

## 월슨병의 조기진단을 위한 선별검사(Screening)법 개발

아주대학교 의과대학 소아과학교실, 면역학교실\*, 제노백(주)<sup>†</sup>

한시훈 · 이수영 · 장영주\* · 김순남 · 신하철<sup>†</sup> · 박선영<sup>†</sup> · 강주형 · 유은선<sup>†</sup>

### Development of a Screening Kit for Early Diagnosis and Prevention of Wilson's Disease

Sihoun Hahn, M.D., Soo-Young Lee, M.D., Young-Ju Jang, Ph.D.\*  
Soon-Nam Kim, M.D., Ha-Cheol Shin, M.S.<sup>†</sup>, Sun-Young Park, M.S.<sup>†</sup>  
Joo-Hyoung Kang, M.D. and Eun-Sun You, B.S.<sup>†</sup>

Department of Pediatrics, Immunology\*, Ajou University School of Medicine,  
ZenoVac, Co.<sup>†</sup>, Suwon, Korea

**Purpose :** Wilson's disease is an autosomal recessive disorder characterized by copper accumulation in the liver, brain, and other organs due to defected copper metabolism. The incidence of Wilson's disease is approximately one in 30,000 population in the world, more common than phenylketonuria in Korea. The early diagnosis or presymptomatic diagnosis of Wilson's disease is critical in order for them to live a normal life. However, unfortunately, there are no commercial kits available for Wilson's disease screening in the world yet.

**Methods :** We developed a mass-screening kit for the purpose of early diagnosis and prevention of Wilson's disease using sandwich ELISA method. This kit can handle a large number of samples at the same time by using filter paper as in newborn screening. Using the polyclonal or monoclonal anti-ceruloplasmin antibodies, this kit determines the plasma ceruloplasmin levels—one of the main markers for Wilson's disease.

**Results :** The plasma levels of the ceruloplasmin were considerably lower in the Wilson's disease ( $4.5 \pm 1.6$  mg/dL) group compared to normal controls ( $22.1 \pm 1.4$  mg/dL), sufficient to be used for mass screening. In addition, the results using this screening kit showed 100% positive and negative concordance rates with the test results obtained from immuno-turbidimetry analysis which is the currently used in most test centers for ceruloplasmin measurement in the serum or plasma after centrifugation.

**Conclusion :** Taken together, we successfully developed a screening kit which is very effective for the early diagnosis and prevention of Wilson's disease. By using simple filter paper method for sample collection, this kit provides suitable mass screening. We suggest the screening for Wilson's disease at the age of 3-5 years. (*J Korean Pediatr Soc* 2001;44:1374-1380)

**Key Words :** Screening, Wilson disease, ELISA, Ceruloplasmin, Filter paper

### 서 론

\* 본 연구는 제노백(주)의 연구비 지원으로 수행되었음.  
접수 : 2001년 6월 19일, 승인 : 2001년 8월 17일  
책임저자 : 한시훈, 아주대학교 의과대학 소아과학교실  
Tel : 031)219-5166 Fax : 031)219-5169  
E-mail : omik@madang.ajou.ac.kr

월슨병은 전세계적으로 2만5천-3만명에 1명의 빈도로 발생하는 상염색체 열성질환으로 보인자율은 1/90으로 비교적 흔한 유전질환의 하나이다<sup>1)</sup>. 한국인의 월슨

