

Haemophilus influenzae type b 피막 다당질 특이 인간 IgG 항체의 정량적 측정을 위한 enzyme immunoassay의 타당성 연구

이화여자대학교 의과대학 소아과학교실, 미생물학교실*, 의과학연구소 백신효능연구센터

김 경 호 · 임 수 영*

Validation of enzyme immunoassay for the quantitative measurement of human IgG antibodies specific for Haemophilus influenzae Type b capsular polysaccharide

Kyung Hyo Kim, M.D., Soo Young Lim, B.A.

Department of Pediatrics and Microbiology, College of Medicine, Ewha Womans University, Center for Vaccine Evaluation and Study, Medical Research Institute, Ewha Womans University, Seoul, Korea

Purpose: This study was conducted to validate enzyme immunoassay (EIA) for the quantitative measurement of human IgG antibodies specific for Haemophilus influenzae type b (Hib) capsular polysaccharide.

Method: We evaluated specificity, repeatability, intermediate precision, accuracy, lower limit of quantification (LLOQ), and stability to validate standardized EIA for the quantitative measurement of human anti-polyribosylribitol phosphate (PRP) IgG antibodies.

Results: The results indicated that this EIA showed specificity to HbO-HA antigen and repeatability and intermediate precision were within acceptance criteria (repeatability: CV ≤15%, intermediate precision: CV ≤20%). The EIA-derived results from this laboratory were equivalent to those obtained by the standard radioactive antigen binding assay (RABA) for quantitation of anti-PRP antibodies in the 28 sera. Spiking recovery result was within acceptance criteria (100±20%). The precision and accuracy of samples in LLOQ were from -14.7 to -4.7% in nominal values, which were within acceptance criteria (precision: CV ≤25%, accuracy: ±25%). Freeze-thaw stability and short term temperature stability were within ±20% of acceptance criteria.

Conclusions: The EIA which is performed at the Center for Vaccine Evaluation and Study Ewha Medical Research Institute, is an appropriate serologic assay which can be used for quantitation of anti-PRP IgG antibodies in human sera. (Korean J Pediatr 2007;50:143-150)

Key Words: Haemophilus influenzae type b, Antibodies, Enzyme immunoassay, Validation studies

서 론

b형 헤모필루스 인플루엔자(Haemophilus influenzae type b, Hib) 피막의 다당질인 polyribosylribitol phosphate (PRP)는

접수: 2006년 9월 12일, 승인: 2006년 10월 30일

본 논문의 요지는 2006년 한국소아감염병학회 추계학술대회에서 구연 발표됨

책임저자: 김경호, 이화여자대학교 의과대학 소아과학교실

Correspondence: Kyung Hyo Kim, M.D.

Tel: 02)760-5363, Fax: 02)765-3855

E-mail: kaykim@ewha.ac.kr

Hib 감염의 발병 이전에 중요한 역할을 하고, PRP에 대한 적절한 농도 이상의 항체가 있으면 Hib 감염이 예방된다¹⁾. 1980년대에 영아에게도 항체 반응을 유발하는 PRP-단백 결합 백신 (PRP-protein conjugate vaccine)이 수종 개발되었다^{1, 2)}. 여기에는 PRP에 수막구균(Neisseria meningitidis)의 외막 단백질(outer membrane protein)을 결합시킨 PRP-OMP^{3, 4)}, 디프테리아균(Corynebacterium diphtheriae)의 독소의 돌연변이 단백질 CRM197 단백을 결합시킨 HbOC (PRP-CRM197)⁵⁾ 및 파상풍 독소이드를 결합시킨 PRP-T 등이 있다^{6, 7)}.

PRP-단백 결합 백신의 면역원성은 PRP에 대한 항체 반응으

로 평가한다⁸⁻¹¹. PRP에 대한 항체는 연령이 증가하면서 자연적으로 생성될 수 있어 이를 자연 항체(natural antibody)라고 한다^{8,9}. 일반적으로 PRP에 대한 자연 항체가가 0.15 µg/mL 이상이면 Hib 감염에 대해 예방이 가능하며, 백신 접종 후에 생성되는 항체가가 1 µg/mL 이상이면 장기적인 예방 효과가 있는 것으로 연구되었다⁸⁻¹¹. 이 때문에 백신의 효과는 PRP에 특이하게 반응할 수 있는 항체의 생성에 의해 결정되어지므로 특이 항체의 측정을 통해 백신의 효과를 알 수 있다. 백신에 대한 특이 항체 반응의 측정은 효소면역법(enzyme immunoassay)에 의한 양적 측정이 가장 잘 알려져 있고 세계적으로 사용되고 있다¹².

본 연구는 그동안 국외에서만 시행된 Hib 백신의 효과를 평가하는데 사용되는 항 PRP 항체 측정을 위한 효소면역법을 국내의 연구실에서 시행하고, 시행하는 효소면역법의 타당성 검사를 시행하여, 이를 통해 향후 Hib 백신의 효과 평가가 가능한 검사실의 설립과 검사실의 질적 확립을 위해 시행하였다.

대상 및 방법

1. 검량 표준액(calibration standard)의 준비와 제조

항 PRP IgG 항체 농도가 60.9 µg/mL인 미국 Center for Biological Evaluation and Research(CBER)의 표준 항-PRP 혈청(Lot 1983, CBER, Bethesda, MD, USA)¹²을 Dr. Carl Frasch로부터 공급 받아 사용하였다. 이를 0.02% NaN₃와 0.05% Tween-2가 포함된 인산완충용액인 항체 완충액(buffer)으로 희석하여 1/500의 희석표준 혈청으로 제조하였다. 이렇게 제조된 0.122 µg/mL의 표준 혈청을 항체 완충액으로 2배씩 6회 연속 희석하여 생성되는 0.122, 0.061, 0.030, 0.015, 0.008, 0.004 그리고 0.002 µg/mL의 희석 표준 혈청 용액을 검량 표준액으로 사용하였다.

