

ELISA를 이용한 cortisol 측정법의 정립 및 임상적 응용

나기정 · 이창우

서울대학교 수의과대학
(1996년 3월 15일 접수)

Development of ELISA for cortisol and it's application to clinical use

Ki-jeong Na, Chang-woo Lee

Department of Veterinary Medicine, Graduate School Seoul National University

(Received Mar 15, 1996)

Abstract : ELISA kit for cortisol was developed and then evaluated. Polyclonal anti-hydrocortisone-3-(o-carboxymethyl)oxime BSA rabbit serum was used to coat the 96-well microplates. The minimum detection limit of the kit was 250pg of cortisol per milliliter. The within-run variation and the day to day variation of the ELISA system were 2.0 and 5.9 at maximum, respectively.

The kit was used to determine whether salivary cortisol concentration could replace blood cortisol concentration in dexamethasone suppression test of dogs. Changes of cortisol concentration were measured in serum or saliva after intravenous administration of 0.01mg of dexamethasone per kilogram of body weight. Blood alone, saliva alone or both were collected at 0, 30, 60, 120, 240, and 360 minutes after injection of dexamethasone. The change in blood cortisol concentration was found to be suitable in dexamethasone suppression test of dogs, but the change in salivary cortisol concentration was not.

The kit was also used to determine whether salivary cortisol concentration could be a stress index as well as blood cortisol concentration in dogs. Two types of trial were performed to estimate the stress either by blood or salivary cortisol concentration.

The first trial was stress experiment by intravenous injection of 0.2IU of PZI-insulin per kilogram body weight. Either blood alone or saliva alone was collected at 0, 30, 60, and 90 minutes after insulin administration. Both blood and salivary cortisol concentration were found to be suitable index in estimating stress from hypoglycemia by injection of insulin.

The second trial was stress experiment by electrical irritation. The dogs were irritated with anti-bark device for 10 seconds. Blood was collected before and at 2 and 5 minutes after electrical irritation. Saliva was collected before and at 3 and 6 minutes after electrical irritation. The blood cortisol concentration, but not the salivary cortisol concentration was

Address reprint requests to Dr. Ki-jeong Na, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744, Republic of Korea.

found to be suitable index in estimating stress from electrical irritation.

Cushing syndrome in a dog was also successfully diagnosed with this kit.

key words : ELISA, cortisol, stress, dexamethasone suppression test.

서 론

처음으로 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 가 Engvall et al¹에 의해 소개된 이후 cortisol의 측정에도 ELISA가 이용되었다².

동물에서 혈액 cortisol 농도가 정상 범위일 때에는 최소 한 90% 가량이 결합력이 강한 transcortin과 결합되어 있다. Cortisol의 농도가 정상보다 높을 때는 transcortin의 양이 제한되어 있기 때문에 transcortin과 결합하고 남은 cortisol의 대부분은 알부민과 결합한다. 나머지는 생리학적 활성을 띠는 유리된 형태의 cortisol로 존재한다^{3,4}. 이 사실은 cortisol의 분비가 증가되면 혈액중 유리 cortisol의 농도가 증가한다는 것을 의미한다.

Cortisol 농도는 동물과 사람에서 부신파질기능항진증과 부신파질기능저하증의 진단을 위해 측정하지만 동물이나 사람에서 스트레스의 정도를 파악하기 위해서도 측정된다⁵. 그 예로 동물에서 수송 및 보정에 따른 스트레스 정도를 알기 위한 지표로써 cortisol 농도를 이용할 수 있다는 것이 제시되었으며⁶ 또한 Chinese water deer의 보정방법에 따른 스트레스의 정도를 혈장 cortisol 농도로 나타내었다⁷.

다른 동물에서와는 달리 개에서 glucocorticoids를 투여했을 때 당신생이 증진되더라도 인슐린의 생성이 빨리 일어나 고혈당증이 나타나지 않는다⁸. 이 사실은 개에서의 스트레스 지표로써 혈당량의 측정은 부적합하며 혈액 cortisol 농도가 이용될 수 있음을 제시한다.

Fell et al⁹은 양에서, Sanhour et al¹⁰은 염소에서, Cooper et al¹¹은 소와 사람에서 타액중의 cortisol 농도가 혈액중의 유리 cortisol 농도를 반영한다고 하였다. 또한 Greenwood와 Shutt⁶은 스트레스를 준 염소의 타액중에 cortisol 농도가 증가한다고 하였다. 이와같은 관찰로부터 스트레스의 지표로써 혈액중 cortisol 농도를 이용할 수 있고, 혈액 총cortisol 농도가 증가하면 혈액중 유리 cortisol 농도가 증가하며 이 현상이 타액 cortisol 농도에 반영된다는 사실을

종합하면 타액중의 cortisol 농도를 측정하여 스트레스 정도를 파악하는 것이 가능하다는 가설이 성립된다.

따라서 본 연구는 cortisol 측정을 위한 ELISA kit를 제작하고, 이것을 이용하여 혈액 대신 타액에서 dexamethasone 억제 시험과 스트레스를 준 개에 있어서 cortisol 농도를 측정함으로써 임상적인 응용이 가능한지를 알아보는데 목적이 있다.

재료 및 방법

공시동물 : Cortisol에 대한 항혈청을 생산하기 위해 3~4개월령의 토키(Newzealand white)를 사용하였다. Cortisol 측정에 이용한 동물은 임상적으로 건강한 체중 2.5~12kg의 잡견 12마리와 임상증상 및 임상병리학적 검사결과 Cushing 증후군으로 진단된 13년령 9kg의 Dachshund 한 마리를 사용하였다. 이 개의 임상증상으로는 변갈증, 읊챙이배 모양, 얇고 나약한 피부 등을 나타내었다. 혈액 검사 결과 총백혈구수 6000개/ml, 호산구 0%, 호염기구 0%, 간상핵호중구 10%, 호중구 80%, 림프구 9%, 단핵구 1% 등이었다. 혈청화학적인 검사결과 ALT 300IU/L, ALP 1320(heat stable isoenzyme 228)IU/L, cholesterol 484mg/dl 이었다. 건강한 실험동물은 케이지에 한 마리씩 사육하였고, 1달 이상의 환경적응과정을 거쳤다.

