

혈중 사이클로스포린 농도 측정에 있어 MEIA법과 비교한 ACMIA법의 유용성

연세대학교 의과대학 ¹외과학교실 및 ²장기이식연구소

김석모¹ · 주만기^{1,2} · 김혜진¹ · 최상미¹ · 장혜경^{1,2} · 김명수^{1,2} · 김순일^{1,2} · 김유선^{1,2}

The Efficacy of the Affinity Column-mediated Immunoassay Method in Cyclosporine Concentration Assay Compared with the Microparticle Enzyme Immunoassay Method

Seok Mo Kim, M.D.¹, Man Ki Ju, M.D.^{1,2}, Hae Jin Kim, B.S.¹, Sang-Mi Choi, B.S.¹, Hye Kyung Chang, M.D.^{1,2}, Myoung Soo Kim, M.D.^{1,2}, Soon Il Kim, M.D.^{1,2} and Yu Seun Kim, M.D.^{1,2}

¹Department of Surgery and ²The Research Institute for Transplantation, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Cyclosporine is a potent immunosuppressive drug used in organ transplantation. Because of its substantial toxic effect, narrow therapeutic index, and the inter-individual variability of pharmacokinetics, therapeutic drug monitoring of the whole blood cyclosporine concentration has been recommended. We have investigated the comparability of the results of two immunoassay systems, the affinity column-mediated immunoassay (ACMIA) and the microparticle enzyme immunoassay (MEIA), and compared the differences in the cyclosporine concentrations between the two methods in relation to the hematologic and biochemical values. **Methods:** One hundred twenty-one blood samples from kidney recipients were used. We used Dimension[®] RxL HM with a CSA Flex[®] reagent cartridge for the ACMIA method and AXSYM[®] Cyclosporine for the MEIA method. **Results:** Cyclosporine concentrations measured by the ACMIA method (n=121) were closely correlated with those measured by the MEIA method (r=0.948, P<0.0001). The Bland-

Altman plot using concentration differences between the two methods and the average of the two methods also showed no specific trends (R²=0.02, P=0.125). Except hematocrit, other hematologic and biochemical value (albumin, total bilirubin) didn't affect to both cyclosporine level by MEIA and ACMIA method. Both cyclosporine levels determined by the MEIA method and the ACMIA method were positively correlated with hematocrit (P<0.05). **Conclusion:** The ACMIA method used for a cyclosporine assay is precise and has advantages, including the lack of a required pretreatment procedure, and shows same influence by hematocrit compared with the MEIA. (J Korean Soc Transplant 2007;21:223-227)

Key Words: Cyclosporine concentration, ACMIA, MEIA
중심 단어: 사이클로스포린 혈중농도, 미량효소입자, 면역측정법

서론

사이클로스포린(Cyclosporine, CsA)은 이식 환자에서 널리 사용되고 있는 면역억제제이다. 사이클로스포린은 골수를 억제하지 않으면서 선택적으로 조력 T 림프구(Helper T cell)에 작용하여 IL-1 (Interleukin-1), IL-2 (Interleukin-2)의 생성과 조력 T 림프구의 증식을 억제하여 궁극적으로 T 세포 의존성 면역 반응을 차단한다.(1) 사이클로스포린 자체가 가지고 있는 부작용, 좁은 치료 지수, 그리고 개개인의 약물 대사 정도의 다양성으로 인해 혈중 사이클로스포린 농도의 측정이 이식 후 면역억제제 사용에 있어 필수적이다.(2) 현재 대부분의 기관에서 혈중 사이클로스포린 농도의 측정을 위해 단클론성 형광 편광 면역 측정법(Monoclonal fluorescence polarization immunoassay)를 이용하고 있다.(3) 액체 크로마토그래피(liquid chromatography with mass spectrometry, LC-MS)법에 의한 면역 측정법은 단클론성 형광 편광 면역 측정법에 비해 높은 특이성을 보이는 반면, 많은 시간과 숙련된 검사자가 필요하다는 제한이 있어 많

책임저자 : 김명수, 서울특별시 서대문구 신촌동 134번지
연세대학교 의과대학 외과학교실, 120-752
Tel: 02-2228-2123, Fax: 02-313-8289
E-mail: ysms91@yuhs.ac

본 논문은 2007년도 연세대학교 의과대학 장기이식연구소의 연구비 지원으로 이루어졌음.

