

Hitachi 7600 P-모듈을 이용한 유리형경쇄 정량검사의 항원과잉역 반응

가톨릭대학교 서울성모병원 진단검사의학과

차 경 호 · 김 승 희 · 송 창 은 · 심 양 보 · 채 효 진

Antigen Excess in Free Light Chain Assay Using the Hitachi 7600 P-module Automatic Chemistry Analyzer

Kyong-Ho Cha, Sung-Hee Kim, Chang-Un Song, Yang-Bo Sim, and Hyo-Jin Chae

Department of Laboratory Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul St. Mary's Hospital, Seoul 137-701, Korea

The analysis of serum free light chains (sFLCs) can improve the diagnosis and monitoring of multiple myeloma and other plasma cell dyscrasias. As with other immunoassays, sFLCstests are subject to potential antigen excess and heterophilic antibody interference. We describe 9 cases of sFLCs antigen excess in patients with multiple myeloma using the Freelite™ Human Kappa and Lambda Free Kits (The Binding Site Ltd., Birmingham, UK) and the Hitachi7600 P module turbidimetric system. A total of 1,247 consecutive samples from 250 patients with multiple myeloma were assayed for sFLCs from April to September, 2009. The samples were assayed using an initial dilution of 1:5and subsequent dilutions of 1:50 and 1:100. The same samples were analyzed for the presence of monoclonal gammopathies using serum protein electrophoresis (SPE) and immunofixation electrophoresis (IFE). There were 9 samples (0.72%) of antigen excess with 3 cases of kappa (0.24%) and 6 cases of lambda (0.48%). These cases represents an example of antigen excess or “hook effect” using the serum free light chain assays and mandates high level of attention to falsely low sFLC levels due to antigen excess, especially when it is disaccordant to other assay results or clinical manifestations.

Received 28 OCT 2009 / Returned for modification 11 DEC 2009 / Accepted 16 DEC 2009

Key Words : Immunoassay, Serum Free light chains, Antigen excess, Hook effect, Monoclonal gammopathy, Multiple myeloma, Serum Protein electrophoresis, Immunofixation electrophoresis

I. 서 론

유리형경쇄(free light chains, FLCs)는 형질세포(plasma

cell)에서 면역글로블린이 생산되어 분비되는 과정 중 중쇄(heavy chain)와 결합하지 못한 과생산된 잉여의 경쇄를 의미하며 정상적으로 혈청 내에 소량 존재하나 다발성골수종(multiple myeloma) 등과 같은 단클론성 감마글로블린장애증(monoclonal gammopathy)에서 특히 농도가 증가하므로 이들 질환을 진단하고 추적하는데 유용하여 최근 정량분석이 많은 검사실에서 수행되고 있다(As-

교신저자 : 차경호 (우)137-701, 서울시 서초구 반포동 505
가톨릭대학교 서울성모병원 진단검사의학과
TEL : 02-2258-1728
E-Mail : 747.cha@catholic.ac.kr

konas와 Williamson, 1967; Bradwell 등, 2001; Bradwell 등, 2003). 근래 자동화된 면역혼탁장비(immuno-nephelometric analyzer)나 혼탁측정장비(immuno-turbidimetric system)로 혈청이나 소변의 FLCs를 정량하는 라텍스 면역법이 소개되었다(Bradwell 등, 2002). 이 방법에서 사용하는 항경쇄표적은 중쇄와 결합된 경쇄는 검출하지 않고 유리형의 경쇄만을 특이적으로 검출할 수 있기 때문에 단백전기영동검사(protein electrophoresis, PEP)나 면역고정전기영동법(immunofixation electrophoresis, IFE)에 비해 정확한 정량분석이 가능하다(박 등, 2004; Tommasi와 Raspanti, 2007; 정 등, 2008). 이러한 자동화 장비를 이용한 sFLCs의 측정이 널리 이용되면서 측정 시 유의해야 할 사항들을 미리 파악하는 것이 더욱 중요하게 되었다. 특히, 항원과잉은 면역학적 방법을 사용하여 측정되는 경우에 매우 높은 농도범위에서 생기는 현상으로 sFLCs의 경우 이를 예방하기 위하여 장비에 따라 1:10 또는 1:100 등으로 검체를 희석하여 검사하도록 권고하고 있다. 최근의 보고에 의하면 면역혼탁장비 BN ProSpec(Siemens Healthcare Diagnostics Inc., USA)로 sFLCs 측정 시 항원과잉에 대한 예가 보고되었으며 1:100으로 희석하여 측정한 κ FLC 값이 <2.9 mg/L 이었으나 1:32,000으로 희석하여 재 측정한 결과는 60,000 mg/L 이었다(Dayal 등, 2007). 그밖에 혼탁측정장비인 Olympus AU400e(Olympus, USA) 에서도 항원과잉의 예가 보고되었는데 1:10으로 희석한 초기 측정결과는 <3.0 mg/L 이었으나 1:500 으로 희석한 후 3,250 mg/L로 높게 측정되었다(McCudden 등, 2009).