병에 대한 유전적 특성이 최근 규명되면서 한국인에서 윌슨병의 빈도가 매우 높음이 확인되었고 특히 중국인, 일본인 그리고 한국인에서 공통되는 돌연변이가 다수 있음이 알려지게 되었다. 최근 일본에서는 윌슨병의 선별검사법을 개발하였고, 이를 이용한 pilot study를 통하여 3-5세 사이에 선별검사를 함으로서 윌슨병을 예방하는데 많은 도움을 줄 수 있음을 확인하였고, 곧 전국적인 선별검사 프로그램으로 적용될 가능성이 높아지고 있다<sup>2-4)</sup>. 따라서 한국인 윌슨병의 유전적 특성으로 보아 국내에서도 윌슨병의 조기진단을 위한 선별검사법 개발이 절실히 요구된다. 선별 검사의 특성상 종래의 혈청 시료를 이용하는 ceruloplasmin 측정방법은 이용이 불가능하며, 따라서 한번에 많은 수의 시료를 측정할 수 있도록 시료의 채취, 운반, 보관이 간편한 중이여과지를 이용한 혈액여과지 검체로부터 ceruloplasmin을 측정하는 새로운 기술을 필요로 한다. 윌슨병 환자는 정상인에 비해 혈액 중의 ceruloplasmin 농도가 낮고, 특히 oxidase 활성도가 없는 apoceruloplasmin의 양은 정상인과 비슷하나 oxidase 활성도가 있는 holoceruloplasmin 농도는 더 낮은 것으로 알려졌다<sup>5)</sup>. 이같은 특징에 착안하여 본 연구에서는 윌슨병 환자에 매우 낮게 측정되는 holoceruloplasmin 분자의 oxidase 활성에 중요한 epitope를 인지하는 단클론 항체와 동일 분자의 다른 epitope를 인지하는 다클론 항체를 이용하여 sandwich ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)법을 시행하여 혈액내 holoceruloplasmin을 정량

분석하는 키트를 개발하였다. 이 진단기술은 일본에 이어 두번째로 개발된 것으로 상용화에 성공할 경우 윌슨병을 원천적으로 예방할 수 있는 계기를 마련하게 될 것으로 기대된다.

**대상 및 방법**

**1. 연구대상 및 blood spot 제작**

1994년에서부터 2000년까지 아주대학교병원 소아과에 내원하여 임상적 증상 및 혈청내 ceruloplasmin 정량분석에 의하여 윌슨병으로 확진된 환자 11명과 정상인으로부터 혈액을 채취하여 혈액여과지를 제작하였다. 중이여과지에 일정한 방법으로 채혈된 전혈을 충분히 적신 후 하룻밤 동안 말리고 검사할 때까지 -20℃에 보관하였다. 검체로 사용된 11명의 윌슨병 환자의 임상적 양상과 기존의 방법으로 측정된 혈청 ceruloplasmin 농도는 Table 1과 같다.

**2. Ceruloplasmin 정제**

Ion exchange chromatography와 gel filtration chromatography 방법을 이용하여 정상인의 혈장으로부터 순수한 ceruloplasmin을 정제하였다<sup>6)</sup>. 또한, 비교분석을 위해 Sigma사(100 units, USA) 및 Calbiochem사(1 mg, Germany)로부터 정제된 ceruloplasmin을 구입하여 사용하였다.

**Table 1.** Clinical Characterization and Serum Ceruloplasmin in Wilson Disease Patients

Patient (sex/age)	Age of diagnosis	Status at diagnosis				Ceruloplasmin (mg/dL)*
		Hepatitis	Cirrhosis	CNS abnormality	K-F ring	
1	(M/25)	+	+		+	<7.0
2	(M/16)	+	+		+	<7.0
3	(F/6)	+				<7.0
4	(F/2)	+				<7.0
5	(M/7)	+				<7.0
6	(M/8)	+			+	4
7	(F/17)	+	+		+	<7.0
8	(M/11)	+				12.9
9	(F/18)	+	+	+	+	<7.0
10†	(M/13)	+	+		+	33.3

\*Serum ceruloplasmin levels measured by immuno-turbidometry, †Wilson disease with normal ceruloplasmin level, positive in K-F ring means presence of K-F ring