시료채취 및 처리 : 실험 1일전에 18G의 정맥용 카테터를 경정맥에 장착하고 회석 heparin 50IU/ml을 약 1ml씩 카테터에 채웠다. 채혈은 혈액 2ml를 미리 뽑아 내어 카테터내의 heparin을 제거한 후에 하였다. 실온에서 응고시킨 혈액은 700×g로 20분간 원심분리하여 혈청을 채취하였다. 타액은 개의 입안 볼 부위에 직경 1~1.5cm의 솜덩어리를 30~40초 가량 넣고서 솜에 묻도록 하였다. 타액이 묻은 솜은 3ml 주사기에 넣고 그 주사기는 다시 원심분리관에 넣었다. 이것을 3000×g로 30분간 원심분리하여 타액만을 회수하였다. 회수한 타액은 열렸다 녹여 점도를 낮췄다. 모든 처리가 끝난 혈청과 타액은 측정할 때까지 -20°C에 보관하였다.

ELISA kit의 제작 : 면역은 hydrocortisone-3-(o-carboxymethyl)oxime BSA (Sigma Chemical Co)을 항원으로 사용하였다. 항원 1.5mg을 complete Freund's adjuvant (Difco Lab)와 혼합하여 토끼의 등쪽에 피내접종하였다. 추가접종은 1.5mg의 항원을 incomplete Freund's adjuvant와 혼합하여 사용하였다. 1, 2차 추가접종은 2주 간격으로, 3차 추가접종은 1개월 후에 하였다.

항체의 역가 측정은 항혈청을 96-well microplate(Nunc Co)에 coating하고 나서 일정량의 표준 cortisol과 흐로우지 cortisol을 경쟁반응시켰으며 면역시키지 않은 혈청을 대조군으로 하여 항체역가를 측정하였다.

항혈청속에 존재하는 항 BSA 항체를 제거하기 위하여 항혈청 ml 당 0.05mg의 BSA(Sigma Chemical Co)를 첨가하여 4°C에서 72시간 incubation하였다. 이것을 원심분리한 후에 상층액을 membrane filter(pore size 0.2, 0.45μm, 녹십자 의료공업)로 여과한 후 Hudson과 Hay¹²의 방법에 따라 Protein G sepharose column(Protein G sepharose Fast Flow와 LKB column C10, Pharmacia)로 친화성 크로마토그라피를 실시하여 3ml씩 분획을 채취하였다. 각각의 분획은 280nm에서 각 분획의 흡광도를 측정하였다. 항 cortisol 항체의 coating은 0.05M carbonate buffer(pH 9.6)로 회석하여 well당 100μl씩 분주한 후에 37°C에서 2시간 정치하여 항 cortisol 항체를 coating하였다. 그후 pH 7.4의 0.02M PBS(0.05% Tween 20 함유, Sigma Chemical Co)로 3회 세척하였다. 이어서 0.1% gelatin (Sigma Chemical Co)이 함유된 PBS를 well 당 200μl씩 넣고 실온에서 30분간 정치하여 blocking 하였다.

ELISA에 의한 cortisol 측정은 direct antigen competition 법으로 실시했다. 시료와 horseradish peroxidase(HRP)표지 cortisol(Sigma Chemical Co)을 well 당 50μl씩 각각 넣고 37°C에서 혼들면서 1시간 반응시켰다. HRP 표지 cortisol은 column PD-10(Pharmacia)로 정제해 사용하였다. 세척은 Tween 20을 함유한 PBS로 3회 하였다. 기질용액을 100μl씩을 넣은 후 37°C에서 혼들면서 20분간 반응시켰다. 기질용액은 tetramethylbenzidine dihydrochloride(TMB, Sigma Chemical Co) 1mg을 0.05M phosphate-citrate buffer(pH 5.0) 10ml에 녹이고 30% H₂O₂ 2μl를 첨가하여 만들었다. 정지액으로는 2M H₂SO₄ 50μl를 사용하였고, 450nm의 파장에서 ELISA reader(Titertek Multiskan MCC/340)로 흡광도를 측정하였다. 측정값은 4회 반복 측정하여 최고치와 최저치를 제외한 평균으로 하였다.

ELISA의 최적 조건은 항혈청과 HRP표지 cortisol에 대한 checkerboard titration을 실시하여 구하였다.

ELISA kit의 검정 : 표준곡선 작성을 위한 cortisol(Sigma Chemical Co)은 ethanol에 2mg/ml이 되도록 용해하여 4°C에 보관하였다. 이것을 PBS로 회석하여 다양한 농도의 표준액(0.1~1000ng/ml)을 만들어 사용하였다. 각각의 표준액에 대해 ELISA를 실시하여 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 percent bound(PB)로 환산하였으며, 각각의 표준액 농도에 대해 24회 반복 측정하였다.

$$PB = \frac{\text{sample OD}}{\text{negative blank OD}} \times 100$$

측정감도는 표준곡선의 0ng/ml의 PB값에서 2SD값을 뺀 값을 매의 PB값에 해당되는 cortisol 농도를 최소 측정한계로 결정하였다.

동시재현성(within-run variation)은 동일한 microplate 내에서 cortisol 표준액을 PBS로 회석하여 2.5~100ng/ml이 되도록 하여 이것을 6회 반복측정하여 각각의 농도에 대하여 coefficient of variation(CV) 값을 구하였다.

일차재현성(day to day variation)은 위와 동일한 용량의 표준 cortisol을 날짜와 microplate를 달리해 5회 반복 측정하여 CV값을 조사하였다.

정확도(accuracy)는 건강한 개에 dexamethasone을 0.5mg/kg으로 투여하고 6시간이 지난후에 cortisol 농도가 낮은 혈청과 타액을 채취하였다. 여기에 cortisol을 5, 50, 500ng/ml이 되도록 첨가하고 회수율을 측정하여 정확도를 조사하였다. 회수율은 다음과 같은 방법으로 계산하였다.

$$\text{회수율} = \frac{\text{혈청 및 타액에서 측정된 cortisol 농도(실측치)}}{\text{혈청 및 타액에 넣은 cortisol 농도(이론치)}} \times 100$$

교차반응은 11-dehydrocorticosterone, 17α-hydroxy-progesterone, 17α-estradiol, 21-deoxycortisol, corticosterone, dexamethasone, prednisone, prednisolone에 대하여 검사하였다(Sigma Chemical Co). 각각의 호르몬은 ethanol로 1mg/ml이 되도록 용해한 후 50, 500, 5000ng/ml이 되도록 PBS로 회석하였다. 제작된 kit로 ELISA를 실시하여 얻어진 흡광도를 가지고 그래프를 작성하여 다음과 같이 교차반응성(CR50)을 구하였다.

$$CR_{50} = \frac{\text{coating 항체와 HRP표지 cortisol의 반응을 50% 억제하는 cortisol 농도}}{\text{coating 항체와 HRP표지 cortisol의 반응을 50% 억제하는 steroid 농도}} \times 100$$

Dexamethasone 억제시험 : Dexamethasone 억제시험 (dexamethasone suppression test; DST)은 dexamethasone 투

여전에 시료를 채취하고 0.01mg/kg의 dexamethasone을 정맥주사한 후 30, 60, 90, 120, 240, 360분에 혈청시료를 채취하여 각각의 cortisol 농도를 측정하였다.

