류마치스성 질환의 면역학적 진단

한양대학교 의과대학 임상병리학교실

김 신 규

Immunologic Diagnosis of Rheumatic Disease

Think-You Kim, M.D.

Division of Diagnostic Immunology, Department of Clinical Pathology,
College of Medicine, HanYang University, Seoul, Korea

서 론

전신성 류마티스 질환(systemic rheumatic disease, 이하 SRD)은 여러 조직을 침범하여 염증성 세포반응과 교원질(collagen)등의 증식반응을 초래하는 전신성 질환이므로 교원성 질환(collagen disease)혹은 넓은 의미로 결합조직성 질환(connective tissue disease)등으로도 불리운다.

SRD중 호흡기에 대한 침범은 전신홍반성 낭창(systemic lupus erythematosus, 이하 SLE)을 비롯하여 progressive systemic sclerosis, polyarteritis nodosa, mixed connective tissue disease (MCTD), Sjögren증후군(SS)등 여러질환에서 볼 수 있다. 특히 pleurisy가 동반되는 경우 적절한 검사없이 결핵으로 오진되어 결핵 치료를 장기간 받는 경우가 우리나라에서는 드문 일이 아니다.

면역학의 발전과 더불어 SRD에 대한 병인(pathogenesis)이 자가면역성이라는 것이 밝혀지고 SRD의 진단에 있어서 면역학적 진단의 중요성이 강조되고 있다.

SRD의 면역학적 진단방법에는 항핵항체(Antinuclear antibody, 이하 ANA)검사를 비롯하여 항 DNA항체(anti-nDNA)검사, Nonhistone nuclear antigen에 대한 항체검사, Rheumatoid factor검사 등이 기본이 되고 있으며 그 밖에 적혈구, 혈소판 등에 대한 항체검사, Anticytoplasmic antibody, 혈중단백질 전기 영동

검사, 혈중보체 농도측정, 한냉글로부린(Cryoglobulin)검사, HLA 검사, 조직면역형광검사(Tissue IF), VDRL위음성에 대한 검사, LE세포검사, CD4/CD8 ratio검사등이 SRD의 진단에 도움이 된다.

필자는 상기 검사중 ANA, Anti-nDNA, Nonhistone nuclear antigen에 대한 항체검사에 대해 중점적으로 간략하게 기술하고자 한다.

A N A(HEp-2)

ANA는 핵거대분자(nuclear macromolecule)에 대한 항체로서 SRD진단에 가장 기본이 되는 검사이다. 보편적으로 가장 많이 이용되는 검사방법은 간접면역형광법인 Fluorescent-ANA(FANA)test이다.

FANA검사를 시행함에 있어 가장 중요한 요인은 첫째 기질(substrate)과 고정액(fixative)의 선택, 둘째 검사방법(methodology)과 정량(quantitation), 셋째 정상범위의 확립, 넷째 검사결과 판독 능력 등이다.

1. 기질(Substrate)의 선택

FANA검사에 이용되는 기질은 주로 포유류의 세포나 조직이 이용되며 이를 크게 두가지로 대별할 수 있다. 즉 포유류 장기의 냉동조직절편(cryostat section)이나 인공배양된 포유류세포(cell culture substrate)를 이용하는 것이다.

냉동조직절편은 주로 백서를 위시한 실험동물의 간장

Table 1. ANA Specificities and SRD

Antigen	FANA pattern	Associated SRD
ds-DNA	Peripheral Homogeneous	SLE
Sm	Speckled	SLE
n-RNP	Speckled	MCTD (alone) : SLE, SS, Scleroderma, Polymyositis
SS-A/Ro	Speckled	SS, SLE
SS-B/La	Speckled	SS, SLE
Scl-70	Speckled	Scleroderma
PM-1	Speckled	Polymyositis
Jo-1	Speckled	Polymyositis
PCNA	Speckled	SLE
RANA	Speckled	RA
Centromere	Speckled	CREST
Nucleolus	Nucleolar	Scleroderma

과 신장이 많이 쓰이고 있고(MKC, RLC, MK, BHK ...)인공배양되는 세포의 종류도 다양해서 백서의 조직 아세포(MF), 원숭이 신장세포(VMK) 등의 동물세포를 비롯 사람의 세포(HA, KB, HEp-2)도 이용되고 있다.

가장 많이 사용되는 것은 포유류의 간장이나 신장의 냉동조직절편이지만 배양된 세포 특히 human cell line 보다 감수성이 떨어짐은 물론이고 진단에 한계가 있는 것이 사실이다.

