

연구논문

면역글로불린제제 효능평가를 위한 5종 B형간염 표면항원항체검출법의 비교

신인수, 이유경, 김오정, 반상자*

Comparison of 5 Assays for Quantification of Antibody to Hepatitis B Virus Surface Antigen with Immunoglobulin G Preparations

In Soo Shin, Yoo Kyoung Lee, Oh Jung Kim, and Sang Ja Ban*

접수: 2011년 2월 16일 / 게재승인: 2011년 3월 22일
© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Five assays for anti-HBs were compared to improve potency test of Human IgG preparations. The three commercial EIA kits were optimized including dose response curve ranges and compared by conducting a co-laboratory study. After selecting the most reproducible EIA kit, methods comparison was performed with 22 samples in 5 different days. As a result, EIA ($7.7 \pm 5.3\%$) and MEIA (AxSYM: $3.7 \pm 1.9\%$, IMx: $1.6 \pm 0.8\%$) showed precision and accuracy ($100.1 \pm 12.6\%$). Therefore, the validated EIA assay was established and it is believed to be comparable to current MEIA.

Keywords: Anti-HBs, Immunoglobulin preparation, Potency, National Lot-Release Test

1. 서론

B형간염표면항체 (Anti-Hepatitis B surface antigen, Anti-HBs) 검사는 B형간염 예방접종 후, 수술 전 혹은 건강검진 목적으로 대부분의 검사실에서 가장 많이 의뢰되는 검사 항목 중 하나이다 [1]. 일반적으로 백신 접종 4-8주 후에 ≥ 100 IU/L 정도의 Anti-HBs 역가 (potency)가 확보된다. 또한 약 10 IU/L의 Anti-HBs를 B형간염 바이러스 감염 양성자로 판별하는 기준

도 비교적 명확하다. 이러한 기준은 그 검사방법의 실험실간, 일간 신뢰성과 정확성을 전제로 한다. 검사방법은 초기 방사성면역분석법 (Radioimmunoassay, RIA)과 수동혈구응집법이 개발되었고, 이들 방법에서는 많은 경우 유의한 결과값 차이가 나타났다 [2-5]. 이후 진보된 검사법으로 효소면역측정법 (enzyme immunoassay, EIA)의 도입으로 보다 정확한 정량 측정이 가능해졌고, 현재 미세입자효소면역검사법 (microparticle enzyme immunoassay, MEIA), 전기화학발광면역검사법 (electrochemiluminescence immunoassay, ECLIA) 및 화학발광면역검사법 (chemiluminescence assay, CLIA)이 보편화되어 사용되고 있다. 이와 같이 백신 접종 후 항체역가 판정 혹은 바이러스 감염여부 판별을 위한 임상적 사용 외에 혈액제제 (Blood Products)인 사람면역글로불린제제 (Human Immunoglobulin G preparation, HuIgG) 등에서도 Anti-HBs 검사가 해당 의약품의 효능을 평가하는 역가 시험 항목으로 선정되어 최근 관련 국내외 규정과 제조사 시험이 기존의 효역항체역가시험을 대체하였고, 또한 유럽약전등 국제적으로 해당 제제의 효능을 판단하는 역가시험으로 Anti-HBs를 채택하여 사용하고 있다 [6]. HuIgG 제제는 혈장분획을 제조할 목적으로 채장된 개별혈장을 가지고 냉에탄올 분획공정 및 불활화열처리 공정 등을 거쳐 제조된 생물학적제제로써 저 무감마글로불린혈증 등의 적응증을 가지고 있다. 동 시험을 역가시험으로 설정하고 있는 특수혈장 (Special Plasma) 유래 HuIgG 중 B형간염 HuIgG 제제는 혈장분획제제 (Plasma derived biologics)를 제조할 목적으로 해당 바이러스 백신등으로 면역된 특수혈장인 B형간염혈장 (Anti-HBs Plasma)을 용해한 후 위와 동일한 제조공정을 거쳐 제조된 제제로서, 성인 및 신생아의 B형간염 치료 및 예방의 목적 등으로 사

식품의약품안전청, 식품의약품안전평가원, 혈액제제검정팀
Blood Products Teams, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Korea Food and Drug Administration, Oh Song, Chungbuk 369-951, Korea
Tel: +82-43-719-5451, Fax: +82-43-718-5450
e-mail: sjban@kfda.go.kr

Table 1. Sample information for the Anti-HBs assay

No	Type of Preparations	Dilution Fold		
1	Maltose added HuIgG lot 1 (Imported Plasma)	20	30	40
2	Maltose added HuIgG lot 1 (National Plasma)	20	30	40
3	HuIgG lot 1	40	50	60
4	IV anti-HBV HuIgG lot 1	4000	5000	6000
5	Maltose added HuIgG lot 2 (National Plasma)	20	30	40
6	IM anti-HBV HuIgG lot 1	4000	5000	6000
7	5% HSA in PBS + 10 IU of NS	100	200	300
8	Maltose added HuIgG lot 2 (Imported Plasma)	20	30	40
9	Maltose added HuIgG lot 3 (National Plasma)	20	30	40
10	HuIgG lot 2	40	50	60
11	IV anti-HBV HuIgG lot 2	4000	5000	6000
12	Maltose added HuIgG lot 4 (National Plasma)	20	30	40
13	IM anti-HBV HuIgG lot 2	4000	5000	6000
14	Maltose added HuIgG lot 1 (Imported Plasma) + 10 IU of NS	100	200	300
15	Maltose added HuIgG lot 3 (Imported Plasma)	20	30	40
16	Maltose added HuIgG lot 5 (National Plasma)	20	30	40
17	HuIgG lot 3	40	50	60
18	IV anti-HBV HuIgG lot 3	4000	5000	6000
19	HuIgG lot 1 + 10 IU of NS	100	200	300
20	Maltose added HuIgG lot 6 (National Plasma)	20	30	40
21	Maltose added HuIgG lot 1 (National Plasma) + 10 IU of NS	100	200	300
22	IV anti-HBV HuIgG lot 1 + 10 IU of NS	4000	5000	6000

Where, HuIgG: Human Immunoglobulin G, IV: *Intra Venous*, IM: *Intra Muscle*, HBV: Hepatitis B Virus, NS: National Standard, IU: International Unit