2. 검액의 준비와 제조

1) 정도 관리(quality control) 혈청의 제조

이화여자대학교 의과대학연구소 백신효능연구센터에서 Hib 백신의 접종력이 없는 건강한 성인 자여자 10명의 혈액을 채취하여 항 PRP 항체 검사를 시행하였다. 이들을 항 PRP 항체가가 매우 높은 군(QCVH), 높은 군(QCH), 보통인 군(QCM), 낮은

군(QCL) 및 미정 군(QCunknown)으로 임의로 분류하여 이들 중 1-3명의 혈청을 모아 정도 관리 혈청 5종을 제조하고 각각 등분하여 -70°C에 보관하였다. 만들어진 5종의 정도 관리 혈청은 아래에 설명한 효소면역법에 의해 항 PRP 항체가를 약 50회 이상 시험하여 각각의 혈청가의 표준편차(standard deviation, SD)를 구하여 ±2SD 값으로 각 정도 관리 혈청 항체가의 허용 범위를 정하였다¹³. 다섯 종류의 정도 관리 혈청과 항체가의 허용 범위는 QCVH는 24.11-66.04 µg/mL, QCH는 3.13-5.52 µg/mL, QCM는 1.20-2.06 µg/mL, QCL는 0.16-0.36 µg/mL, 및 QCunknown은 3.45-5.78 µg/mL이다.

2) 검액의 제조

QCVH 혈청을 항체 완충액으로 기본적으로 1/100 희석하여 준비하였다. 또한 QCH, QCM, QCL 및 QCunknown 정도 관리 혈청을 각각 항체 완충액으로 기본적으로 1/50 희석하여 준비하였다. 1/100로 희석된 QCVH 시료와 1/50로 희석된 나머지 정도 관리 시료들을 항체 완충액으로 각각 2배씩 7회 연속 희석해 1/100-1/12,800 희석 QCVH 용액 또는 1/50-1/6,400 희석 QCH, QCM, QCL 및 QCunknown 정도 관리 혈청을 검액으로 사용하였다.

3. 효소 면역법

항 PRP 항체 측정을 위한 효소 면역법에 사용된 HbO-HA 항원은 Hib 단당질 (oligosaccharide)을 인간 혈청 알부민에 결합시킨 것으로¹⁰ 미국 University of Alabama at Birmingham (UAB)의 Dr. Nahm으로부터 공급받아 사용하였다. 항원은 살균된 1급 물(Merck KGaA, Darmstadt, Germany)로 1 µg/mL이 되도록 희석하여 준비하였다.

HbO-HA 항원을 96 well의 평평한 바닥(flat bottom)의 중등도 결합(medium binding)의 polystyrene 평판(Corning & Costar, Corning, NY, USA)에 50 µL 씩 넣고 37°C에서 90 분간 습기가 있는 상자에 넣어 코팅(coating) 시켰다. 항원이 코팅된 평판은 30초 동안 0.01%의 Brij 35가 포함된 pH 7.2의 tris 완충 용액(tris buffered solution, TBS)으로 흠뻑 적신 후 같은 용액으로 5회 세척하였다. 준비한 표준액과 검액 그리고 정도 관리 시료를 Fig. 1의 템플릿에 따라 각각 50 uL씩 주입하였다. 공백(blank) well은 비특이 배경 결합(background binding)을 평가하

	Sample		Sample		Sample		Standard		Sample		Sample	
Serum dilutions	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A 1:50												
B 1:100												
C 1:200												
D 1:400												
E 1:800												
F 1:1,600												
G 1:3,200												
H 1:6,400							Blank	Blank				

Fig. 1. Typical microtiter plate layout for validation assay for anti-PRP IgG antibodies enzyme immunoassay.

기 위하여 항원은 넣지 않고 항체 완충액을 50 μ L씩 주입하였다. 이를 실온에서 1시간 동안 방치하여 반응시키고 앞에서와 동일한 방법으로 세척 후, 50 μ L의 희석된 goat anti-human IgG-alkaline phosphatase conjugate (Southern Biotek, Birmingham, AL, USA)를 주입하였다. 다시 실온에 1시간 두어 반응시킨 후 동일한 방법으로 세척하였다. 그 후 1 mg/mL 농도의 p-nitrophenyl phosphate (Sigma, St. Louis, MO, USA) 기질 용액을 각 well당 100 μ L씩을 넣고 실온에 1시간 반응시켰다. 각 well에 3 M의 NaOH를 50 μ L씩 첨가하여 발색반응을 정지시킨 후 405 nm와 690 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. 효소 면역법의 타당성 검사

1) 특이성(specificity)

HbO-HA 항원이 흡착된 well (HbO-HA (+))과 항원이 없는 용액만 반응시킨 well(HbO-HA (-))을 준비하였다. 검량 표준액 및 정도 관리 혈청을 주입하여 앞에 기술된 ELISA 방법에 따라 시험한 후 HbO-HA (+) well과 HbO-HA (-) well에서 측정된 흡광도를 비교하였다.