저자들은 최근 자동화학분석기 Hitachi 7600 P-module에 혼탁측정 방식을 이용하여 FLCs검사를 도입하면서 항원과잉의 빈도를 파악하고 측정 시 유의점을 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 대상

2009년 4월부터 9월까지 가톨릭대학교 서울성모병원에서 다발성골수종, 림프형질세포성 림프종(lymphoplasmacytic lymphoma) 등의 단클론성 감마글로블린증으

로 진단받고 치료중인 환자 250명을 대상으로 하였다. 성별은 남자 129명, 여자 121명, 연령은 중앙값 60세(29-82)이었고 검체는 sFLCs 1,240검체, 요 FLCs 7검체를 대상으로 하였다. 모든 환자들은 면역글로블린 G, A, M의 정량검사, 혈청단백전기영동과 면역고정전기영동을 시행하였으며 FLCs 결과와 비교하였다.

2. 혈청유리경쇄의 측정과 단클론 단백 정량

sFLCs는 Freelite Human Kappa/Lambda 키트(The Binding Site Ltd., Birmingham, UK)를 제조사의 지침에 따라 Hitachi 7600-210의 P-module(Hitachi, Japan)에서 측정하였다. 검사 시 κ FLC은 1:5, λ FLC은 1:8의 비율로 희석하여 측정하였다. 대상환자의 단클론성 면역글로블린의 정량을 위해서는 Capillary2 전기영동시스템(Sebia, France)의 단백전기영동검사를 이용하였고, 검출능을 보완하기 위하여 IFE를 통해 확인하였다.

3. 희석연구

직선성 검증을 위해 측정가능범위(analytical measurement range, AMR)와 자동희석범위의 일부분을 포함하는 κ FLC 92.76 mg/L, λ FLC 99.08 mg/L의 검체를 각각 1:19, 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1, 1:0으로 희석하여 농도를 구하였다. AMR을 넘는 검체의 경우, 자동희석 재검기능을 통해서 각각 κ FLC 1:50, λ FLC 1:80으로 희석되어 37~562 mg/L, 70~930 mg/L까지 AMR을 확장하는 것으로 되어있고 이를 넘어서는 검체는 1차 수작업 희석을 통해서 1:100으로 희석하여 54~1124 mg/L 및 140~1,860 mg/L, 2차로 1:500까지 희석하여 270~5,620 mg/L, 700~9,300 mg/L까지 측정하였다. 재검을 통해 항원과잉이 의심되는 검체는 탈이온수를 이용하여 1:10, 1:100, 1:200, 1:500까지 계열 희석하여 잠재적인 항원과잉을 확인하였다. 희석오류를 확인하기 위하여 정도관리 물질을 동배수 희석하여 대조군으로 하였으며 항원과잉 검체를 외부기관의 BN ProSpec(Siemens Healthcare Diagnostics Inc.)로 의뢰하여 비교검사 하였다.

