

# 단클론감마병증에서 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 복합체 직접 측정의 유용성: 모세관 전기영동과의 수행능 비교

## Direct Measurement of Serum Immunoglobulin Heavy and Light Chain Pairs for Identification of Monoclonal Gammopathy and a Performance Comparison with Capillary Electrophoresis

강민구<sup>1</sup> · 신명근<sup>1</sup> · 김진각<sup>2</sup> · 장민중<sup>1</sup> · 이오진<sup>1</sup> · 김혜란<sup>3</sup> · 조 덕<sup>1</sup> · 김수현<sup>1</sup> · 기승정<sup>4</sup> · 신종학<sup>4</sup> · 서순팔<sup>4</sup> · 양동욱<sup>4</sup>

Min Gu Kang, M.D.<sup>1</sup>, Myung-Geun Shin, M.D.<sup>1</sup>, Jin-Gak Kim<sup>2</sup>, Min-Joong Jang, M.D.<sup>1</sup>, O-Jin Lee, M.D.<sup>1</sup>, Hye-Ran Kim<sup>3</sup>, Duck Cho, M.D.<sup>1</sup>, Soo-Hyun Kim, M.D.<sup>1</sup>, Seung-Jung Kee, M.D.<sup>4</sup>, Jong-Hee Shin, M.D.<sup>4</sup>, Soon-Pal Suh, M.D.<sup>4</sup>, Dong-Wook Ryang, M.D.<sup>4</sup>

화순전남대학교병원<sup>1</sup>, 광양보건대학교 임상병리과<sup>2</sup>, 전남대학교 의생명 인력 사업단 두뇌한국 21<sup>3</sup>, 전남대학교 의과대학 진단검사의학교실<sup>4</sup>  
Department of Laboratory Medicine<sup>1</sup>, Chonnam National University Hwasun Hospital, Hwasun; Department of Clinical Pathology<sup>2</sup>, Gwangyang Health College, Gwangyang; Brain Korea 21 Project<sup>3</sup>, Center for Biomedical Human Resources, Chonnam National University, Gwangju; Department of Laboratory Medicine<sup>4</sup>, Chonnam National University Medical School, Gwangju, Korea

**Background:** Determination of monoclonal gammopathy through conventional protein electrophoresis is sometimes difficult because of the presence of large proteins such as haptoglobin and transferrin, which may obscure the results. Ambiguity in an electrophoresis band can give rise to confusion or difficulty in interpretation. The heavy chain/light chain assay (HLC assay) using Hevylite antibody (The Binding Site, UK) has recently been developed for the accurate measurement of monoclonal proteins. We compared the immunotyping (IT) profiles to the immunoglobulin (Ig) heavy/light chain measurements obtained using the HLC assay and observed the ratios between intact Ig kappa and lambda.

**Methods:** We collected 35 and 28 sera from patients with suspicious and definitive monoclonal protein, respectively. Then we performed serum protein electrophoresis (SPEP) and IT by Capillarys2 (Sebia, USA). Monoclonal protein production was investigated using Freelite antibody (The Binding Site) and specific Ig(G, A)κ and Ig(G, A)λ Hevylite antibodies. The results were analyzed using PASW 18.0 for Windows (IBM, USA).

**Results:** Direct measurement of Ig heavy/light chains showed discordant IT results for 12 (34.2%) of 35 patients' sera with suspicious SPEP pattern and identical IT results for 28 patients' sera with definitive monoclonal peak in the SPEP results. Overall, the results of the HLC assay and IT showed good agreement ( $\kappa=0.718$ ,  $P=0.000$  by cross-tabulation Gamma, Kappa analysis).

**Conclusions:** The results of direct measurement of serum Ig heavy chain/light chain pairs were comparable to those of IT and were helpful for determination of monoclonality in the case of ambiguous electrophoresis results. Measurement of the heavy chain/light chain pair ratio also allowed precise quantification of the monoclonal Igs with ambiguous electrophoresis patterns and identification or discrimination of clonality.

**Key Words:** Immunoglobulin, Monoclonal gammopathy, Multiple myeloma, Protein electrophoresis

**Corresponding author:** Myung-Geun Shin

Department of Laboratory Medicine, Chonnam National University Hwasun Hospital, 322 Seoyang-ro, Hwasun 519-809, Korea  
Tel: +82-61-379-7950, Fax: +82-61-379-7984, E-mail: mgshin@chonnam.ac.kr

Received: October 26, 2012

Revision received: January 14, 2013

Accepted: January 14, 2013

This article is available from <http://www.labmedonline.org>

© 2014, Laboratory Medicine Online

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 서론

한 가지 클론의 형질세포가 대량으로 증식하는 경우에 환자의 혈청에 있는 특정 단백질의 농도가 증가하게 되어 전기영동에서 뚜렷한 밴드로 보이게 되고, 이를 M단백(M-spike 또는 M-protein)이라고 한다. 이러한 파라단백질(paraprotein)은 단량체, 다량체, 또는 유리경쇄나 중쇄, 면역글로불린의 조각과 같은 면역글로불린 사슬일 수 있다[1].

이러한 단클론성 면역글로불린은 다발골수종, 만성골수백혈병, 버킷림프종, B세포 급성림프모구백혈병, 아미로이드증, 악성 종양,

자가면역질환 등과 같은 다양한 질환과 연관되어 있다. 또한 다발 골수종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증과 같은 B 세포 종양에서는 그 농도가 증가하므로, 관련 질환의 검출이나 추적검사에 있어 중요한 임상적 의미를 가진다. 특히 다발골수종의 치료반응 평가에 있어서 중요한 의미를 가지는데, 면역고정 전기영동(IFE)에서 음성소견을 보이는 것은 관해의 주요한 평가 기준으로 되어 있다. 일반적으로 혈청이나 소변의 단백 전기영동(SPEP)이나 면역고정 전기영동(IFE)에 의해 이러한 단세포군 감마글로불린병증을 선별하고 있음이 현실이다[1, 2].