DST는 dexamethasone 투여후 혈청 대신 타액중의 cortisol 농도를 측정하여 진단하는 것이 가능한지 조사하기 위해 혈청과 타액의 cortisol 농도를 측정하여 비교하였다. Dexamethasone 투여후 혈액과 타액을 모두 채취할 때 과다한 스트레스로 인한 문제점의 발생여부를 조사하였다. 이를 위해 dexamethasone 투여후 혈액을 먼저 채취하고 즉시 타액을 채취하여 각각의 cortisol 농도를 측정하기도 하고, 타액과 혈액을 각각 단독으로 채취하여 cortisol 농도를 측정하여 비교하였다. 시료채취 방법에 변이를 주는 실험은 최소한 1주일간의 간격을 두고 하였다.

Cushing 증후군으로 진단된 개에 대한 DST는 축주의 집에서 실시하였다.

Insulin 스트레스 실험 : Insulin 주사전에 혈청을 채취하고 중시간형 insulin 제제인 human insulin(PZI형, 녹십자) 0.2IU/kg을 정맥주사한 후 30, 60, 90분에 혈액을 채취하여 혈당 및 혈청 cortisol 농도를 각각 측정하였다. 1주일후 동일한 방법으로 insulin을 주사하고 타액만을 채취하여 타액 cortisol 농도를 측정하였다.

전기자극 실험 : 개가 짖을 때 진동에 의해서 전기가 흐르도록 고안된 장치(ワンSTOP, 株キンペツクス インタナショナル)를 목에 장착한 후 10초간 전기자극을 하였다. 자극을 주기 전에 혈액과 타액을 채취하고 자극이 끝난 후 혈액은 2분과 5분에, 타액은 3분과 6분에 채취하여 각각 cortisol을 측정하였다.

통계처리 : DST, insulin 스트레스 실험 및 전기자극 시험에서 시간별 cortisol 농도 및 혈당량의 변화를 Tukey의 ANOVA test로 유의성을 검정하였다.

결 과

항혈청의 항체역가 : Cortisol을 접종하지 않은 토끼의 혈청을 대조로 하여 4차 접종이 끝난 토끼의 혈청을 가지고 ELISA를 실시하였다. 혈청을 32,000 회석배율에서도 대조 혈청보다 높은 흡광도를 보였다.

ELISA의 최적조건 : Checkerboard titration을 실시하여 항체와 HRP표지 cortisol의 최적 회석배수를 관찰한 결과 각각 800과 2,000배일 때 가장 적합하였다(Fig 1, 2). 기질과 반응하여 발색을 일으키는 시간은 20분이 적정시간

이었다.

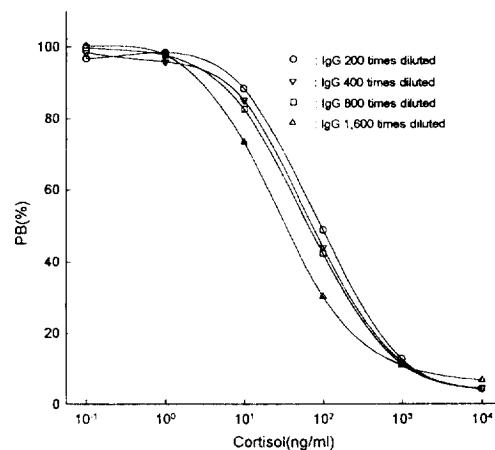


Fig 1. Dose response curve of cortisol when HRP-cortisol was diluted to 1:2,000 and purified IgG was diluted to 1:200, 400, 800, or 1,600 times.

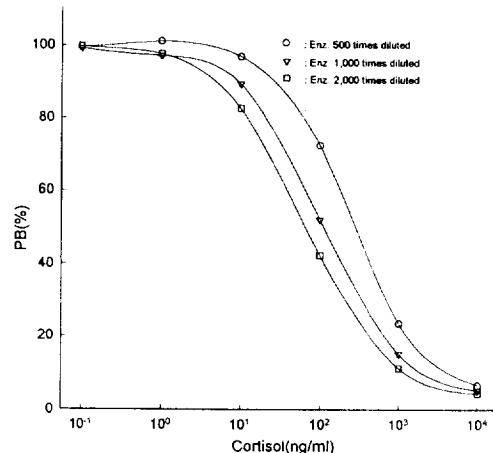


Fig 2. Dose response curve of cortisol when purified IgG was diluted to 1:800 and HRP-cortisol was diluted to 1:500, 1,000, or 2,000 times.

ELISA kit의 검정 : 다양한 농도의 cortisol 표준액에 대해 각각 24회 반복측정하고 PB값을 구하여 얻은 표준곡선은 Fig 3과 같았다. 제작된 kit의 최소측정한계는 250pg/ml이었다.

Cortisol 농도가 2.5~100ng/ml일 때 동시재현성의 CV값은 0.6~2.0이었다(Table 1). 일차재현성의 CV값은 0.7~5.9로써 동시재현성의 CV값보다 약간 높은 경향을 보였 다(Table 2).

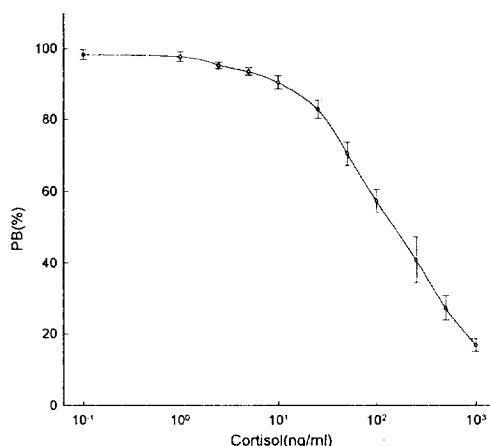


Fig 3. Standard curve for determination of cortisol concentration. The vertical bar represents one standard deviation.