Table 1. Results for antigen excess using Hitachi 7600 P-module

FLC	T.N	Confirmed antigen excess		Doubtful antigen excess		Total Antigen Excess	
		No (%)	No (%)	No (%)	No (%)		
κFLC	1,247	3 (0.24%)	6 (0.48%)	9 (0.72%)			
λFLC	1,247	6 (0.48%)	0	6 (0.48%)			

Abbreviation: T.N, total number; FLC, free light chain

III. 결 과

1. 항원과잉

조사대상 1,247건 중 FLCs의 항원과잉은 κFLC 3건 (0.24%)이 100배 희석검사를 통해 확인되었다(Table 1). λFLC는 6건(0.48%)이 확인되었다(Table 2). 9건의 항원 과잉발생은 다발성골수종 환자의 검체였으며 혈청 γ-globulin이 1예를 제외하고는 3 g/dL이 넘는 단클론성 감마글로블린 장애증이었다. 모든 항원과잉은 IFE 결과를 확인하였다. 희석 전후 측정치 차가 2배 이상 상승하는 것을 항원과잉이라 정의한다면 9례 모두 항원과잉이며 평균 23배 이상 희석 시 증가 하였다(Table 2).

2. 항원과잉의 예

여자 54세의 다발성골수종 환자의 κFLC의 농도는 4월부터 8월까지 10.28 mg/L 이하에서 9월에 갑자기 920 mg/L 로 높아졌다(A). 이와는 반대로 같은 기간 동안에 IgA κ 단클론성 단백질은 평균 6.29 g/dL에서 6.68 g/dL로

큰 변화가 없었다(B). 총 IgA 면역글로블린 농도도 평균 2,476 mg/dL에서 2,407 mg/dL로 큰 변화가 없었다(A). PEP와 IFE 결과와 연관적으로 FLCs결과를 검토하던 중 희석실험을 통해 최초측정 시 8.18 mg/L이었던 κFLC결과는 1:100 희석을 통해서 920 mg/L로 드러났다. 추가적인 희석을 통해서 AMR 하단에서 1:500까지의 희석검사 범위를 확인하였다. 제조사에서는 특정한 희석에서 불일치가 있을 수 있다고 보고하였으며, 그러므로 인위적인 인공산물로 인한 증가를 배제하였다. 항원과잉 문제 동정 후에 이 환자의 순차적인 검체는 반사적으로 희석 측정 하였다. 1개월 후에 <10.0 이하이던 것을 100배 희석을 통해 311 mg/L로 보고하였다. 대상군 중에서 κFLC의 항원과잉이 발생한 검체를 1:5,000 희석하여 6,161 mg/L로 분석된 검체를 외부기관의 BN ProSpec로 1:8,000 희석하여 13,000 mg/L로 결과를 얻었다.

3. 직선성의 검증

항원과잉이 나타나지 않은 κFLC 92.76 mg/L, λFLC

Table 2. Immunoglobulin, PEP, IFE, and FLCs results

Case	Specimen	Ig G	Ig A	Ig M	IFE	γ-globulin (g/dL)	Protein (g/dL)	κFLC (mg/L)		λFLC (mg/L)	
								A.E conc.	Dilution (x100)	A.E conc.	Dilution (x100)
1	s	244	2,176	14	Ig A κ	5.14	9.4	25	319		
2	s	887	2,199	39	Ig A κ	3.56	8.8	38	2,089		
3	s	230	2,407	7	Ig A κ	6.68	11.5	8	910		
4	s	358	43	5,980	Ig M λ	4.83	8.9			56	1,638
5	s	328	40	2,482	Ig M λ	4.26	9.1			55	1,839
6	s	747	3,084	37	Ig A λ	2.88	7.3			80	777
7	s	12,360	27	18	Ig G λ	9.66	14.9			67	1,634
8	u				Ig G λ					84	592
9	u				Ig G λ					88	699

Abbreviation: s, serum; u, urine; A.E, antigen excess; conc, concentration PEP, protein electrophoresis IFE, immunofixation electrophoresis; FLCs, free light chains