일반적으로 배양된 세포가 냉동조직절편보다 핵의 크기가 크고, 특정 핵항원의 함유량이 더 높고 다양해 형광양상(fluorescent pattern)의 판독이 용이하고 위음성의 가능성이 훨씬 낮은 것으로 알려져 있다. 그러므로 SRD가 의심되는 환자에서 냉동조직절편을 이용한 FANA검사 결과 음성인 경우 반드시 배양된 human cell line을 기질로 하여 확인할 것을 권하고 있다. 실제로 ANA음성 SRD로 보고된 환자중 HEp-2 cell등을 기질로 하면 ANA양성으로 나타나는 경우가 상당수 있음을 저자는 경험하였다.

배양된 세포를 이용하는 경우 또다른 장점은 분열도중에 있는 세포(mitotic cell)의 형광양상을 이용하여 냉동조직절편에서는 불가능한 항centromere항체, 항 proliferating cell nuclear antigen (PCNA)등을 찾아 낼수 있고, 구분이 어려운 형광양상의 분별은 물론 모든 형광양상을 다시한번 확진할 수 있는 이점이 있다.

필자의 경우도 자가제조 백서 간세포(mouse liver cell)를 사용해 오다가 최근 HEp-2 cell(ATCC CCL-23)을 직접 배양하여 기질로 이용 함으로써 만족스러운 결과를 얻고 있다.

2. FANA검사의 형광 Pattern

FANA검사에 있어서 형광양상은 특정 SRD의 진단에 많은 도움을 준다. 임상적 의의가 있는 형광양상은 크게 네가지로 분류할 수 있다. 즉 핵 전체가 골고루 형광염색이 되는 "Homogeneous"형, 핵 주변부가 강하게 염색되는 "Peripheral"형, 다수의 형광부분이 전체에 흩어져 있는 "Speckled"형, 핵소체 부위만이 형광염색이 되는 "Nucleolar"형으로 나눌 수 있고 그밖에 speckled형을 세분화거나 "Spindle" 형처럼 임상적 의의를 모르는 형광양상들도 있다.

일반적으로 Homogeneous형과 Peripheral형은 SLE 때 나타나고 Speckled형은 SLE, MCTD, Sjögren 증후군, 경피증(Scleroderma), 류마티스성 관절염, CREST증후군, Polydermatomyositis(PDM)등과 연관되며 Nucleolar형은 Scleroderma에서 나타나는 것으로 알려져 있다.

그러므로 FANA검사의 결과는 단순히 양성, 음성으로 한정지우는 것보다는 역가(titer), 형광양상(mitotic cell의 형광양상도 포함), 형광강도 (intensity)등을 포

Fig. 1. FANA test 양성조건 (Speckled pattern).

시하는 것이 SRD의 진단, 치료 및 예후판정에 도움을 받을 수 있다.

Anti-DNA (CLIF)

DNA는 다수의 epitope를 갖는 분자이기 때문에 anti-DNA도 여러종류의 specificity를 나타낸다. 이중 가장 혼란것은 ss-DNA (purine & pyrimidine nucleotide determinants)에 대한 항체이다.

그러나 Anti-ss-DNA는 여러 자가면역질환이나 결합 조직성 질환에서 발견될 수 있으므로 진단적인 특이도 (specificity)가 낮다.

반면 Anti-ds-DNA (deoxyribose-phosphate determinant와 반응)는 SLE의 진단에 있어서 중요한 지표가 된다.

Anti-DNA 검사방법은 방사면역법(RIA)과 간접면역형광법(IF)으로 크게 나뉘고 최근에 ELISA방법도 이용되고 있다. 일반적으로 RIA가 예민도가 높고 정확한 것으로 알려져 있지만 피검혈청과 radiolabeled nDNA를 혼합하고 DNA-anti-DNA complex를 침전 혹은 여과시키는 과정에서 ss-determinants의 노출 가능성이 높아지기 때문에 검사의 특이도가 떨어지게 된다.

그러므로 nDNA만을 함유하고 있는 기질을 이용한 간접면역형광법으로 특이도가 높은 검사결과를 얻을 수 있기에 이 검사법에 관하여 기술하고자 한다.

1. 기질의 선택

C. luciliae (ATCC 14765)는 hemoflagellate로써 kinetoplast내에 고농도의 nDNA를 함유하고 있으며 다른 성분은 배제되어 있고 원형을 이루고 있어 식별이 용이하다. 1975년 Aarden이 처음 보고한 이래 *C. luciliae*를 이용한 간접면역형광법(CLIF)이 예민도나 특이도면에서 기존의 RIA와 견줄만 하거나 오히려 더 좋다는 연구결과등이 계속 발표되었다.