용되고 있다. 약사법에 의해 생물학적제제는 그 물리화학적 특성이 규명하기 어려워 공정관리에 역점을 두고 있고 따라서 최종제품 생산 후 국가로부터 최소시험항목 (Minimum Requirement) 검사를 통과해야 시판될 수 있는 국가검정 대상 의약품 (Lot-Release Products)으로 분류되어, 그 관리를 일반 의약품에 비해 강화하여 실시하고 있다. 그러므로 이러한 국가 검정과 제조사의 자체 품질관리 시험에 사용할 수 있는 검증된 (Validated) 시험방법을 확립하는 것은 국민보건 향상과 관련 의약품의 품질관리에 매우 중요하다. 본 연구에서는 시중에서 허가 판매되고 있는 효소면역검사 (Enzyme Immunoassay, EIA) 키트와 항원 혹은 항체를 미세입자에 고정된 미세입자 고착 효소면역검사법 (Microparticle Enzyme Immunoassay, MEIA)을 이용한 장비 등 총 5 종류의 시험법을 국가검정 등에 맞도록 최적화 하여 확립하고, 제조사 등과 해당 제제에 대한 공동시험 (Co-laboratory Test)을 통하여 국제적 분석법 검증 [7]에 따라 분석-검증하므로써 임상검체에 적용되는 이들 시험법이 생물의약품의 효능평가 항목인 역가시험 국가 검정 등에 적용할 수 있으며, 그 결과가 여러 실험실에서도 상관성을 갖는 신뢰할만한 것인지를 검증하고자 한다. 그러므로 본 연구의 목적은 3종의 EIA 키트를 국가검정 등에 사용할 수 있도록 국가표준품 등을 이용하여 최적화한 후 장비 (Abbott사의 IMx 및 AxSYM)를 이용한 2종의 MEIA 시험법들과 비교분석하여 시험법을 확립하고자 하며, 나아가 4개 해당 연구실의 공동연구를 통하여 확립된 시험법을 상호 검증하고자 하였다. 결론적으로 이러한 결과를 토대로 해당 치료제 의약품의 역가시험 표준화를 통한 품질관리 능력을 향상하고 국제적인 해당 생물학적제제 (Biologics) 효능관리 방법 변화 추세에 부응하고자 하였다 [6].

2. 재료 및 방법

2.1. 국제 표준품

Anti-HBs 1차 WHO 국제표준품 (The 1st International Reference Preparation for Anti-Hepatitis B Immunoglobulin)은 1977년에 확립되었으며, NIBSC에서 code W1042로 지정된 것을 사용하였다. 이 표준품은 HBs, anti-HIV, HCV RNA 음성이 확인된 혈장을 사용하여 제조한 동결건조물이며 역가는 앰플 당 100 IU이다.

2.2. 국가 표준품

2008년 식품의약품안전청 연구사업으로 제조·확립된 Anti-HBs 국가표준품 (KFDA 08/026, 95.45 IU/vial, KFDA, Oh Song Chungbuk, Korea)이 검사의 정확성과 정밀성을 확보하기 위하여 각 키트의 표준물질을 사용하는 대신 Anti-HBs 표준품으로 WHO 국제표준품 (NIBSC 07/164, 100 IU/ampoule, London, UK)과 함께 표준곡선 작성 및 회수율 시험 등에 사용되었다.

2.3. 시험검체

시험에 사용할 검체는 정상 사람 혈장 (normal plasma)에서 분획하여 제조된 HuIgG 제제군과 B형간염 특수혈장을 이용하여 제조한 B형간염 Human Immunoglobulin G (HuIgG) 제제 총 17로트 (lot: 같은 원료 혈장에서 한 제조일에 제조된 생산단위)가 사용되었다. 먼저 HuIgG 제제군에는 정맥주 사용인 말토스첨가 HuIgG이 국내 혹은 수입 혈장 원료별로 각각 녹색자사 (Green Cross, Oh-Chang, Chungbuk, Korea)의 정맥주사용 아이비글로불린에스주 6로트가 사용되었고, 국내

혈장 원료로 제조된 에스케이 케미칼 (Oh-San, Gyunggido, Korea)의 리브감마주 3로트가 구입되었다. 또한, 근육주사 용인 HuIgG 제제는 녹십자 감마글로불린 3로트 그리고 B형 간염 HuIgG 제제로는 녹십자사의 정맥주사용 혹은 근육주 사용 제제가 각 3로트 및 2로트씩 사용되었다. 또한 녹십자사의 5% 사람혈청알부민 (Human Serum Albumin, HSA)에 국가표준품 10 IU/L이 포함된 검체 및 각 제제 중 대표 로트에 대해서도 마찬가지로 국가표준품 10 IU/L가 첨가된 검체가 회수를 시험 등에 이용되었다 (Table 1).

2.4. 국제·국가표준품을 이용한 EIA 키트 선정시험

사람면역글로불린 (Human Immunoglobulin G HuIgG) 제제 등의 역가시험에 최적화된 Enzyme Immuno Assay (EIA) 키트 선정을 위한 시험이 각 키트 제조사의 시험방법을 변형하여 본 연구목적에 맞도록 최적화된 방법에 따라 수행되었다. 세 종류의 키트는 Enzygnost Anti-HBs II (SEMENS, Deerfield, IL, USA), Monolisa Anti-HBs Plus (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 및 Murex Anti-HBs (Abbott Diagnostics, Santa Clara, CA, USA)가 구입되었다. 세 키트의 주요 시험방법을 비교하였다 (Table 2). 요약하면, B형간염 표면항원 항체 (이하 Anti-HBs) 국가표준품 및 WHO 국제표준품을 초순수 (Deionized water, DIW) 1 mL에 녹인 용액을 각각 검액 및 표준액으로 하여 시험이 실시되었다. 먼저 Enzygnost 키트의 경우 HBs-HRP 접합체 (conjugate)를 25 µL씩 먼저 각 웰에 넣고 검액 및 표준액을 키트에 포함된 사람음성혈장 (negative plasma) 혹은 5% 사람혈청 알부민 (이하 5% HSA, Green Cross, Oh-Chang, Chungbuk, Korea)을 이용하여 각각 1000, 2000, 4000 및 10000배 희석하여, 즉시 각 희석액 100 µL를 각 농도별로 3개의 웰에 넣는다. 이때 키트에 포함된 양성 대조액과 음성 대조액 각각을 3개의 웰에 100 µL씩 넣는다. 60분간 37°C에서 반응한 후, 키트내 세척액을 이용하여 5회 세척한 후 세척액을 제거하고, 즉시 TMB와 H₂O₂가 포함된 발색 시약을 웰당 100 µL씩 넣고 상온에서 30분간 발색한다. 반응 정지액인 1 N H₂SO₄시약을 100 µL씩 첨가한 후 즉시 450 nm에서 비교과장 650 nm로 흡광도를 측정한다. 국제표준품을 표준곡선으로 하여 각 희석배수의 국가표준품의 농도를 계산

하였다. Monolisa와 Murex 키트의 경우 Enzygnost 키트와 동일하게 검액을 희석하되, 희석액은 5% HSA를 사용하였다. 먼저 검액, 음/양성 대조액 100 µL씩을 각각 3개의 웰에 넣고 60분간 37°C에서 반응한다. 키트내 세척액을 이용하여 5회 세척한다. Anti-HBs-HRP가 포함된 반응용액을 Monolisa의 경우 웰당 100 µL, Murex의 경우 50 µL씩 첨가한 후 60분간 37°C에서 반응한다. 세척 및 이후 과정은 Enzygnost와 동일하게 수행하였다. 각 키트의 성능을 평가하고 최적 키트를 선정하기 위하여 3종류의 EIA 키트인 Enzygnost, Murex 및 Monolisa 각각의 정확성, 정밀성, 실험실간 재현성 등을 확인하는 제조사를 포함한 4개의 실험실 (A~D laboratories) 공동연구가 계획되었고 통계분석이 수행되었다.