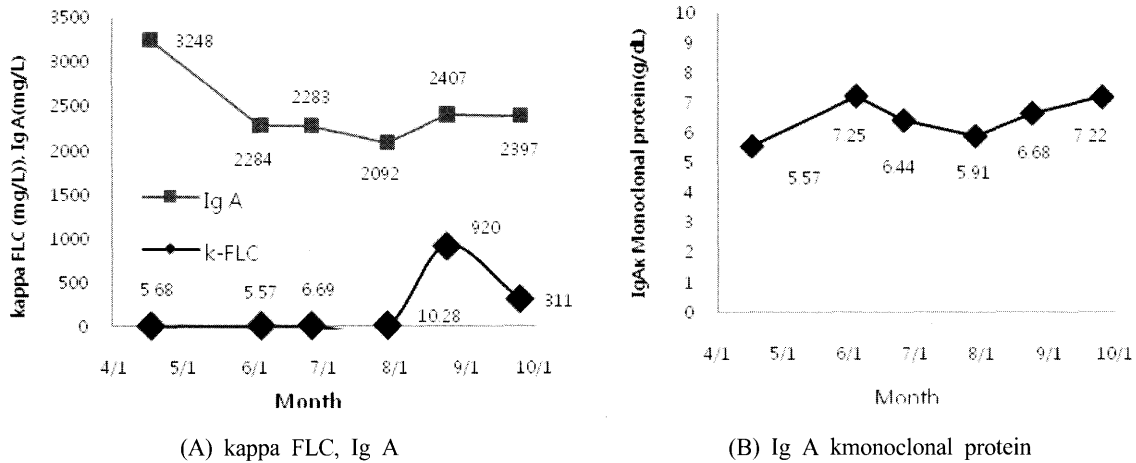


Fig 1. Immunoglobulin A, PEP, and FLCs results

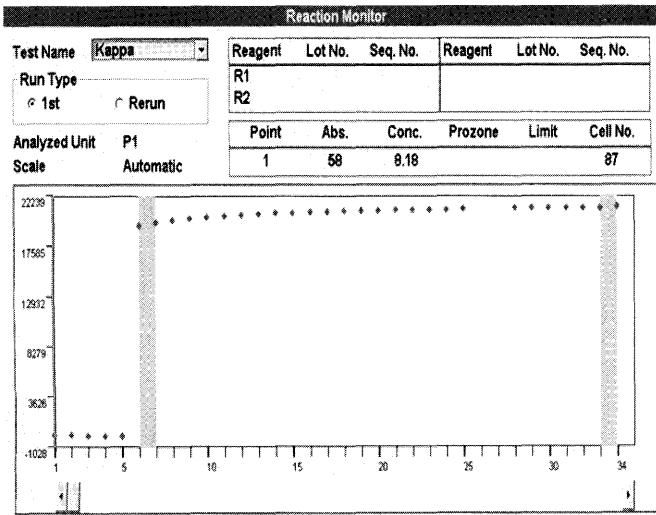


Fig 2. Reaction monitor using Hitachi 7600 P-module with 1:5 dilution

99.08 mg/L의 검체를 계열 희석한 결과 FLCs 결정계수 r2 은 κFLC 0.977, λFLC 0.970로 우수하였으며 κFLC은 66.19부터 λFLC은 82.93부터 자동희석 분석되었다. 이와 유사한 농도의 추가희석실험에서도 비슷한 결과를 나타내었다.