필자도 *C. luciliae*를 직접 고안한 배지를 이용하여 보다 판독이 용이한 기질을 얻을 수 있었고, RIA와도 좋은 상관관계를 보이고 있음을 확인할 수 있었다.

2. 형광 Pattern

여러종류의 형광양상이 나타날 수 있지만 의미있는 것은 kinetoplast단독 혹은 핵과 함께 형광을 나타내는 경

우에만 양성으로 판정할 수 있다.

Basal body의 형광이 kinetoplast와 혼돈을 줄 수도 있지만 식별이 어렵지는 않다.

일반적으로 역가가 1:160 이상인 경우는 활동성 lupus로 1:10이하에서만 양성인 경우 비활동성 lupus로 간주한다.

3. 장·단점

CLIF의 장점은 첫째 가격이 저렴하고, 둘째 검사시간이 짧으며 한번에 더 많은 수의 검체를 처리할 수 있고, 셋째 면역글로불린의 종류(Ig class)와 보체결합능(Complement fixing activity)을 측정할 수 있다. 반면, 단점으로는 매번 음성, 양성 대조군은 세워야 하는 점, 반정량적(semiquantitative)방법이라는 점등을 들 수 있으나 심각한 단점으로 보기는 어렵고 human origin이 아니기 때문에 이의를 제기하기도 하지만 어디까지나 이론적일뿐이다.

결국 CLIF는 anti-nDNA를 측정하는데 있어서 가장 바람직한 검사방법으로 간주되고 있다.

Nonhiston핵 항원에 대한 항체검사(DID)

SRD가 의심되는 환자의 선별검사(screening test)로서 FANA검사가 가장 널리 이용되는 검사임은 전술한 바 있다.

FANA검사결과 양성으로 판정된 경우 항핵항체의 면역학적 특성을 세부적으로 밝히는 것은 여러 SRD의 진

Fig. 2. CLIF test 양성 소견
(Combination pattern).

단에 크게 도움이 된다. 많은 검사방법들이 적용되어 왔지만 현재 가장 널리 이용되는 검사법은 이중면역확산법(Double immunodiffusion Ouchterlony technique, 이하 DID)이다.

DID는 면역침강반응에 의한 검사법으므로 대량의 항체를 필요로 한다. 그러므로 ELISA에 비해 예민도가 떨어지지만 두가지 이유로 아직도 가장 많이 이용되고 있다. 첫째, 대부분의 SRD환자가 대량의 항체를 갖고 있고, 둘째, ELISA는 순수 정제된 항원을 필요로 하는데 아직 일반 검사실에서 쉽게 이용할 수 있을 정도로 정도로 대량의 항원이 분리, 공급되지 않고 있기 때문이다.

1. 항원의 종류

생리식염수에 용해되는 Sm, n-RNP를 비롯하여 SS-A/Ro, SS-B/La, Scl-70, Jo-1, PM-1, PCNA, RANA, Ma등의 항원이 있으며 이들에 대한 항체를 검사하기 위한 항원은 여러성분이 함께 들어있는 RTE(Rabbit thymus extract)가 가장 많이 쓰이고, 그 밖에 HSE(Human spleen extract), HLE(Human lymphocyte extract), Wil₂ cell extract등도 항체에 따라 이용된다.

2. 표준 혈청

1982년 미국 AF, CDC에서 anti-Sm, anti-n-RNP, anti-SS-B/La, anti-Scl-70등 일부 표준혈청이 생산되었

다.

WHO에서도 개발중에 있으며 일부는 상품화되기 시작하고 있지만 아직까지는 부족한 실정이어서 피검혈청중 동일한 특성을 갖는 것을 보관하였다가 이용하기도 한다.

3. 판독

면역침강선은 세가지 형태로 나타날 수 있다.

즉, "line of fusion", "Spur", "line of nonfusion"이 그것이며 line of fusion은 표준혈청과 동일한 특성을 갖는다는 것을 알 수 있고 Spur는 anti-Sm과 anti-n-RNP 침강선 간에 잘 나타난다.

line of nonfusion은 표준혈청과 전혀 다른 특성을 나타낸다는 것을 의미한다.

3. 항체종류에 따른 SRD와의 연관성

검출된 ANA의 특성에 따라서 특정 SRD와 깊은 연관성을 나타낸다.

Anti-Sm은 SLE환자의 1/4에서 나타나며, 정상인이나 다른 SRD에서는 검출되지 않는 특이도가 상당히 높은 표식자(marker)이다.

