

재조합 인슐린 치료 중 발생한 혈중 인슐린농도의 비정상적 상승 증례에 대한 고찰

Unusually Elevated Serum Insulin Level in a Diabetic Patient during Recombinant Insulin Therapy

김세림¹ · 윤여민² · 허미나² · 문희원²

Serim Kim, M.D.¹, Yeo-Min Yun, M.D.², Mina Hur, M.D.², Hee-Won Moon, M.D.²

한마음혈액원¹, 건국대학교병원 진단검사의학과²

Hanmaem Blood Center¹, Gwacheon; Department of Laboratory Medicine², Konkuk University School of Medicine, Seoul, Korea

Herein, we report a case of unusually elevated serum insulin level as a result of increased anti-insulin antibody (IA)-bound insulin after continuous subcutaneous insulin infusion therapy. Detecting free insulin (unbound IAs) levels after polyethylene glycol pre-treatment could be useful to assess functional insulin levels in diabetic patients receiving insulin therapy. The E170 insulin assay can estimate total insulin (bound IAs and free insulin) levels, but it does not measure the levels of exogenous insulin analogues.

Key Words: Insulin, Insulin antibodies, Insulin immunoassay, Insulin analogues, Cross-reactivity

증례

62세 남자환자가 정기적 경과관찰을 목적으로 내분비내과 외래를 방문하였다. 환자는 6년 전 제2형 당뇨병으로 진단받고 경구혈당강하제 치료를 받고 있다가 16개월 전부터 지속적 피하인슐린주입법(continuous subcutaneous insulin infusion, 인슐린펌프)으로 변경하여 insulin aspart (NovoRapid, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark)로 치료받았으며, 최근 9개월 전부터는 insulin glulisine (Apidra, Sanofi-Aventis, Paris, France)으로 다시 변경하여 치료받고 있었다. 환자는 평소 혈당조절이 잘되지 않는 것 외에 특별히 호

소하는 증상은 없었고 신체진찰에서도 특별한 이상은 발견하지 못하였다. 당일 시행한 환자의 일반화학검사결과는 Table 1과 같다. 환자의 식전 및 식후 2시간째 측정된 인슐린(E170 module from MODULAR analytic, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) 결과가 정상상한치의 10배 이상으로 상승되어 있었으며, 이는 C-peptide의 상승 정도와 비교하였을 때 설명이 되지 않아 임상의로부터 확인을 요청받았다.

증례 해결 과정

환자의 혈중 인슐린농도의 상승 원인이 치료를 목적으로 투여된 재조합인슐린이 함께 측정된 결과일 가능성이 있으므로, 재조합인슐린에 의한 교차반응 정도를 평가하기 위하여 insulin aspart (NovoRapid, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark)와 insulin glulisine (Apidra, Sanofi-Aventis, Paris, France) 100 IU/mL의 정중용액을 각각 7% Bovine Serum Albumin에 희석하여 최종농도가 30, 100, 300, 1,000 mIU/L가 되도록 준비하여, 환자의 검체를 측정하는 것과 동일한 방식으로 E170 면역측정법으로 측정하였다(Table 2). 측정결과 재조합인슐린과의 교차반응(cross-reactivity)을 거의 보이지 않아 환자의 상승된 혈중 인슐린은 모두 생체 내에서 생성된 것으로 판단하였다.

Corresponding author: Yeo-Min Yun, M.D.

Department of Laboratory Medicine, Konkuk University Hospital, Konkuk University School of Medicine, 120-1 Neungdong-ro, Gwangjin-gu, Seoul 143-729, Korea

Tel: +82-2-2030-5582, Fax: +82-2-2030-5587, E-mail: ymyun@kuh.ac.kr

Received: August 21, 2012

Revision received: November 12, 2012

Accepted: November 12, 2012

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

© 2013, 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.