Table 1. Coefficient of variation in within-run assay for each cortisol concentration

Cortisol(ng/ml)	CV
100	2.0
50	1.3
25	1.1
10	1.0
5	0.8
2.5	0.6

Table 2. Coefficient of variation in day to day assay for each cortisol concentration

Cortisol(ng/ml)	CV
100	5.9
50	2.7
25	2.8
10	0.7
5	3.0
2.5	1.2

Cortisol 농도가 낮은 혈청과 타액에 5, 50, 500ng/ml의 cortisol을 첨가한 후 cortisol 농도를 측정한 결과 혈청 cortisol 농도는 각각 5, 56, 630ng/ml로써 평균 회수율은 113%이었다. 타액 cortisol 농도는 각각 4, 52, 487ng/ml으로써 평균 94%의 회수율을 보였다. 혈청의 회수율은 낮은 농도에서 100%에 가까운 값을 보인 반면에 높은 농도인 500ng/ml에서는 126%의 회수율을 보였다(Table 3).

각종 스테로이드 호르몬에 대한 교차반응은 0.004~34%으로 다양하게 나타났다(Table 4). 특히 prednisolone의 경우 가장 높은 교차반응을 보였으며 DST에 사용되는 dex-

amethasone의 경우 0.2%의 매우 낮은 교차반응을 나타냈다.

Table 3. Cortisol recovery rate from serum and saliva

Added amount of cortisol (ng/ml)	Serum		Saliva	
	Measured value (ng/ml)	Recovery rate(%)	Measured value (ng/ml)	Recovery rate(%)
5	5	100	4	80
50	56	112	52	104
500	630	126	487	97

Table 4. Cross-reactivity of the rabbit anti-cortisol-3-(o-carboxymethyl) oxime IgG with various steroid Hormones

Steroid hormone	Cross-reactivity(%)
① 11-Dehydrocorticosterone	0.56
② 17 α -Hydroxyprogesterone	6.6
③ 17 α -Estradiol	0.004
④ 21-Deoxycortisol	14.8
⑤ Corticosterone	4.7
⑥ Dexamethasone	0.2
⑦ Prednisolone	34.0
⑧ Prednisone	7.0

Dexamethasone 억제시험 : Dexamethasone을 투여 후 혈청과 타액의 cortisol농도를 시간별로 측정하였다. 혈청중의 cortisol농도는 dexamethasone 투여후 60분부터 현저한 감소를 나타내어 투여후 6시간에는 투여전 수준의 49%에 달했다(Fig 4). 그러나 분산분석 결과 혈청 cortisol 농도는 시간별로 유의성을 나타내지 못했다. 타액중 cortisol 농도는 dexamethasone 투여후 오히려 증가하는 경향을 나타내었다(Fig 4).

Dexamethasone 투여후 혈청에서만 cortisol 농도를 측정한 결과 투여후 30분부터 투여전 수준에 비해 감소하기 시작하고 투여후 60분부터 유의성 있는 감소를 나타내었다($p < 0.01$) 그리고 투여후 6시간에는 투여전 수준의 7%에 달했다(Fig 5).

Dexamethasone 투여후 타액만 채취하여 cortisol 농도를 측정한 결과 투여후 30분부터 투여전 수준에 비해 감소하기 시작하고 투여후 6시간에는 투여전 수준의 43%에 달했다. 그러나 시간별 cortisol 농도는 유의차를 나타내지 못했다(Fig 6).

Insulin 스트레스 실험 : Insulin 정맥주사 전과 주사후 30, 60, 90분에 혈당량과 혈청 cortisol 농도를 측정한 결과 cortisol 농도는 혈당량의 경시적인 감소에 반비례하여

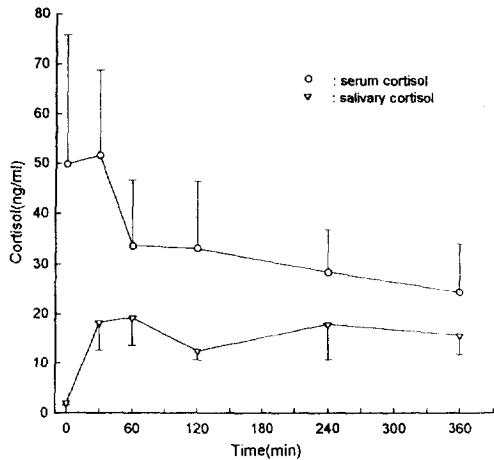


Fig 4. Changes of cortisol concentration in serum and saliva of 9 dogs after intravenous administration of 0.01mg of dexamethasone per kilogram of body weight. The saliva was collected soon after the completion of blood sampling each time. The vertical bar represents one standard deviation.

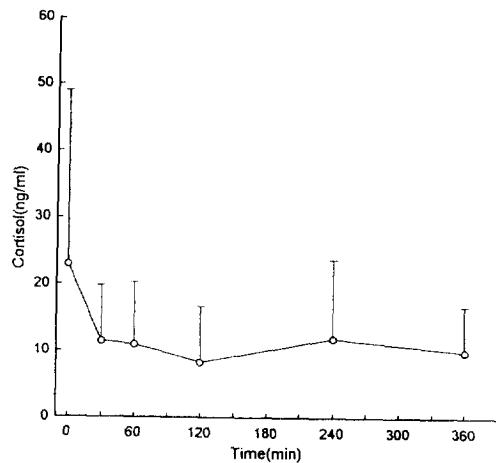


Fig 6. Changes of cortisol concentration in saliva of 9 dogs after intravenous administration of 0.01mg of dexamethasone per kilogram of body weight. Only saliva was sampled each time. The vertical bar represents one standard deviation.