### 3. Ceruloplasmin 특이적 단클론 및 다클론 항체 제작

정제된 ceruloplasmin을 이용하여 mouse와 rabbit 으로부터 통상의 방법으로 단클론 및 다클론 항체를 제작하였으며<sup>7,8)</sup> peroxidase가 결합된 항 ceruloplasmin 항체 제작 역시 통상의 방법으로 시행하였다<sup>9)</sup>. 단클론 항체생성을 위하여 인산완충용액에 녹여진 정제된 ceruloplasmin 200  $\mu$ g을 Complete Freund's adjuvant로 유화시켜 생후 6-8주 가량된 암컷 BALB/c 생쥐의 복강내에 2주 간격으로 3회 면역시킨 후, 항체생성을 확인한 뒤, 2주 후에 100  $\mu$ g의 ceruloplasmin을 추가 면역시키고 3일 후에 생쥐로부터 비장을 추출하여 세포융합을 시행하였다. 비장으로부터 비장 세포의 단일세포 현탁액을 얻어 Sp2/0-Ag14 myeloma 세포와 1:5의 비율로 혼합하여 50%(w/v)의 polyethyleneglycol을 이용하여 세포융합을 시행하였다. 세포 침전물을 10% fetal bovine serum이 함유된 HAT 배지에 부유시켜 96 well plate에 well 당 100  $\mu$ L씩 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 2주 동안 배양하였고, 배양과정 중 hybridoma 세포의 항체생산 여부는 효소면역 측정법으로 확인하여, 양성 well의 세포를 계열희석(limiting dilution)법에 의하여 3회 subcloning함으로써 단클론화를 시행하였다.

다클론 항체 생성을 위해서는 1 mg/mL 농도로 인산완충용액에 녹여진 정제된 ceruloplasmin 용액 400  $\mu$ L를 동량의 Freund's adjuvant(BRL사 제품)로 유화시킨 후 10주된 토끼에게 11일 간격으로 4회 근육 주사하였고, 4번째 근육주사한 10일 후 심장 천공법으로 혈액을 채취하고 채취된 혈액은 상온에서 30분, 4°C에서 하룻밤 동안 방치하여 완전 응고시킨 후 원심분리하여 상등액을 취하여 혈청을 얻고 이것에 ammonium sulfate를 최종 농도가 40% 되도록 첨가하여 침전시키고 10 mM 인산완충용액(pH 7.0)에 하룻밤동안 투석시킨 후 protein G affinity column을 이용하여 항체를 정제하였다. 또한 제조된 항체들의 peroxidation을 위하여 정제된 항체 5 mg과 동일량의 peroxidase를 0.1 M 인산완충액(pH 6.8)에 섞어 하룻밤 동안 투석시키고 0.1 M 인산완충액으로 최종 농도 1%로 희석된 glutaraldehyde 용액을 첨가하여 상온에서 3시간 동안 천천히 교반시키고 2 M glycine을 최종농도 0.1 M이 되도록 첨가하여 상온에서

2시간 동안 방치하고 다시 인산완충액에서 하룻밤 동안 투석시키고 10,000 g에서 30분 동안 원심분리하여 얻은 상등액에 동일한 부피의 glycerol를 첨가하여 -20°C에 저장하였다. 상기의 제조된 단클론 항체의 oxidase 활성도 중화능력은 native polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)를 시행하여 p-phenylenediamine과의 반응성을 시험해 봄으로서 확인하였다<sup>10)</sup>.

### 4. 효소면역 측정법을 이용한 ceruloplasmin screening 검사 키트 개발

정상인의 혈액으로부터 ceruloplasmin이 걸여된 혈액을 제조하여 standard blood spot과 control blood spot 제조에 이용하였다. Standard blood spot은 표준농도의 범위를 각각 0, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50 mg/dL의 8개 범위로 하였다. Control blood spot을 제조하여 검사가 잘 이루어지는 지를 확인할 수 있도록 하였다. Blood spot에 있는 ceruloplasmin 농도를 측정하기 위한 방법으로 상기의 제조된 단클론 항체를 96 well microtiter plate에 고정시켰고 blood spot을 well에 넣어 PBS buffer(pH 7.4)로 4°C에서 하룻밤 동안 ceruloplasmin을 추출한 다음, HRP(horseradish peroxidase)가 표지된 다클론 항체를 넣고 상온에서 90분 동안 반응시키고 세척 후에 TMB(3,3',5,5'-tetramethylbenzine) 용액을 넣어주고 용액의 색깔이 변하면 정지액을 넣어 반응을 정지시켜 450 nm에서 흡광도를 측정하여 ceruloplasmin의 농도를 측정하였다.