2) 정밀성(precision)

정도 관리 혈청들을 사용하여 반복 검사하였다. 반복성(repeatability)을 확인하기 위해서는 Fig. 1의 템플릿에 따라 하나의 평판에 각 정도 관리 혈청들을 다섯번 넣어 검사하였으며 총 4회 시험하였다. 실험실내 정밀성(intermediate precision)을 확인하기 위해서는 하나의 평판에 5가지 정도 관리 혈청을 모두 한 번 씩 주입하여 시험하였으며, 총 11회 반복 시험하였다.

3) 정확성(accuracy)

이미 radioantigen binding assay (RABA) 방법으로 혈청 항체가 규정한 다양한 농도의 28개의 혈청을 서울대학교 의과대학 소아과학교실 이환중교수로부터 공급받아 본 검사실에서 효소 면역법을 시행, RABA의 결과와 비교하였다.

4) 첨가 회복 검사(spiking recovery test)

1/50로 희석한 QCL 혈청과 0.061, 0.015 및 0.004 μ g/mL 농도의 검량 표준액을 동일 분량 비로 혼합하여 효소 면역법으로 항체 농도를 측정 한 후 회복율을 확인하였다.

5) 최소 정량 한계(lower limit of quantification, LLOQ)

항 PRP 항체의 자연 예방적 항체가 혹은 백신 접종 후 단기 예방 항체가는 0.15 μ g/mL로 규명되어 있으며, 통상 측정된 항체가가 0.15 μ g/mL 미만인 경우 백신 접종 후 적절한 항체가 생성되지 않은 것으로 판정한다⁸⁻¹¹⁾. 따라서 본 시험에서는 0.15 μ g/mL 을 LLOQ로 정하고, 검량표준액을 0.15 μ g/mL 농도로 희석하여 제조한 후 정량 시험하여 LLOQ 시료 정량결과의 정밀성과 정확성을 확인하였다.

6) 안정성(stability)

(1) 냉·해동(freeze-thaw, FT) 안정성

시료의 냉·해동 과정이 시험결과에 미치는 영향을 평가하기

위해 QCVH 시료를 -20°C에서 12시간 이상 냉동 보관 후 다시 실온에 30분 이상 방치하여 녹이는 냉·해동 과정을 1-4회 반복한 후 효소면역법으로 항체가를 검사하였다.

(2) 단기 온도(short-term temperature) 안정성

시료의 실온 방치 시간 영향을 평가하기 위해 QCVH 시료를 실온에서 1시간, 2시간 및 4시간 동안 방치한 후 효소면역법으로 항체가를 검사하였다.

결 과

1. 특이성

1) 표준 혈청의 HbO-HA (+) well과 HbO-HA (-) well에 대한 반응비교

희석된 표준혈청을 HbO-HA 항원이 흡착된 HbO-HA (+) well에서 반응시킨 경우에는 표준혈청을 희석함에 따라 흡광도가 감소하는 양상을 보이는 반면, 항원이 흡착되지 않은 HbO-HA (-) well에서는 모든 시료가 공백 well에서 비특이적 반응으로 측정되는 수준의 반응을 보였다(Fig. 2).

2) 정도 관리 시료의 HbO-HA (+) well과 HbO-HA (-) well에 대한 반응비교

HbO-HA 항원이 흡착된 HbO-HA (+) well에서만 QCVH, QVH 및 QCM 혈청을 희석함에 따라 흡광도가 감소하였으며, 동일 희석 배수에서의 흡광도는 항체가가 높은 시료일수록 높게 측정되었다. 항원이 흡착되지 않은 HbO-HA (-) well에서는 각 정도 관리 시료의 흡광도는 혈청의 희석 배수나 시료 종류와 상관없이 모두 일정하게 공백 well 수준으로 측정되었다(Fig. 3).

2. 정밀성

반복성은 QCVH, QCH, QCM 및 QCunknown 시료의 co-

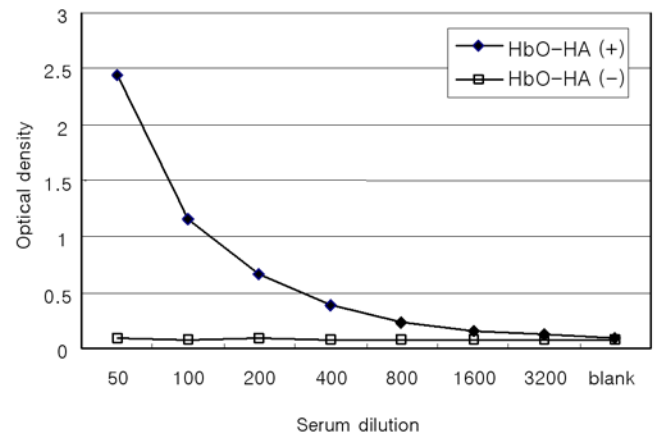


Fig. 2. Specificity of anti-PRP enzyme immunoassay with standard sera. EIA showed specificity to HbO-HA antigen. Abbreviations: HbO-HA (+), wells coated with HbO-HA antigen; HbO-HA (-), wells coated with coating buffer only.

efficient variation (CV)가 각각 3.98-6.15%, 4.32-8.07%, 5.33-6.57% 및 3.16-6.65%로 통상적인 반복성 허용기준인 CV ≤15%를 만족하였다. 실험실내 정밀성은 QCVH, QCH, QCM 및 QCunknown 시료의 경우 모두 12.10-15.20%로 모두 허용기준인 CV ≤20%를 만족하였다(Table 1). QCL 시료의 경우 반복성은 12.83-22.49%, 실험실내 정밀성은 25.87%로 허용기준을

벗어나는 결과를 보였으나, 해당 농도는 LLOQ 수준의 낮은 농도이므로 LLOQ에서의 정밀성 허용 기준인 CV ≤25%를 만족하였으며, 통상 백신 접종 후 방어적 항체 생성의 기준이 되는 항체가인 1 µg/mL⁴⁾에 비해 충분히 낮은 농도 수준이므로 방어적 항체 생성여부의 판정에도 영향을 주지는 않는다.