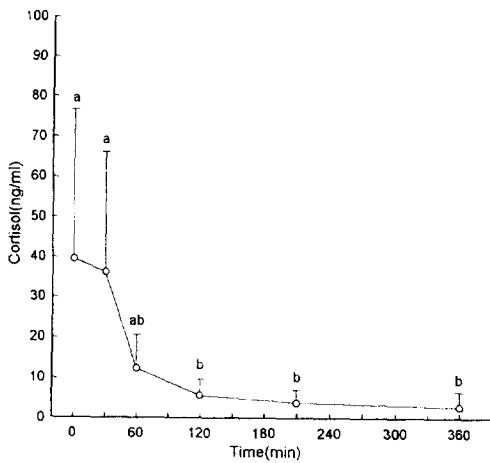


Fig 5. Changes of serum cortisol concentration of 9 dogs after intravenous administration of 0.01mg of dexamethasone per kilogram of body weight. Only blood was sampled each time. The vertical bar represents one standard deviation ($p < 0.01$).

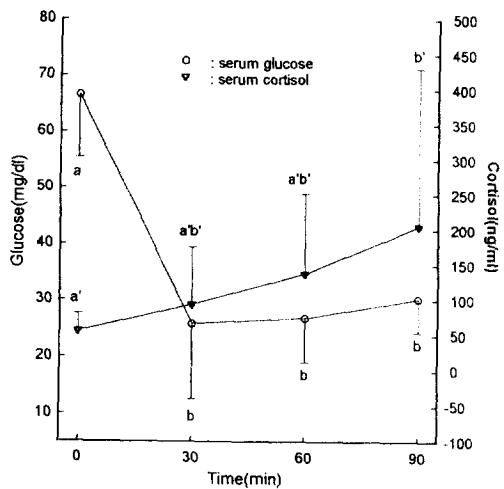


Fig 7. Changes of glucose and cortisol concentration in serum of 10 dogs after intravenous injection of 0.2 IU of insulin (PZI type) per kilogram of body weight. The vertical bar represents one standard deviation ($p < 0.05$).

증가하였고 투여후 30분부터 증가하기 시작하여 90분에 유의성($p < 0.05$) 있는 증가를 나타냈다(Fig 7).

Insulin 정맥주사 전과 주사후 30, 60, 90분에 타액 중의 cortisol 농도를 측정한 결과 insulin 투여후 60분부터 완만히 증가하여 90분에 유의성($p < 0.05$) 있는 증가를 나타냈

다(Fig 8). 이 결과는 혈청 cortisol 농도의 증가보다 늦은 속도로 타액 cortisol 농도가 증가한 것이다.

전기자극 실험 : 혈청 cortisol 농도는 10초간 전기자극을 한 후에 즉시 증가하기 시작하였고, 자극후 2분과 5분에 각각 투여전에 비해 유의성($p < 0.05$) 있는 증가를 나타

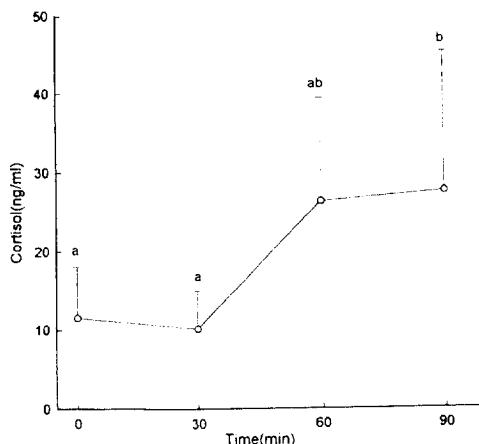


Fig 8. Changes of cortisol concentration in saliva of 10 dogs after intravenous injection of 0.2 IU of insulin(PZI type) per kilogram of body weight. The vertical bar represents one standard deviation($p < 0.05$).

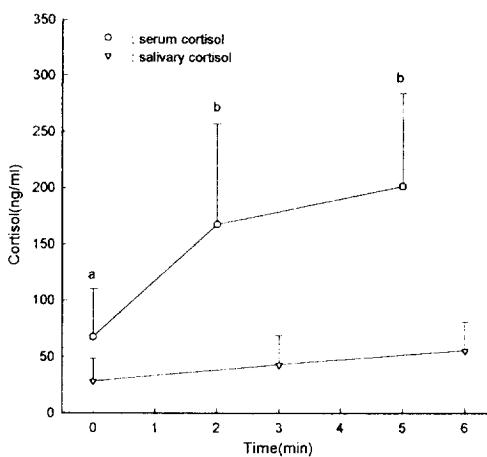


Fig 9. Changes of cortisol concentration in serum and saliva of 9 dogs after electrical irritation for 10 seconds. The vertical bar represents one standard deviation($p < 0.05$)

내었다(Fig 9).

타액 cortisol 농도는 10초간 전기자극을 한 후에 즉시 증가하기 시작하였으나 증가폭이 혈청 cortisol 농도 보다 낮고 자극 후 3분과 6분의 타액 cortisol 농도가 자극 전에 비해 유의차를 나타내지 못했다(Fig 9).

Cushing 증후군에 걸린 개의 DST : 임상증상과 임상 병리학적 검사결과 Cushing 증후군으로 진단된 개에 대해 dexamethasone 억제시험을 실시하였다. 투여직전의 혈청 cortisol 농도는 530ng/ml이었으며, 투여후 8시간의 혈청

cortisol 농도는 420ng/ml로써 dexamethasone 투여전의 79% 수준이었으며, Cushing 증후군을 확진할 수 있었다.

고 칠

오랫동안 보관하기 위하여 sodium azide를 PBS²와 항혈청¹³에 첨가하기도 하지만 cyanide, sulfide, fluoride, azide, hydrazine, hydroxamic acid 등은 horseradish peroxidase (HRP)의 반응을 억제시키는 것으로 알려져 있다. 이 실험에서는 HRP를 효소로 사용하는 관계로 sodium azide를 사용하지 않았다.

이 실험에서는 혈중 cortisol 농도를 측정하기 위한 시료로써 혈청을 사용하였다. 실험자에 따라서 혈청¹⁴⁻¹⁶을 사용하기도 하고, 때로는 혈장^{9,17-19}을 사용하기도 한다. 혈장을 사용하는 것이 시료준비 시간이 단축되고 세포의 효소에 의해서 cortisol이 대사되는 것을 신속히 막아주는 장점이 있다. 그러나 heparin을 항응고제로 사용해야 하고 heparin 처리 혈장은 오래 보관할 경우 fibrin이 형성되기도 하는 단점이 있다. 혈청분리를 위해서는 어느정도 시간이 걸리지만 cortisol은 채혈후 4°C에 보관할 경우 24시간 까지 안정한 것으로 밝혀져 Gosling et al⁴은 cortisol 측정에 혈청을 사용하는 것이 문제가 되지 않는다고 하였다.