## 결 과

### 1. 항-ceruloplasmin 항체

Ceruloplasmin에 대한 단클론 및 다클론 항체의 특이성을 확인하기 위한 실험결과, holoceruloplasmin 특이적 항체를 분리하는데 성공하였다. 항체와 항원 혼합액을 37°C에서 30분간 배양하여 전기영동 시켰을 때 oxidase 활성도가 없어지는 것이 관찰되었다(Fig. 1).

### 2. ELISA를 위한 standard curve 확립

본 연구에서 개발한 혈액여과지의 standard ceruloplasmin을 이용하여 sandwich method에 의한 ELISA를 시행한 결과 7단계의 standard spot들의 농도측정을 위한 변별력 있는 검사결과를 얻을 수 있

었고, 5회 반복한 intra-laboratory variant는 ±5% 이내이었다.

**3. 환자 및 정상인의 혈액여과지로부터 추출한 ceruloplasmin 농도**

12명의 윌슨병 환자와 5명의 정상인으로부터 추출한 혈액여과지로부터 본 연구에서 개발한 ELISA kit를 이용하여 ceruloplasmin을 측정한 결과 Fig. 2와 같은 결과를 얻었다. 즉 ceruloplasmin농도가 감소된 11명의 윌슨병 환자군에서는 정상인에 비하여 유의하게 낮은 농도로 측정되었으며 정상인과 뚜렷이 비교되었고, ceruloplasmin 농도가 정상이면서 윌슨병으로 판명된 1명의 환자는 본 키트에 의하여도 역시 정상 농도로 판명되었다. 본 키트를 이용한 검사 결과 혈청

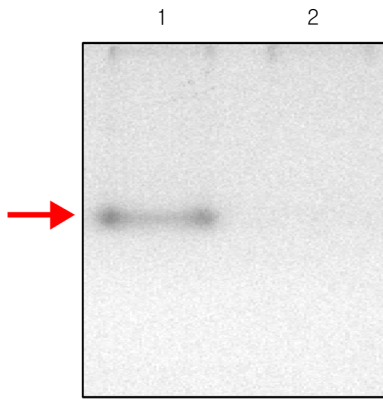
을 이용한 기존의 검사인 immuno-turbidimetry 법으로 측정된 ceruloplasmin 농도와도 100% 일치도 (concordance rate)를 보였다(Table 2).

**고 찰**

윌슨병은 전세계적으로 2만5천에서 3만명에 1명의

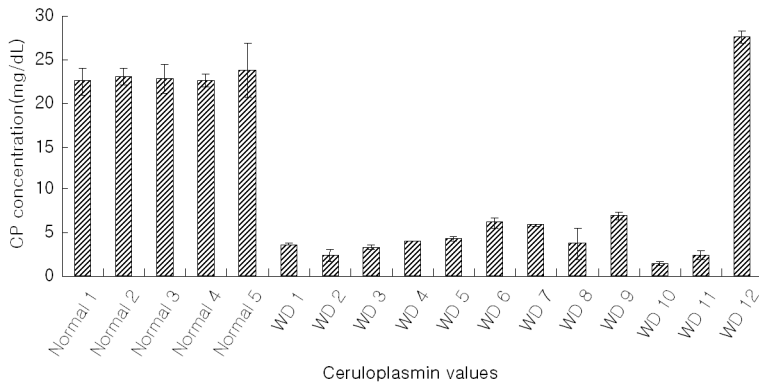
**Table 2.** Comparison of Ceruloplasmin Concentration Using Two Analysis Methods

Subject	Immunoturbidimetric assay(mg/dL)	ELISA (mg/dL)
Wilson disease		
1(M/25)	<7.0	3.4
2(M/16)	<7.0	5.9
3(F/6)	<7.0	4.1
4(F/2)	<7.0	3.4
5(M/7)	<7.0	4.3
6(M/8)	4.0	6.1
7(F/17)	<7.0	7.0
8(M/11)	<7.0	4.3
9(F/18)	<7.0	2.3
10(F/13)	<7.0	1.4
11(M/10)	<7.0	2.4
12(M/13)*	33.3	27.7
Normal control		
1(F/27)	20	22.5
2(M/30)	19	23
3(F/25)	21	22.8
4(F/28)	21	22.5
5(F/29)	20.5	23.8



**Fig. 1.** Oxidase activity staining of native polyacrylamide gel. Lane 1: purified ceruloplasmin. lane 2: mixture of purified ceruloplasmin and antibody.