3. 정확성

RABA 정량 결과와 효소 면역법 정량 결과 비교시험에서 두 방법에 의한 항체가 결과 간의 상관관계수는 r=0.858로 의미 있는 상관관계를 보여주었다(P<0.05, Fig. 4). 그런데 RABA에 의한 항체가 결과는 IgG, IgA, 및 IgM 등이 모두 포함된 총 항체 값을 나타내며 효소면역법은 IgG 항체만을 측정하므로 이 두 가지 방법에 의한 항체가 결과가 꼭 일치하지 않을 수 있다.

4. 첨가 회복 검사

50배 희석된 QCL 시료에 0.061, 0.015 그리고 0.004 µg/mL의 표준혈청을 각각 동량씩 혼합하여 시험한 결과, 회복율은 104-110%로 허용기준 (100±20%)을 만족하였다(Table 2).

5. 최소 정량 한계

LLOQ 시료 정량결과의 정밀성을 5회 측정한 결과 정밀성은 CV 4.3%, 정확성은 공칭 양(nominal dose)의 -14.7~-4.7% 로 모두 허용기준(정밀성: CV≤25%, 정확성: ±25%)을 만족하였다.

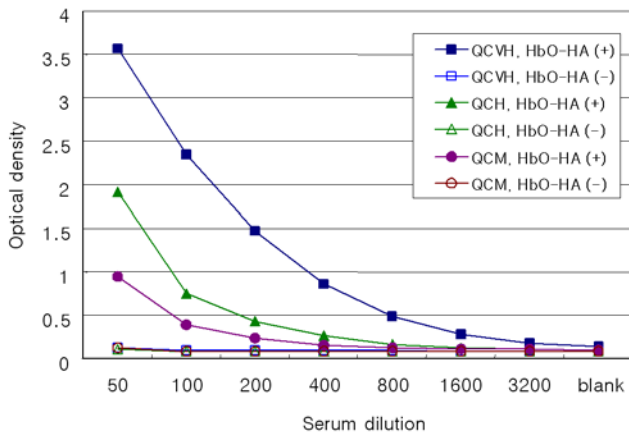


Fig. 3. Specificity of anti-PRP enzyme immunoassay with various QC sera. EIA showed specificity to HbO-HA antigen with three kinds of QC sera with various concentration of anti-PRP antibody. Abbreviations: HbO-HA (+), wells coated with HbO-HA antigen; HbO-HA (-), wells coated with coating buffer only; QCHV, quality control sera with very high concentration of anti-PRP antibody; QCH, quality control sera with high concentration of anti-PRP antibody; QCM, quality control sera with medium concentration of anti-PRP antibody.

Table 1. Intermediate Precision Test Results of Quality Control Sera

Assay run	Anti-PRP Ab Concentration in QCVH (µg/mL)	Anti-PRP Ab Concentration in QCH (µg/mL)	Anti-PRP Ab Concentration in QCM (µg/mL)	Anti-PRP Ab Concentration in QCL (µg/mL)	Anti-PRP Ab Concentration in QCunknown (µg/mL)
1	42.39	3.89	1.55	0.30	4.96
2	47.44	4.94	1.88	0.30	5.43
3	39.54	4.17	1.44	0.24	4.77
4	42.80	4.17	1.46	0.26	4.68
5	38.32	3.63	1.26	0.19	3.72
6	39.62	4.01	1.32	0.24	4.40
7	41.04	4.73	1.60	0.37	5.75
8	39.38	4.89	1.75	0.37	5.05
9	61.26	3.98	1.36	0.16	3.74
10	41.01	5.17	1.62	0.32	4.39
11	40.22	4.56	1.51	0.21	4.34
Mean	43.00	4.38	1.52	0.27	4.66
Standard deviation	6.54	0.50	0.18	0.07	0.63
Coefficient variation (%)	15.20	11.52	12.10	25.87	13.58

Abbreviations: QCHV, quality control sera with very high concentration of anti-PRP antibody; QCH, quality control sera with high concentration of anti-PRP antibody; QCM, quality control sera with medium concentration of anti-PRP antibody; QCL, quality control sera with low concentration of anti-PRP antibody; QCunknown, quality control sera with unknown concentration of anti-PRP antibody

6. 안정성

1) 냉·해동 안정성

냉·해동을 1회 시행한 시료에 비해 냉·해동을 2-4회 반복한 시료의 상대량은 98.7-108.0%로 모두 ±10% 이내의 차이를 보여 허용기준 (±20% 이내)을 만족하였다.

2) 단기 온도 안정성

QCVH 시료를 실온에서 2시간 및 4시간 동안 방치 후 측정 한 항체가는 1시간 방치 후 측정 한 항체가의 99.7%와 105.3%로 ±6% 이내의 차이만을 보여 허용기준(±20% 이내)을 만족하였다.