Table 1. Laboratory data

Analytes*	Case	Reference interval
Protein (g/dL)	6.8	6.0-8.0
Albumin (g/dL)	4.4	3.3-5.2
AST (IU/L)	27	7-38
ALT (IU/L)	30	4-43
ALP (IU/L)	60	40-120
Uric acid (mg/dL)	7.3	2.5-7.5
Cholesterol (mg/dL)	179	100-220
Free fatty acid (μ Eq/L)	752	176-586
HbA _{1c} (%)	7.3	4.3-6.0
Fasting insulin (μ U/mL)	337.5	2.6-24.9
Fasting glucose (mg/dL)	231	70-110
Fasting C-peptide (ng/mL)	5.66	1.1-4.4
Postprandial (2h) insulin (μ U/mL)	525.8	N/A
Postprandial (2h) glucose (mg/dL)	309	N/A
Postprandial (2h) C-peptide (ng/mL)	7.68	N/A

*We performed biochemical tests using reagents from Kyowa with the TBA 200FR Neo system (Toshiba Medical Systems Co., Ltd., Tokyo, Japan). Serum insulin, C-peptide levels, and plasma HbA_{1c} were determined using the E170 module from MODULAR analytics (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and a HLC-723 G7 analyzer (Tosoh Corporation, Tokyo, Japan), respectively.
Abbreviation: N/A, not available.

또한 혈중 인슐린 측정에 영향을 줄 수 있는 요인으로 알려져 있는 항 인슐린항체를 manual anti-insulin IRMA (CIS Bio International, Areva S.A., France) 방법으로 측정한 결과 71.9% (참고치, < 5.4%)로 증가되어 있었다. 항인슐린항체의 영향을 확인하기 위하여 환자의 식전 검체를 20% PEG (Polyethylene Glycol) 용액과 1:1 혼합한 후 20분간 섞어 주고, 다시 4°C, 3,000 g으로 30분간 원심분리한 후 상층액을 분리하여 E170 면역측정법으로 항인슐린항체와 결합되어 있지 않은 유리형 인슐린(free insulin)을 측정하였으며, 우선 환자의 혈청과 1.0 N HCl 용액을 먼저 섞어 항체와의 결합을 분리시킨 후에 PEG 처리를 하고, 다시 1.0 NaOH 용액을 첨가하여 중화시킨 후 위와 같은 방법으로 원심분리하여 상층액에서 총 인슐린(total insulin)을 측정하여 이 두 값을 기존의 전처리 없이 측정한 식전인슐린농도(direct insulin)와 비교하였다(Table 3). 전처리 과정에서의 일부 소실을 감안한다면, E170 면역측정법은 항인슐린항체에 결합된 인슐린과 유리형 인슐린을 구분하지 않고 모두 측정한 총 인슐린 양을 측정하는 것으로 생각되었다.

검사실 진단

항인슐린항체 양성 환자의 경우 인슐린의 정상적인 혈당 강하 기능을 하지 못하는 항체와 결합한 인슐린 농도 증가로 인하여 생체 내 인슐린 분비가 지속적으로 상승되는 것으로 생각하였고, E170 면역측정법의 경우 항 인슐린항체와 결합한 인슐린과 유리형

Table 2. Cross-reactivity with recombinant human insulin analogues in the E170 insulin assay

Concentration (mIU/L)	Detection level, mIU/L (Cross-reactivity %)*	
	Insulin aspart (NovoRapid)	Insulin glulisine (Apidra)
30	<0.2 (<0.67)	<0.2 (<0.67)
100	<0.2 (<0.2)	<0.2 (<0.2)
300	0.312 (0.10)	0.340 (0.11)
1,000	0.341 (0.03)	0.513 (0.05)

*The percentage of cross-reactivity was calculated as detected insulin level/given concentration \times 100.

Table 3. Direct, free, and total insulin levels

Analytes	Insulin level (μ U/mL)	Reference interval (μ U/mL)
Direct insulin	337.50	2.6-24.9
Free insulin	27.02	N/A
Total insulin	308.10	N/A

Abbreviation: N/A, not available.

인슐린을 구분이 없이 모두 측정하여 비정상적으로 높은 혈중 인슐린 농도 값을 보인 것으로 판단하였다.

토의

Dr. 김세림(진단검사의학과): 본 증례의 경우 항인슐린항체로 인하여 혈중 인슐린 농도 측정에 영향을 받았습니다. 항인슐린항체 이외에 혈중 인슐린 측정 결과에 간섭효과를 나타낼 수 있는 다른 요인에는 어떤 것들이 있을까요?