\*12: Wilson disease with normal ceruloplasmin level



**Fig. 2.** Concentrations of ceruloplasmin on filter paper obtained from Wilson disease(WD) patients and normal controls. Average of ceruloplasmin concentration in WD patient: 4.5±1.6 mg/dL(except case of WD12), and Normal: 22.9±1.4 mg/dL(P<0.001, by t-test).

빈도로 발생하는 상염색체 열성질환으로 보인자율은 1/90으로 비교적 흔한 유전질환의 하나이다. 현재까지 밝혀진 율슨병의 가장 중요한 병인은 구리가 ceruloplasmin에 흡수되는데 이상이 있는 것과 담도로 구리배출이 감소되어 있다는 점이다. 이로 인하여 율슨병 환자에서는 수년에 걸쳐 구리가 간조직내에 축적되게 되는데, 일부의 환자에서는 경한 간세포손상이 있지만, 환자에 따라서는 8-10세 사이에 이미 심한 간경화증으로 진행되기도 한다. 이어서 nonceruloplasmin copper가 증가되어 혈중에 증가하며 신장으로 배출이 증가되고 여러 다른 장기에 축적되어 가는데 특히 각막(Kayser-Fleischer ring), basal ganglia (lenticular degeneration), 신장(renal tubular damage), 근육세포, 뼈 및 관절 등에 축적된다. 율슨병 환자에서 간이식을 할 경우 간의 장기에 축적된 구리의 감소가 관찰되는 점으로 미루어 간에서 구리의 overflow에 의한 타 장기로의 구리축적이 이루어지는 것으로 보인다<sup>1)</sup>.

사람의 혈청내 존재하는 구리의 약 80%는 ceruloplasmin과 결합되어 있으며 율슨병의 경우 구리의 ceruloplasmin내로의 incorporation에 장애가 있음이 이미 오래 전부터 알려져 왔다<sup>11)</sup>. Ceruloplasmin은 분자구조상 6개의 구리원자를 함유하며 이는 ceruloplasmin의 산화작용(oxidation)에 필수적이다. Ceruloplasmin은 제 2철을 제 3철로 산화시켜 ferritin으로부터 철분을 분리시켜 transferrin에 결합되도록 한다. 또한 현재까지의 연구결과로 볼 때 ceruloplasmin이 구리가 필요한 장기로 이동하는데 중요한 역할을 하는 것으로 확인되었으나 그 기전에 대하여는 아직 확실히 규명되어 있지 않다. 정상인에서 ceruloplasmin은 oxidase 활성도가 있고 구리가 포함된 holoceruloplasmin 형태로 대부분 존재하고 극소수가 oxidase 활성도가 없고 구리를 포함하지 않는 apoceruloplasmin 형태로 존재한다( $3.3 \pm 3.1$  mg/dL). 대부분의 율슨병 환자에서 혈액내의 ceruloplasmin의 농도가 낮게 측정되는데, 특히 apoceruloplasmin의 양은 정상인과 거의 비슷한 수준( $2.7 \pm 2.0$  mg/dL)으로 존재하나 holoceruloplasmin은 정상인에 비해 매우 낮게 존재하는 특징이 있다<sup>5)</sup>.