2.5. 검체를 이용한 시험법 검증 및 공동연구.

시험법 검증을 위한 공동연구가 총 22개의 검체에 대해 수행되었다. 각 검체의 희석배수는 해당 로트가 시판되기 전 수행된 국가검정 등에서의 판정 결과를 기준으로 그 예측치가 표준곡선 범위에 포함되도록 희석되었다 (Table 1). 각 검체는 표준곡선의 성능평가 등의 목적으로 저·중·고 농도 3단계의 희석배수가 적용되었으며, 공동연구에 참여한 4실험실 (녹십자, 적십자 혈장분획센터, SK 케미컬 및 식약청)에 각 검체번호별 희석배수만이 배포된 semi-blind test로 공동 시험이 설계되었다. MEIA 방법에 기초한 반자동화 장비인 IMx (Abbott Diagnostics, Santa Clara CA USA)와 AxSYM (Abbott Diagnostics, Santa Clara CA USA)의 경우, 각 장비 및 시약 제조사 시험방법을 준용한 국가검정 표준시험절차가 식약청의 검토를 거쳐 적용되었다 [8]. 이때 표준품은 국가 표준품을 사용하였고, 우선 1 mL 초순수 (DIW)로 완전히 용해된 후 추가적으로 음성사람혈장을 이용하여 25 IU/L에서 150 IU/L 범위에서 4개의 농도로 희석되어 사용되었다. EIA 키트를 이용한 공동연구는 최적 키트로 선정된 Enzygnost가 사용되었고 4개의 실험실에서 5일 동안 22개 검체군 (Table 1) 각각을 3회씩 반복한 결과를 얻었다. 이 결과를 이용하여 일내, 일간, 실험실간 통계적 유의성이 분석되었다. MEIA 원리를 이용한 자동화 장비인 AxSYM과 IMx 시험의 경우 장비 보유 실험실이 각각 1개씩인 관계로 AxSYM은

Table 2. Comparison key assay methods of three EIA kits

Step	Kits	Enzygnost Anti-HBs II	Monolisa Anti-HBs Plus	Murex Anti-HBs
Manufacturer		SEMEMS (previously DADE BEHRING)	BIO-RAD	ABBOTT DIAGNOSTICS
Coated Ag (subtype)		ad and ay	ad and ay	ad and ay
Sample Diluent		Negative Serum	Fetal calf serum	Bovine protein Buffer
Washing Solution		PBS w/ Tween	Tris NaCl pH 7.4	Glycine/Borate
Sample volume		100 µL/well	100 µL/well	100 µL/well
1st Reaction		N/A	37 ± 2°C for 60 ± 5 min	37 ± 1°C for 60 min
Washing		N/A	375 µL/well, 5 times	500 µL/well, 5 times
Anti-HBs-HRP vol		25 µL/well*	100 µL/well	50 µL/well
2nd Reaction		37 ± 1°C for 60 ± 2 min	37 ± 2°C for 60 ± 5 min	37 ± 1°C for 60 min
Washing		300 µL/well, 4 times	375 µL/well, 5 times	500 µL/well, 5 times

* For Enzygnost kit, the Anti-HBs-HRP (conjugate solution) was added to each well before the standards or samples were added according to manufacturer's manual.

1일 1회씩 5일간 실시되었고, IMx는 1일 3회 반복하여 얻은 22개 검체에 대한 결과를 토대로 시험법 (Enzygnost, IMx 및 AxSYM)을 비교하였다. 시험의 설계와 결과분석까지의 일련의 과정은 미국 FDA의 관련 규정 [7]을 기초로 수립되었다.

2.6. 통계처리

모든 통계분석은 LSK Global Pharma Service (Seoul, Korea)에 의해 수행되었으며, SAS[®] (Version 9.1.3, SAS Institute, Cary, North Carolina, USA)을 이용하였고 그룹간의 유의성 검정은 상대적으로 비교 데이터가 많아 유의수준 1%하에서 양측 검정 (two-sided)을 원칙으로 하였다. 실험 중에 발생한 오류와 같이 명백한 이상치는 분석에서 제외하고 결측치는 보정없이 분석되었다. 세부적으로 흡광도의 산술 및 기하 평균, 표준편차, coefficient variation (CV), 신뢰구간 등을 요인 수준에 따라 제시되었다. 자료가 정규성을 만족하는 경우, two sample t-test 또는 ANOVA test를 실시하고, 그렇지 않은 경우 비모수 검정인 Wilcoxon rank-sum test 또는 Kruskal-Wallis test를 실시하였다. 비교 그룹의 수가 3개 이상인 경우 ANOVA test 또는 Kruskal-Wallis test를 실시하는데 검정 결과가 유의한 경우, 두 개 그룹을 짝지어 모든 조합에서 two sample t-test 또는 Wilcoxon rank-sum test를 실시하고 Bonferroni 방법으로 p값을 보정하였다 [9].

3. 결과 및 고찰

3.1. EIA 키트 재현성 비교

EIA 키트의 시험법을 확립하고 키트별로 국제표준품을 표준곡선 제작용으로 사용하여 국가표준품의 역가를 측정할 기술 통계량을 키트별, 실험실별, 용액별로 제시하였다 (Table 3). 우선 기하평균과 산술평균간에는 큰 차이가 없었고, Enzygnost 키트의 음성혈장 희석액의 경우 한 실험실의 결과를 제외한 나머지 실험실의 CV는 10% 미만으로 적은 반면 5% HSA의 경우에는 CV가 상대적으로 더 크게 나타났다. 이를 통해 음성혈장 희석액의 재현성이 5% HSA 희석액보다 상대적으로 더 높음을 알 수 있었고, 뿐만 아니라 1, 2.5 및 5% HSA를 희석액으로 사용한 결과 상대적으로 저농도 (5% 미만) HSA에서 낮은 재현성이 관찰되었고, 모든 농도범위에서 음성혈장의 흡광도보다 높은 background 흡광도를 나타냈다 (data not shown). 5% HSA의 단백질 농도가 혈장의 일반적 단백질 농도와 유사한 점이 상대적으로 재현성이 1% 혹은 2.5%의 HSA보다 개선된 이유로 생각되었다.