하지만, 낮은 농도의 M단백이거나 M단백이 다른 혈청 단백질과 함께 이동하는 경우에는 검출하기 어려운 측면이 있다. 면역고정 전기영동을 함으로써 이와 같은 문제점을 어느 정도 해결할 수는 있으나, 정성검사이므로 환자의 치료에 대한 반응을 정확히 모니터링하는 데 사용할 수 없다[3]. 전기영동의 방법으로서 최근 많이 사용되고 있는 모세관 전기영동은 자동화기법으로서 겔을 다루거나 염색하는 과정 없이 빠른 분석이 이루어진다. 이러한 모세관 전기영동에서는 자외선을 이용한 직접 검출방법으로 겔 전기영동보다 나은 특이도와 재현성을 보일 수 있으며 면역고정이 아니라 특이한 항혈청을 이용한 immunosubtraction방법으로 파라단백질을 검출할 수 있다. 또한 모세관 전기영동은 겔 전기영동과 유사한 민감도와 특이도를 보이며 일차율이 높은 방법으로서 겔 전기영동을 대체할 수 있다고 보고된 바 있다[4, 5].

한편 SPEP와 함께 혈청 유리형 경쇄검사를 하게 되면, 혈청과 소변에서 면역고정 전기영동(IFE)을 할때와 유사한 정도로 관련 질환의 진단을 위한 분석능력을 보일 수 있는데, 유리형 경쇄의 카파/람다( $\kappa/\lambda$ ) 비율을 측정함으로써 면역고정전기영동보다 더 낮은 농도에서도 민감하게 잔여질환이나 재발을 조기에 검출할 수 있는 장점이 있다[1].

최근, 면역글로불린 분자의 중쇄와 경쇄 사이의 결합부위를 항원결정인자로 인식하는 다클론성 항혈청(Hevlyte antibody)이 개발되었는데(heavy chain/light chain assay, HLC assay), 이를 이용하면 각 면역글로불린의 개별적인 경쇄형을 구별할 수 있고(예; IgG $\kappa$ , IgG $\lambda$ ), 이것을 쌍으로 측정하여 그 결과를 비율로 나타냄으로써(예; IgG $\kappa$ /IgG $\lambda$ ) 결과적으로는 특정한 단클론성 면역글로불린 생산이 증가하였는지 그 형별을 구분하고, 정량까지 할 수 있게 되었다[3].

유리형 경쇄검사와 위에서 언급된 HLC assay는 비정상적으로 증가하거나 감소한  $\kappa/\lambda$  비율이 있는지 검사함으로써 M단백의 존재를 확인할 수 있는데, 비정상적으로 증가한 경우에는 단클론성 카파형 면역글로불린임을 알 수 있고, 비정상적으로 감소한 경우에는 람다형 면역글로불린임을 알 수 있게 된다[6, 7]. 즉, HLC assay에서는 IgG, IgA, IgM 각자의 개별적인 카파형 경쇄와 람다형 경쇄를 각

각 측정함으로써 각 종양 클론이 어떤 형별을 가지고 있는지 평가할 수 있고, 각자의 비중양성 면역글로불린이 상대적으로 얼마나 억제되었는지에 대한 정량적인 정보 또한 얻을 수 있다[6].

본 연구에서는 이러한 혈청 면역글로불린의 경쇄형에 대하여 개별적으로 측정하고 그 비율을 알아보는 것이 단클론감마병증의 진단에 얼마나 유용성을 가지고 있는지, 특히 완전 면역글로불린형의 다발골수종환자에 있어서 얼마나 유용한지에 대하여 알아보고자 하였다.

## 대상 및 방법

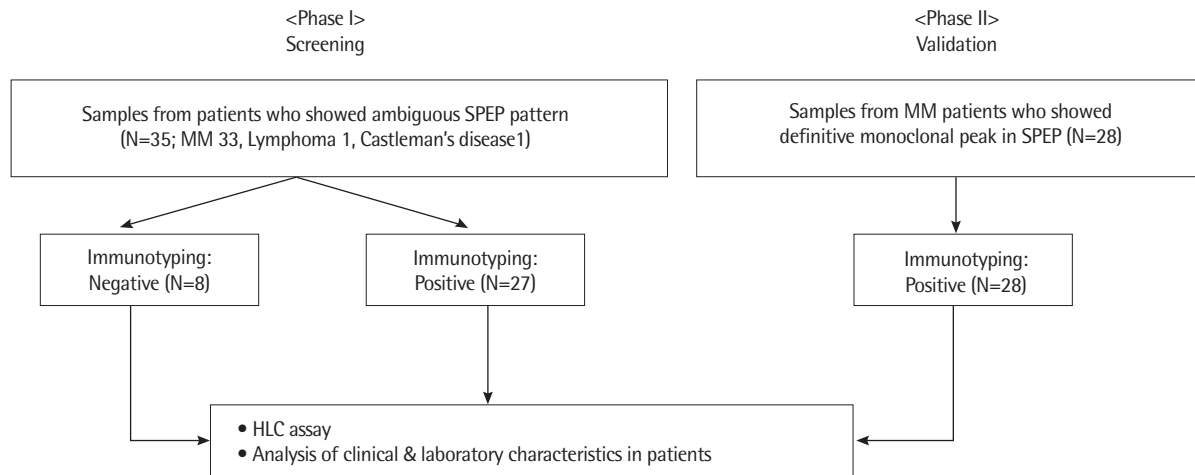
### 1. 대상

모세관 전기영동검사에서 의심스럽거나 애매한 피크를 보인 경우 혹은 확실한 단클론성 피크를 보인 환자 57명으로부터 얻은 총 63개의 잔여 혈청을 이용하였다. 대상환자는 다발골수종(완전 면역글로불린 IgG 혹은 IgA형), 림프종, Castleman병으로 화순전남대학교 병원에서 진단받았거나 혹은 추적관찰을 위해서 내원한 환자였다. 성별 분포는 남자 36명, 여자 21명이었고, 연령분포는 43-81세였다. 위 대상환자와는 별도로 다발골수종(완전 면역글로불린 IgG $\kappa$ 형)으로 진단받은 46세 남자 환자 1명에 대해서는 진단 시점 이후로 총 6회의 추적검사를 시행하였다.