고 찰

본 연구는 이화여자대학교 의과대학연구소 백신효능연구센터에서 수행한 인체의 항 PRP IgG 항체를 정량적으로 측정하기 위

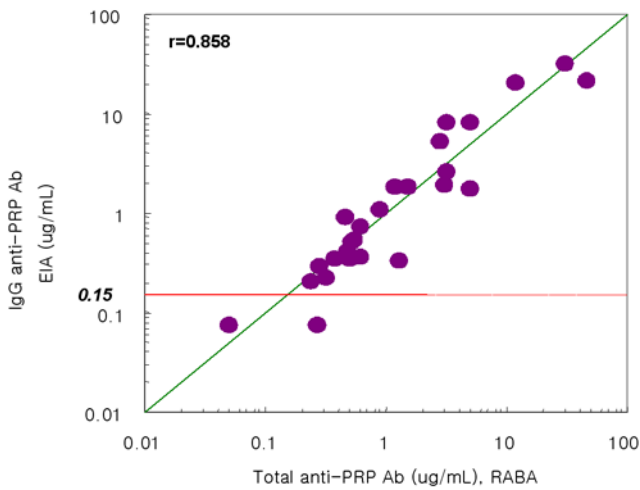


Fig. 4. Comparison of anti-PRP antibody titers of 28 sera with radioantigen binding assay with those with enzyme immunoassay. The EIA-derived results (y axis) from this laboratory were equivalent to those obtained by the standard radioactive antigen binding assay (RABA) (x axis) for quantitation of anti-PRP antibodies in 28 sera ($r=0.858$, $P<0.05$). Solid line means identity line between antibody titers with RABA and those with EIA. Dashed line means lower limit of quantification (0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of EIA.

한 방법인 표준화된 효소 면역법의 타당성을 증명하기 위해 특이성, 반복성과 실험실내 정밀성 등의 정밀성, 정확성, 최소 정량 한계 및 안정성 등을 평가하였다. 그 결과 본 연구실에서 수행한 검사는 검사에 사용된 항원에 특이성을 보였으며 반복성, 실험실내 정밀성 등의 정밀성이 통상적인 타당성 검사의 허용기준을 만족하였다. 또한 같은 혈청으로 시행한 항 PRP 항체의 RABA 정량 결과와 효소 면역법 정량 결과 비교시험에서 높은 상관성을 보여 정확성을 확인할 수 있었으며 첨가 회복 검사 결과 타당성 검사의 허용기준을 만족하였고 LLOQ 시료 정량 결과의 정밀성과 정확성, 냉·해동 안정성과 단기 온도 안정성 등에서 모두 허용기준을 만족하였다. 따라서 본 연구실에서 수행한 효소 면역법은 혈액 내에 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상으로 존재하는 항 PRP IgG 항체를 정량적으로 측정하는 시험법으로 적절하였다.

백신 접종에 의해 항체가 생성되고, 생성된 항체가 질병의 주 방어 기전이 되는 경우 인구 집단 수준에서 질병에 대한 방어를 예측할 수 있는 항체 농도를 확립할 수 있다¹⁴⁾. 실제로 디프테리아, 파상풍, 일본 뇌염, B형 간염 등의 백신으로 예방 가능한 질환에서 백신으로 유도된 항체는 질병으로부터 인체를 보호해 주는 방어 항체들이며 이들의 방어 항체 농도는 이미 잘 확립되어 있다^{14, 15)}. Hib도 마찬가지로 1933년 이미 Fothergill과 Wright는¹⁶⁾ 5세 미만 소아에게 헤모필루스 인플루엔자 수막염의 위험이 높은 이유가 살균(bactericidal) 항체가 없는 것과 관련되어 있음을 관찰하였고 그 후 살균 항체는 Hib의 피막 다당질인 PRP에 대한 항체 즉 감염으로부터 보호해 줄 수 있는 방어 항체임이 보고되었다^{8, 9)}. PRP에 대한 항체는 연령이 증가하면서 자연적으로 생성될 수 있어 이를 자연 항체라고 한다^{8, 9)}. 일반적으로 PRP에 대한 자연 항체가 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상이면 Hib 감염에 대해 예방이 가능하지만 자연 항체가 혈청에 충분히 생성되기 전인 5세 미만 소아들은 침습성 Hib 감염에 매우 취약한 상태이며 질병에 이환 시 높은 치명율과 합병증의 발생을 보인다^{8, 9)}. 이를 예방하기 위해 1980년대 Hib 단백 결합 백신이 개발되었으며, Hib 백신의 평가는 접종 후 나타나는 PRP에 대한 항체 반응 즉 백신의 면역원성으로 이루어진다^{10, 12)}. 또한 백신 접종 후에 생성되는 항체가가 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상이면 단기간 예방 가능한 항체 농도이고 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상이면 장기적인 예방 효과가 있는 것으로 연구되었다¹¹⁾.

잘 확립된 항체의 방어 농도는 백신 연구에 매우 유용하다.

Table 2. Spiking Recovery Test of Standard Serum with 1/50 Dilution of QCL Sera

Spiking concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Anti-PRP Ab concentration in QCL ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Expected concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Observed concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Recovery* (%)
0.061	0.003	0.064	0.066	103.8
0.015	0.003	0.018	0.020	108.3
0.004	0.003	0.007	0.008	110.3

*Recovery = Observed Concentration ÷ Expected Concentration × 100
Abbreviations: QCL, quality control sera with low concentration of anti-PRP antibody;

어떤 백신의 효과가 인정되어 사용이 인가되고 추천되고 있는 중 같은 성분의 다른 백신이 만들어져 백신의 효능을 알아보고자 할 때 이미 사용이 추천되고 있는 이 종류의 백신을 대조군으로 삼은 백신의 효능 연구는 더 이상 가능하지도 않고 윤리적으로도 하지 못하여 시행할 수 없다. 이런 경우 같은 종류의 새로운 백신에 대한 효능 연구는 방어 항체 생성 연구 혹은 면역원성 연구로 대치가 가능하도록 인정되고 있다. 따라서 백신 효능 연구를 위해 면역원성 연구는 매우 중요하며 면역원성이 방어 항체 형성으로 측정되는 경우 항체의 측정은 백신의 평가에 매우 결정적 요인이 된다.