IV. 고 찰

본 예의 초점은 FLCs의 측정 시 항원과잉의 위험성에

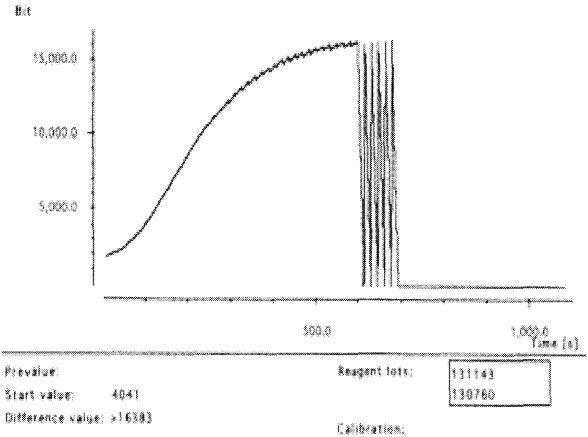


Fig 3. Reaction monitor using BN ProSpec with 1:100 dilution

있다. 여기서의 다소간의 분석적 이슈는 FLCs 농도의 과평가 또는 저평가이다. 이것은 면역혼탁이나 혼탁측정으로 M 단백을 측정하는데 있어서 잠재적인 문제인데 일반적으로 단클론 M 단백질은 시약의 항혈청 내에서 다클론 칼리브레이터에 비하여 다르게 반응하는데 이것은 잠재적으로 어떠한 완전한 단클론성 글로블린 또는 유리혈청을 희석하여 검사하는데 발생된다(Graziani와 Merlini, 2001; Le Bricon 등, 2002; Tate 등, 2003; 강 등, 2004). 항원과잉은 잘못 측정된 낮은 농도 값의 원인이며 의심이 될 때는 검체를 희석해서 측정해야 한다(Daval 등, 2007). 몇 개의 장비는 항원과잉을 체크하는 것을 고안하여 만들어졌으며 제조사에 따르면 FLCs의 농도범위는 매

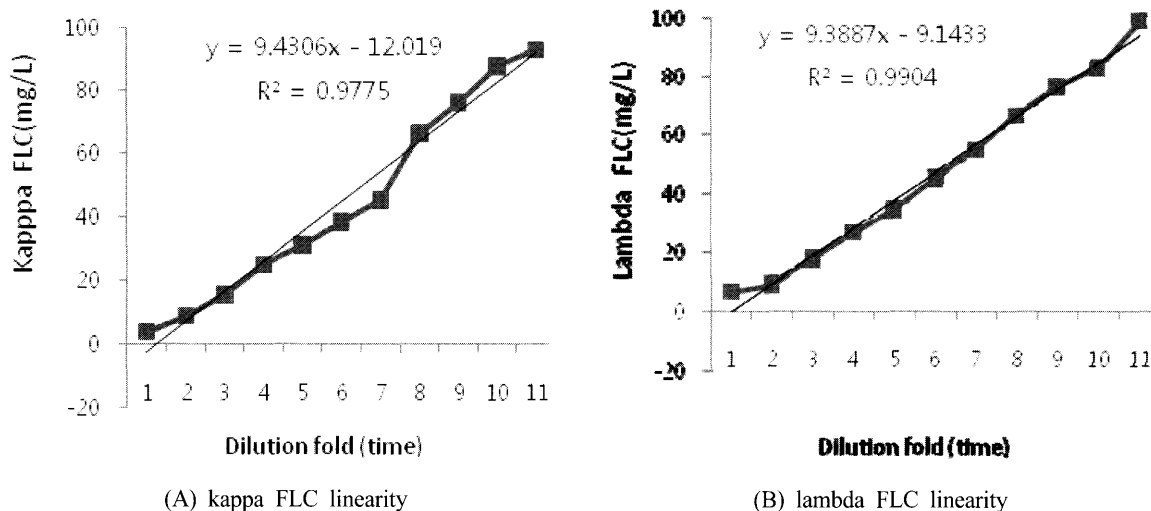


Fig 4. Dilution of the patient's serum specimen for linearity tests

우 넓고 면역분석법은 매우 높은 농도에서는 필연적으로 항원과잉에 기인하여 낮게 측정되는 현상이 나타날 수 있다고 한다(Graziani와 Merlini, 2001). 높은 농도에서의 이러한 현상은 개개인의 골수종에 의한 독특한 단백성 단백질에 의존하며 발생하며, 본 예에서와 같이 극히 일부에서는 크게 높지 않은 농도에서도 나타난다(Carr-Smith 등, 2002). 제조사에서는 또한, 항원과잉현상을 최소화 하려 노력하고 있으나 완벽하게 근절하는 것이 불가능하다고 말하고 있으며, 저평가되는 결과는 진단과 모니터링에 영향을 줄 수 있으며 다음과 같이 제안하였다.