3.2. 표준품별 표준곡선 직선성

Anti-HBs 국가표준품과 국제표준품으로 도출한 표준곡선의 직선성을 평가하기위해 회귀도 (R²)를 비교한 결과 거의 모든 표준곡선이 1.00에 가까운 값을 나타내 직진성에 큰 문제가 없다고 판단하였다. 세부적으로 보면 표준곡선의 회귀도 (R²)는 국가표준품의 경우 평균 0.9982, 국제표준품의 평균은 0.9967로 전반적으로 표준품의 종류에 상관없이 직선성이 우수한 것으로 평가되어 검체의 Anti-HBs를 측정하는데 두

표준품 모두 적합하였다. 국제표준품을 표준곡선으로하여 국가 표준품의 역가를 표시역가에 대비한 회수율로 표시한 결과 음성혈장을 희석액으로 사용한 경우 103.3 ± 11.7% 그리고 5% HSA를 사용한 경우 96.4 ± 19.2%의 회수율을 보였다 (Table 4).

Table 3. Comparison of three EIA kits' reproducibility using IS and NS for Anti-HBs with 4 co-laboratory tests (N ≥ 9)

Kit	Diluent Type	Lab	Mean (IU/vial)	SD	CV (%)	GM	GCV (%)
Enzygnost	Negative Plasma	A	93.93	2.22	2.36	93.91	2.39
		B	95.12	2.22	2.33	95.09	2.38
		C	106.73	6.51	6.10	106.55	6.46
		D	90.99	4.53	4.98	90.89	5.22
	5% HSA	A	88.52	4.96	5.60	88.40	5.75
		B	88.49	7.03	7.94	88.25	8.18
		C	105.58	6.65	6.29	105.38	6.85
		D	88.32	6.35	7.19	88.11	7.63
Monolisa	5% HSA	A	79.87	2.86	3.58	79.82	3.68
		B	91.98	3.80	4.13	91.90	4.25
		C	78.63	14.76	18.77	77.11	23.68
		D	89.82	4.16	4.63	89.72	4.79
Murex	5% HSA	A	94.96	7.12	7.50	94.70	7.91
		B	97.34	4.34	4.46	97.25	4.57
		C	105.42	5.28	5.01	105.30	5.10
		D	99.63	6.90	6.93	99.41	7.09

Where SD: Standard Deviation, CV: Coefficient of Variation, GM: Geometric Mean, GCV: Geometric Coefficient of Variation and HSA: Human Serum Albumin. The participated laboratories were A~D.

Table 4. Comparison of recovery of Anti-HBs NS calculated from dose response curve of IS of Anti-HBs

Diluent	N	Recovery (%)	CV (%)
Negative Plasma	48	103.3	11.7
5% Human Serum Albumin	48	96.4	19.2

Where, NS: National Standard, IS: International Standard, Recovery = NS concentration of Anti-HBs to IS dose response curve/NS theoretical concentration × 100, CV: coefficient variation.

3.3. 희석액별 비교 분석

효소면역분석법 (EIA)를 이용한 Anti-HBs 분석에서 음성혈장 희석액과 5% HSA 희석액 간 유의한 차이 유무를 판정하기 위해 비모수 검정인 Wilcoxon rank-sum test를 실시하여 두 용액 간에 차이가 있는지 분석하였다. 4개 실험실에 걸쳐 모두 음성혈장이 5% HSA보다 높은 역가를 보였으나, 실험실 A, C 및 D의 경우, 두 용액 간에는 p value가 0.05 이상이었으며, 실험실 B의 경우에는 p value가 0.046으로 나타났다. 모든 결과를 통합한 데이터로 분석한 결과 두 용액 간의 차이를 나타내는 p value는 0.03이었다 (Table 5). 비록 5% HSA를 희석용액으로 사용했을 경우 정밀도가 낮아지는 결과를 보였으나, 회수율에서 통계적으로 유의한 수준의 차이를 보이지 않았기 때문에 (p = 0.03) 희석용액으로 5% 알부민도 사용 가능한 것으로 판단되었다.

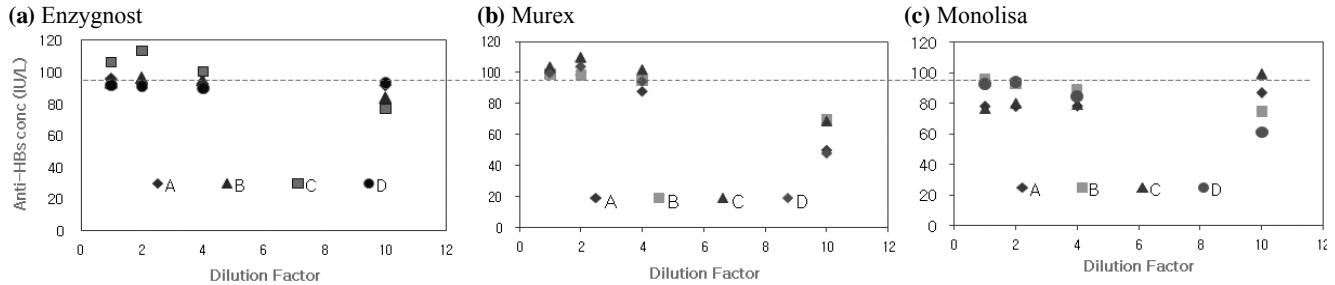


Fig. 1. Comparison recovery of Anti-HBs NS concentration to the labeled potency with the dose response curve of IS using three EIA kits. Where, red dot line represents the theoretical 100% recovery of Anti-HBs NS (95.45 IU/vial). X axis shows dilution factor/1,000 and Y axis represents Anti-HBs concentration (IU/L). Where, the participated laboratories were (A)~(D), (a) for Enzygnost, (b) for Murex, (c) for Monolisa. N=18 to each kits.

Table 5. Effect of diluent types on Anti-HBs EIA assay based on statistical analysis of co-laboratory test

lab	Diluents	N	Mean (IU/L)	SD	CV (%)	p value
A	NP	12	93.5	3.2	3.4	0.47
	5% HSA	12	93.4	10.4	11.1	
B	NP	12	92.4	7.6	8.2	0.05
	5% HSA	12	81.5	16.7	20.5	
C	NP	12	99.3	18.8	19.0	0.84
	5% HSA	12	97.2	19.3	19.8	
D	NP	12	91.5	4.8	5.3	0.06
	5% HSA	12	79.3	17.5	22.0	
Total	NP	48	94.2	10.7	11.3	0.03
	5% HSA	48	87.9	17.5	20.0	

Where, SD: Standard Deviation, CV: Coefficient of Variation, NP: Negative Plasma, HSA: Human Serum Albumin, the participated laboratories were A~D and p value <0.01 considered as significant.