### 2. 방법

모세관 전기영동을 위한 검사장비로서 Capillarys2 (Sebia, USA)을 이용하여 시행된 혈청단백 전기영동과 immunotyping결과를 분석하여 의심스럽거나 애매한 피크를 보인 경우 혹은 확실한 단클론성 피크를 보인 환자에서, 그와 동시에 시행된 혈청 유리형 경쇄검사, 골수검사, 총 면역글로불린, 나이, 성별을 의무기록 조취를 통하여 후향적으로 검토하였으며, 본 연구의 흐름을 그림으로 제시하였다(Fig. 1). 측정 장비로는 면역비타장비인 SPA<sub>PLUS</sub> (The Binding Site Ltd., UK)를 사용하였다. Hevlyte 항체(The Binding Site Ltd.)시약으로 제조사의 지시에 따라서 대상환자들의 잔여 혈청검체를 이용하여 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 복합체와 그 비율을 각각 측정하여(예; IgG $\kappa$ , IgG $\lambda$ , IgG $\kappa$ /IgG $\lambda$ ), 정상 참고범위(IgG $\kappa$ , 3.84-12.07 g/L; IgG $\lambda$ , 1.91-6.74 g/L; IgG $\kappa$ /IgG $\lambda$ , 1.12-3.21; IgA $\kappa$ , 0.57-2.08 g/L; IgA $\lambda$ , 0.44-2.04 g/L; IgA $\kappa$ /IgA $\lambda$ , 0.78-1.94)를 벗어나서 증가한 경우에는 Ig $\kappa$ 형의 클론형성능, 감소한 경우에는 Ig $\lambda$ 형의 클론형성능이 있는 것으로 판정하였다. 또한 제조사에서 제공되는 고농도의 IgG $\kappa$ , IgG $\lambda$ , IgA $\kappa$ , IgA $\lambda$  정도관리 물질을 정상 혼합혈청으로 단계별 희석하여 측정값과 예상값을 비교하였다.

통계 분석에는 PASW 18.0 for Windows (IBM, USA)을 이용하였고,  $P$  값이 0.05 미만인 경우에 통계적으로 유의한 것으로 판단하였



**Fig. 1.** Schematic diagram and study plan. This study comprised 2 phases: in phase I, the laboratory utility of direct measurement of serum immunoglobulin heavy/light chain pairs (the HLC assay) was determined. In phase II, the HLC assay was validated by testing samples showing a definitive monoclonal peak in SPEP and immunotyping.

Abbreviations: SPEP, serum protein electrophoresis; MM, multiple myeloma; HLC assay, heavy chain/light chain assay.

다. 전기영동에서 의심스럽거나 애매한 피크를 보인 군과 확실한 단클론성 피크를 보인 군 간에 혈청 유리형 경색검사, HLC assay, 혈청 단백질 immunotyping에 유의한 차이가 있는지를 보기 위해 Pearson's chi-square test와 independent sample *t*-test를 시행하였다.

측정된 HLC assay결과와 혈청단백 전기영동 및 immunotyping 결과 간의 일치성 분석을 위해서는 Gamma, Kappa 분석을 시행하였고, 정도관리물질과 정상 혼합혈청의 혼합에 따른 측정값과 예상값 간의 상관성 평가에는 단순회귀분석을 시행하였다.

또한 추가로 IgGκ형의 완전형 면역글로불린 다발골수종 환자 1명에 대해서는, 진단 이후로 6회에 걸친 골수검사 소견, 혈청단백 전기영동, immunotyping, 총 면역글로불린 G, 혈청 유리형 경색검사 결과를 후향적으로 검토하였고, 시기별로 보관된 잔여혈청 6검체로 HLC assay (IgGκ, IgGλ, IgGκ/IgGλ ratio)를 시행하여 검사 결과를 비교하였다.

## 결 과

모세관 전기영동법으로 시행된 혈청단백 전기영동검사에서의 의심스럽거나 애매한 피크 혹은 확실한 단클론성 피크를 보인 환자 57명의 나이, 성별, 질환, 혈청 immunotyping결과의 분포는 Table 1과 같다. 또한 57명의 환자로부터 얻어진 63개 혈청으로 시행되었던 단백질 전기영동에서 의심스럽거나 애매한 피크를 보인 군(N=35)과 확실한 단클론성 피크를 보인 군(N=28)의 혈청 유리형 경색검사, HLC assay, 혈청 immunotyping결과의 분포는 Table 2와 같았다. 두 군 간에 HLC assay-IgGκ, HLC assay-IgGκ/IgGλ ratio, serum immunotyping 결과에서는 유의한 차이를 보였으나(*P* <

**Table 1.** Demographics and clinical characteristics of the study population

Study population (N=57)	
Age [yr, median (range)]	66 (43-81)
Sex [N (%)]	
Male/Female	36 (63)/21 (37)
Disease type [N (%)]	
Multiple myeloma	55 (96)
Lymphoma	1 (2)
Castleman's disease	1 (2)
SPEP pattern [N (%)]	
Ambiguous or suspicious	33 (58)
Definitive monoclonal peak	24 (42)
Serum immunotyping result [N (%)]	
IgGκ	30 (53)
IgGλ	12 (21)
IgAκ	3 (5)
IgAλ	4 (7)
Negative	8 (14)

Abbreviation: SPEP, serum protein electrophoresis.

0.05), 혈청 유리형 경색검사, HLC assay-IgGλ, IgAκ, IgAλ, IgAκ/IgAλ ratio의 경우에는 유의한 차이가 없었다.

63개 혈청검체의 혈청단백 전기영동, immunotyping, HLC assay, 혈청 유리형 경색검사결과는 다음과 같았다. 혈청단백 전기영동에서 의심스럽거나 애매한 피크를 보인 35검체의 immunotyping과 HLC assay에 의한 클론형성능 판정을 비교해 보면 23검체(23/35, 66%)는 일치하는 소견을 보였고, 12검체(12/35, 34%)는 immunotyping과 HLC assay에 의한 클론형성능 판정에 있어서 일치하지 않는 소견을 보였다.

위에서 언급된, immunotyping과 HLC assay 간에 불일치 소견을 보인 12검체의 HLC assay와 혈청 유리형 경색검사 결과를 살펴 보았을 때(Table 3), 12검체 중에서 8검체는 immunotyping에서는