Hib 백신에 대한 특이 항체 농도의 측정은 현재 효소면역법에 의한 양적 측정이 가장 잘 알려져 있고 세계적으로 사용되고 있지만¹²⁾ 백신이 개발되기 시작한 초기에는 고전적인 RABA 방법이 사용되었다^{17, 18)}. 그러나 RABA는 방사성 항원을 준비해야 하며, 많은 양의 혈청이 요구되어 혈액 채취가 어려운 영아의 면역원성 연구에서는 더욱 어려운 점이 있고, 시행에 많은 시간과 노력이 들어 연구자와 연구실에 부담이 되며, 실험 방법과 데이터 분석을 자동으로 처리하기 어려운 제한점 등이 있다. 게다가 RABA는 형성된 총 항체를 검사하기 때문에 백신에 의해 형성된 항체의 종류나 아형을 연구할 수 없는 단점도 있다¹²⁾. 그래서 몇 가지 효소 면역법이 RABA를 대신해 개발되었다^{19, 20)}. 이 때 개발된 효소 면역법에 요구되는 사항으로는 RABA에 의해 얻어지는 항체와 필적하는 항체를 얻을 수 있어야 하고, 여러 연구실에서 같은 결과를 낼 수 있어야 하며, RABA에서와 같이 최소 방어 농도를 평가할 수 있을 정도로 민감한 측정 방법이어야 한다는 점이었다¹²⁾. 이와 같은 요구에 적합한 효소 면역법 개발을 위해 사용되는 항원으로 다양한 크기의 Hib 단당질을 인간 혈청 알부민에 결합시킨 HbO-HA이 개발되었다¹⁰⁾. 1990년에 이 항원을 이용한 효소 면역법이 처음으로 보고되었는데 214 개의 혈청을 대상으로 RABA와 효소 면역법에 의한 항체가 결과의 상관성을 본 결과 매우 좋은 결과를 내었다¹⁰⁾. 또한 이 연구에서는 여러 곳의 다른 연구실에서 같은 효소 면역법을 시행한 결과를 보고하였는데 시종일관된 만족스런 결과를 내었다¹⁰⁾. 그 후 1996년에 전 세계의 12개 연구실에서 RABA와 HbO-HA 항원을 사용한 효소 면역법에 의한 항체를 비교한 결과 효소 면역법에 의한 항체가 고전적인 RABA에 의한 항체와 상응할 만하다는 결론을 내리고 이 방법을 Hib 백신의 면역원성 연구를 위한 표준 항체 검사 방법으로 추천하여 현재까지 사용되고 있다¹²⁾.

본 연구에서는 현재 표준 항체 검사 방법으로 추천되고 있는 이들이 사용한 같은 효소 면역법을 적용하였고 같은 HbO-HA 항원과 표준 항체를 사용하였다. 단 효소 면역법에 사용한 2차 항체, 코팅 완충액, 세척 완충액, 및 항체 완충액 등은 폐구균 다당질 특이 항체 검사에 사용하는 완충액을 사용하였다. 그 이유는 첫째, 본 연구실에서 이미 효소 면역법에 의한 폐구균 다당질 특이 항체 검사를 시행하고 있으므로 같은 용액을 사용하

는 편리성이 있으며 둘째, 이 때 사용하는 용액은 세계보건기구 기준 연구소(reference laboratory)에서 폐구균 다당질 항체 검사를 위해 추천하는 표준 용액으로²¹⁾ 항 PRP 항체 검사를 위한 효소 면역법에도 적용이 가능하고, 셋째, 이미 시행한 1996년 12개 연구실에서의 효소 면역법 비교 시험에서도 항원과 표준 혈청 외의 다른 용액 등은 각 연구실에서 사용하는 것을 그대로 사용하도록 하였기 때문이다¹²⁾.

그 결과 본 연구실에서 수행한 효소 면역법은 검사에 사용된 항원에 특이성을 보였다. 또한 한 평판 내에서 같은 결과가 나오는지 보는 반복성, 각각 다른 평판을 사용하며 한 실험실 내에서 반복 시행하는 검사의 정밀성 시험은 모두 미국 Center for Drug Evaluation and Research(CDER)의 생분석 방법 타당성(Bioanalytical Method Validation) 지침²²⁾을 만족하였다. 특히 정확성은 1996년 Madore 등¹²⁾의 연구에 참여한 연구실에서 RABA로 시행한 혈청의 항 PRP 항체가 결과와 본 연구실에서 효소 면역법으로 같은 혈청을 검사한 항체가 결과 간 높은 상관계수를 보여 본 연구실의 검사 수행 능력의 정확성을 확인할 수 있었다.

