



리포솜 면역측정법을 이용한 CH50 검사의 유용성에 대한 재평가

Re-evaluation of the Utility of the CH50 Test Using Liposome Immunoassay

이 준^{1,2} · 전래희^{1,2} · 김신규²Jun Lee, M.D.^{1,2}, La-He Jearn, M.D.^{1,2}, Think-You Kim, M.D.²한양대학교병원 진단검사의학과¹, 한양대학교 의과대학 진단검사의학교실²Department of Laboratory Medicine¹, Hanyang University Seoul Hospital, Seoul; Department of Laboratory Medicine², Hanyang University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: This study aimed to evaluate whether the 50% hemolytic complement (CH50) is a suitable screening test to investigate complement activity by comparing its liposomal immunoassay-based results with C3 and C4 values and determine if it meaningfully reflects changes in the complement system.

Methods: A retrospective study was conducted on 35,908 test samples that were simultaneously evaluated using C3, C4, and CH50 assays. Liposomal immunoassay was used for CH50 test, and rate nephelometry or immunoturbidimetry was used for C3 and C4 tests. The CH50, C3, and C4 results were divided into low, normal, and high groups for comparison and analysis. The distribution of C3 and C4 measurements according to the three different CH50 groups was analyzed.

Results: Of the 35,908 cases, the C3 and C4 results were decreased in 19,051 (53%) and 14,666 (41%) cases, respectively. However, CH50 results were decreased in 6,257 cases (17%), which were lower than those for C3 and C4. A statistically significant difference was observed in the distribution of C3 and C4 values among different CH50 groups ($P < 0.001$).

Conclusions: The CH50 test based on the liposome immunoassay does not sensitively reflect the decrease in C3 and C4. However, it tends to show a better decrease at low concentrations proportional to the decreased amount of C3 and C4. Hence, it can be useful for severe complement deficiency screening. Therefore, there are limitations with the use of the CH50 test alone for the screening of complement activity, and care should be taken during result interpretation.

Key Words: CH50, Liposome immunoassay, Complement, C3, C4

서론

보체 검사는 일반적으로 감염과 자가면역질환, 약물 또는 다양한 원인으로 생긴 보체의 변화를 측정하거나, 환자의 보체 결핍이

Corresponding author: La-He Jearn, M.D., Ph.D.

<https://orcid.org/0000-0002-6712-3895>

Department of Laboratory Medicine, Hanyang University Seoul Hospital, Hanyang University College of Medicine, 222-1 Wangsimni-ro, Seongdong-gu, Seoul 04763, Korea

Tel: +82-2-2290-8978, Fax: +82-2-2290-9193, E-mail: lhchun@hanyang.ac.kr

Received: September 23, 2020

Revision received: October 12, 2020

Accepted: October 19, 2020

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

© 2021, Laboratory Medicine Online

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

있는지를 확인하기 위해서 시행한다[1, 2]. 임상에서 흔하게 사용되는 보체 정량 검사로는 전신홍반루푸스(systemic lupus erythematosus)의 진단 및 추적검사에 사용되는 C3, C4 검사가 있다.

그리고 보체 단백질의 기능과 양에 대한 검사를 모든 종류에 대해 처음부터 평가하기는 힘들기 때문에 전반적인 기능을 확인할 수 있는 고전 경로 보체활성검사인 50% hemolytic complement (CH50) 검사가 선별검사로 주로 사용되고 있다[3]. CH50 검사방법으로는 전통적으로 사용되는 변형된 Mayer 법과 검사방법이 상대적으로 간편한 리포솜 면역측정법(liposome immunoassay)과 효소면역측정법이 있으며[4], 현재 많은 검사실에서는 검사방법의 편의성으로 리포솜 면역측정법을 채택하여 검사하는 경우가 많다.