단백질은 microplate에 1 μ g/ml의 농도로 coating을 하여야 monolayer를 형성하고, 보다 높은 농도를 사용하게 되면 microplate에 흡착되지 않고 다른 단백질에 결합하여 반응을 방해한다²⁰. 정제하여 얻은 항체의 농도는 0.6mg/ml로 coating 할 때는 800배 회석하였다. 결국 0.75 μ g/ml 이 microplate에 coating 할 때 사용한 단백질의 최종농도가 된다. Checkerboard titration을 하여 얻은 최적의 coating 단백질 농도는 1 μ g/ml에 근사한 값으로 적정수준에서 결정된 것으로 판단된다.

발색반응이 끝난 microplate의 최대흡광도는 2.0 전후에서 결정되도록 하였다. log-log 그래프에서 coating되는 항체의 농도가 너무 낮아서 receptor에 결합하는 ligand가 receptor의 수를 초과하지 않는 한 시료의 농도에 따른 흡광도의 변화는 이론적으로 직선을 나타낸다²¹. 그러므로 시료의 낮은 농도와 높은 농도에서도 직선을 형성하도록 coating 항체와 효소의 농도 및 반응시간을 조절하면서 적정조건을 설정하였다.

Coating이 끝난 microplate에 coating buffer를 넣고 4°C에서 보관했을 때 3개월간 안정하다고 Dressendörfer et

al²²은 보고하였다. 본 실험에서 제작하여 사용한 cortisol 측정용 kit는 37°C에서 전조시켜 제습제가 들어있는 밀폐 용기에 넣은 다음 4°C에서 보관하면서 사용하였다. 이때 6개월 이후에도 최대흡광도가 2.0에 가깝게 유지되는 것으로 보아서 안정성이 있는 것으로 판단되었다. 제작된 kit에 대한 검정결과 최소 측정한계 즉, 민감도는 Kaiser와 Specker²³의 방법에 따라 결정하였다. 이때의 최소측정 한계는 250pg/ml로 이차항체를 사용한 Cooper et al¹¹의 1pg/ml, Lewis et al²⁴의 10pg/ml 보다는 민감도가 떨어졌으나 Lewis와 Elder²의 값과 같았다.

정상적인 개에서 조사된 혈중 cortisol 농도는 9.4~23.2ng/ml¹, 6.0~28.5ng/ml¹⁵, 10~57.7ng/ml¹⁷ 등으로 조사자에 따라 다양하게 보고되어 있다. 정상적인 개에 스트레스를 주거나 ACTH를 투여했을 경우 Eiler와 Oliver²⁵는 121ng/ml을, Feldman²⁶은 부신피질기능항진증의 개에서 최고 500ng/ml의 값을 얻었다. 즉, 1~500ng/ml 범위의 cortisol을 측정할 수 있는 kit는 부신의 기능을 평가하는 기본적인 실험에 적합하다고 생각된다. 본 실험에서 제작된 kit의 목표 측정범위는 0~1,000ng/ml이었으며 실험기간 동안 측정된 cortisol농도는 0~350ng/ml이었다. Microplate에 coating 되는 항체의 농도를 0.75μg/ml 보다 낮은 농도로 하여 최대 측정 한계를 낮춘다면 최소 측정한계는 250pg/ml 보다 낮아질 수 있었을 것으로 생각된다.

시료를 측정할 때는 매 microplate마다 standard curve를 작성하고 반복측정에 의하여 오차를 줄일 수 있으며 그 횟수는 경제적인 면을 고려해야 한다²⁷. 본 실험에서 microplate 내의 변이계수는 최대 2.0%이고, microplate 간의 변이계수는 최대 5.9%였다. 이것은 Lewis와 Elder²가 보고한 microplate 내 간의 최대 변이계수인 10.2와 10.4% 보다 낮은 값이었다. 이것은 이차항체를 사용하는 실험단계가 생략됨으로 인해 비록 측정감도는 낮아지나 반복 측정에 따른 오차의 폭이 줄어든 것으로 생각된다.

Cortisol과 유사한 구조를 갖는 다른 steroids와의 교차반응은 dexamethasone, prednisolone 및 21-deoxycortisol에 대하여 각각 0.2, 34, 14.8%로 나타냈다. dexamethasone에 대한 교차반응은 0.2%로 매우 낮아 DST에서 사용하는 dexamethasone이 cortisol의 측정에 영향을 거의 주지 않는 것으로 판단되었다. Gosling et al¹이 지적하였듯이 prednisolone은 steroids의 기본구조중 20~21번 탄소부위가 cortisol과 동일하고 1번과 2번 탄소 사이에 이중결합을 형성하는 점이 다르다. 본 연구에서는 항원으로 cortisol-3-(o-

carboxymethyl) oxime BSA를 사용하였다. 면역원성을 높이기 위하여 사용하는 다리(bridge)가 3번 탄소에 결합될 경우는 1~2번의 이중결합이 가리어 에피톱으로 작용할 확률이 낮아진다. 따라서 34%의 prednisolone에 대한 교차반응은 낮추기 어려울 것으로 판단된다. 그러나 prednisolone은 합성제제로써 cortisol 측정에 사용되는 동물에 측정하기 전에 투여하지만 않는다면 이러한 문제점은 해결되리라고 추측된다.

개에서의 circadian rhythm 존재여부는 확실하게 밝혀지지는 않았고, 일반적으로 cortisol 측정은 오전에 실시하고 있으며²⁸, circadian rhythm이 확인되지 않았기 때문에 채혈을 오전 9시와 오후 3시 사이에서 하기도 한다¹⁶. 이 실험에서는 오전 8~10시 사이에 실험을 시작하였으므로 circadian rhythm에 따른 문제점이 없다고 판단되며 DST의 경우는 6시간이 소요되어 오후에 채혈이 끝나기도 하였다.

사람에서 cortisol 측정은 타액에서 유리 cortisol을 측정하는 것이 혈중의 총cortisol을 측정하는 것보다 훨씬 좋다고 하였다²⁹. Vincent와 Michell³⁰은 개의 타액 cortisol을 잘 훈련된 beagle 견을 이용하여 측정하였다. 그러나 소와 성숙한 양에서는 타액 받는 것이 쉬울 수 있으나 나이가 어린 양에서는 타액을 받는 것이 쉽지는 않다고 하였으며^{9,11}, 이 실험에서도 소형의 개에서 1ml 가량의 타액을 얻는 것이 어려웠다.