은 환자를 대상으로 한 정기적인 검사에 사용하기에는 부적합하다. 단클론성 형광 편광 면역 측정법의 하나인 미량 효소 입자 면역 측정법(microparticle enzyme immunoassay, MEIA)은 측정하고자 하는 물질과 결합하는 소립자(submicron microparticle)를 사용하는 방법으로, 검사를 위하여 적혈구와 붙어있는 싸이클로스포린을 분리시키기 위해 용해제를 넣은 후 분해된 상층액을 검사기에서 검사하기 위해 용기에 따로 담아야 하는 전처치가 필요하다.(4) 이런 점을 보완하여 Dade Behring Inc.은 혈중 싸이클로스포린 농도 측정에 Dimension® RxL HM module를 사용한 전처치가 필요 없는 단클론성 면역 측정법(Monoclonal antibody-based immunoassay)인 ACMIA법을 개발하였다. 하지만 아직까지 MEIA법과 ACMIA법을 통한 혈중 싸이클로스포린 농도를 비교한 연구는 몇몇 연구에 국한되어 있고, 또한 MEIA법으로 측정된 혈중 싸이클로스포린의 농도는 혈중 헤마토크릿, 혈청 알부민 및 총 빌리루빈의 농도에 영향을 받는 것으로 알려져 있으나,(5) 이런 인자들이 ACMIA법에도 영향을 미치는지는 아직 확립되지 않은 상태이다.

저자들은 MEIA법과 ACMIA법으로 측정된 혈중 싸이클로스포린 농도 결과의 상관 관계를 살펴 봄과 동시에 이러한 방법으로 측정된 혈중 싸이클로스포린의 농도와 일반혈액 혹은 생화학검사 결과간의 관계를 분석하고자 하였다.

방 법

신장이식을 받고 이식신이 기능하고 있는 121명의 환자

로부터 채취한 혈액 검체를 이용하였다. 환자들은 오전/오후 9시에 싸이클로스포린 경구 제제인 산디문(Sandimmun Neoral®, Novartis Korea Ltd.)이나 사이폴엔(Cipol-N®, Chongkeundang.Co.)을 복용하였고, 투약 후 최소 8시간 이후인 다음날 아침 8~9시 사이에 채혈 하였다.

Dimension® RxL HM with CSA Flex® reagent cartilage (Dade Behring Inc., Newark, U.S.A.)를 사용하여 ACMIA법에 의한 싸이클로스포린 농도를 측정하였으며, MEIA법은 AXSYM® Cyclosporine (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, U.S.A.)장비를 사용하였다. 상기의 두 가지 혈중 농도를 위한 면역 검사법은 동일한 검사실에서 이뤄졌고 제조사에서 제공한 시약과 장비의 사용법에 따라 진행되었다. Dimension®을 이용한 ACMIA법의 진행 과정은 다음과 같다.: CSA Flex® reagent cartridge를 Dimension® system에 적절히 위치시킨 후 The Dimension® system에서 전혈 검체를 혼합, 용해하고, 용해된 검체를 다시 항체가 결합된 시약과 혼합시킨다. 반응 혼합물을 자기장을 이용하여 분리시킨 후, 싸이클로스포린 항체 효소 복합체를 다른 큐벳으로 옮긴 후 기질과 혼합시킨다. 한편, 577 nm에서 빛을 가장 많이 흡수하는 CPR (chlorophenol red)를 생산하기 위해서 CPRG (Chlorophenol red β-d-galactopyranoside)를 β-galactopyranosidase를 이용하여 가수분해 시켜 얻는다. 이렇게 얻은 CPR에 의해 변화되는 577 nm의 파장에서 빛의 흡수를 변화는 환자에서 채취한 검체의 싸이클로스포린의 농도와 비례하여 나타나게 되며 577 nm와 700 nm에서 이색광 분석법을 통해 혈중 싸이클로스포린의 농도를 구할 수 있