그러나 CH50 검사가 보체의 활성을 평가하는 기능검사로 사용되고 있음에도 불구하고, 실제로 CH50 검사가 보체활성에 따른 보체량의 증감을 민감하게 반영하고 있는가에 대한 연구는 시행한 예를 찾기 어려웠다. 흔히 측정되는 C3, C4 검사조차 CH50 검사

결과와의 연관성을 명확히 규명한 연구에 대해 확인하기 힘든 부분이 있었고, 더욱이 대량의 검사에 대한 비교 평가는 없었다.

본 연구에서는 리포솜 면역측정법을 이용한 CH50 검사 결과와 C3, C4 측정치의 비교를 통해 CH50 검사가 보체의 증감을 유의하게 반영하고 있는지에 대하여 확인하고, 해당 결과를 통해 CH50 검사가 보체기능의 선별검사로서 사용하기에 적절한지 그 유용성을 평가하고자 한다.

대상 및 방법

1. 대상

2017년 1월부터 2019년 12월까지 한양대학교병원에 내원한 환자 중 CH50 검사를 시행한 경우를 대상으로 후향적 연구를 진행하였다. 확인된 총 36,086건의 검사결과 중에서, C3, C4 측정치와의 비교를 위해 CH50 검사와 C3, C4 검사를 같이 시행한 35,908건의 검사를 대상군으로 선정하였다.

본 연구는 한양대학교병원 기관생명윤리위원회의 승인을 받아 진행되었다.

2. 측정 방법

CH50 검사는 상품화된 리포솜 면역측정법 시약(Autokit CH50, Wako Ltd, Osaka, Japan)을 이용하여, 자동분석기(Hitachi clinical analyzer 7600, Hitachi Ltd, Tokyo, Japan)로 제조회사의 지침에 따라 측정하였다. 참고범위는 31.6-57.6 U/mL이었다.

C3와 C4 검사는 비율비탁측정법(rate nephelometry)을 이용하여, 자동분석기(IMMAGE 800 Immunochemistry system, Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA)로 제조회사의 지침에 따라 검사하였다. 참고범위는 C3는 79-152 mg/dL, C4는 16-38 mg/dL이었다. 2018년 이후에는 면역혼탁측정법(immunoturbidimetry)을 이용하여, CH50 검사와 동일한 자동분석기(Hitachi clinical analyzer 7600)

로 제조회사의 지침에 따라 측정하였다. 참고범위는 C3는 76-139 mg/dL, C4는 12-37 mg/dL이었다(Table 1).

3. 자료분석

1) C3, C4 검사와 CH50 검사의 증감 결과 비교

C3, C4, CH50의 검사치를 감소, 정상, 증가의 3개군으로 나누어, C3, C4 결과와 CH50 결과를 군별로 비교하였다.

그리고, C3와 C4 검사기기 및 검사방법의 차이에 따라 다시 두 개의 Subgroup으로 나누어 분석하였다. 즉, C3, C4 검사와 CH50 검사가 다른 장비로 나누어 시행된 경우를 Subgroup 1으로, C3, C4 검사와 CH50 검사가 동일 장비에서 시행된 경우를 Subgroup 2로 세분하여 시행된 플랫폼 차이를 반영하였다(Table 1).

C3, C4 검사와 CH50 검사의 상관관계를 확인하기 위해 피어슨 상관계수로 분석하였다. 또한, 교차분석을 통한 카파 통계량을 이용하여 일치도를 확인하였고, Subgroup에 대해서도 동일하게 실시하였다.

2) CH50의 증감에 따른 C3, C4 결과값 분석

CH50의 증감에 따른 C3와 C4의 검사 결과값의 분포 및 사분위수를 확인하고, 각각의 분포를 boxplot으로 나타내었으며 맨 휘트니 검정으로 통계 분석하였다. 이 과정에서 분석을 위하여 측정 한 한계를 초과한 값들에 대하여 다음과 같은 값으로 수치화하였다: C3의 경우 <5.8 mg/dL을 5 mg/dL로, C4의 경우 <1.67 mg/dL을 1 mg/dL로, <1 mg/dL을 1 mg/dL로 소수점 아래를 버리는 방식으로 변환하였다.