3.4. EIA 키트간 상관성 분석

5% 사람혈청알부민 (HSA) 희석액을 이용한 키트간 상관성 비교 분석 결과, 실험실 C의 경우 모든 키트에서 상관성을 보였으나, 다른 세 실험실에서 키트간 차이를 보였다. 그러나 다중비교를 통한 통계분석에서 Enzygnost 키트와 다른 개별 키트간에는 상관성을 나타냈다 (Table 6). 전체 결과를 통합하여 키트간의 차이를 분석한 결과, Monolisa를 제외한 Enzygnost와 Murex 두 키트간에는 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다 (p = 0.099~1.000). 이 결과는 기존의 연구 [1]에서 지정한 Monolisa 키트결과의 다른 EIA 키트간의 차이와도 비슷한 결과로 분석되었으나, 정확한 판단을 위해서는 상대적으로 수동 검사법인 EIA가 시험자의 숙련도에 민감한 점, 다량의 분석을 비교적 짧은 시간에 수행해야 하는 점 및 검체의 희석배수가 상대적으로 커 (최대 10,000배) 희석된 검액의 시험시간동안의 안정성 영향 등을 고려하여 추후 추가적 연구가 필요한 것으로 생각되었다. 본 연구에서는 키트간의 비교를 통한 본 연구목적에 맞는 최적 키트 선정을 위한 시험이므로 추가적 시험은 수행되지 않았다. 또한, Enzygnost 키트의 CV 평균은 음성혈장 희석액이 3.94%로 5% HSA 희석액의 CV 평균인 6.76% 보다 적었고, 다른 두 키트의 CV 평균 (Monolisa 7.78%, Murex 5.98%)보다 정밀한 값을 나타

내었다 (Table 3). 각각의 키트의 특성분석에서 Enzygnost는 적용된 모든 희석범위 즉 1000, 2000, 4000 및 10000배 희석에서 국제표준품 대비 국가표준품의 이론적 표시역가에 근접한 재현성 있는 결과를 보였다 (Fig. 1(a)). 반면, Monolisa와 Murex 두 키트는 최대 희석배수 10,000배 희석범위에서 낮은 회수율 (Fig. 2(b)) 혹은 낮은 재현성 (Fig. 1(c))을 보이므로써 상대적으로 낮은 재현성을 보였다. 이것은 Enzygnost 키트에 포함된 음성혈장이 Monolisa 등 다른 키트에서 사용된 5% HSA보다 낮은 background를 보이므로써 기인할 수도 있다고 생각되었다. 또한 가장 높은 희석배수, 즉 10,000배의 추정 역가인 10 IU/L에서 상대적으로 낮은 재현성이 관찰되었고, 이것은 EIA 키트 등을 이용한 Anti-HBs 분석에서 HBV 양성 판정기준인 10 IU/L를 20 IU/L 이상으로 수정해야 한다는 기존의 연구결과 내용과 유사하였다 [1]. 그럼에도 불구하고 통계분석에 의한 가장 낮은 농도의 표준액 (10 IU/L)에서도 음성대조액인 음성혈장의 흡광도에 대비하여 통계적으로 매우 유의한 분석결과 (p < 0.0001)를 나타내어, 본 연구에서 확립한 EIA 키트를 이용한 Anti-HBs 분석은 최소 10 IU/L의 측정 하한농도를 나타내는 것으로 분석되었다 (Table 7).

Table 6. Relevance of the three EIA kits of Anti-HBs test

Lab.	Kits	N	Mean (IU/L)	SD	Bonferroni method (p-value**)		
					E vs. Mo	E vs. Mu	Mo vs. Mu
A	E	12	93.3	10.4	0.000	1.000	0.044
	Mo	24	81.2	8.0			
	Mu	24	83.7	22.2			
B	E	12	81.5	16.7	0.918	0.127	0.084
	Mo	24	86.7	10.6			
	Mu	24	90.5	13.5			
C	E	12	97.2	19.3	0.161	1.000	0.234
	Mo	24	83.8	32.9			
	Mu	24	96.3	17.2			
D	E	12	79.3	17.5	1.000	0.099	0.044
	Mo	24	83.9	11.3			
	Mu	24	86.8	24.4			
Total	E	48	87.9	17.5	0.030	0.416	0.000
	Mo	96	83.9	18.4			
	Mu	96	89.3	20.1			

Where E: Enzygnost kit, Mo: Monolisa kit, Mu: Murex kit, SD: Standard Deviation. The participated laboratories were (A)~(D).

Table 7. Determination of detection limit of EIA assays for Anti-HBs with NS. (N = 20)

Category	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference (A ₄₅₀)	95% Confidence	
					Lower	Upper
NS (10 IU/L)	17.678	17	.000	.18761	.1652	.2100
Negative Plasma	6.519	17	.000	.06300	.0426	.0834

3.5. EIA 시험법 확립 및 최적 키트의 선정

검체를 적용하는 공동연구에서는 국가표준품과 국제표준품의 성능이 유의한 차이를 보이지 않았으므로 국가표준품을 사용하도록 결정하였다. 또한 키트선정 시험에서의 결과를 바탕으로 표준곡선의 영역을 기존의 10~100 IU/L에서 25~150 IU/L로 상향 조절하여 시험하도록 표준절차방법서를 변경하여 EIA 시험법을 확립하였다. 최적 키트는 시험결과에서 드러난 본 연구목적에 적합한 우수한 재현성, 두 단계의 반응을 한 단계로 줄인 (Table 2) 분석의 신속성 및 희석액인 음성혈장을 제공하는 시험의 편리성 등을 이유로 검체를 이용한 공동 비교실험에서 사용할 키트로 Enzygnost가 선정되었다. 또한 Murex는 Enzygnost와 상관성이 입증되어 키트 판매 중단 등 유사시 대체 키트로써 사용할 수 있다고 판단되었다.

3.6. 시험검체를 이용한 EIA 시험법 검증

3.6.1. 일내 재현성

각 실험실별 1일 1회씩 총 5일간의 EIA 결과를 분석하여 각 검체별 실험실별 EIA 키트를 사용한 Anti-HBs 시험의 일내 재현성을 평가하기 위해 coefficient variation (CV)가 조사되었다 (Fig. 2). 각 검체는 각 실험실별로 총 45번의 측정이 이루어졌고, 그 재현성 평가 지표로 일내 CV가 제시되었다 (Fig. 2). 전체 평균 CV는 $4.6 \pm 2.0\%$ 였으며, 실험실별로 약간의 정밀도 차이가 있었으나 전반적으로 CV는 10%를 넘지 않았다. 각 실험실별 CV는 실험실 A가 $5.8 \pm 2.0\%$, B는 $5.6 \pm 2.1\%$, C는 $4.3 \pm 1.5\%$ 그리고 실험실 D는 $2.8 \pm 0.9\%$ 로 나타났다. 또한, 표준곡선의 직선성은 키트 선정을 위한 시험과 마찬가지로 R²가 모두 0.998이상으로 조사되었다. 실험실별 약간의 차이가 관찰되었으나 전체적으로 CV는 10%를 넘지 않았다.