문희원 교수(진단검사의학과): 인슐린 측정에 있어서 결과에 간섭효과를 나타낼 수 있는 것으로 지금까지 알려져 있는 요인으로 는 검체의 보관 조건, 용혈, 항 인슐린항체 및 치료 목적으로 투여 받은 재조합인슐린과의 교차반응 등을 들 수 있습니다[1, 2]. 인슐린은 전혈 상태에서는 상온조건에서 24시간 안정적이며 4°C 조건에서는 1주일 안정하다고 알려져 있으며, 혈장 상태에서는 이보다 더 안정적으로, 20°C 상온조건에서는 3일, 4°C 조건에서는 2주, 그리고 -20°C에서는 최대 수개월 동안 안정적입니다. 또한 혈청 상태에서 동결과 해동을 반복하여도 인슐린 측정에는 큰 영향이 없는 것으로 알려져 있습니다. 다만, 검체가 용혈이 되었을 때는 insulin-degrading enzyme (IDE)이 적혈구로부터 혈청 내로 유리되어 나와 혈중 인슐린 농도를 원래보다 낮게 측정되게 하는 원인이 될 수 있습니다. 하지만, 본 증례에서 문제가 되는 것은 비정상적으로 높은 인슐린 농도이며, 언급하지는 않았지만 채혈 후 수 시간 내에 이루어지는 통상적인 병원 검사 기준에서 생각한다면, 검체 보관이나 용혈로 인한 영향은 배제할 수 있을 것입니다.

또 다른 간섭원인인 재조합인슐린과의 교차반응은 다음과 같은 원인에서 발생할 수 있습니다. 인슐린 측정원리에 따라, 혹은 같은

원리 내에서도 제조사에 따라 검사시약 내 사용하는 항체가 목표로 하는 표적항원 결정기(epitope)가 다르기 때문에 인슐린전구체뿐만 아니라 일부 아미노산기를 치환한 다른 재조합 인슐린과도 다양한 교차반응을 보일 수 있다고 알려져 있습니다. 일반적으로 1세대 radioimmunoassay (RIA) 들은 다클론항체를 사용하므로 인슐린전구체뿐 아니라 여러 종류의 재조합 인슐린들과도 모두 교차반응을 보이는 것과는 달리 실제로 2세대 Immunoradiometric assay (IRMA) 들과 Immunometric assay (IMA)들은 연구에 따라서 조금씩 다른 정도의 교차반응을 나타내고 있습니다[3, 4].

Dr. 김: 본 증례에서 사용한 E170 면역측정법에서는 두 가지 외부 재조합 인슐린을 측정하지 않는 것으로 나타났습니다. 생체 내에서 생성된 인슐린과 외부에서 투여한 재조합 인슐린과의 구조적 차이점은 무엇이며 본 증례의 인슐린측정법에서 사용한 시약의 표적항원은 구체적으로 어떤 부위인가요?

허미나 교수(진단검사의학과): 인슐린은 췌장 랑게르한스섬의 β 세포에서 전구체인 preproinsulin과 proinsulin (human proinsulin, hPI, 9600 Da, 51개 아미노산) 형태로 분비되며 hPI는 secretory granule 안에서 다시 동 분자량의 c-peptide (connecting peptide)와 insulin (5808 Da, 51개 아미노산) 형태로 대사된 후 문맥순환 내로 방출됩니다. 인슐린분자는 A 사슬(21개 아미노산)과 B 사슬(30개 아미노산) 총 2개의 폴리펩타이드 사슬로 구성되며, 2개의 이황화물 결합(A7-B7 그리고 A20-B19)으로 연결되어 있습니다. 인슐린 B-사슬의 C말단은 생물학적 활성도(biologic activity)와 관련된 항원결정기로 알려져 있습니다. 하지만 C말단 가장 끝 5개의 아미노산기(B26-B30)는 인슐린의 항원성에 영향을 미치지 않고, 다만 인슐린의 구조(dimerization)에만 영향을 미치므로 대부분의 속효성 재조합인슐린은 B-사슬의 C말단 끝 5개의 아미노산기 중 1-2개의 치환을 함으로써 생물학적 활성도의 큰 변화 없이 생체 내 작용시간을 변화시킬 수 있습니다[5]. 본 증례에서 사용한 인슐린 측정법의 단클론항체는 항인슐린항체 결합부위와 중복되지 않는 다른 부위, 특히 B-사슬 C말단 끝 아미노산기 중 일부를 인지하는 것으로 추정되며, 따라서 이 부분이 치환된 exogenous recombinant insulin과는 거의 교차반응을 보이지 않는 반면, 이보다 근위부의 항 인슐린항체 작용부위와는 경쟁을 피할 수 있으므로, 항인슐린항체와 이미 결합되어 있는 인슐린까지 거의 모두 측정을 하게 되는 것으로 생각됩니다[1] (Fig. 1).