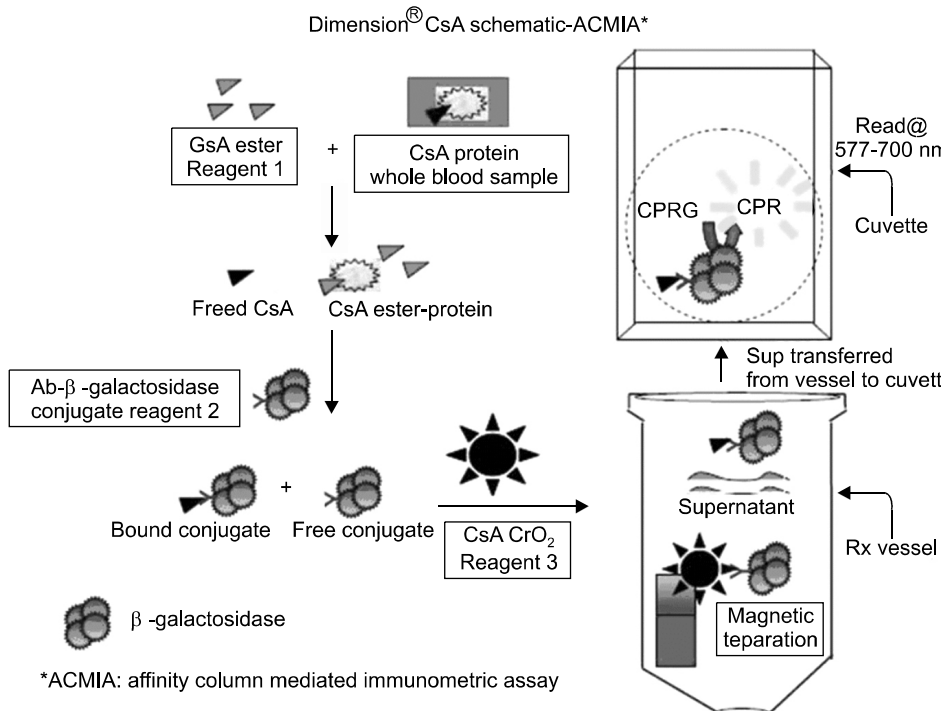


Fig. 1. Schematic image of the cyclosporine assay performed by the affinity column-mediated immunoassay (ACMIA) method with Dimension® RxL HM with a CsA Flex® reagent cartilage (Dade Behring Inc., Newark, U.S.A.) (Adopted from Dimension® Clinical Chemistry System CSA Flex® Reagent Cartridge IFU, Ref DF 107, Version 02/02/06. Dade Behring Inc., Newark, DE 19714 with permission).

다(Fig. 1).

같은 혈액 검체로 일반혈액검사와 생화학검사를 시행하였다. 일반혈액검사는 Advia® 120 (Bayer Corporation, Tarrytown, U.S.A.)를 사용하였고, 생화학검사는 Hitachi 7600-210® (Hitachi Corporation, Japan)을 이용하였다.

통계 분석은 SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)와 MedCalc 9.3 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium)을 이용하였다. 상관 분석, 회귀 분석 및 Bland-Altman plots을 이용하여 ACMIA법과 MEIA법에 따른 결과간의 상관관계를 검사하였고, 혈중 사이클로스포린 농도에 영향을 주는 혈액학적 및 생화학적 인자를 찾기 위해 단순 및 다중 회귀 분석을 이용하였다. 유의수준이 0.05 이하인 경우에 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1) Dimension® 장비의 재현성(performance characteristics) 평가

저, 중, 고농도 세 그룹으로 나누어서 측정한 변동계수(coefficient of variation)는 저농도 그룹(55 ng/mL, 39~77)에서 10.3%로 가장 높았으며 전체적으로 3.4~10.3%의 변동계수를 보였다(Table 1).