통계 분석은 Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) 및 SPSS version 21 (IBM Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였다.

결 과

1. C3, C4 검사와 CH50 검사의 증감 비교 결과

C3, C4 검사와 CH50 검사의 증감 비교 결과를 Table 2에 제시하

Table 1. Characteristics of subgroups according to the method used for C3, C4, and CH50 assay

	Subgroup 1	Subgroup 2
Measurement of CH50, C3, C4	Separately in dual platform	Simultaneously in one platform
Test sample	Different sample	Same sample
CH50 Method	Liposome immunoassay	Liposome immunoassay
Reference range	31.6-57.6 U/mL	31.6-57.6 U/mL
C3 Method	Rate nephelometry	Immunoturbidimetry
Reference range	79-152 mg/dL	76-139 mg/dL
C4 Method	Rate nephelometry	Immunoturbidimetry
Reference range	16-38 mg/dL	12-37 mg/dL

Abbreviation: CH50, 50% hemolytic complement.

Table 2. The distribution of C3, C4, and CH50 results grouped into low, normal, and high values

	CH50, N (%)			r
	Low (N=6,257)	Normal (N=20,442)	High (N=9,209)	
C3 Low (N = 19,051)	5,942 (31.2)	11,847 (62.2)	1,262 (6.6)	0.649
Normal (N = 16,554)	313 (1.9)	8,582 (51.8)	7,659 (46.3)	
High (N=303)	2 (0.7)	13 (4.3)	288 (95.0)	
C4 Low (N = 14,666)	5,546 (37.8)	8,162 (55.7)	958 (6.5)	0.596
Normal (N = 20,657)	706 (3.4)	12,173 (58.9)	7,778 (37.7)	
High (N=585)	5 (0.9)	107 (18.3)	473 (80.9)	

Abbreviations: CH50, 50% hemolytic complement; r, Pearson's correlation coefficient.

였다. 전체 35,908건의 검사 중, C3는 19,051건(53%)에서 감소하였고, C4는 14,666건(41%)에서 감소하였다. 반면 CH50 결과는 6,257건(17%)에서 감소하여, C3와 C4의 감소율에 비해 낮은 비율로 감소하였다. CH50 감소군에서는, C3 감소군의 31%, C4 감소군의 38%에서만 CH50이 감소한 결과를 보였다.

코헨의 카파는 C3와 CH50, C4와 CH50에서 각각 0.086, 0.174로 매우 낮은 일치도를 보여주었으며($P < 0.001$), 피어슨 상관계수는 각각 0.649, 0.596으로 중등도의 상관관계를 보여주었다($P < 0.001$).

2. Subgroup별 C3, C4 검사와 CH50 검사의 증감 비교 결과

Subgroup별 C3, C4 검사와 CH50 검사의 증감 비교 결과를 Table 3에 제시하였다. Subgroup 1의 검사건수는 12,194건이었으며, 9,014건(74%)에서 C3가 감소하였고, C4는 7,915건(65%)에서 감소하였다. 반면 CH50은 2,079건(17%)에서 감소하여, C3와 C4의 감소결과에 비해 낮은 비율로 감소하였다. CH50 검사결과는 C3 감소군의 23%, C4 감소군의 25%에서만 감소한 것에 불과하였다.

Subgroup 2의 검사건수는 23,714건이었으며, 10,037건(42%)에서 C3가 감소하였고, C4는 6,751건(28%)에서 감소하였다. 반면 CH50은 4,178건(18%)에서 감소하여, C3와 C4의 감소결과에 비해 낮은 비율로 감소하였다. CH50 검사결과는 C3 감소군의 39%, C4 감소군의 52%에서만 감소한 것에 불과하였다.

Subgroup 1에서, 코헨의 카파는 C3와 CH50, C4와 CH50에서 각각 -0.013, 0.045로 매우 낮은 일치도를 보여주었으며($P < 0.001$), 피어슨 상관계수는 0.701, 0.588로 중등도의 상관관계를 보여주었다($P < 0.001$). Subgroup 2에서, 코헨의 카파는 C3와 CH50, C4와 CH50에서 각각 0.153, 0.262로 매우 낮은 일치도를 보여주었으며($P < 0.001$), 피어슨 상관계수는 0.689, 0.622로 중등도의 상관관계를 보여주었다($P < 0.001$).