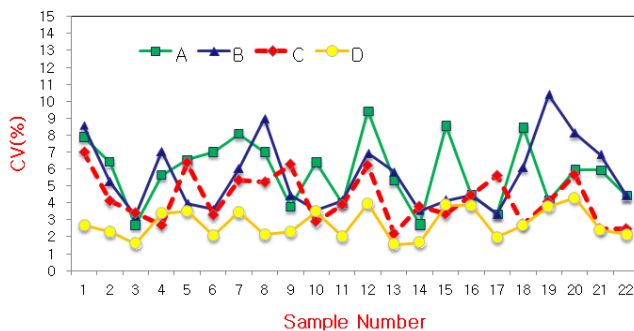


Fig. 2. Comparison of intra-day precision (CV%) of Anti-HBs tests using EIA (Enzygnost) kit with 22 samples. Where A~D were participated labs, green square: lab A, blue triangle: lab B, red diamond: lab C and yellow circle: lab D, N = 45 for each sample.

3.6.2. 일간 재현성

각 실험실에서 측정된 Anti-HBs의 일간 차이가 있는지에 대해 측정법별, 검체별로 일간 CV가 조사되었다 (Fig. 3). 전반적으로 안정된 정밀도를 보였으며 (평균 CV = $4.3 \pm 3.1\%$), EIA (CV = $7.7 \pm 5.3\%$)의 경우 전반적으로 MEIA법을 사용한 자동화 장비인 AxSYM (CV = $3.7 \pm 1.9\%$)이나 IMx (CV = $1.6 \pm 0.8\%$)보다 약간 높은 CV를 나타냈다. 단, EIA의 경우 1일 1회씩 4개 실험실에서 5일간 실시되어 각 검체별로 180회 검사가 실시된 반면, 자동화 장비는 보유한 실험실이 각각 한 실험실인 관계로 한 실험실에서만 시험되었고 AxSYM은 1일 2회씩 5일간 IMx는 기기 시약 단종으로 1일 3회씩 2일간 실시된 결과가 제시되었다.

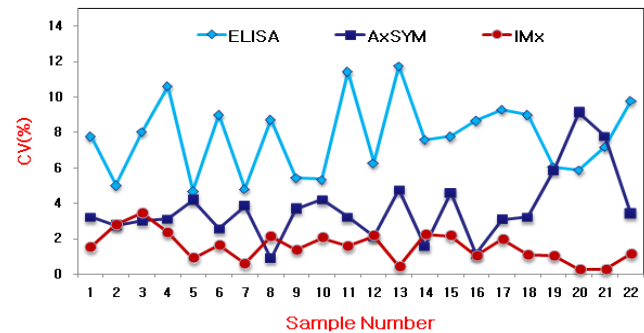


Fig. 3. Comparison of inter-day (for 5 days) precision of Anti-HBs test using EIA (Enzygnost) and MEIA (AxSYM, IMx) with 22 samples. Where N = 180 for EIA (5 days), N = 10 for AxSYM (5 days) and N = 6 for IMx (2 days) to each sample, light blue diamond for EIA, blue square for AxSYM and red circle for IMx.

3.6.3. 정확성

정확성 검증을 위해 검체군중 한 로트씩을 선정하여 10 IU의 국가표준품 (National Standard, NS)이 첨가 되었고 (Table 1) 희석액으로 사용되는 5% HSA에도 동일한 양의 국가표준품이 첨가되어 회수율이 조사되었다 (Table 8). EIA와 MEIA를 이용한 총 752회 시험에서 전체적으로 $100.1 \pm 12.6\%$ 의 회수율을 보였으며, 검체 종류별 회수율 차이는 통계적으로 유의한 변이를 보이지 않았다. 따라서 본 EIA 시험법은 일내-일간 정밀성, 정확성 및 표준곡선의 직선성을 보였을 뿐만 아니라 기존의 시험법인 자동화 장비를 이용한 MEIA와 동등한 정도의 정밀성과 정확성을 나타냈다.

Table 8. Spiking test result of Anti-HBs EIA assay with 4 representative lot from each sample groups and one blank solution

Samples	N	Recovery (%)	SD	CV (%)
HSA (Blank)	188	96.2	20.6	21.4
Maltose HuIgG (Imported source plasma)	188	109.0	11.4	10.4
HuIgG	188	88.4	14.3	16.2
Maltose HuIgG (National source plasma)	188	112.7	12.9	11.4
Anti-HBV HuIgG	188	90.2	16.3	18.0
Total	188	100.1	12.6	14.0

Where, SD: Standard Deviation, CV: Coefficient of Variation, Recovery (%): mean value.