2) ACMIA법과 MEIA법으로 측정된 혈중 사이클로스포린 농도의 상관관계

ACMIA법으로 측정된 혈중 사이클로스포린 농도는 134.1±56.2 ng/mL (range 51~328 ng/mL)로 MEIA법으로 측정된 농도 117.9±53.8 ng/mL (range 21~309 ng/mL)보다 높았다. 그러나 ACMIA법으로 측정된 혈중 사이클로스포린

농도는 MEIA법으로 측정된 혈중 사이클로스포린의 농도와 유의한 상관관계가 있었다($r=0.948$, $P<0.0001$, Fig. 2A). Bland-Altman plot상에서도 ACMIA법과 MEIA법에 의해 측정된 농도의 평균값과 차이간에도 특정 경향을 보이지 않았다($R^2=0.020$, $P=0.125$, Fig. 2B).

3) 일반혈액 및 생화학검사 결과와 혈중 사이클로스포린 농도간의 상관관계

ACMIA법과 MEIA법으로 측정된 혈중 사이클로스포린 농도는 각각 혈중 헤마토크릿과 양의 상관관계를 보였다(ACMIA법: $P=0.017$, $R^2=0.047$, MEIA법: $P=0.001$, $R^2=0.082$, Fig. 3A, B). 혈청 알부민농도, 혈청 총 빌리루빈농도, 혈청 ALT 및 AST농도, 혈청 요소질소농도 및 크레아티닌농도, 혈청 전해질농도 등의 생화학검사결과와는 ACMIA법 및

Table 1. Total precisions of measurements of cyclosporine in whole blood by the affinity column-mediated immunoassay (ACMIA) method using the Dade Dimension® RxL HM

Samples (n=20)	Range (ng/mL) (median)	Mean (ng/mL)	SD* (ng/mL)	CV† (%)
Whole blood pool 1	39~77 (55)	48.9	5.0	10.3
Whole blood pool 2	98~170 (134)	114.0	8.5	7.4
Whole blood pool 3	315~503 (409)	353.1	12.0	3.4

*SD = standard deviation; †CV = coefficient of variation.

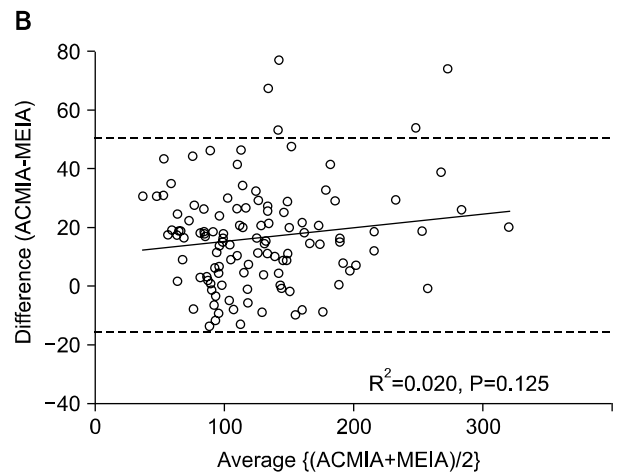
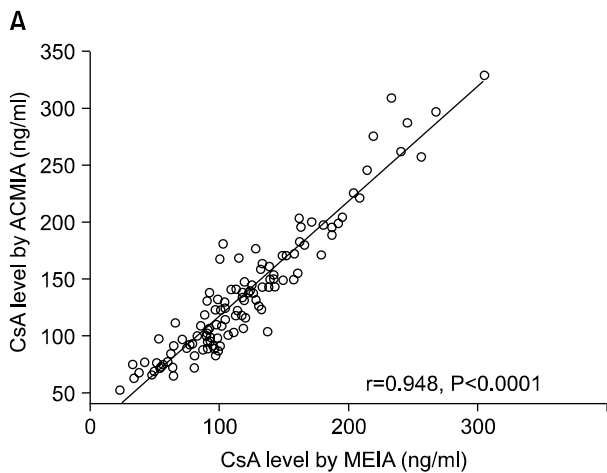


Fig. 2. Correlation of blood cyclosporine concentrations measured by both the microparticle immunoassay (MEIA) and the affinity column-mediated immunoassay (ACMIA) methods. Bimodal correlation analysis shows a significant correlation ($r=0.948$, $P<0.0001$) (A), and Bland-Altman plots show no specific trend ($R^2=0.020$, $P=0.125$) (B).