3. CH50의 증감에 따른 C3, C4 측정치 분석

CH50의 증감에 따른 C3, C4 측정치 분석 결과를 Fig. 1에 제시

하였다. C3의 중앙값은 CH50 증가군에서 95 mg/dL, 정상군에서 73 mg/dL, 감소군에서 48 mg/dL로 차이를 보였으며, 각 군 간의 C3 측정치 분포 또한 통계적으로 유의한 차이가 있었다($P < 0.001$). CH50 검사치가 정상범위에 속하더라도, 58.0%에서 C3의 값이 감소된 것을 확인하였다.

C4의 중앙값은 CH50 증가군에서 22 mg/dL, 정상군에서 15 mg/dL, 감소군에서 6 mg/dL로 차이를 보였으며, 각 군 간의 C4 측정치 또한 통계적으로 유의한 차이가 있었다($P < 0.001$). CH50 검사치가 정상범위에 속하더라도, 40.0%에서 C4의 값이 감소된 것을 확인하였다.

각 Subgroup과 전체 검사군 모두에서 CH50의 증가에 따라 중앙값도 증가하는 경향을 보였다. 하지만 CH50 정상군에서의 C3, C4 각각의 중앙값이 각 검사의 정상 범위의 하한치에 가깝게 형성된 것을 확인하였다. 이러한 경향은 Subgroup 1, 2 모두에서 동일하게 관찰되었다. 다만 한 장비로 측정된 Subgroup 2에서는 CH50 정상군에서의 중앙값이 정상범위 내에 포함되었다. 맨 휘트니 검정을 통해 CH50 증가, 정상, 감소에 따른 C3와 C4 결과값의 분포가 유의하게 차이는 것을 확인하였다($P < 0.001$).

고찰

보체의 경우 검사의 불안정성은 이전 연구들에 의해 지적되어 왔고[5-8], CH50 검사 방법 간의 결과를 비교한 논문은 있으나[4], 정작 CH50 검사결과가 보체의 감소를 얼마나 정확하게 반영하는지에 대한 연구는 충분하지 못한 상황이다. 본 연구에서는 3년간의 대량의 데이터를 통해 CH50 검사와 보체량 측정 검사와의 실제적 연관성을 확인하였다.

저자들은 CH50 검사가 각 보체의 감소를 반영하여, CH50 결과의 분포가 C3와 C4 결과의 분포와 유사할 것으로 예상하였으나, C3와 C4가 감소한 집단에서 CH50이 감소한 집단의 비율이 각각 31.2%, 37.8%에 그쳤다. 이는 다소 예상하지 못한 결과로서 CH50

Table 3. The distribution of C3, C4, and CH50 results grouped into low, normal, and high values in subgroups

		CH50, N (%)									
		Subgroup 1					Subgroup 2				
		Low (N=2,079)	Normal (N=7,232)	High (N=2,883)	Total (N=12,194)	r	Low (N=4,178)	Normal (N=13,210)	High (N=6,326)	Total (N=23,714)	r
C3	Low	2,062 (22.9)	6,013 (66.7)	939 (10.4)	9,014	0.701	3,880 (38.7)	5,834 (58.1)	323 (3.2)	10,037	0.689
	Normal	17 (0.5)	1,219 (38.6)	1,925 (60.9)	3,161		296 (2.2)	7,363 (55.0)	5,734 (42.8)	13,393	
	High	0 (0.0)	0 (0.0)	19 (100.0)	19		2 (0.7)	13 (4.6)	269 (94.7)	284	
C4	Low	2,014 (25.4)	5,042 (63.7)	859 (10.9)	7,915	0.588	3,532 (52.3)	3,120 (46.2)	99 (1.5)	6,751	0.622
	Normal	64 (1.5)	2,187 (51.7)	1,982 (46.8)	4,233		642 (3.9)	9,986 (60.8)	5,796 (35.3)	16,424	
	High	1 (2.2)	3 (6.5)	42 (91.3)	46		4 (0.7)	104 (19.3)	431 (80.0)	539	

Abbreviations : CH50, 50% hemolytic complement; r, Pearson's correlation coefficient.