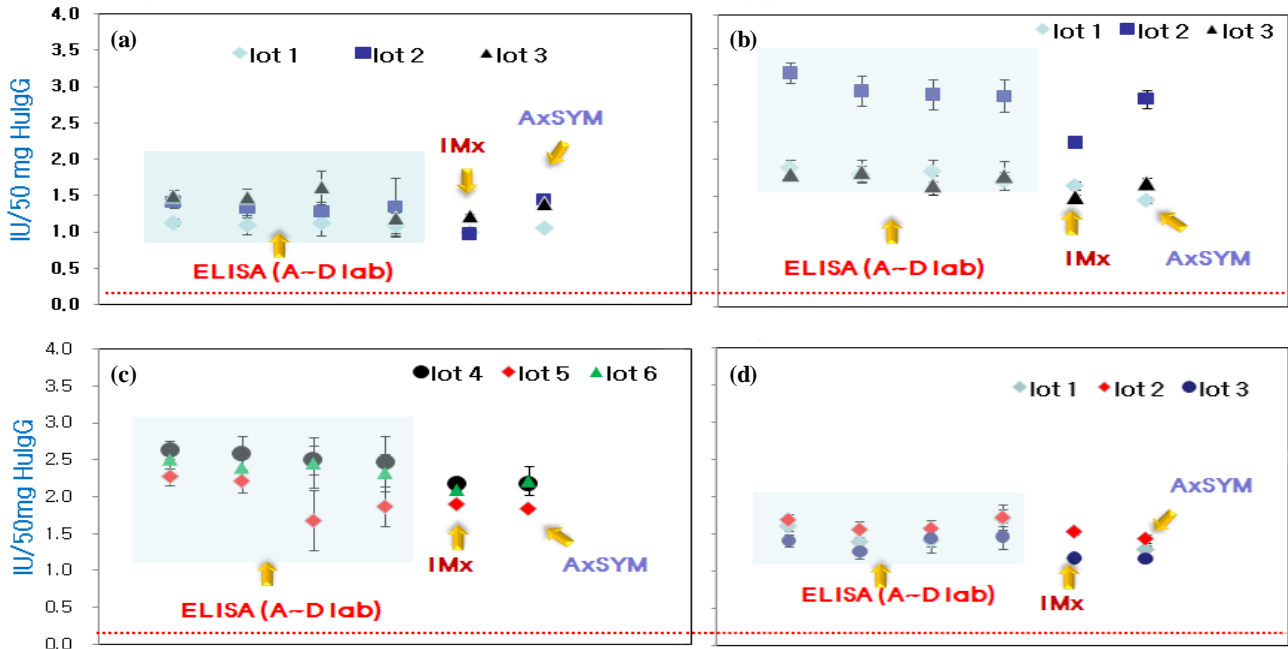


Fig. 4. Comparison of Anti-HBs assays (EIA: Enzygnost, MEIA: IMx and AxSYM) with 3 different lot of maltose added HuIgG from imported (a) and national (b, c) source plasma and HuIgG (d). Manufacturer K's 9 lot (a,b,d) and Manufacturer L's 3 lot were used. Where N = 180 for EIA, N = 10 for AxSYM and N = 6 for IMx, inside light blue rectangle represents for EIA (each 4 participated labs: A~D) results.

3.7. 공동연구를 통한 검체군별 시험법간·로트간·실험실간 검증

3.7.1. 사람면역글로불린 (HuIgG) 제제군

성능이 검증된 EIA 키트와 두 종류의 장비를 사용한 MEIA 시험법에 대하여 정상 사람혈장을 원료로 제조되는 HuIgG 군에 대한 원료별, 제조사별, 로트별, 제제중류별 실험실간 비교시험이 실시되었다. 먼저, 수입 (Fig. 4(a))/국내 (Fig. 4(b)(c)) 혈장을 원료로 제조된 정맥주사용 제제인 말토스첨가 HuIgG 제제 3~6로트 등에 적용한 시험 결과가 실험실간 및 시험법간 분석되었다. 먼저 수입 혈장 유래 제제의 경우 전체적으로 각 로트간 약간의 차이는 있었으나, EIA를 이용한 4개 실험실간의 차이는 통계적으로 유의하지 않았으며 (CV = 6.4%, 최소값 1.6%, 최대값 13.0%), 네 실험실의 EIA 결과 평균값과 MEIA 방법 각각의 결과값 또한 상관성을 보였다 (CV = 2.9% 최소값 0.6%, 최대값 6.0%). 국내 혈장을 이용한 해당 제제를 생산하는 두 곳을 제조사에 대한 비교에서 'K' 제조사 (Fig. 4(b))의 CV는 4.8%이었으며, 'L' 제조사 (Fig. 4(c))의 경우 CV는 6.8%로 조사되었다. 네 실험실의 EIA 측정값과 MEIA 방법 결과값 또한 상관성을 보였다 (K 제조사 CV = 1.9%, L 제조사 CV = 4.3%). 근육주사용인 HuIgG 제제의 경우 EIA 실험실간 CV는 7.3%이었으며 (Fig. 4(d)), 네 실험실의 EIA 결과 평균값과 MEIA 방법 각각의 결과값 또한 일치하였다 (CV = 3.1%). 정맥용인 말토스첨가 HuIgG 제제와 근육용인 HuIgG 제제간 역가시험 결과에는 큰 차이가 없는 것으로 조사되었다. 다만, 말토스첨가 HuIgG간의 수입 혈장과 국내 혈장에 따른 차이는 유의한 것으로 나타났다 (p = 0.001). 이것은 외국 (주로 미국)과 국내의 HBV 유행율의 차이 및 백신 접종률의 차이 등에 기인한 원료별 차이로

해석되었다. 그러나 모든 결과값은 해당 제제의 역가 시험법 기준인 0.19 IU/50 mg HuIgG에 최소 5배 이상 수준이었다 [8]. 더욱이, 국내 기준은 유럽약전 기준의 약 9배 이상 (0.02 IU/50 mg HuIgG) 강화된 수준이므로 유럽약전 기준과 비교하면 45배 이상 높은 역가수준에서 변이를 보인 것으로 해석된다.

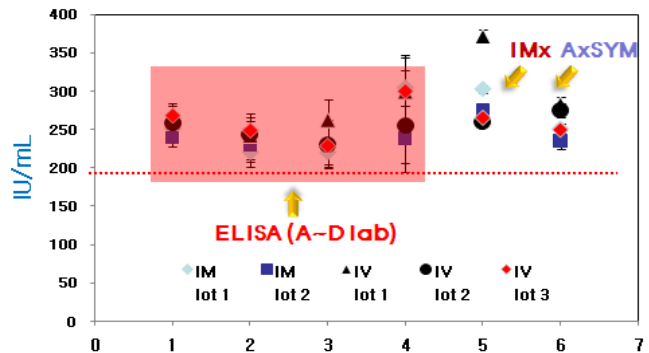


Fig. 5. Comparison of Anti-HBs assays (EIA: Enzygnost, MEIA: IMx and AxSYM) with 5 different lot of Anti-HBV HuIgG (3 iv and 2 im preparation). Where N = 180 for EIA, N = 10 for AxSYM and N = 6 for IMx, inside light red rectangle for EIA (4 participated labs: A~D), light blue diamond for the first lot (preparation via im), blue square for the second lot (preparation via im), blue triangle for the first lot of preparation via iv, black circle for the second lot of preparation via iv and red diamond for the third lot of preparation via iv.

3.7.2. B형 간염 HuIgG 제제

정상 사람 혈장을 원료로 제조되는 HuIgG 제제군 외에 특정 바이러스 혹은 항원 등에 대해 면역한 특수혈장 (special plasma)를 이용한 B형 간염 HuIgG 제제를 적용한 시험이 실시

되었다. 성능이 검증된 EIA 키트와 MEIA 시험법에 정맥주사용 및 근육주사용 B형 간염 HuIgG 제제 각각 3로트 및 2로트가 적용되었고, 그 결과가 실험실간 및 시험법간에 분석되었다 (Fig. 5). 전체적으로 각 로트간 약간의 차이는 있었으나, 근육주사용과 정맥주사용간의 통계적 유의한 차이는 없었다. EIA를 이용한 4개 실험실간의 차이 또한 통계적으로 유의하지 않았으며, 네 실험실의 EIA 결과 평균값과 MEIA 방법 각각의 결과값 또한 일치하였다 (CV = 4.4%). 또한 모든 결과값은 해당 제제의 기준인 200 IU/mL 이상으로 조사되었다.