반면 anti-n-RNP는 SLE, discoid LE(DLE), 류마티스성 관절염, Sjögren증후군등 여러 SRD에서 나타나지만 다른 표식자들이 검출되지 않고 anti-n-RNP만이 높은 역가로 측정될 때 MCTD의 가능성이 강력히 사료된다.

Anti-SS-A/Ro는 Sjögren증후군 환자의 2/3, SLE환

Fig. 3. DID test조건

(A: Anti-Sm 양성, Anti-n-RNP 양성)
(B: Anti-Sm 음성, Anti-n-RNP 양성)

Fig. 4. DID test조건

(A: Anti-Scl-70 양성, Anti-SS-B 음성)
(B: Anti-Scl-70 음성, Anti-SS-B 양성)

자의 1/3에서 검출되며 광과민성 피부염(photosensitive dermatitis)과 연관이 있음이 밝혀졌다. Anti-Scl-70는 경피증(Scleroderma) 환자의 1/5에서 검출되며 특히 증세가 더 악화된 환자에서 잘 발견된다. Anti-PM-1은 다발성근염(Polymyositis) 환자의 2/3, 다발성근염과 경피증이 중복된 환자의 약 90%에서 나타나는 것으로 보고되고, 최근에 밝혀진 Anti-Jo-1도 다발성근염의 중요한 표식자가 될 것으로 예상된다.

Anti-PCNA는 분열증식중인 세포와만 반응하는 항체로서 SLE환자에서만 검출되며 다른 SRD에서는 나타나지 않는다.

Anti-RANA는 류마티스성 관절염 환자나 Sjögren증후군과 동반된 류마티스성 관절염 환자의 약 2/3에서 나타나며, anti-Ma는 anti-Sm, anti-nDNA가 검출되는 SLE환자보다 더 중증의 환자에서 나타난다.

필자는 CDC에서 기증받은 표준혈청을 이용하여 검사를 시행하고 있으나 부족한 실정이어서 충분한 양의 혈청확보를 위해 노력하고 있는 중이다.

결 론

우리나라에서는 SRD에 대해 환자는 물론 의료인 조차도 인식이 부족한 상태이므로 ANA검사의 의뢰건수가 타검사에 비해 현저히 적은 편이며 특히 FANA검사를 시행하는 병원은 한정되어 있고 기질도 대부분 냉동조직 절편을 이용하고 있다.

필자의 소견으로 SRD의 선별검사로써 FANA검사를 시행함은 물론 음성으로 판정된 경우라도 HEp-2 cell같은 human cell line을 기질로 하여 재검을 하는 것이 바람직하고 생각된다.

Anti-nDNA의 검사도 RIA보다는 CLIF가 더 많은 장점이 있음을 전술한 바 있고, Nonhistone 핵 항원에 대한 항체 검사도 충분한 양의 표준혈청만 확보된다면

쉽게 검사를 시행할 수 있다. 끝으로 필자의 경험으로 미루어 고가의 kit제품을 수입하지 않더라도 상기 검사종목들은 검사실 자체내에서 자급자족할 수 있으리라 사료된다.

REFERENCES

- 1) McCarty GA, Valencia DW, Fritzler MJ: Anti-nuclear antibodies; contemporary techniques and clinical application to connective tissue diseases. Oxford University Press, New York-Oxford. 1984
- 2) Molden DP, Nakamura RM, Tan EM: Standardization of the immunofluorescent test for autoantibody to nuclear antigens (ANA): use of reference sera of defined antibody specificity. Am J Clin Path 82:47, 1984.
- 3) Nakamura RM, Peebles CL, Molden DP, Tan EM: Advances in laboratory test for autoantibodies to nuclear antigens in systemic rheumatic diseases. Lab Med 15:190, 1984.
- 4) Whiteside TL, Dixon JA: Clinical usefulness of Crithidia luciliae test for antibodies to native DNA. Am J Clin Path 72:829, 1979.
- 5) Tan EM: Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. Adv Immunol 33:167. 1982.
- 6) 김신규, 김성윤 : HEp-2 cell 세포배양을 이용한 항핵 항체(ANA)검사에 관한 연구 I. 대한내과학회잡지 35:315, 1988
- 7) 김신규, 김성윤 : Crithidia luciliae 배양을 이용한 Anti-nDNA검사에 관한 연구 I. 대한내과학회잡지 35:471, 1988
- 8) 김신규, 김성윤, 김춘원 : 이중 면역확산법(DID)에 의한 Anti-ENA 검사에 관한 연구. 대한임상병리학회 추계학술대회초록 1988
- 9) 김신규, 김성윤, 김춘원 : Anti-Scl-70와 Anti-SS-B/La 검사에 관한 연구. 대한임상병리학회 추계학술대회초록 1988