MEIA법으로 측정된 혈중 사이클로스포린 농도와는 유의한 상관관계를 보이지 않았다.

Table 2. Hematologic and biochemical results affecting to the difference of cyclosporine level by affinity column-mediated immunoassay and microparticle immunoassay

	Unstandardization coefficient		Standardization coefficient β	t	P-value
	B	S.E.*			
Constant	18.911	27.318		0.692	0.490
Hematocrit	-0.623	0.454	-0.191	-1.372	0.173
CsA [†] level by MEIA [‡]	0.016	0.033	0.047	0.472	0.638
Serum creatinine level	1.589	3.582	0.052	0.444	0.658
Serum albumin level	3.106	4.449	0.074	0.698	0.486
Total bilirubin level	-2.761	6.618	-0.047	-0.417	0.677
Serum sodium	-0.015	0.014	-0.100	-1.088	0.279
Serum bicarbonate	0.310	0.589	0.057	0.526	0.600

Dependent variables: Difference between CsA[†] level by MEIA[‡] and ACMIA[§] method. $R^2=0.052$, $P=0.520$. *S.E. = standard error; [†]CsA = cyclosporine; [‡]MEIA = the microparticle enzyme immunoassay method; [§]ACMIA = the affinity column-mediated immunoassay method.

4) 일반혈액 및 생화학검사 결과가 두 농도간의 차이에 미치는 영향

다중회귀분석상 ACMIA법과 MEIA법으로 측정된 혈중 사이클로스포린 농도간의 차이는 헤마토크릿을 포함한 일반혈액검사 결과나 생화학검사결과에 영향을 받지 않는다 (Table 2).

고찰

민감성과 특이성을 고려한다면 질량 분석을 이용한 액체 크로마토그래피(liquid chromatography with mass spectrometry, LC-MS)법에 의한 혈중 사이클로스포린 농도 측정이 MEIA법이나 ACMIA법보다 우위에 있다. 하지만 LC-MS법은 긴 검사 시간과 숙련된 검사자를 필요로 하기 때문에 많은 수의 환자를 대상으로 한 정기적인 검사로는 적합하지 않다. 실제 임상 영역에서는 이러한 면을 고려하여 LC-MS법을 대신하여 MEIA법이 가장 많이 사용되고 있다. 하지만 MEIA법 역시 검사자에 의한 전처리(pre-treatment)가 필요하다. 이와 달리 ACMIA법에서는 전처리가 필요하지 않아 검사시간을 줄일 수 있으며, 검사자에 따른 개체 변이 오류(individual variation errors)를 방지 할 수 있다.(6,7)

본 연구에서 MEIA법으로 이용한 AXSYM[®] Cyclosporine 장비의 변동계수(coefficient of variation, CV)는 5.9~8.9%이며, ACMIA법으로 이용한 Dimension[®] 장비의 변동계수는 3.4~10.3%였다. 변동계수에 대한 허용기준은 없지만 본 연구에서 확인된 변동계수는 임상적으로 유용한 수준으로, 다른 보고에서의 결과와 비슷하였다.(8)