Dr. 김: 항인슐린항체란 무엇이며, 어떠한 경우에 발생하나요? 또한 인슐린측정 시 이에 대한 간섭을 최소화하는 방법에는 어떤 것들이 있습니까?

윤여민 교수(진단검사의학과): 인슐린농도측정 시 결정적으로

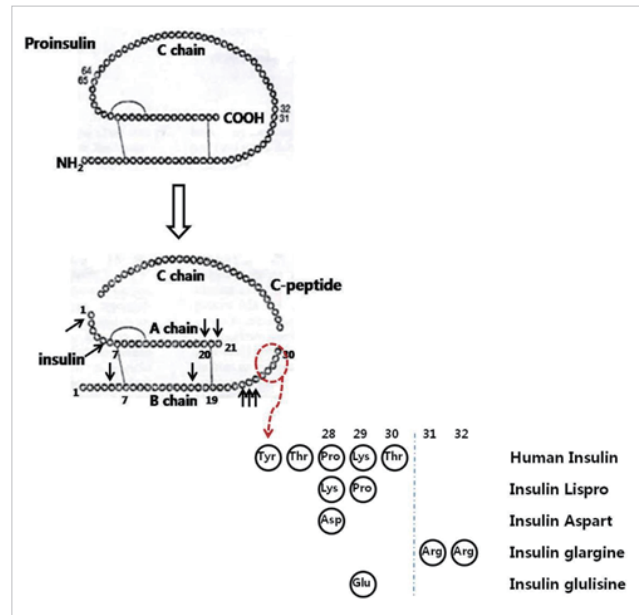


Fig. 1. Structures of insulin, C-peptide, and exogenous recombinant insulin [2]. The dotted circle is the target for the recombinant human insulin analogues. The arrows indicate the antigenic determinant area (antibody recognition site).

영향을 미칠 수 있는 요인 중의 하나로 항인슐린항체를 들 수 있습니다. 항인슐린항체는 인슐린자가면역증후군(insulin autoimmune syndrome)이나 제1형 당뇨병의 전 임상기(pre-clinical phase), 혹은 재조합인슐린으로 치료를 받고 있는 환자들에게서 발견할 수 있습니다. 최근 수십 년간 재조합 인슐린은 단백 공학기술의 발전으로 인하여 발전을 거듭하였으며, 따라서 1960-70년대의 정제되지 않은 동물유래인슐린을 사용할 때와 비교하여 근래에는 항인슐린항체로 인한 인슐린저항성의 발생빈도는 급격히 감소하여 항인슐린항체는 더 이상 임상적으로 문제가 되지 않는 것으로 생각되었습니다.

하지만 최근의 보다 집중적인 인슐린치료법(예: 지속적 피하 인슐린 주입법, continuous subcutaneous insulin infusion, 지속적 복막 인슐린 주입법, continuous peritoneal insulin infusion, 인슐린흡입치료, insulin inhalation 등)은 지속적인 외부 재조합 인슐린에의 노출을 야기하여 오히려 항인슐린항체의 생성을 촉진시킬 수 있는 것으로 보고되고 있습니다[6]. 가능한 주요 원인기전으로는 pump reservoir에서의 인슐린보존자체, 또는 보존제로 사용되는 계면활성제(surfactant) 혹은 polyethylene glycol 사용 등을 들 수 있습니다[7, 8].

항 인슐린항체에 의한 간섭효과는 RIA나 IMA 두 측정법 모두에서 다 나타날 수 있는 것으로 알려져 있으며, 2-site IMA에서는 주로 분석에 사용되는 단클론 항체가 환자의 혈장 내 항인슐린항체보다 친화도가 강하거나, 혹은 항 인슐린항체가 결합하고 있지 않