소량의 항체가 포함된 혈청을 첨가하고 측정된 첨가 회복 검사 결과에서도 허용기준을 만족하였고 LLOQ 시료 정량 결과의 정밀성과 정확성은 모두 허용기준을 만족하였다. 안정성 중 냉·해동 안정성과 단기 온도 안정성도 허용기준을 만족하였다. 본 연구의 결과에 서술하지 않았으나 본 실험실에서 12개월 이상 같은 효소 면역법을 수행하고 그 결과를 비교한 장기간 안정성 결과도 허용 기준을 만족하였다. Madore 등¹²⁾의 연구에서는 8개월간 진행한 효소 면역법 결과가 지속적으로 허용할 만한 결과를 보여주었다고 하였다. 따라서 본 연구실에서 수행한 항 PRP 항체의 효소 면역법에 의한 정량 방법은 혈액 내에 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상으로 존재하는 항 PRP IgG 항체를 정량적으로 측정하는 시험법으로 적절함을 증명할 수 있었고 향후 국내에서 생산되거나 도입되는 새로운 Hib 백신 혹은 Hib 백신을 포함하는 혼합 백신²³⁻²⁵⁾의 효과 평가를 위한 면역원성 검사를 수행할 수 있음을 확인할 수 있었다.

효소면역법은 면역글로불린 아형 중 IgG 측정을 위한 방법만이 표준화되어 있고, 간혹 항체 농도와 항원과의 친화력 등 기능과의 상관성이 낮은 항체가 발견되기도 하여¹²⁾, 백신에 대한 면역원성을 검사 시 항체의 기능을 함께 측정하여 효소면역법에 의한 항체가 검사를 보완하도록 추천한다²⁶⁻²⁸⁾. 이를 위해서는 항체의 세균살상 역가(bactericidal titer)를 측정하여 생성된 항체의 기능을 연구할 수 있는데 이는 특이 항체가 보체의 도움을 받아 특정 세균을 살상하는 능력을 측정하는 원리이다. 이 방법은 많은 수의 혈청을 대상으로 시행하기 위해서 방법이 간편하고 용이하며 빠르고 쉽게 표준화 될 수 있어야 하는 문제점이 있다²⁸⁾. 현재 시간과 노력이 많이 들지만 백신의 효과를 평가하기 위한 항 PRP 항체 기능 검사에 필수적인 세균 살상법(bactericidal assay)에 대해서도 본 연구실에서 타당성 검사를

수행 중이다. 이를 통해 Hib 백신의 평가를 위한 필수 검사가 국내 연구실에서 이루어져서 현재 개발 중인 Hib 백신과 혼합 백신의 평가에 많은 역할을 하게 되기를 기대한다.

감사의 글

본 연구를 위해 표준 항원을 제공해 주시고 전반적인 연구에 많은 도움을 주신 University of Alabama at Birmingham의 Moon Nahm 교수님, 표준 혈청을 제공해 주신 미국 Center for Biological Evaluation and Research의 Carl Frasch 박사님, 정확성 평가를 위해 RABA 항체가가 확립된 혈청을 제공해 주신 서울대학교 의과대학 소아과학교실 이환중 교수님, 그리고 본 타당성 연구의 전반적인 내용에 많은 도움과 큰 조언을 주신 LG Life Science의 이상현 박사님께 진심으로 감사를 드립니다.

요 약

목 적 : 인체의 항 PRP IgG 항체를 정량적으로 측정하기 위한 방법인 표준화된 효소면역법의 타당성을 연구하는 것이 목적이다.

방 법 : 인체의 항 PRP IgG 항체를 정량적으로 측정하기 위한 방법인 표준화된 효소면역법의 타당성을 연구하기 위해 특이성, 반복성, 실험실내 정밀성, 정확성, 최소 정량 한계, 및 안정성을 평가하였다.

결 과 : 본 연구에서 사용한 효소면역법은 검사에 사용된 항원(HbO-HA)에 특이성을 보였으며 반복성, 실험실내 정밀성 등의 정밀성은 허용기준(반복성: CV ≤ 15%, 실험실내 정밀성: CV ≤ 20%)을 만족하였다. 정확성은 28개 혈청을 대상으로 한 RABA 정량결과와 효소 면역법 정량결과 비교시험에서 높은 상관계수를 보였고 첨가 회복 검사 결과 허용기준(100 ± 20%)을 만족하였다. 최소 정량 한계 시료 정량결과와 정밀성과 정확성은 공칭 양의 -14.7 ~ -4.7%로 모두 허용기준(정밀성: CV ≤ 25%, 정확성: ± 25%)을 만족하였다. 안정성 중 냉·해동 안정성과 단기 온도 안정성도 모두 허용기준(± 20% 이내)을 만족하였다.

결 론 : 이상의 결과로 이화여자대학교 의과학연구소 백신효능 연구센터에서 시행한 본 효소 면역법은 혈액 내에 존재하는 항 PRP IgG 항체를 정량적으로 측정하는 시험법으로 적절하였다.

References

- 1) Wenger JD, Ward JI. Haemophilus influenzae vaccine. In: Plotkin SA, Orenstein WA, editors. Vaccines. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 2004:229-68.
- 2) American Academy of Pediatrics, Haemophilus influenzae infections. In: Pickering LK, editor. 2003 Red book: Report of the committee on infectious diseases. 26th ed. Elk Grove Village, 2003:293-301.