DST 결과, 혈액과 타액을 같이 측정한 실험에서는 혈액과 타액중으로의 cortisol 분비가 제대로 억제되지 않았다. 타액에서와 혈청에서의 DST를 따로 실시하였을 경우 Eiler와 Oliver²⁵의 결과에서와 같이 1시간 후 부분적인 혈청 cortisol 농도의 감소가 관찰되고 이어서 2시간 후 완전한 감소를 확인할 수 있었다. 그러나 타액 cortisol은 dexamethasone 투여 6시간 후 cortisol 농도가 기초치의 49%로 감소하였으나 유의성 있는 감소는 확인되지 않았다. Rijnberk et al¹⁹이 Cushing 증후군의 개를 감별하는데는 저용량 DST가 가장 좋지만 스트레스나 질병 및 약물투여에 의해서 영향을 받는다고 하였듯이 타액채취과정이 스트레스로 작용하여 DST의 결과에 영향을 준 것으로 판단된다. Knol et al³¹의 실험에 의하면 훈련된 실험견에서 채혈 환경이나, 주사바늘 삽입시의 통통 스트레스 등이 혈중 cortisol의 농도에 영향을 주지 않는다고 하였다. 이러한 사실을 고려해볼 때 타액을 받기 위해 개의 입을 벌리는 행동이 스트레스로 작용할 수 있으며 반복훈련에 의해서

이러한 상태는 완화될 것으로 판단된다. 그러나 환축을 대상으로 타액을 받는 훈련을 시킨 후에 DST를 실시하는 것은 실용적이지 못한 것으로 판단된다. 연구기간에 Cushing 증후군에 걸린 환축에 대해 DST를 실시할 수 있는 기회는 1건밖에 없었으나 이 연구에서 제작한 ELISA kit로 Cushing 증후군을 확진할 수 있었으며, 이 기술을 앞으로 임상에 효과적으로 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

DST의 실험결과에 따라서 타액채취 때의 거부반응을 줄이기 위해 타액채취 동작을 반복 연습시켰다. 초기 타액 채취 때는 입안에 넣은 솜뭉치를 벨으려고 했으나 횟수가 거듭되면서 솜뭉치를 그대로 물고 있는 것을 볼 수 있었다. 사람에서 타액을 쉽게 빨기 위해 Benjamins et al⁵은 citric acid crystal을 입에 넣어 타액분비를 자극하였다. 예비 실험 단계에서 citric acid crystal을 가지고 개의 타액분비를 촉진시켜 충분한 타액을 채취하기는 하였으나 타액채취시 개가 심하게 거부하였으며 cortisol 농도의 측정치가 일정하게 나오지 않는 경향을 보였다. 사람에서와는 달리 citric acid crystal을 경구내 투여했을 때 개들에게서는 스트레스로 작용하는 것으로 추측된다.

Insulin 스트레스 실험은 뇌하수체 전엽의 기능과 미주 신경 절단술의 평가에 사용된다³². Insulin을 투여하면 성장호르몬과 ACTH 그리고 cortisol이 증가하게 된다. Insulin 스트레스 실험에서 혈청 cortisol 농도의 변화폭보다는 타액 cortisol 농도의 변화폭이 훨씬 적었다. 타액의 cortisol 농도는 혈액내의 총 cortisol 농도중 유리 cortisol 농도를 반영해 준다³⁰는 사실을 고려하면 insulin 스트레스에 의한 혈중 cortisol 농도의 증가는 유리 cortisol보다 생리학적 활성을 띠지 않는 결합 cortisol의 증가폭이 훨씬 높은 것으로 보인다.

전기자극 실험은 혈액과 타액을 같이 채취하여 cortisol 농도를 측정하였다. 이때의 결과에서도 결합 cortisol 농도의 변화 폭이 훨씬 크게 나타났다. 염소를 가지고 실험한 Greenwood와 Shutt⁶의 결과와도 일치하였다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 저용량 DST에서 타액 시료를 이용하는 것은 적합하지 않았다. 그리고 전기자극 스트레스 실험과 같이 짧은 시간동안의 스트레스 지표로써는 타액 cortisol 농도가 적합하지 않으나 insulin 스트레스 실험처럼 장시간의 스트레스 지표로서는 매우 유용할 것으로 판단된다. 앞으로 사람에서 타액을 빨기 위해 사용하는 장치를 개에서도 응용할 수 있다면 저용량 DST에 타

액시료를 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

결 론

Cortisol 측정을 위하여 ELISA kit를 제작하고 이것을 검정하였다. 96-well microplate는 다클론성 anti-hydrocortisone-3-(o-carboxymethyl)oxime BSA 토끼 혈청으로 흡착시켰다.

이 kit의 최소 측정한계는 250pg/ml이고 동시재현성과 일차재현성의 변이계수는 각각 최대 2.0와 5.9였다. 이 kit를 사용하여 개에서 dexamethasone 억제시험을 할 때 혈청 cortisol 농도 대신 타액 cortisol 농도로 대치할 수 있는지를 조사하였으며 체중 kg당 0.01mg의 dexamethasone을 정맥 주사하였다. 혈액 단독, 타액 단독 또는 두 가지 모두를 dexamethasone 투여 전, 투여 후 30, 60, 120, 240 및 360분에 채취하여 cortisol 농도를 측정하였다. 측정결과 dexamethasone 억제시험의 시료로써 타액 보다 혈청이 적합하였다.

타액의 cortisol 농도가 혈청 cortisol 농도처럼 스트레스 지표로 이용될 수 있는지를 조사하기 위하여 두 가지 형태의 스트레스 실험에 혈청 cortisol 농도와 타액 cortisol 농도를 측정하였다.

첫번째, insulin 스트레스 실험에서는 체중 kg당 0.2IU의 PZI-insulin을 정맥주사하였다. insulin 주사 전과 주사 후 30, 60, 및 90분에 혈액만을 채취하거나 타액만을 채취하여 cortisol의 경시적인 변화를 관찰하였다. 이 결과 insulin 스트레스 실험을 위한 시료로써는 혈청과 타액이 모두 적합하였다.