**Table 2.** Characteristics of the clinical specimen based on serum protein electrophoresis (SPEP) patterns

	SPEP pattern		P values
	Suspicious peak (N=35)	Monoclonal peak (N=28)	
sFLC assay (mean $\pm$ SD)			
FLC $\kappa$ (mg/L)	42.2 $\pm$ 54.5	377.1 $\pm$ 1,201.5	0.152
FLC $\lambda$ (mg/L)	40.4 $\pm$ 87.8	48.1 $\pm$ 172.5	0.819
FLC $\kappa$ : $\lambda$ ratio	2.0 $\pm$ 3.1	47.1 $\pm$ 139.0	0.097
HLC assay (mean $\pm$ SD) <sup>†</sup>			
IgG $\kappa$ (g/L)	6.8 $\pm$ 5.9	20.9 $\pm$ 17.7	0.000*
IgG $\lambda$ (g/L)	3.5 $\pm$ 3.1	3.1 $\pm$ 6.4	0.763
IgG $\kappa$ /IgG $\lambda$ ratio	2.7 $\pm$ 3.1	26.8 $\pm$ 34.2	0.001*
IgA $\kappa$ (g/L)	1.6 $\pm$ 2.4	0.3 $\pm$ 0.1	0.453
IgA $\lambda$ (g/L)	1.6 $\pm$ 2.4	7.4 $\pm$ 10.2	0.567
IgA $\kappa$ /IgA $\lambda$ ratio	2.3 $\pm$ 3.1	0.6 $\pm$ 0.9	0.481
Serum immunotyping			0.001*
IgG $\kappa$ [N (%)]	10 (29)	23 (82)	
IgG $\lambda$ [N (%)]	10 (29)	4 (14)	
IgA $\kappa$ [N (%)]	3 (9)	0 (0)	
IgA $\lambda$ [N (%)]	4 (11)	1 (4)	
Normal [N (%)]	8 (22)	0 (0)	

\*Statistical differences in HLC-IgG $\kappa$ , HLC-IgG $\kappa$ /IgG $\lambda$  ratios, and serum immunotyping results between the suspicious electrophoresis group and the definitive monoclonal peak group were evaluated ( $P < 0.05$ ); <sup>†</sup>Reference range for the HLC assay: IgG $\kappa$ , 3.84-12.07 g/L; IgG $\lambda$ , 1.91-6.74 g/L; IgG $\kappa$ /IgG $\lambda$ , 1.12-3.21 g/L; IgA $\kappa$ , 0.57-2.08 g/L; IgA $\lambda$ , 0.44-2.04 g/L; IgA $\kappa$ /IgA $\lambda$ , 0.78-1.94 g/L.

Abbreviations: Ig, immunoglobulin; sFLC assay, serum free light chain assay; FLC $\kappa$ , free light chain-kappa; FLC $\lambda$ , free light chain-lambda; HLC assay, heavy/lightchain assay.

IgG $\kappa$  또는 IgG $\lambda$ 형의 minor 클론형성능을 보였으나 HLC assay에 의해서는 8검체 모두 클론형성능이 없었고, 동시에 시행되었던 혈청 유리형 경색검사에서 그 8검체 중 3검체가  $\kappa$ 경색형이었다. 또한, immunotyping과 HLC assay 간에 불일치 소견을 보인 12검체 중 4검체는 immunotyping에서는 정상 또는 다클론성이거나 의심스러운 소견을 보였지만, HLC assay에 의해서는 4검체 모두 IgG $\kappa$  또는 IgA $\kappa$ 의 클론형성능을 보였고, 혈청 유리형 경색검사에서 그 4검체 중 3검체가  $\kappa$ 경색형이었다.

한편 혈청 단백 전기영동과 immunotyping에서 확실한 단클론성 피크가 확인된 28검체는 HLC assay에 의해서도 모두 동일한 클론형성능을 보였으며, 각각의 클론형성능의 분포와 그에 따른 Ig $\kappa$ , Ig $\lambda$ , Ig $\kappa$ /Ig $\lambda$  ratio 결과의 중위수와 범위는 Table 4와 같았는데, IgG $\kappa$ 형은 23건, IgG $\lambda$ 형은 4건, IgA $\lambda$ 형은 1건이었고 각각 Ig $\kappa$ /Ig $\lambda$  ratio의 중위수는 19.9, 0.21, 0.03를 나타내어 각 검체의 클론형성능을 잘 판정할 수 있었다. 또한, M단백의 검출에 있어서 모세관 전기영동법에 의한 immunotyping을 기준으로 하여 비교해보았을 때, 혈청 유리형 경색검사와 HLC assay의 민감도는 각각 58.1%, 83.6%였으며, 특이도는 각각 50%, 37.5%로 나타났다.

위에 기술된 결과를 종합해보면, 혈청단백 전기영동에서 애매하거나 의심스러운 피크(N=35) 혹은 확실한 단클론성 피크(N=28)를 보인 63개의 혈청검체를 대상으로 HLC assay를 시행한 결과 51건(51/63, 81%)에서 동일한 결과를 확인할 수 있었고, HLC assay와 혈청단백 전기영동 및 immunotyping결과의 일치성 분석을 위해서 시행한 Gamma, Kappa analysis에서 일치도( $\kappa$ )는 0.718이었다( $P = 0.000$ ).

또한 고농도의 정도관리물질(IgG $\kappa$ , IgG $\lambda$ , IgA $\kappa$ , IgA $\lambda$ )과 정상 혼

**Table 3.** Samples showing ambiguous serum protein electrophoresis (SPEP) patterns (12 of 35), which also showed discordance in the immunotyping results and HLC ratios

Sample	SPEP	Immunotyping	HLC ratios*	sFLC ratios* ( $\kappa$ / $\lambda$ )	Clinical status <sup>†</sup>
1	Suspicious	Minor IgG $\kappa$	2.54	FLC $\kappa$ 17.49	Diagnosis time point
2	Suspicious	Minor IgG $\kappa$	2.13	1.41	SD
3	Suspicious	Minor IgG $\kappa$	2.74	1.24	PR
4	Suspicious	Minor IgG $\lambda$	1.74	1.44	VGPR
5	Suspicious	Normal/suspicious	IgG $\kappa$ 3.7	FLC $\kappa$ 1.73	SD
6	Suspicious	Minor IgG $\kappa$	2.28	FLC $\kappa$ 1.89	PR
7	Suspicious	Minor IgG $\lambda$	1.31	0.96	PR
8	Suspicious	Minor IgG $\kappa$	2.72	FLC $\kappa$ 7.03	SD
9	Suspicious	Minor IgG $\kappa$	1.75	1.21	SD
10	Suspicious	Normal/polyclonal	IgG $\kappa$ 3.41	0.81	SD
11	Suspicious	Normal/suspicious	IgA $\kappa$ 2.51	FLC $\kappa$ 3.62	VGPR
12	Suspicious	Normal/suspicious	IgG $\kappa$ 3.76	FLC $\kappa$ 2.27	VGPR

\*In the case of only numerical data without Ig $\kappa$  or FLC $\kappa$  labeling, this indicates that the result of HLC assay or FLC assay was within the reference range (IgG $\kappa$ /IgG $\lambda$ , 1.12-3.21, IgA $\kappa$ /IgA $\lambda$ , 0.78-1.94; FLC $\kappa$ / $\lambda$ , 0.26-1.65); <sup>†</sup>Described as per the response criteria given by the International Myeloma Working Group.