1. 아주 적은 수의 고농도의 free κ 또는, free λ 환자 검체는 'elevated'라고 불리는 거짓 저농도의 결과를 가져올 수 있다. 이러한 대부분의 경우에서는 FLCs의 참고치 또는 FLCs의 κ/λ 비율을 상회한다. 그러므로 어떠한 검체가 참고치를 넘어서는 기대하지 않은 결과를 보여준다면 고도의 희석으로 항원 과잉 보고를 방지해야 한다.
2. 앞에서 설명한 항원과잉은 항상 재 희석하여 보고 하여야 한다.
3. 이와 같은 항원과잉에 대한 검사실간의 결과값이 일치하지 않을 수 있으므로 항원과잉은 희석하여 검사하여야 한다.
4. FLCs 검사를 의뢰하는 의사에게 다음과 같이 조언 한다. 항원과잉은 면역검사법에서 낮게 평가된 결과를 가져온다. FLCs측정은 항원과잉을 최소화하려

노력하였지만 완벽하게 제거하지는 못하였다. 이를 완벽하게 제거하는 것은 불가능하다. FLCs의 측정 결과는 다른 검사와 임상적 증거와 결합해서 해석해야 한다. 이러한 이례적 현상은 측정 검사실과 논의를 해야 한다. 이 중요한 사실이 FLCs 검사실에 채택되길 권고한다.

Showell 등(2008)에 의한 FLCs 측정용 8종의 장비 비교에서 항원과잉이 발견된 장비는 Bindig Site SPPlus와 Roche COBAS Integra 400 뿐이었으나, 최근의 보고에서 Olympus AU400과 Siemens BNII II도 항원과잉이 발생되었다고 보고되었으며(Dayal 등, 2007 McCudden 등, 2009) 본 예에서 Roche Modular P와 같은 기종인 Hitachi 7600 P에서도 항원과잉이 발생하였다. BNII로 항원과잉을 보고한 예에서는 7,538 검체의 κ FLC을 측정할 결과 9검체가 항원과잉을 나타내어 1/840(0.12%)의 비율을 보고하였고 λ FLC에서는 발견되지 않았다고 하였다(Clark 등, 2007).

본 예에서 확인된 항원과잉을 보면 κ FLC 3건(0.24%) λ FLC 6건(0.48%)로서 BNII보다 높은 비율로 항원과잉이 발생하였고 기타 보고가 없어 타 기종과 비교가 불가능하나, 기본적으로 저배율 희석을 사용하므로 항원과잉이 비교적 많이 발생될 것이라고 추정된다. 면역글로블린 G, A, M과 FLCs의 상관관계는 이미 보고된 바와 같이 상관관계가 없었으며(Mead 등, 2004), Tate 등(2003)에

보고에 의하면 FLCs의 분석적 부정확성은 CV 10~11% 이상이며 intra-individual variation은 이보다 높다. 따라서 그들은 좁게 관리되는 정밀한 정도관리와 적절한 칼리브레이션이 중요하다라고 분명히 강조하였다. 또한, McCudden 등(2009)에 의하면 Lot 간의 의미있는 변화를 관찰하였고 본원에서도 일부 Lot 간 차이로 추정되는 결과를 발견하여 제공된 측정범위를 약 15% 축소한 AMR을 사용하고 있으며 저자들이 Delta check 시스템을 사용하여 검체 간 >300 mg/L 농도 변화 검체는 회석검사를 수행하여 추가적인 항원과잉으로 인한 낮은 농도의 보고를 하지 않았다고 하였다. 본원에서는 임상과의 요청에 의해 2시간 이내 보고로 규정되어있는 응급검사인 FLCs의 Delta check와 Panic check를 각각 30%와 >1.0 mg/L, >40 mg/L로 설정하여 면역글로블린 G, A, M의 결과와 기타 생화학적 검사결과를 확인 후 결과를 보고하고 있다. 결과보고 후 FLCs 검사와 같은 검체로 수행되는 PEP, IFE 검사 및 이의 전문의 판독 시에 FLCs의 결과를 확인하여 항원과잉이 의심되는 검체는 재 회석하여 측정하여 확인하도록 업무 흐름이 구성되어 있다.