한편 최근 들어 율슨병 유전자가 발견되었고 이에 대한 돌연변이 연구들이 진행되고 있는데 율슨병 유전자를 이용한 진단법 개발도 하나의 과제로 떠오르

고 있다. 염색체 13q14-21에 존재하는 율슨병 유전자(WND gene)는 mRNA 크기가 7.5 kb로 주로 간, 신장, 태반에 많이 발현되며 심장, 뇌, 근육 및 췌장에도 약간 존재하고 있다. 예상되는 아미노산은 1,465개이며 cation-transporting P-type ATPase subfamily의 하나로 멘케스(Menkes)병의 유전자와 매우 유사한 구조(57%의 homology)를 가지며 구조적으로 metal binding domain, ATP binding domain, cation channel, phosphorylation region, transduction domain을 가지고 있어 ATP hydrolysis에 의한 에너지로 cation을 이동시키는 것으로 보인다. WND 단백질은 transgolgi network에 존재하고 있는 것으로 최근 밝혀졌으며 멘케스 단백질 역시 같은 부위에 존재하고 있어 copper trafficking에서 이 두 단백질의 기능에 대한 이해가 구리 대사 이해에 가장 핵심적일 것으로 보인다.

율슨 유전자에 대한 돌연변이연구는 유전자 발견 이후 집중적으로 이루어짐으로서 돌연변이 양상이 동서양간에 차이가 있음이 확인되었다. 서양인의 경우 H1069Q 돌연변이가 가장 흔하여 약 40% 정도의 유전자빈도(allelic frequency)를 보이는 반면 이 돌연변이는 동양인에게서는 아직까지 발견된 바 없는 매우 드문 것으로 알려졌다. 이 돌연변이는 exon 14에 위치하며 ATP binding domain지역으로 중요한 기능의 결함을 초래한다. 그 외 missense, nonsense, insertion, deletion 등 다양한 형태의 돌연변이가 보고되었다. 한국인의 경우 exon 8에 위치하고 있는 R778L이 가장 흔한 것으로 본 연구자 등에 의해 밝혀졌으며<sup>12)</sup> 빈도가 약 30%에 이른다. 이 돌연변이는 동양인에게서만 발견되며 특히 중국인, 일본인 등에서도 흔히 발견됨으로서 이들 국가간의 인종적 교류가 많이 있었음을 시사하고 있다. 이 돌연변이는 transmembrane domain에 위치하고 있어 역시 단백질의 기능을 심하게 손상시킬 것으로 추정된다. 그 외의 돌연변이는 비교적 드문 형태의 것으로 보인다. 따라서 지금까지의 연구결과로는 유전형과 임상표현형간의 상관관계가 확실하지 않으며 따라서 이를 이용한 선별검사 test법의 개발도 한계가 있다고 여겨진다.

일반적으로 율슨병의 진단은 특징적인 임상 증상과 함께 낮은 혈중 ceruloplasmin, 소변내 구리배출의 증가, 간 조직 검사 및 간내 구리양의 증가 등에 의존하고 있다. Ceruloplasmin의 측정은 대개 radial immu-

nodiffusion assay를 이용하고 있으나 정상집단에 대한 선별검사방법으로는 적합지 않다. 현재 사용 중인 방법에는 혈청내 ceruloplasmin oxidase 활성도 측정 방법, 다클론 항체를 이용한 방사면역확산법(radial immunodiffusion assay), 면역비탁법(immunoturbidimetric assay) 등이 있다. Oxidase 활성도 측정법의 경우 ceruloplasmin 특이적 기질이 없어 혈청내 ceruloplasmin만을 측정하기 힘들며, 또한 측정 조건의 표준화가 어렵기 때문에 민감도가 대단히 낮다<sup>10)</sup>. 다클론 항체를 사용한 경우 혈청내의 holoceruloplasmin 뿐만 아니라 apoceruloplasmin도 측정되기 때문에 민감도가 낮다<sup>13)</sup>. 이러한 방법들은 모두 혈청 시료를 이용하기 때문에 혈액 채취 후 별도의 원심분리 과정이 필요하고 단백질의 안정성 문제로 저장 및 운반 과정 중에는 항상 동결된 상태로 보관해야 되기 때문에 유아들을 대상으로 다량의 혈액 검체 채취가 근본적으로 불가능할 뿐 아니라 한번에 측정할 수 있는 시료의 수가 제한적인 수밖에 없다. 이와 같은 이유로 인해 많은 시료를 검사해야 하는 전국적인 선별검사 검사로는 지금까지 개발되어 있는 ceruloplasmin 측정 기술들이 모두 이용될 수 없는 문제점이 있다.