Abbreviations: SPEP, serum protein electrophoresis; HLC ratios, heavy/lightchain assay  $\kappa$ / $\lambda$  ratios; sFLC assay, serum free light chain assay; FLC $\kappa$ , free light chain-kappa; MM, multiple myeloma; SD, stable disease; PR, partial response; VGPR, very good partial response.



**Table 4.** HLC concentrations and HLC immunoglobulin  $\kappa/\lambda$  ratios in patients with multiple myeloma (IgG and IgA) showing a definitive monoclonal peak inserum protein electrophoresis

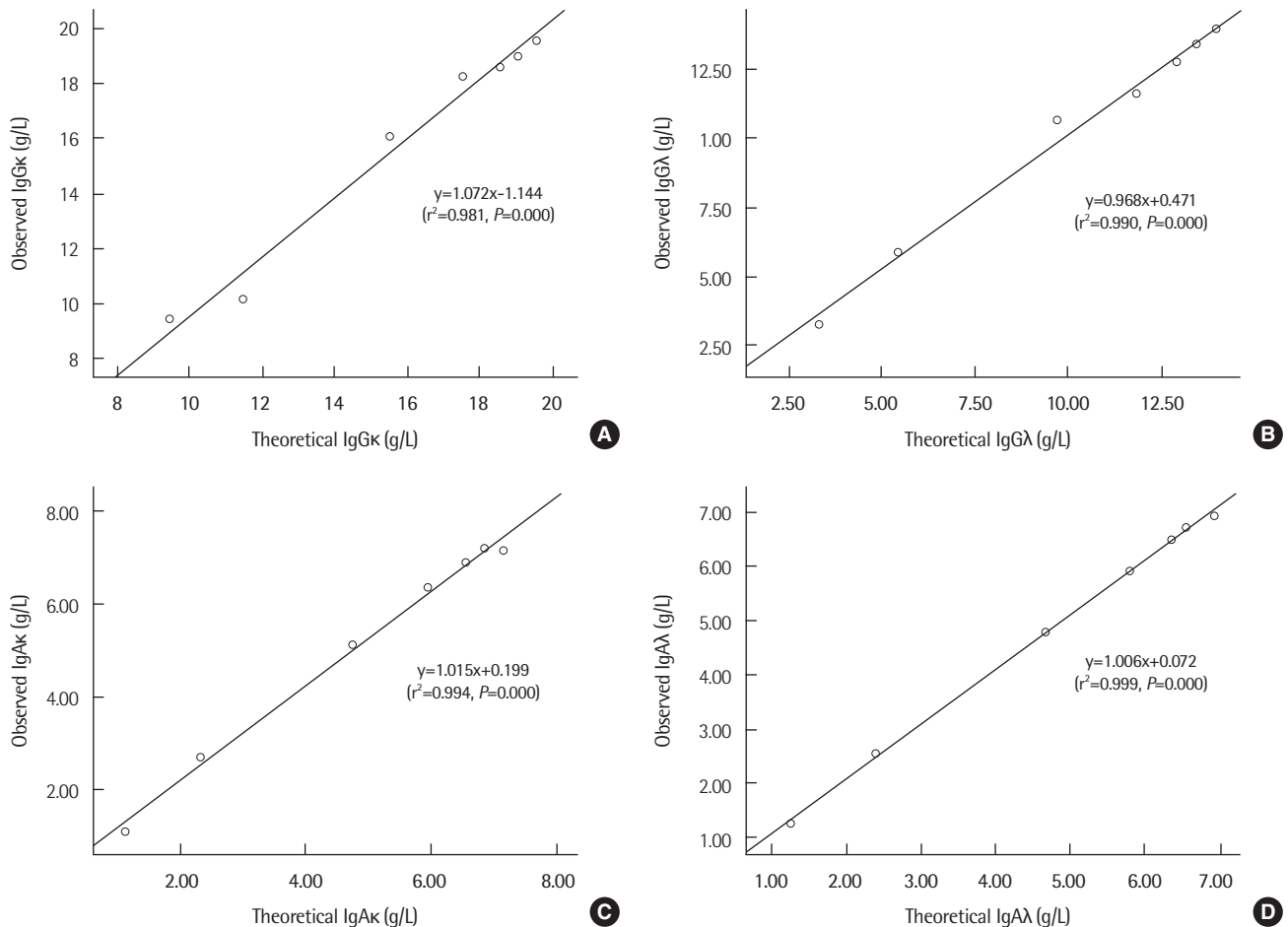
	N	Median (range)
Tumor HLC type (g/L)		
IgG $\kappa$	23	20.18 (4.97-77.82)
IgG $\lambda$	4	8.18 (3.75-33.36)
IgA $\lambda$	1	14.56*
Non-tumor HLC type (g/L)		
IgG $\lambda$	23	0.96 (0.15-5.49)
IgG $\kappa$	4	1.99 (1.00-2.44)
IgA $\kappa$	1	0.44*
HLC ratios		
IgG $\kappa$ /IgG $\lambda$	23	19.90 (3.50-143.89)
IgG $\kappa$ /IgG $\lambda$	4	0.21 (0.06-0.50)
IgA $\kappa$ /IgA $\lambda$	1	0.03*

\*Raw data were presented, because only IgA sera from 1 multiple myeloma patient was assayed.

Abbreviations: HLC, heavy/lightchain assay; SPEP, serum protein electrophoresis.

합혈청의 혼합에 따른 단계별 희석을 하여 실제 측정되는 값과 예상되는 값 사이의 선형 회귀분석을 해보았을 때(Fig. 2), IgG $\kappa$ , IgG $\lambda$ , IgA $\kappa$ , IgA $\lambda$  각각에 대해서  $r^2$ 값은 각각 0.981, 0.990, 0.994, 0.999였다( $P=0.000$ ).