ACMIA법으로 측정된 사이클로스포린의 혈중농도는 MEIA법으로 측정된 농도와 비교하여, 통계학적으로 유의

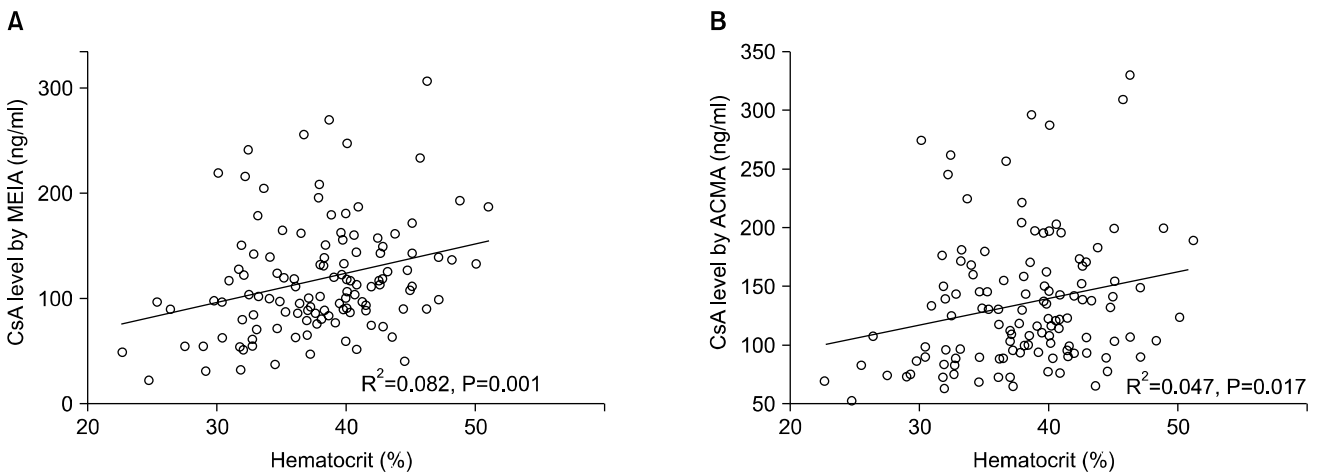


Fig. 3. Cyclosporine concentrations measured by both the microparticle immunoassay (MEIA) ($R^2=0.082$, $P=0.001$) (A) and the affinity column-mediated immunoassay (ACMIA) ($R^2=0.047$, $P=0.017$) (B) methods were affected by hematocrit levels in each of the correlation analyses.

한 상관관계를 가지고 있다고 보고되고 있으며,(8) 본 연구의 결과도 이와 일치하였다. 비록 ACMIA법으로 측정된 혈중 농도의 값이 MEIA법으로 측정된 혈중 농도보다 높았으나, 그 검사결과간에는 높은 상관성을 가지고 있었다($r=0.948$, $P<0.0001$).

혈중 헤마토크릿, 혈청 알부민 및 총 빌리루빈의 농도는 면역학적 방법을 이용한 혈중 농도검사에서 사이클로스포린 농도에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.(9,10) 하지만 본 연구에서는 MEIA법과 ACMIA법에서 혈중 헤마토크릿에만 유의한 관계를 보였고(ACMIA법: $P=0.017$, $R^2=0.047$, MEIA법: $P=0.001$, $R^2=0.082$, Fig. 3A, B), 혈청 알부민 및 총 빌리루빈 농도와는 유의한 관계를 보이지 않았다(알부민: $P=0.056$, 총 빌리루빈: $P=0.898$). 하지만 이전 연구에 의하면 혈중 혈액학적 인자나 혈청 생화학적 인자와 면역학적 검사를 통한 약물농도는 음의 상관관계, 즉 헤마토크릿이나 총 빌리루빈이 정상 농도보다 낮을 시에 측정된 혈중 사이클로스포린의 농도가 높게 나오는 것으로 알려져 있으나,(11,12) 이번 연구에서는 헤마토크릿에서만 유의한 상관관계를 보였고, 양의 상관관계를 보이는 다른 결과를 얻었다. 이는 연구에서 사용된 대부분의 검체가 이식된 기능을 유지하고 있는 즉 일반혈액 및 생화학검사 결과가 정상 범위 내에 있는 환자를 대상으로 하였기 때문에 면역검사에 영향을 줄 수 있는 검체의 수가 적었던 것에 기인 하였을 것으로 생각된다.