두번째, 전기자극 실험은 10초간 개를 짓지 못하게 훈련시키는 전자기구를 이용하여 전기자극을 가하고 경시적으로 혈액과 타액을 채취하여 cortisol 농도의 변화를 관찰하였다. 전기자극 스트레스 실험을 위한 시료로써 혈청은 적합하였으나 타액은 부적합하였다. 이 연구에서 제작된 kit를 이용하여 Cushing 증후군을 성공적으로 진단할 수 있었다.

참 고 문 헌

- Engvall E, Jonsson K, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of en-

- zyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. *Biochem Biophys Acta*, 251:427, 1971.
2. Lewis JG, Elder PA. An Enzyme-Linked immunosorbent assay(ELISA) for plasma cortisol. *J Steroid Biochem*, 22:673-676, 1985.
 3. Baulieu EE, Kelly PA. *Hormones from molecules to disease*. New York:Hermann, 396-397, 1990.
 4. Gosling JP, Middle J, Siekmann L, et al. Standardization of hapten immunoproccedures: total cortisol. *Scand J Clin Lab Invest*, 53:3-41, 1993.
 5. Benjamins C, Asschelman H, Schuurs AH. Increased salivary cortisol in severe dental anxiety. *Psychophysiology*, 29:302-305, 1992.
 6. Greenwood PL, Shutt DA. Salivary and plasma cortisol as an index of stress in goats. *Aust Vet J*, 69: 161-163, 1992.
 7. Hastings BE, Abbott DE, George LM, et al. Stress factors influencing plasma cortisol levels and adrenal weights in Chinese water deer (Hydropotes inermis). *Res Vet Sci*, 53:375-380, 1992.
 8. Siegel ET. *Endocrine diseases of the dog*. Philadelphia: Lea & Febiger, 150-151, 1977.
 9. Fell LR, Shutt DA, Bentley CJ. Development of a salivary cortisol method for detecting changes in plasma "free" cortisol arising from acute stress in sheep. *Aus Vet J*, 62:403-406, 1985.
 10. Sanhouri AA, Jones RS, Dobson H. Effects of xyazine on the stress response to transport in male goats. *Br Vet J*, 148:119-128, 1992.
 11. Cooper TR, Trunkfield HR, Zanella AJ, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay for cortisol in the saliva of man and domestic farm animals. *J Endo*, 123:13-16, 1989.
 12. Hudson L, Hay FC. *Practical immunology*. 3rd ed. London:Blackwell scientific publications, 315, 1989.
 13. Ruder HJ, Guy RL, Lipsett MB. A radioimmunoassay for cortisol in plasma and urine. *J Clin Endocrinol Metab*, 35:219-224, 1972.
 14. Becker MJ, Helland D, Becker DN. Serum cortisol (hydrocortisone) values in normal dogs as determined by radioimmunoassay. *Am J Vet Res*, 37: 1101-1102, 1976.
 15. Chen CL, Kumar MSA, Williard MD, et al. Serum hydrocortisone(cortisol) values in normal and adrenopathic dogs as determined by radioimmunoassay. *Am J Vet Res*, 39:179-181, 1978.
 16. Frank LA, Kunkle GA, Beale KM. Comparison of serum cortisol concentration before and after intradermal testing in sedated and nonsedated dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 200:507-510, 1992.
 17. Eiler H, Oliver JW, Legendre AM. Stages of hyperadrenocorticism: Response of hyperadrenocorticoid dogs to the combined dexamethasone suppression/ACTH stimulation test. *JAVMA*, 185:289-294, 1984.
 18. Feldman EC. Comparison of ACTH response and dexamethasone suppression as screening tests in canine hyperadrenocorticism. *JAVMA*, 182:506-510, 1983.
 19. Rijnberk A, von Wees A, Mol JA. Assessment of two tests for the diagnosis of canine hyperadrenocorticism. *Vet Rec* 1988;122:178-180.
 20. Cantarero LA, Butler JE, Osborne JW. The absorptive characteristics of proteins for polystyrene and their significance in solid phase immunoassays. *Anal Biochem*, 105:375, 1989.
 21. Peterman JH. Immunological considerations in the analysis of data from non-competitive solid-phase immunoassays. In: Butler JE, ed. *Immunochemistry of Solid-phase immunoassay*. Florida:CRC Press, 47-65, 1991.
 22. Dressendorfer RA, Kirschbaum C, Rohde W, et al. Synthesis of a cortisol-biotin conjugate and evaluation as a tracer in an immunoassay for salivary cortisol measurement. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 43: 683-692, 1992.
 23. Kaiser H, Specker H. Vergleich von analysen Verfahren. *Z Anal Chem*, 149:46, 1956.
 24. Lewis JG, Manley L, Townsend JC, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for urinary free cortisol. *Clinica Chimica Acta*, 159:205-209, 1986.

25. Eiler H, Oliver J. Combined dexamethasone suppression and cosyntropin (synthetic ACTH) stimulation test in the dog: New approach to testing of adrenal gland function. *Am J Vet Res*, 41:1243-1246, 1980.
 26. Feldman EC. Evaluation of a six-hour combined dexamethasone suppression/ACTH stimulation test in dogs with hyperadrenocorticism. *JAVMA*, 189: 1562-1566, 1986.
 27. Bunch DS, Rocke DM, Harrison RO. Statistical design of ELISA protocols. *J Immu Methods*, 132: 247-254, 1990.
 28. Bamberg-Thalén B, Nyberg L, Fackler L, Edqvist LE. Cortisol binding capacity of corticosteroid binding globulin in hyperadrenocorticoid and healthy dogs. *Res Vet Sci*, 52:363-366, 1992.
 29. Bonnin R, Villabona C, Rivera A, et al. Is salivary cortisol a better index than free cortisol in serum or urine for diagnosis of Cushing syndrome? *Clin Chem*, 39:1353-1354, 1993.
 30. Vincent IC, Michell AR. Comparison of cortisol concentrations in saliva and plasma of dogs. *Res Vet Sci*, 53:342-345, 1992.
 31. Knol BW, Dieleman SJ, Bevers MM, et al. Effects of methods used for blood collection on plasma concentrations of luterising hormone, testosterone, and cortisol in male dogs. *Vet Q*, 14:126-129, 1992.
 32. Lascelles PT, Donaldson D. *Diagnostic function tests in chemical pathology*. United Kingdom:Kluwer Academic Publishers, 91-93, 1989.
-