4. 결론

임상 검진 목적으로 주로 사용되는 Anti-HBs 시험은 EIA를 비롯한 여러 가지 검사 방법이 사용되고 있다. 임상 목적 외에 혈액제제로 무저 감마글로불린 혈증 등의 치료제로 사용되는 사람면역글로불린 (HuIgG) 제제 등에서도 기존의 효역항체 역가시험을 대체하여 Anti-HBs 시험을 통해 효능을 입증할 수 있는 시험항목으로 유럽약전등에서 채택하고 있고, 2010년부터 국내에서도 도입되어 시행중에 있다. 따라서 생물학적 제제인 HuIgG 등의 제조사 자사 품질검사 및 국가에서 시험하는 국가검정 시험법을 확립·검증하는 목적으로 3종류의 EIA와 두 종의 MEIA를 총 22종의 관련 의약품을 검체로 하여 4 실험실의 공동연구를 통해 비교 평가하는 연구가 수행되었다. 먼저 제조사 등과의 국가표준품 및 WHO 국제 표준품을 이용한 키트 선정실험 수행결과 정확성 (회수율 > 96%) 및 정밀성 (CV 평균 5%)이 확인된 Enzygnost 키트를 최적 조건으로 선정하였으며, 희석 용액으로 키트에 포함된 음성 혈장 혹은 사람혈청 알부민 5%가 사용가능함을 밝혔다. 확립된 EIA 키트 시험법을 포함하여 4개 실험실에서 22개의 검체를 사용하여 MEIA법 및 EIA법을 각각 수행한 결과 정밀성 (precision) 및 반복성 (repeatability) 평가를 위한 실험실간, 일간 평균 CV는 약 10%로 확인되었다. 특이성과 검출한계는 음성 대조액 대비 최저 농도 표준액의 흡광도 통계분석 비교에서 10 IU/L 이하로 결정되었으며, 정량한계는 10~150 IU/L로 확인되었다. 표준곡선의 직선성은 모든 표준곡선 결과에서 $R^2 > 0.998$ 로 나타났고, 완전성 (Robustness)은 matrix effect 등을 평가하기 위하여 사용된 3개군 (HuIgG, 말토스첨가 HuIgG 및 B형간염 HuIgG) 그리고 희석용액인 5% HSA를 이용하였을 때 회수율이 100.1%로 조사되었다. 동 연구결과 22개의 검체에 대한 조사에서 IMx 및 AxSYM 장비를 이용한 MEIA 결과와 EIA 키트의 결과는 상관성을 나타내었다. 특히 HuIgG 및 말토스첨가 HuIgG의 기준 (> 0.19 IU/50 mg HuIgG)을 5배 이상 상회하는 범위에서 변이가 관찰되었다. 또한, 본 연구를 통해 기존의 임상적 사용외 시험대상을 생물학적 제제 (Biologics)인 의약품으로 확대·검증하였고, 특히 사람면역글로불린, 말토스첨가사람면역글로불린 및 B형간염사람면역글로불린 (정맥 및 근육 주사용) 등 다양한 제제가 가지고 있는 부형제 (additives)의 방해효과 (matrix effect)를 회수율 시험 (recovery test) 등을 통해 검증 (validation)하였다. 또한 기존에 임상 검사에서 Anti-HBs 양성 판단 기준인 10 IU가

본 연구 수행결과 표준곡선 측정 범위에 포함되나, 25 IU 미만에서는 상대적으로 큰 변이를 세 종류의 EIA 키트에서 공통적으로 보여주었다 (Fig. 1). 따라서 본 연구에서는 이들 키트의 시험방법을 해당 의약품에 최적화하여 표준곡선과 검체 희석구간을 검증 (validation)하여 표준곡선의 범위를 기존의 1 L당 5 IU~100 IU에서 25 IU~150 IU로 변경하고 일반적인 각 해당 의약품의 희석구간을 정하여 임상검체에 비해 Anti-HBs를 상대적으로 고용량으로 포함하고 있는 검체의 특성에 최적화하였고 또한 희석용액의 차이를 분석하므로써 재현성을 향상시켰다. 이로써 본 연구를 통하여 확립된 Anti-HBs 시험법을 통해 관련 HuIgG 제제의 품질관리 향상에 기여할 것으로 기대된다.

감사

본 연구내용은 2010년 식품의약품안전평가원에서 시행한 자체 연구개발과제의 연구결과물임을 밝힙니다. 본 연구사업 수행을 위해 공동 시험에 참여해 주신 대한적십자사 혈장분획센터, 녹십자 및 에스케이케미칼 담당자 분들 및 통계처리에 애써 주신 LSK Global Pharma Service 관계자분들께 감사말씀드립니다. 또한 영문교정에 도움을 주신 식품의약품안전청 영문에디터 이상운 선생님께 감사드립니다.

References

- Huzly, D., T. Schenk, W. Jilg, and D. Neumann-Haefelin (2008) Comparison of nine commercially available assays for quantification of antibody response to hepatitis B virus surface antigen. *J. Clin. Microbiol.* 46: 1298-1306.
- Haas, J. and G. Hotz (1980) Rapid detection of HBsAg and anti-HBs by enzyme-immunoassay. *J. Virol. Methods* 2: 63-69.
- Kruining, J., P. G. Mulder, and R. A. Heijink (1988) Immune response to HBsAg differently interpreted by RIA and EIA. *J. Virol. Methods* 22: 89-98.
- Ostrow, D. H., B. Edwards, D. Kimes, J. Macioszek, H. Irace, L. Nelson, K. Bartko, J. Neva, C. Krenc, and L. Mimms (1991) Quantitation of hepatitis B surface antibody by an automated microparticle enzyme immunoassay. *J. Virol. Methods.* 32: 265-276.
- Racela, L. S., G. E. Tegtmeier, G. R. Hodges, and J. S. Reed (1986) Comparison of two testing methods to determine hepatitis B surface antibody response to hepatitis B vaccine among health-care workers. *Am. J. Clin. Pathol.* 86: 527-529.
- EP (2007) Monograph Human Hepatitis B Immunoglobulin. pp. 2068-2069 *European Pharmacopoeia 6.0*. European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM) Council of Europe, Strasbourg, France.
- FDA (2000) Analytical Procedures and Methods Validation. *FDA Guidance for Industry*, White Oak, Maryland, USA.
- KFDA (2005) Monograph Human Hepatitis B Immunoglobulin. pp. 589-591. *Biologics Test and Specification*. Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea.
- EP (2007) Statistical analysis of results of biological assays and tests. pp. 571-600. *European Pharmacopoeia 6.0*, European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM) Council of Europe, Strasbourg, France.