은 항원결정기에 결합함으로써, 생체 내 작용을 반영하지 않는 항인슐린항체와 결합하고 있는 형태(Ab-bounded form)의 인슐린까지 일부(혹은 모두) 측정하게 되어 혈장 내 인슐린농도가 과다하게 측정되는 결과를 가져오는 것으로 알려져 있습니다[9]. 이를 해결하기 위해서는 우선, 비정상적으로 인슐린이 높게 측정이 되었을 때 우선 항인슐린항체의 유무를 검사한 후, 항체가 존재한다면 이 항체와 결합한 인슐린(bounded form)은 생물학적 활성도가 없는 형태이므로, 이를 제거한 후 항체와 결합하지 않은 인슐린(free form)만 따로 측정하는 방법을 고려할 수 있겠습니다. 가능한 방법으로는 본 증례에서 시행한 방법인 PEG 침전방법이 가장 대표적이며, 그 외에 겔여과법(gel filtration), 초고속원심분리(Ultracentrifugation) 혹은 산 에탄올(Acid ethanol) 방법 등이 제안되었습니다[10, 11]. PEG 침전방법은 항인슐린항체를 이 항체와 결합하고 있는 인슐린(bounded form)과 함께 PEG를 이용하여 침전시킨 후, 상층액에서 결합하지 않은 인슐린(free form)만을 측정할 수 있는 방법입니다. 이전의 항인슐린항체로 인한 고인슐린혈증에 대한 보고들에서는[12-14] 직접 측정한 인슐린에서 항체와 결합하고 있는 인슐린을 제거한 후 free insulin을 측정하여 항체와 결합하고 있는 부분은 외부에서 주입된 인슐린이라고 판단하였으나, 본 증례의 결과에서 알 수 있듯이 측정방법별로 외부 재조합인슐린에 대한 교차반응 정도가 다르므로, 임상 의사의 검사 결과 해석 시 주의가 필요할 것으로 생각됩니다.

참고문헌

- Kim S, Yun YM, Hur M, Moon HW, Kim JQ. The effects of anti-insulin antibodies and cross-reactivity with human recombinant insulin analogues in the E170 insulin immunometric assay. *Korean J Lab Med* 2011;31:22-9.
- Sapin R. Insulin assays: previously known and new analytical features. *Clin Lab* 2003;49:113-21.
- Sapin R. Anti-insulin antibodies in insulin immunometric assays: a still possible pitfall. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997;35:365-7.
- Owen WE, Roberts WL. Cross-reactivity of three recombinant insulin analogs with five commercial insulin immunoassays. *Clin Chem* 2004;50:257-9.
- Cao Y, Smith WC, Bowsher RR. A sensitive chemiluminescent enzyme immunoassay for the bioanalysis of carboxyl-terminal B-chain analogues of human insulin. *J Pharm Biomed Anal* 2001;26:53-61.
- Radermecker RP, Renard E, Scheen AJ. Circulating insulin antibodies: influence of continuous subcutaneous or intraperitoneal insulin infusion, and impact on glucose control. *Diabetes Metab Res Rev* 2009;25:491-501.
- Jeandidier N, Boivin S, Sapin R, Rosart-Ortega F, Uring-Lambert B, Réville P, et al. Immunogenicity of intraperitoneal insulin infusion using programmable implantable devices. *Diabetologia* 1995;38:577-84.
- Fineberg SE, Kawabata TT, Finco-Kent D, Fountaine RJ, Finch GL, Krasner AS. Immunological responses to exogenous insulin. *Endocr Rev* 2007;28:625-52.
- Sapin R. The interference of insulin antibodies in insulin immunometric assays. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:705-8.
- Arnqvist H, Olsson PO, von Schenck H. Free and total insulin as determined after precipitation with polyethylene glycol: analytical characteristics and effects of sample handling and storage. *Clin Chem* 1987;33:93-6.
- Hanning I, Home PD, Alberti KG. Measurement of free insulin concentrations: the influence of the timing of extraction of insulin antibodies. *Diabetologia* 1985;28:831-5.
- Hara K, Tobe K, Uchigata Y, Nakazono M, Yasuda K, Terauchi Y, et al. Antibody-mediated insulin resistance treated by cessation of insulin administration. *Intern Med* 2000;39:143-5.
- Koyama R, Nakanishi K, Kato M, Yamashita S, Kuwahara H, Katori H. Hypoglycemia and hyperglycemia due to insulin antibodies against therapeutic human insulin: treatment with double filtration plasmapheresis and prednisolone. *Am J Med Sci* 2005;329:259-64.
- Kim MR, Sheeler LR, Mansharamani N, Haug MT, Faiman C, Gupta MK. Insulin antibodies and hypoglycemia in diabetic patients. Can a quantitative analysis of antibody binding predict the risk of hypoglycemia? *Endocrine* 1997;6:285-91.