maillmurry MB (1987) A novel colored latex test for the detection and identification of more than one antigen. *J Immunol Methods*. 97:153-158.
- Haynes SP, Goldie DJ (1977) Simultaneous radioimmunoassay of thyroid hormones in unextracted serum. *Ann Clin Biochem* 14:12-15.
- Hirano T, Yamakawa N, Miyajima H, Maeda K, Takai S, Ueda A, Taniguchi O, Hashimoto H, Hirose S, Okumura K (1989) An improved method for the detection of IgE antibody of defined specificity by ELISA using rat monoclonal anti-IgE antibody. *J Immunol Methods* 119:145-50.
- Ishikawa E, Hashida S, Tanaka K, Kohno T (1989) Methodological advances in enzymology: development and applications of ultrasensitive enzyme immunoassays for antigens and antibodies. *Clin Chim Acta* 185: 223-230.
- Jackson TM, Ekens RP (1986) Theoretical limitation on immunoassay sensitivity. Current practice and advantages of fluorescent Eu^{3+} chelates as non-radioisotopic tracers. *J Immunol Methods* 87:13-20.
- Jaffe BM, Behrman HR (1979) *Methods of Hormone Radioimmunoassay*, 2nd ed. New York: Academic Press.
- Karawajew L, Behrsing O, Kaiser G, Micheel B (1988) Production and ELISA application of bispecific monoclonal antibodies against fluorescein isothiocyanate (FITC) and horseradish peroxidase (HRP). *J Immunol Methods* 111:95-99.
- Khanna PL, Dworschack RT, Manning WB, Harris JD (1989) A new homogeneous immunoassay using recombinant enzyme fragments. *Clin Chim Acta* 185:231-239.
- Kohler G, Milstein C (1975) Continuous culture of fused cells secreting specific antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495-497.
- Messeri G, Caldini AL, Bolelli GF, Pazzagli M, Tommasi A, Vannucchi N, Serio M (1984) Homogeneous luminescence immunoassay for total estrogens in urine. *Clin Chem* 30:653-657.
- Miles LEH, Hales CN (1968a) An immunoradiometric assay of insulin. In: Margoulies M (eds). *Protein and Polypeptide Hormones Part 1* 61-70 Excerpta Medica Amsterdam.
- Miles LEH, Hales CN (1968b) Labelled antibodies and immunological assay systems. *Nature* 219:186-189.
- Mohammad K, Esen A (1989) A blocking agent and a blocking step are not needed in ELISA, immunostaining

- dot-blot and western blot. *J Immunol Methods* 117: 141-145.
- Moore GP (1989) Genetically engineered antibodies. *Clin Chem* 35:1849-1853.
- Nelson JC, Tomei RT (1988) Direct determination of free thyroxin in undiluted serum by equilibrium dialysis/radioimmunoassay. *Clin Chem* 34:1737-1744.
- Reis KJ, von Mering GO, Karis MA, Faaulman EL, Lottenberg R, Boyle MDP (1988) Enzyme-labelled type III bacterial Fc receptors: A versatile tracer for immunoassay. *J Immunol Methods* 107:273-280.
- Rugg JA, Flaa CW, Dawson SR, Rigl CT, Leung KS, Evans SA (1988) Automated quantification of thyrotropin by radial partition immunoassay. *Clin Chem* 34: 118-122.
- Samoilovich SR, Dugan CB, Macario AJM (1987) Hybridoma technology: new developments of practical interest [Review]. *J Immunol Methods* 101:153-170.
- Schwarz S, Berger P, Wick G (1985) Epitope-selective, monoclonal-antibody-based immunoradiometric assays of predictable specificity for differential measurement of choriogonadotropin and its subunits. *Clin Chem* 31: 1322-1328.
- 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.
- Stanley CJ, Cox RB, Cardosi MF, Turner APF (1988) Amperometric enzyme-amplified immunoassays. *J Immunol Methods* 112:153-161.
- Walker WHC, Keane PM (1977) Theoretical aspects of radioimmunoassay. In: Abraham GE, (ed) *Handbook of Radioimmunoassay* New York: Marcel Dekker, 87-130.
- Wehmeyer KR, Halsall HB, Heineman WR (1985) Heterogeneous enzyme immunoassay with electrochemical detection: Competitive and "sandwich"-type immunoassays. *Clin Chem* 31:1546-1549.
- Wide L, Bennich H, Johansson SGO (1967) Diagnosis of allergy by an *in-vitro* test for allergen antibodies. *Lancet* 2:1105-1107.
- Whitehead TP (1976) Principles of quality control. WHO Report. pp 1-29.
- Wilkins TA, Brouwers G, Mareschal JC, Cambiaso CL (1988) High sensitivity, homogeneous particle-based immunoassay for thyrotropin (MultipactTM). *Clin Chem* 34:1749-1752.
- Yalow RS, Berson SA (1960) Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest* 39: 1157-1175.
- Zuk RF, Ginsberg VK, Houts T, Rabbie J, Merrick H, Ullman EF, Fisher MM, Sizto CC, Litman DJ (1985) Enzyme immunochemistry - a quantitative immunoassay requiring no instrumentation. *Clin Chem* 31: 1144-1150.