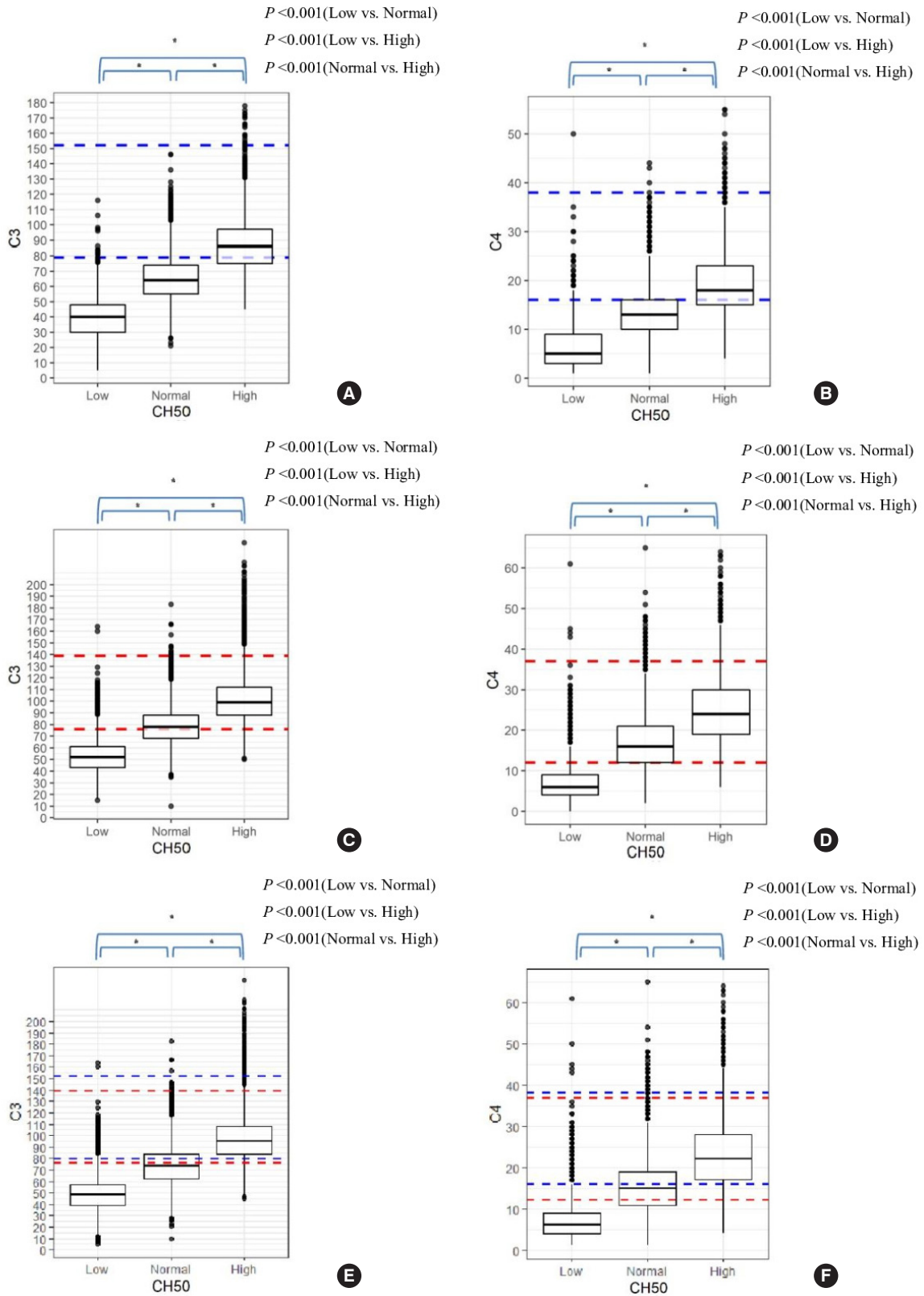


Fig. 1. The box plot and Man-Whitney comparison of C3 or C4 values with CH50 low, normal, and high groups in subgroup 1 (A), (B), subgroup 2 (C), (D), and total (E), (F).
Abbreviation: CH50, 50% hemolytic complement.

검사가 C3와 C4의 감소를 실제로 민감하게 반영하지 못하고 있음을 나타내고 있다. 다만, Subgroup 1에 비해 Subgroup 2에서, C3, C4의 감소를 CH50 검사에서 더 잘 반영하여, 플랫폼 변경에 따른 약간의 개선된 결과를 보여주었다. 그러나 여전히 절반이 넘는 비율에서 보체량 감소가 반영되지 못한 것은 여전히 한계이다.

또한, 전반적으로 C3, C4 검사와 CH50 검사의 증가, 정상, 감소 결과에 대해 서로 간에 낮은 일치도를 보였으며, 특히 Subgroup 1의 C3와 CH50의 코헨의 카파는 음수의 일치도를 보여, 검사 결과 간의 연관성이 매우 낮음을 보여주었다. Subgroup 2에서 Subgroup 1에 비해, C3와 C4 모두에서 일치도가 상승하여, 동일 플랫폼으로 검사를 진행하였을 때, 검사 결과 간의 일치도가 다소 개선된 것을 확인하였다.

이와 같은 저자들의 연구 결과로 미루어 볼 때 현재 널리 사용되는 리포솜 면역측정법으로 측정된 CH50 검사는 C3, C4 검사와 어느 정도의 상관관계를 보이는 하나, C3, C4가 소량 감소하는 경우에는 정상범위를 잘 벗어나지 않아, C3와 C4의 감소를 민감하게 반영하기에는 미흡한 부분이 있다.