따라서 정상집단에 대한 선별검사방법으로는 전세계적으로 아직까지 상품화되어 있는 제품이 없으며 1994년 일본학자에 의해 개발된 sandwich ELISA 방법이 pilot study에 이용되고 있다<sup>14)</sup>. 1999년 1-6세 사이의 일본 유아 2,789명에 대한 pilot study에서 평균적으로  $12.4 \pm 3.95$  mg/dL로 측정되었고 2명의 유아에게서 두드러진 ceruloplasmin 농도의 감소가 관찰되어 이들에 대한 유전자분석을 시행한 결과 윌슨병으로 확인되어 문헌 보고된 바 있다<sup>3)</sup>.

본 연구에서 개발된 진단시약은 기본적으로 신생아 대사이상 선별검사에서 이용되고 있는 ELISA법과 동일한 방법을 이용하고 있다. 즉, 한번에 많은 수의 시료를 측정할 수 있도록 시료의 채취, 운반, 보관 등이 간편한 종이여과지에 피를 한 두방울 묻힌 혈액여과지를 시료로 사용하기 때문에 전국적인 선별검사가 가능하다. 또한 효소면역 측정법을 채택함으로써 측정 방법의 단순화 및 신속성, 대량의 시료 측정가능, 취급의 용이성, 높은 민감도 획득 등의 장점을 얻을 수 있다. 또한 구리가 포함된 holoceruloplasmin을 대상으로 측정하기 때문에 정상인과 환자를 높은 민감도로 구분할 수 있었다. 즉 구리가 포함된 holocerulo-

plasmin 분자의 oxidase 활성에 중요한 항원결정기(epitope)와 같은 분자의 다른 항원결정기(epitope)를 인지하는 두개의 단클론 항체 또는 단클론 항체와 다클론 항체 또는 두개의 다클론 항체를 이용하여 샌드위치 방법으로 혈액내 holoceruloplasmin을 정량 분석함으로써 높은 민감도로 윌슨병을 진단할 수 있다. 일반적으로 생후 1세까지 ceruloplasmin의 농도가 낮은 점을 고려하여 3-5세 사이에 선별검사를 시행하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

## 요 약

**목 적 :** 윌슨병은 전세계적으로 2만5천-3만명에 1명의 빈도로 발생하는 상염색체 열성질환으로 보인자율은 1/90이며, 특히 한국인에게 가장 흔한 유전질환의 하나로 추정되고 있다. 윌슨병은 구리가 간, 뇌 등에 축적되는 대사질환으로 진단이 되는 시기에 대부분 간경화 혹은 뇌질환 등으로 진행되어 있어 치료의 효과가 미비한 실정이다. 더욱이 간경화의 경우 간이식을 필요로 하며, 뇌병변이 나타나는 경우 치료 후에도 상당한 후유증이 남게 되어 조기진단 및 치료가 매우 중요하다. 그럼에도 불구하고 아직까지 윌슨병에 대한 조기 진단 체계가 확립되어 있지 못하며 결과적으로 의료비를 포함한 사회경제적 손실이 상당한 것으로 추정된다. 따라서 윌슨병의 조기진단을 위한 간편한 선별 검사 키트의 개발이 요구된다.

**방 법 :** 이에 본 연구에서는 한번에 많은 수의 시료를 측정할 수 있고 시료의 채취, 운반, 보관 등이 간편한 종이여과지에 피를 한 두방울 묻힌 혈액여과지를 시료로 사용하여 집단 선별 검사가 가능한 sandwich-ELISA법에 의한 윌슨병 조기 진단 키트를 개발하였다. 본 진단 키트의 원리는 혈액여과지로부터 윌슨병의 진단에 있어서 주요지표 중의 하나인 ceruloplasmin의 농도를 샌드위치 효소면역 측정법(Sandwich ELISA)으로 정량 분석하여 윌슨병을 조기에 진단하는 것이다.