위에 언급된 대상환자와는 별도로, 1명의 IgG형 다발골수종 환자에 대해서 진단시점 이후로 부분 관해, 자가조혈모세포이식 후 재발, 항암치료에 의한 이차 관해에 이르기까지 기존의 검사와 HLC assay 검사결과를 비교한 내용은 다음과 같았다. 진단시점으로부터 6회에 걸쳐 기존에 시행되었던 혈청단백 전기영동, immunotyping, 총 IgG, HLC assay 결과를 비교 검토해 보았을 때(Fig. 3), 일차 항암치료로 인하여 부분적 관해에 이른 때와 이식 후 재발을 보였던 때에 혈청단백 전기영동, immunotyping에서 IgG $\kappa$ 형의 클론형성능이 있었으나, HLC assay에서는 클론형성능을 보이지 않았다. 그후 재항암치료에 의한 이차 관해에 이른 이후에는 혈청단백 전기영동, immunotyping에서 음성이었었고, HLC assay에 의해서도 클론형성능이 없다고 판정되었다.



**Fig. 2.** Linearity results of Hevylite Ig $\kappa$  and Ig $\lambda$  assays performed using a mixture of normal pooled sera with high concentration controls (simulation test by serial dilution). (A) IgG $\kappa$  assay, (B) IgG $\lambda$  assay, (C) IgA $\kappa$  assay, (D) IgA $\lambda$  assay.

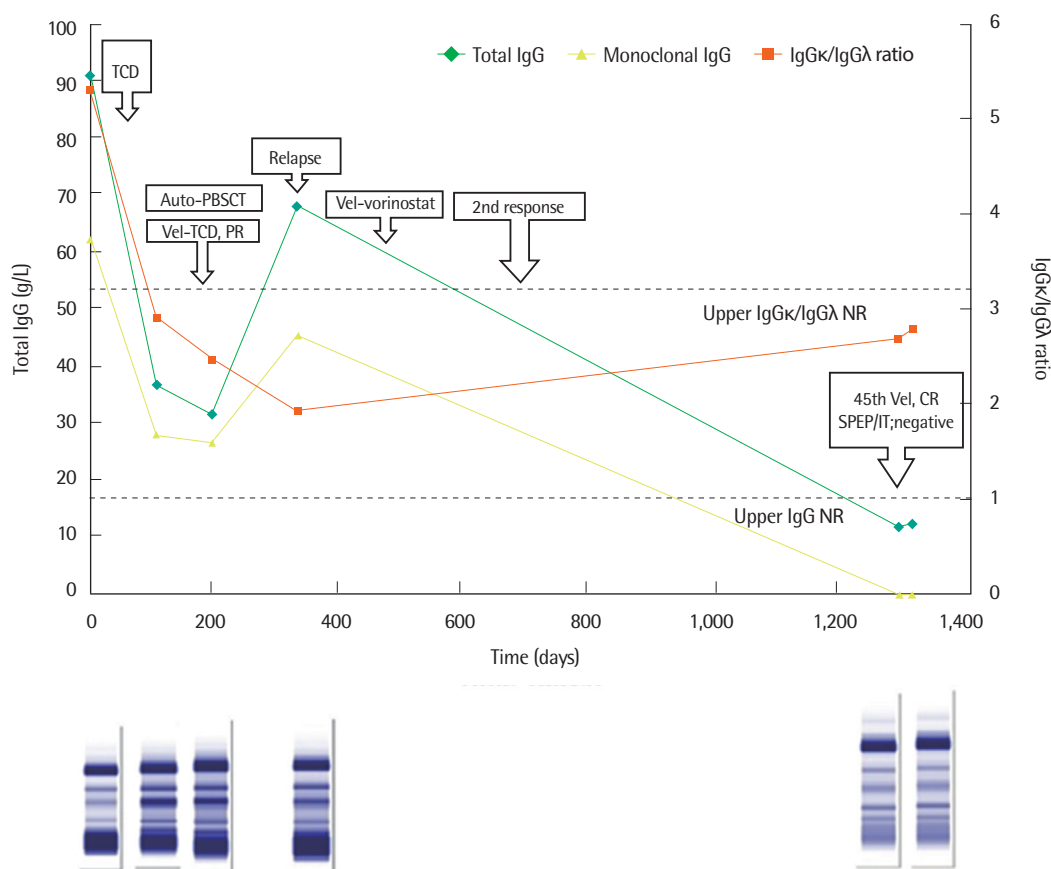


Fig. 3. Serial analysis of sera from an IgGκ multiple myeloma patient; a comparison of serum protein electrophoresis (SPEP), total immunoglobulin G (IgG), monoclonal IgG from SPEP densitometry, and Hevlyte™ IgG κ:λ ratio.

Abbreviations: IgG, immunoglobulin G; κ, kappa; λ, lambda; TCD, thalidomide plus cyclophosphamide plus dexamethasone treatment; auto-PBSCT, autologous peripheral blood stem cell transplantation; Vel, velcade (bortezomib); IT, immunotyping; PR, partial response; CR, complete response; NR, normal range.

## 고찰

단클론감마병증을 보이는 질환들 중에서 다발골수종의 대략적인 빈도는 전체 혈액총량의 10%이며 전체 종양의 1% 정도를 차지한다. 또한 그 발생빈도는 인종에 따른 뚜렷한 차이를 보이는데, 동양인에서는 다른 인종에 비해 일반적으로 발생빈도가 낮은 것으로 알려지고 있으며, 우리나라에서 다발골수종은 드문 질환이었다. 그러나, 최근 우리나라에서도 다발골수종의 발생률과 사망률이 급격하게 증가하고 있다[8].

이러한 다발골수종 환자의 진단, 치료 및 추적 검사에 최근 활발히 사용되고 있는 혈청 유리형 경쇄검사는 단백전기영동뿐만 아니라 면역고정 전기영동보다 훨씬 예민하며, 자동화 장비를 이용하여 직접적으로 정량보고가 가능하고, 육안해석 등의 주관적인 과정이 배제된 객관적인 결과를 얻을 수 있다는 점에서 M단백을 보이는 환자들의 진단과 추적검사 및 예후판정에 있어서도 매우 유용한 표지자라 할 수 있다[3, 9].

Legg A 등[3]에 의하면, 이러한 혈청 유리형 경쇄검사와 유사하게 HLC assay를 통하여 구할 수 있는 Igκ/Igλ ratio 또한 다발골수종 환자의 예후 판정에 있어서 중요한 의미를 가질 수 있다고 하였다.

본 연구에서 저자들은 면역비타법을 이용한 자동화 장비로 면역글로불린의 중쇄와 경쇄의 결합부위를 항원결정기로 하는 특이 항체를 사용하여, 각 면역글로불린의 경쇄형에 대한 개별적인 정량검사를 시행하여 그 비율을 구하였고(예; IgGκ/IgGλ) 이를 통해서 클론형성능의 유무를 판정하였다.