다만, Fig. 1의 결과에서 보여주듯이 CH50이 증가, 정상, 감소에 따라 C3와 C4 측정치가 비례적으로 낮아지는 분포도를 나타내고 증양값 또한 낮아지므로, C3, C4의 감소량에 비례하여 낮은 농도에서 더 뚜렷이 감소될 것으로 예측할 수 있는 점은 보체기능검사로써의 유용성을 일정 부분 보여주었다고 판단된다.

이러한 불일치 결과의 원인으로는 우선 검사원리상 사용되는 리포솜의 보체활성에 의한 lysis가 실제 혈액에서 일어나는 반응 정도를 동일하게 반영하지 못할 가능성, 혹은 검체 채취 후 보체의 불안정성으로 인한 상태 변화 등을 우선적으로 추정할 수 있을 것이다. 본 연구진은 이전 연구에서, 검체를 냉장보관 후 C3와 C4 검사를 시행하였을 때, 예상과 다르게 감소하는 것이 아니라 오히려 증가됨을 보고한 적이 있다[5]. 이처럼 보체 관련검사의 실제적 측면은 더 연구되어야 할 것이다.

본 연구의 한계점으로는 후향적 연구인 점과 그로 인해 주말 등의 이유로 검체의 보관과 검사의 지연이 된 경우도 포함되어 결과 분석에 영향을 미칠 수 있는 점, 그리고 변형된 Meyer 법과 본 검사실에서 사용하고 있는 리포솜 면역측정법을 비교 분석하지 못한 점 등이 있다. 하지만, 변형된 Meyer 법은 대용량 검사에 부적합하여 거의 사용되고 있지 않으며, 저자들이 분석한 3만5천여건의 방대한 데이터는 후향적 분석의 한계와 일부 지연 검체의 영향을 어느 정도 극복할 수 있으리라 판단한다. 그리고 무엇보다 실제 검사실에서 이루어지고 있는 현실을 반영한 결과를 제시하였다고 생각한다.