혈중 사이클로스포린 농도 검사를 시행할 때 혈중 생화학적 인자들이 낮은 상태에서는 세포 내 물질들이 세포 밖으로 이동하게 되고 이들과 검사에 사용하는 항체와의 불특정 결합으로 인해 실제 보다 높은 혈중 농도를 보이게 된다.(13,14) 일반적으로 ACMIA법에서 사용하는 항체가 보다 높은 특이성을 가지는 것으로 알려져 있다.(14) 하지만 이번 결과에서는 두 검사법 모두 헤마토크릿에만 영향을 받고 다른 혈액학적 및 생화학적 인자에는 영향을 받지 않는 것으로 나타나 ACMIA법이 MEIA법과 비교하여 보다 높은 특이성을 보이지는 않았다. 더구나 두 검사결과간의 차이도 헤마토크릿을 포함한 모든 일반혈액 및 생화학검사에 따라 영향을 받지 않았다. 이는 두 검사결과가 같은 일반혈액 및 생화학검사 결과 내에서는 동일한 결과를 보인다는 것을 의미한다.

결론적으로 Dimension® 장비를 이용한 ACMIA법은 기존의 MEIA법과 높은 상관 관계를 가지면서, 전처리 과정이 필요 없는 장점을 지닌다. 따라서 ACMIA법은 기존에 널리 사용되고 있는 MEIA법을 대체할 수 있는 유용한 방법이라고 생각된다.

REFERENCES

- 1) Ollerich M, Armstrong VW, Schutz E, Shaw LM. Therapeutic drug monitoring of cyclosporin and tacrolimus. Clin Biochem 1998;31:309.
- 2) Fahr A. Cyclosporin clinical pharmacokinetics. Clin Pharmacokinet 1993;24:472.
- 3) McKenna RM, Schroeder TJ. Immunological monitoring in cyclosporine-treated patients. Clin Biochem 1991;24:75-80.
- 4) Shibata N, Hoshino N, Yamaji A, Park Ki, Inoue H, Tomoyoshi H, Abe H, Kodama M, Nakane Y. Erythrocyte-to-plasma distribution ratio of cyclosporine: a useful indicator to predict cyclosporine pharmacokinetics and physiological changes during cyclosporine monitoring. Transplant Proc 1996; 28:1313-5.
- 5) Shibata N, Shimakawa H, Minouchi T, Yamaji A. Erythrocyte uptake and protein binding of cyclosporin A (CyA) in human blood: factors affecting CyA concentration in erythrocytes. Biol Pharm Bull. 1993;16:702-7.
- 6) Cyclosporine, AXSYM® system. Ref 3B36, 34-4274/R9. Abbott Laboratories. Abbott Park, Illinois, U.S.A.
- 7) Mik O'Connor, Dimension® CSA Technical Training, 06/06, Dade Behring Today's Best Resource™.
- 8) Griffey MA, Hock KG, Kilgore DC, Wei TQ, Duh SH, Christenson R. Scott MG. Performance of a no-pretreatment tacrolimus assay on the Dade Behring Dimension RxL clinical chemistry analyzer. Clinica Chimica Acta In press.
- 9) Shibata N, Yamaji A, Park K, Tomoyoshi T, Sako H, Abe H, Kodama M, Nakane Y, Hodohara K, Hosoda S. A simple method for predicting the cyclosporin A erythrocyte-to-plasma distribution ratio in blood, and its clinical assessment. Biol Pharm Bull 1994;17:709-14.
- 10) Homma M, Tomita T, Yuzawa K, Takada Y, Kohda Y. False positive blood tacrolimus concentration in microparticle enzyme immunoassay. Biol Pharm Bull 2002;25:1119.
- 11) Akhlaghi F, Trull AK. Distribution of cyclosporin in organ transplant recipients. Clin Pharmacokinet 2002;41:615-37.
- 12) Wong SH. Therapeutic drug monitoring for immunosuppressants. Clin Chim Acta 2001;313:241-53.
- 13) Cogill JL, Taylor PJ, Westley IS, Morris RG, Lynch SV, Johnson AG. Evaluation of the tacrolimus II microparticle enzyme immunoassay (MEIA II) in liver and renal transplant recipients. Clin Chem 1998;44:1942.
- 14) Ansermot N, Fathi M, Veuthey JL, Desmeules J, Hochstrasser D, Rudaz S. Quantification of cyclosporine A in peripheral blood mononuclear cells by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry using a column-switching approach. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2007;857: 92-9.