Bradwell 등[6]의 연구와 Keren [10]에 의하면, HLC assay는 혈청 단백 전기영동보다 IgG형 M단백을 검출하는데 있어서 약간 더 낮은 분석능을 보이며, IgA나 IgM형 M단백의 검출에 대해서는 비슷하거나 더 나은 민감도를 나타내었고 M단백의 형별결정에 있어서도 면역고정전기영동과 거의 동등한 결과를 보였다고 하였다.

본 연구에서도 혈청단백 전기영동, immunotyping과 HLC assay 결과를 비교해 보았을 때, 의심스러운 혈청단백 전기영동 소견을 보인 35개의 혈청검체 중 8건에서 IgGκ형의 클론형성능을 immu-

notyping에서는 확인할 수 있었으나, HLC assay에서는 클론형성능이 없다고 판정되었다. 반대로, immunotyping에서 클론형성능이 없었으나 HLC assay에서는 IgG $\kappa$  또는 IgA $\kappa$ 형의 클론형성능을 보인 4건이 있어서, 상기 보고와 같이 IgG형의 M단백을 검출하는데 있어서는 HLC assay가 혈청단백 전기영동보다는 민감도가 낮음을 알 수 있었다(Table 3). 따라서, HLC assay 단독검사를 할 경우에는 단백전기영동보다 M단백 검출의 민감도가 낮을 수 있으나, 기존의 단백전기영동 및 immunotyping과 함께 HLC assay를 하게 되면 M단백 검출의 민감도를 좀더 높일 수 있을 것으로 사료된다.

Table 3에서 전기영동과 HLC assay 결과 간 불일치를 보였던 12예는 모두 전기영동에서 애매한 피크를 보인 경우로서, 다발골수종으로 진단된 시기의 검체로 검사가 시행된 1예를 제외하고는 임상적으로 매우 좋은 부분관해, 부분관해, 불변 상태에 해당하였다. 따라서, 재발하거나 질환이 악화된 경우에 HLC assay로 M단백을 검출하지 못한 경우는 없었다. 또한, 전기영동 및 immunotyping에서 확실한 단클론성 피크를 보인 28예에서는 immunotyping과 HLC assay 모두 M단백 검출 및 형별 결정에서 동일한 결과를 보여(Table 4) HLC assay의 유용성을 확인할 수 있었다.

모세관 전기영동법으로 시행한 Immunotyping결과를 기준으로 하여 혈청 유리형 경색검사와 HLC assay를 비교해 보았을 때, M단백 검출 민감도는 HLC assay (83.6%)가 더 높았으나, 특이도는 혈청 유리형 경색검사(50%)가 더 높은 것으로 나타났다.

요약하자면, 이번 연구에서 혈청단백 전기영동에서의심스럼거나 애매한 피크를 보인 경우(N=35) 혹은 확실한 단클론성 피크(N=28)를 보인 63개의 혈청검체를 대상으로 HLC assay를 시행한 결과, 51건(51/63, 81%)에서 모세관 전기영동에 의한 immunotyping과 동일한 결과를 확인할 수 있었다. Immunotyping과 HLC assay에 따른 clonality의 판정은 상호 간에 좋은 일치도를 보였으며( $k=0.718$ , degree of agreement), 이는 통계적으로 유의함을 알 수 있었다( $P=0.000$ ). 기존 보고에서도 혈청단백 전기영동에서 단클론성 피크를 보이거나 의심스러운 소견을 보인 40개의 검체로 면역고정 전기영동과 HLC assay를 시행하여 비교한 결과, 그 중 31개의 검체(31/40, 78%)에서 동일한 클론형성능 판정을 얻은 바 있다고 하였다[6, 10].

또한 고농도의 정도관리물질(IgG $\kappa$ , IgG $\lambda$ , IgA $\kappa$ , IgA $\lambda$ )과 정상 혼합혈청의 혼합에 의해서 측정값과 예상값 사이의 회귀분석을 한 결과(Fig. 2), IgG $\kappa$ , IgG $\lambda$ , IgA $\kappa$ , IgA $\lambda$  각각에 대해서  $r^2$ 값은 거의 1에 가까운 유의한 상관성을 보였기에( $r^2=0.981, 0.990, 0.994, 0.999$ ;  $P$  value=0.000), HLC assay의 분석적 민감도가 우수함을 확인할 수 있었다.

1명의 IgG $\kappa$  type의 다발골수종 환자에 대해서 진단 이후로 6회에 걸쳐 기존에 시행된 검사와 HLC assay 결과를 비교하였을 때

(Fig. 3), 일차 항암치료로 인하여 부분적 관해에 이르는 동안 혈청단백 전기영동, immunotyping에서는 진단시보다는 약하더라도 여전히 IgG $\kappa$ 형의 단클론형성능을 보였다. 그러나, HLC-assay에서 IgG $\kappa$ , IgG $\lambda$ 는 모두 정상범위보다 증가하였더라도, IgG $\kappa$ /IgG $\lambda$  비율은 정상범위에 있음으로 인하여 결과적으로는 클론형성능이 없는 것으로 판단되었다. 이식 후 재발한 시기에도 혈청단백 전기영동, immunotyping에서 IgG $\kappa$ 형의 클론형성능이 있었으나, HLC assay에서는 IgG $\kappa$ , IgG $\lambda$ 가 모두 정상범위보다 증가하였더라도 결과적으로는 IgG $\kappa$ /IgG $\lambda$  비율에 의한 클론형성능 판정에서 음성으로 간주되었다. 이와 같은 소견은 위에서 언급했던 IgG형 M단백의 검출에 있어서는 혈청단백 전기영동보다 낮은 민감도를 보인다고 했던 바와 일치하는 것으로 판단된다.

상기 환자는 그후 재항암치료에 의한 이차 관해에 이른 상태에서 현재까지 추적검사로 2번 시행된 혈청단백 전기영동, immunotyping에서 클론형성능을 보이지 않았고, HLC assay에 의해서도 IgG $\kappa$ , IgG $\lambda$ , IgG $\kappa$ /IgG $\lambda$  비율 모두 정상범위에 속하여 클론형성능이 없다고 판정되었다. 하지만, 바로 이전의 재발했던 시기의 HLC assay-IgG $\kappa$ /IgG $\lambda$  비율보다는 약간씩 증가하는 양상이어서, 이것이 다발골수종 클론세포에 의한 IgG $\kappa$  수치증가에 따른 것인지에 대해서는 앞으로의 추적검사가 더 이루어진 다음에서야 판단할 수 있을 것으로 사료된다.