결론적으로, 현재 검사실에서 널리 사용되고 있는 리포솜 면역측정법에 의한 CH50 검사는 C3, C4의 감소를 민감하게 반영하지

못한다. 다만 C3, C4의 감소량에 비례하여 낮은 농도에서 더 뚜렷이 감소되는 경향을 보이므로 심한 보체결핍에서는 유용하게 사용될 수 있다. 따라서 CH50 검사를 단독으로 보체기능에 대한 선별검사로 사용하기에는 제한적이며 그 결과의 해석에 주의를 요한다.

요 약

배경: 리포솜 면역측정법을 이용한 CH50 검사 결과와 C3, C4 측정치의 비교를 통해, CH50 검사가 보체의 증감을 유의하게 반영하고 있는지에 대하여 확인하고, 해당 결과를 통해 CH50 검사가 보체기능의 선별검사로 사용하기에 적절한지 그 유용성을 평가하고자 하였다.

방법: C3, C4와 CH50 검사를 동시에 시행한 35,908건의 검사를 대상으로 후향적 연구를 시행하였다. CH50 검사는 리포솜 면역측정법으로, C3와 C4 검사는 비율비탁측정법 또는 면역혼탁측정법으로 측정하였다. CH50 결과와 C3, C4 결과를 감소, 정상, 증가군으로 나누어 비교 분석하였고, CH50 결과의 증감에 따른 C3, C4 측정치 분포를 분석하였다.

결과: 35,908건의 검사 중, C3는 19,051건(53%)에서 감소하였고, C4는 14,666건(41%)에서 감소하였다. 반면 CH50 결과는 6,257건(17%)에서 감소하여, C3와 C4의 감소율에 비해 낮았다. CH50 증가, 정상, 감소군 간에 C3와 C4 측정치 분포는 통계적으로 유의한 차이가 있었다($P < 0.001$).

결론: 리포솜 면역측정법에 의한 CH50 검사는 C3, C4의 감소를 민감하게 반영하지 못한다. 다만 C3, C4의 감소량에 비례하여 낮은 농도에서 더 뚜렷이 감소되는 경향을 보이므로 심한 보체결핍에서는 유용하게 사용될 수 있다. 따라서 CH50 검사를 단독으로 보체기능에 대한 선별검사로 사용하기에는 제한적이며 그 결과의 해석에 주의를 요한다.

이해관계

저자들은 본 연구와 관련하여 어떠한 이해관계도 없음을 밝힙니다.

REFERENCES

- Henry JB, McPherson RA, et al. eds. Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods. 22nd ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders, 2011:914-32.
- Ho A, Barr SG, Magder LS, Petri M. A decrease in complement is associated with increased renal and hematologic activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2001;44:2350-7.

3. Wen L, Atkinson JP, Giclas PC. Clinical and laboratory evaluation of complement deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:585-93.
4. Jaskowski TD, Martins TB, Litwin CM, Hill HR. Comparison of three different methods for measuring classical pathway complement activity. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6:137-9.
5. Lee ZY, Jearn LH, Park IK, Kim TY. Alterations of complement C3 and C4 levels in delayed testing. *Lab Med Online* 2014;4:152-6.
6. Yang S, McGookey M, Wang Y, Cataland SR, Wu HM. Effect of blood sampling, processing, and storage on the measurement of complement activation biomarkers. *Am J Clin Pathol* 2015;143:558-65.
7. Mollnes TE, Garred P, Bergseth G. Effect of time, temperature and anticoagulants on in vitro complement activation: consequences for collection and preservation of samples to be examined for complement activation. *Clin Exp Immunol* 1988;73:484-8.
8. Maguire OC, Curry MP, O'Gorman P, Parfrey N, Hegarty J, Cunningham SK. In vitro cold activation of complement shown by an overestimation of total complement 4: a study in patients with hepatitis C virus infection. *Ann Clin Biochem* 2001;38:687-93.