**결 과 :** 본 선별 검사 키트를 이용한 검사결과 윌슨병을 가진 환자의 혈액여과지로부터 추출된 ceruloplasmin은 모두 유의하게 낮게 측정( $4.5 \pm 1.6$  mg/dL) 되었으며 정상인( $22.9 \pm 1.4$  mg/dL)과 구분이 가능함으로서 집단 선별검사에 적합함을 증명하였다. 또한 본 키트를 이용한 검사의 결과는 기존의 cerulo-

plasmin 검사법인 immuno-turbidometry법에 의하여 측정된 검사 결과와 100%의 양성 및 음성 일치도를 보였다.

**결론 :** 본 검사시약의 개발로 한국인에게 가장 많은 유전질환으로 생각되는 윌슨병의 조기 진단이 가능하게 되었으며 3-5세 유아를 대상으로 윌슨병을 조기 진단하는데에 이용하게 되는 경우 조기치료를 제 공함으로써 정상적인 생활을 영위할 수 있도록 하여 결과적으로 사회경제적인 효과가 매우 높을 것으로 전망된다.

**참 고 문 헌**

- 1) Danks DM. Disorders of copper transport. In: Scriver CR, Beaudet A, Sly WS, Valle D, editors. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 7th ed. New York: McGraw-Hill Inc, 1995:2211-35.
- 2) Endo F, Taketa K, Nakamura K, Awata H, Tanoue A, Eda Y, et al. Measurement of blood holoceruloplasmin by EIA using a mouse monoclonal antibody directed to holoceruloplasmin. Implication for mass screening of Wilson disease. *J Inher Metab Dis* 1994;17:616-20.
- 3) Ohura T, Abukawa D, Shiraishi H, Yamaguchi A, Arashima S, Hiyamuta S, et al. Pilot study of screening for Wilson disease using dried blood spots obtained from children seen at outpatient clinics. *J Inher Metab Dis* 1999;22:74-80.
- 4) Yamaguchi Y, Aoki T, Arachima S, Ooura T, Takada G. Mass screening for Wilson's disease: Results and recommendations. *Pediatrics International* 1999;41:405-8.
- 5) Ichiro M, Pearson T, Holtzman NA. Determination of apoceruloplasmin by radioimmunoassay in nutritional copper deficiency, Menkes' kinky hair syndrome, Wilson's disease, and umbilical cord blood. *Pediatrics* 1974;8:821-4.
- 6) Kim IG, Park SY. Requirement of intact human ceruloplasmin for the glutathione-linked peroxidase activity. *FEBS Lett* 1998;437:293-6.
- 7) Dean C, Shepherd P. Preparation of rodent monoclonal antibodies by in vitro somatic hybridization. In: Shepherd P, Dean C, editors. *Monoclonal Antibodies* Oxford University Press, 2000:15-49.
- 8) Kim IG, Park SY, Kim KC. Development of a competitive enzyme linked immunosorbent assay to measure ceruloplasmin in gamma-irradiated rat serum. *Biochem Mol Biol Int* 1998;45:599-608.
- 9) Avrameas S. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochimistry* 1969;6:43-52.
- 10) Sunderman FW, Nomoto S. Measurement of human serum ceruloplasmin by its p-phenylenediamine oxidase activity. *Clin Chem* 1970;16:903-10.
- 11) Mitsuru S, Gitlin JD. Mechanism of copper incorporation during the biosynthesis of human ceruloplasmin. *J Biol Chem* 1991;266:5128-34.
- 12) Kim EK, Yoo OJ, Song KY, Yoo HW, Choi SY, Hahn SH. Identification of three novel mutations and a high frequency of Arg778Leu mutation in Korean patients with Wilson disease. *Hum Mutat* 1998;11:275-8.
- 13) Hiyamuta S, Ito K. Monoclonal antibody against the active site of ceruloplasmin and the ELISA system detecting active ceruloplasmin. *Hybridoma* 1994;13:139-41.
- 14) Fujioka Y, Aoki T, Shimizu N. A new screening method for Wilson's disease by measuring blood ceruloplasmin level. In: Farriauz JP, Dhondt JL, editors. *New horizons in neonatal screening*. Excerpta Med., Amsterdam, 1994:285-8.