한편 Tovar 등[11]에 따르면, IgG형 다발골수종 환자에서 IgA $\kappa$ /IgA $\lambda$  비율이 증가하는 것처럼 종양세포 클론과 무관한 면역글로불린의 Ig $\kappa$ /Ig $\lambda$  비율이 상대적으로 더 증가하게 되면 총 생존율과 무진행 생존율이 유의하게 증가함을 예측할 수 있었으며, 이는 인체 면역체계의 회복과 관련지을 수 있는 지표가 될 수 있다고 하여 예후판정에 있어서 중요함을 시사한 바 있다.

또한 면역고정 전기영동에서는 M단백과 함께 이동할 수 있는 혈청내 물질에 의한 간섭을 받지 않으며, 양클론감마병증, IgD와 IgE형 M단백, 그리고 IgG/IgA/IgM 중쇄질환까지도 검출할 수 있는 등의 장점이 있기에 HLC assay가 면역고정 전기영동을 완전히 대체하기는 힘들다[10].

하지만, 본 연구에서 보여진 결과에서처럼 HLC assay는 M단백의 검출 및 정량을 위해 추가적으로 필요한, 중요한 검사로서 M단백 형별 결정 및 정량을 위한 수치화된 정보를 재현성 있게 제공할 수 있으며, 위에서 언급한 바와 같이 다발골수종 환자의 예후판정에도 도움을 줄 수 있는 유용한 검사방법이라고 하겠다.

## 요 약

**배경:** 전통적인 단백 전기영동에 의한 단클론감마병증의 확인은 합도글로빈, 트랜스페린과 같은 큰 농도를 가진 단백질에 의해 가려

지므로 어려울 수 있다. 전기영동 밴드에서의 이와 같은 불확실성으로 인해 혼란스럽거나 해석에 어려움이 있을 수 있다. 최근 M단백의 정확한 측정을 위해서 Hevylite 항체(The Binding Site, UK)를 사용하는 Heavy chain/light chain assay (HLC assay)가 개발되었기에, 면역 전기영동에 의한 M단백의 형별판정과 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄 쌍의 직접 측정을 하여 얻은 완전 면역글로불린의 카파 및 람다 비율에 의한 형별판정의 결과를 비교하였다.

**방법:** Capillarys2(Sebia, Norcross, USA)에 의한 혈청 단백 전기영동과 면역 전기영동에서 의심스러운 소견을 보인 35검체와 확실한 단클론성을 보인 28검체를 각각 모았다. M단백의 생산은 Freelite 항체(The Binding Site, UK)와 특이적인 Ig(G, A) $\kappa$  and Ig(G, A) $\lambda$  Hevylite 항체(The Binding Site)에 의해서도 측정되었다. 검사결과는 PASW 18.0에 의해서 분석되었다.

**결과:** 면역글로불린 중쇄/경쇄 쌍의 직접 측정은 의심스러운 전기영동 소견을 보인 35검체 중에서는 12검체(34.2%)에서 면역전기영동에 의한 M단백의 형별판정과 일치하지 않았고, 혈청단백 전기영동에서 확실한 단클론성 피크를 보였던 28검체에서는 면역전기영동에 의한 M단백의 형별판정과 모두 일치한 소견을 보였다. 전반적으로, HLC assay와 면역 전기영동검사 결과는 M단백의 형별판정에 있어서 좋은 일치율을 보였다( $\kappa=0.718$ ,  $P=0.000$ , 일치도 분석).

**결론:** 혈청 면역글로불린 중쇄/경쇄 쌍의 직접측정은 면역전기영동과 동등한 유용성을 보이며, 전기영동에서 애매한 단클론성을 보이는 경우 형별판정을 하는 데 도움이 될 수 있다. 또한 애매한 전기영동 소견을 보이는 M단백의 경우, 정량을 하여 형별판정의 확인 및 감별을 하는 데 유용하다고 하겠다.

## REFERENCES

- Hortin GL. Amino acids, peptides, and proteins. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, eds. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 5th ed. Missouri: ELSEVIER Saunders, 2012:509-63.
- McPherson RA and Massey HD. Laboratory evaluation of immunoglobulin function and humoral immunity. In: McPherson RA, Pincus MR, eds. Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods. 22th ed. Philadelphia: ELSEVIER Saunders, 2011:899-913.
- Legg A, Harding S, Hughes RG, Levoguer AM, Bradwell AR. Serum free light chain and Hevylite analyses in the diagnosis, monitoring and prognosis of B cell disorders. *Klin biochem metab* 2010;18:56-61.
- Yang Z, Harrison K, Park YA, Chaffin CH, Thigpen B, Easley PL, et al. Performance of the Sebia CAPILLARYS 2 for detection and immunotyping of serum monoclonal paraproteins. *Am J Clin Pathol* 2007;128:293-9.
- McCudden CR, Mathews SP, Hainsworth SA, Chapman JF, Hammett-Stabler CA, Willis MS, et al. Performance comparison of capillary and agarose gel electrophoresis for the identification and characterization of monoclonal immunoglobulins. *Am J Clin Pathol* 2008;129:451-8.
- Bradwell AR, Harding SJ, Fourrier NJ, Wallis GL, Drayson MT, Carr-Smith HD, et al. Assessment of monoclonal gammopathies by nephelometric measurement of individual immunoglobulin kappa/lambda ratios. *Clin Chem* 2009;55:1646-55.
- Katzmann JA, Clark RJ, Abraham RS, Bryant S, Lymp JF, Bradwell AR, et al. Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. *Clin Chem* 2002;48:1437-44.
- Lee JH and Bang SM. Epidemiological change of multiple myeloma in Korea. *Korean J Hematol* 2006;41:225-34.
- Kang SY, Suh JT, Lee HJ, Yoon HJ, Lee WI. Establishment of serum reference range for free light chains and its clinical usefulness in multiple myeloma. *Korean J Lab Med* 2004;24:273-8.
- Keren DF. Heavy/Light-chain analysis of monoclonal gammopathies. *Clin Chem* 2009;55:1606-8.
- Tovar N, Fernández de Larrea C, Elena M, Cibeira MT, Aróstegui JI, Rosiñol L, et al. Prognostic impact of serum immunoglobulin heavy/light chain ratio in patients with multiple myeloma in complete remission after autologous stem-cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012;18:1076-9.