결론적으로 본 연구를 통해 아직까지 보고된 바 없는 Hitachi 7600 P module을 이용한 FLCs의 측정 시 발생한 항원과잉 예를 보고하였고 이는 검사방법에 한계가 있음을 제조사에서 보고하였으므로 이미 인지하고 있었으나, 본 연구에서는 회석배율이 낮은 원인으로 인해 극히 높지 않은 높은 농도에서도 발생되었다. 검사실에서는 항원과잉으로 인한 저치의 결과를 보고하지 않도록 경각심을 갖고 필요한 업무체계를 구성해야 하겠으며 이를 구축하는 과정에서 FLCs의 검사는 PEP 또는 IFE와 상호보완적이므로 반드시 수행되어야 함을 확인하였다.

참 고 문 헌

1. Askonas BA, Williamson AR. Balanced synthesis of light and heavy chains of immunoglobulin G. *Nature* 216:264-267, 1967.
2. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Drayson MT. Serum free light chain immunoassays and their clinical application. *Clin Appl Immunol Rev* 3:17-33, 2002.
3. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Harvey TC, Drayson MT. Serum test for assessment of patients with Bence Jones myeloma. *Lancet* 361:489-491, 2003.
4. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Tang LX, Showell PJ, Drayson MT, Drew R. Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. *Clin Chem* 47:673-680, 2001.
5. Clark RJ, Lockington KS, Tostrud LJ, Katzmann JA. Incidence of antigen excess in serum free light chain assays. *Clin Chem* 53:145a, 2007.
6. Carr-Smith HD, Showell P, Bradwell AR. Antigen excess assessment of free light chain assays on the Dade-Behring BNII nephelometer. *Clin Chem* 48:23a, 2002.
7. Daval S, Tridon A, Mazon N, Ristori JM, Evrard B. Risk of antigen excess in serum free light chain measurements. *Clin Chem* 53:1985-1986, 2007.
8. Graziani MS, Merlini G. Measurement of free light chains in urine. *Clin Chem* 47:2069-2070, 2001.
9. Le Bricon T, Bengoufa D, Benlakehal M, Bousquet B, Erlich D. Urinary free light chain analysis by the Freelite immunoassay: a Preliminary study in multiple myeloma. *Clin Biochem* 35:565-567, 2002.
10. McCudden CR, Voorhees PM, Hammett-Stabler CA. A case of hook effect in the serum free light chain assay using the Olympus AU400e. *Clin Biochem* 42:121-124, 2009.
11. Mead GP, Carr-Smith HD, Drayson MT, Morgan GJ, Child JA, Bradwell AR. Serum free light chains for monitoring multiple myeloma. *Br J Haematol* 126:348-354, 2004.
12. Showell PJ, Lynch EA, Mitchell F, Mead GP, Bradwell AR. Comparison of serum free immunoglobulin light-chain assays on eight Nephelometric/Turbidimetric analysers. *Clin Chem* 54:C92a, 2008.
13. Tate JR, Gill D, Cobcroft R, Hickman PE. Practical considerations for the measurement of free light

- chains in serum. *Clin Chem* 49:1252-1257, 2003.
14. Tommasi M, Raspanti S, Hook effect in calcitonin immunoradiometric assay. *Clin Chem Lab Med* 45: 1073-1074, 2007.
 15. 강소영, 서진태, 이희주, 윤휘중, 이우인. 혈청유리형 경쇄 참고치 설정과 다발성골수종 환자 들에서의 임상적의의. 대한진단검사의학회지 24:273-278, 2004.
 16. 박일중, 조성란, 이위교. 단클론성 감마글로불린병증 감별을 위한 유리형경쇄 측정. 대한진단검사의학회지 24:91-95, 2004.
 17. 정신경, 김명신, 임지향, 김용구, 한경자, 민창기, 민우성. 다발성골수종 환자의 진단 및 치료효과 추적을 위한 혈청 유리형 경쇄 정량검사의 의의. 대한진단검사의학회지 28:169-173, 2008.