- 3) Santosham M, Wolff M, Reid R, Wolff M, Reid R, Hohenboken M, et al. The efficacy in Navajo infants of a conjugate vaccine consisting of Haemophilus influenzae type b polysaccharide and Neisseria meningitidis outer-membrane protein complex. N Engl J Med 1991;324:1767-72.
- 4) Harrison LH, Tajkowski C, Croll J, Reid R, Hu D, Brenneman G, et al. Postlicensure effectiveness of the Haemophilus influenzae type b polysaccharide-Neisseria meningitidis outer-membrane protein complex conjugate vaccine among Navajo children. J Pediatr 1994;125:571-6.
- 5) Black SB, Shinefield HR, Fireman B, Hiatt R, Polen M, Vittinghoff E, The Northern California Kaiser Permanente Vaccine Study Center Pediatrics Group. Efficacy in infancy of oligosaccharide conjugate Haemophilus influenzae type b (HbOC) vaccine in a United States population of 61,080 children. Pediatr Infect Dis J 1991;10:97-104.
- 6) Fritzell B, Plotkin S. Efficacy and safety of a Haemophilus influenzae type b capsular polysaccharide-tetanus protein conjugate vaccine. J Pediatr 1992;121:355-62.
- 7) Booy R, Hodgson S, Carpenter L, Mayon-White RT, Slack MP, Macfarlane JA, et al. Efficacy of Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine PRP-T. Lancet 1994;344:362-6.
- 8) Kayhty H, Peltola H, Karanko V, Makela PH. The protective level of serum antibodies to the capsular polysaccharide of Haemophilus influenzae type b. J Infect Dis 1983;147:1100.
- 9) Anderson P. The protective level of serum antibodies to the capsular polysaccharide of Haemophilus influenzae type b. J Infect Dis 1984;149:1034-5.
- 10) Phipps DC, West J, Eby R, Koster M, Madore DV, Quataert SA. An ELISA employing a Haemophilus influenzae type b oligosaccharide-human serum albumin conjugate correlates with the radioantigen binding assay. J Immunol Methods 1990;135:121-8.
- 11) Mathews DE, Farewell VT. Using and understanding medical statistics, 2nd ed. Basel: Karger AG, 1988:178.
- 12) Madore DV, Anderson P, Baxter BD, Carlone GM, Edwards KM, Hamilton RG, et al. Interlaboratory study evaluating quantitation of antibodies to Haemophilus influenzae type b polysaccharide by enzyme-linked immunosorbent assay. Clin Diagn Lab Immunol 1996;3:84-8.
- 13) Kemeny DM, Challacombe SJ. ELISA and other solid phase immunoassays. Theoretical and practical aspects. New York: John Wiley & Sons Ltd. 1988:57-84.
- 14) Siber GR. Methods for estimating serological correlates of protection. Dev Biol Stand 1997;89:283-96.
- 15) Robbins JB, Schneerson R, Szu SC. Perspective: hypothesis: serum IgG antibody is sufficient to confer protection against infectious diseases by inactivating the inoculum. J Infect Dis 1995;171:1387-98.
- 16) Fothergill LD, Wright J. Influenzal meningitis: the regulation of age incidence to the bactericidal power of blood against the causal organism. J Immunol 1933;24:273-84.
- 17) Farr RS. A quantitative immunochemical measure of the primary interaction between I BSA and antibody. J Infect Dis 1958;103:239-62.

- 18) Ward JI, Greenberg DP, Anderson PW, Burkart KS, Christenson PD, Gordon LK, et al. Variable quantitation of Haemophilus influenzae type b anticapsular antibody by radioantigen binding assay. *J Clin Microbiol* 1988;26:72-8.
- 19) Barra A, Schulz D, Aucouturier P, Preud'homme JL. Measurement of anti-Haemophilus influenzae type b capsular polysaccharide antibodies by ELISA. *J Immunol Methods* 1988;115:111-7.
- 20) Kayhty H, Makela O, Eskola J, Saarinen L, Seppala I. Isotype distribution and bactericidal activity of antibodies after immunization with Haemophilus influenzae type b vaccines at 18-24 months of age. *J Infect Dis* 1988;158:973-82.
- 21) Wernette CM, Frasci CE, Madore D, Carlone G, Goldblatt D, Plikaytis B, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of human antibodies to pneumococcal polysaccharides. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10:514-9.
- 22) Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. Drug Information Branch (HFD-210) Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 2001 May. Available from: <http://www.fda.gov/CDER/GUIDANCE/4252fnl.htm>
- 23) Schmitt HJ, Zepp F, Muschenborn S, Sumenicht G, Schuind A, Beutel K, et al. Immunogenicity and reactivity of a Haemophilus influenzae type b tetanus conjugate vaccine when administered separately or mixed with concomitant diphtheria-tetanus-toxoid and acellular pertussis vaccine for primary and for booster immunizations. *Eur J Pediatr* 1998;157:208-14.
- 24) Pichichero ME, Latiolais T, Bernstein DI, Hosbach P, Christian E, Vidor E, et al. Vaccine antigen interactions after a combination diphtheria-tetanus toxoid-acellular pertussis/purified capsular polysaccharide of Haemophilus influenzae type b-tetanus toxoid vaccine in two-, four- and six-month-old infants. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16:863-70.
- 25) Nolan T, Altmann A, Skeljo M, Streeton C, Schuerman L. Antibody persistence, PRP-specific immune memory, and booster responses in infants immunised with a combination DTPa-HBV-IPV/Hib vaccine. *Vaccine* 2004;23:14-20.
- 26) Amir J, Liang X, Granoff DM. Variability in the functional activity of vaccines induced antibody to Haemophilus influenzae type b. *Pediatr Res* 1990;27:358-64.
- 27) Goldblatt D, Vaz AR, Miller E. Antibody avidity as a surrogate marker of successful priming by Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines following infant immunization. *J Infect Dis* 1998;177:1112-5.
- 28) Romero-Steiner S, Fernandez J, Biloft C, Wohl ME, Feris J, Balter S, et al. Functional antibody activity elicited by fractional doses of Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine (polyribosylribitol phosphate-tetanus toxoid conjugate). *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;8:1115-9.