



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석 사 학 위 논 문

눈물 기질 금속단백분해효소 9
현장면역 검사의 실험적 검증계 명 대 학 교 대 학 원
의 학 과

김 하 립

김
하
립

지도교수 전 중 화

2
0
2
1
년

2
월

2 0 2 1 년 2 월

눈물 기질 금속단백분해효소 9 현장면역 검사의 실험적 검증

지도교수 전 중 화

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2 0 2 1 년 2 월

계 명 대 학 교 대 학 원

의학과 안과학 전공

김 하 립

김하림의 석사학위 논문을 인준함

주 심 이 동 철

부 심 전 종 화

부 심 강 경 태

계 명 대 학 교 대 학 원

2 0 2 1 년 2 월

감사문

본 논문을 제출하기까지 바쁘신 일정 중에서도 많은 가르침을 주신 전종화 지도교수님과 심사위원을 맡아주신 이동철 교수님, 강경태 교수님께 감사의 마음을 드립니다.

또한, 연구를 진행하며 많은 도움을 준 손명진 선생님, 이현교 박사님, 그리고 늘 저를 위해 기도해주시는 부모님께 감사드립니다.

2021년 2월

김 하 림

목 차

1. 서 론	1
2. 재료 및 방법	3
3. 성 적	10
4. 고 찰	22
5. 요 약	26
참고문헌	27
Abstract	34
국문초록	36

표 목 차

<표 1> 서로 다른 샘플 농도와 용량에서 inter-assay와 intra-assay coefficient of variation	21
--	----

그림 목차

<그림 1> 분석 프로토콜과 키트 구성 요소 및 명칭	5
<그림 2> 농도계에 의해 평가된 농도-밴드 밀도 관계	11
<그림 3> MMP-9 면역분석의 시간 의존성 평가 및 용매량 의존성 양상	14
<그림 4> MMP-9 면역분석의 부피 의존성	18
<그림 5> 재현성을 위한 실험 및 데이터	20

1. 서 론

Tear Film & Ocular Surface Society와 Dry Eye Workshop II에 의해 최근 새롭게 개정된 안구건조증(Dry eye disease)의 정의는 안구건조증 환자의 악순환을 유발하는 눈물막 불안정성과 삼투압 상승, 안구 표면 염증 및 손상을 강조하고 있다(1,2). 안구건조증의 기본 진단방법에는 눈물막 파괴 시간, 쉬르머 테스트, 증상 점수 설문지, 플루오레세인 또는 리사민 그린을 이용한 세극등현미경 검사가 있다. 그러나 이러한 전통적인 진단방법은 검사자의 주관이 개입될 가능성이 크고 특이성이 부족하며 낮은 재현성으로 안구건조증을 정확히 진단하는데 어려움이 있다. 또한, 눈물 삼투압의 상승과 안구 표면 염증이 안구건조증의 새롭게 떠오르는 중요한 지표이지만 과거의 진단방법은 이러한 병리 생리학적 요인을 반영하지 못하고 있다(3).

최근, 눈물 삼투압과 안구 표면 염증 측정을 위한 눈물 matrix metalloproteinase 9(MMP-9)의 농도를 객관적으로 측정하기 위해 두 가지 진단방법이 도입되었다(4-6). 그중 하나인 InflammaDry는 눈물에서 활성 및 잠재적인 형태의 인간 MMP-9을 검출하도록 설계된 일회용 면역분석법이다(7). InflammaDry 제조사에 따르면 10 μ L의 눈물량으로 40 ng/mL 이상의 MMP-9을 검출하여 10분 이내에 안구건조증을 진단할 수 있다고 제시하고 있다. 일반적으로 MMP-9은 손상된 각막 표면 세포외기질 리모델링에 관여하며 무균성 각막 궤양, 눈의 알레르기 반응, 화상, 원추각막, 익상편, 결막이완증, 안검염 및 안구건조증의 병인과 관련이 있는 것으로 알려져 있다(8-15). 또한, 안구건조증이나 원추 각막의 경우 눈물 내 MMP-9 수치가 상승되어 있을 때 점안 사이클로스포린 안약과 같은 항염증 치료제의 사용을 고려할 수 있다(8,16). MMP-9 현장 면역검사는 일종의 측방 유동 면역분석법(lateral flow immunoassay, LFIA)이기 때문에 InflammaDry는 LFIA와 유사한 기본 특성을 가진다. 임상적 관점에서 보면, 상당수의 임상 안과의사들은 밴드 밀도가 안구 표면의 염증 중증도를 직접 또는 간접적으로 나타내는 것인지에 대해 의문을 가지고 있는데 LFIA는 일반적으로 정량적 결과를 제공할 가능성이 있으므로 InflammaDry

가 MMP-9의 농도를 기반으로 정량적 결과를 생성하는지를 확인하는 것도 중요하다. InflammDry의 결과가 MMP-9의 눈물 내 농도를 정량적으로 반영할 수 있다면 이는 염증의 경중을 판단하는 데 결정적인 역할을 할 수 있으며 단순한 진단을 넘어 안구건조증 환자의 치료결과를 판단하는데 중요한 정보를 제공할 수 있다.

또한, 안구건조증의 심한 임상 징후와 증상에도 불구하고 쇼그렌 증후군(17) 또는 안구 이식편대숙주병(18)과 같은 수성 눈물 결핍 건성 안에서 음성 결과를 나타내기 때문에 검사 중 희미한 테스트 라인(붉은색)에 대한 임상적 해석은 모호할 수 있다. 그러므로 눈물의 양이 변함에 따라 키트의 결과가 어떻게 변하는지 정확히 확인하는 것은 중요하다 할 수 있다. 또한, 키트 지침에 따르면 처음 10분 후에 결과를 읽고 초기 결과가 음성이면 추가로 10분 후를 관찰해야 한다고 제안하고 있는데, 이는 시간 경과에 따라 키트의 반응이 어떻게 변하는지 정확히 파악할 필요가 있음을 제시한다. 따라서 본 연구는 검사 후 경과 시간, 샘플의 농도, 샘플 용량이 결과에 미치는 영향을 조사하여 InflammDry를 실험적으로 검증하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 기기 및 시약:

MMP-9 면역분석 키트(InflammaDry)는 Quidel Corporation사의 제품을 사용하였다. 재조합 인간(Recombinant human, rh) MMP-9의 활성 형태는 BioLegend®에서 구매했다(550502, San Diego, CA, USA). 100 µg/mL rhMMP-9을 phosphate buffered saline(PBS)으로 계대희석하여 12.5, 25, 50, 100, 200, 500 및 1000 ng/mL의 활성 rhMMP-9을 포함하는 샘플을 생성하였다.

2.2. 실험 절차:

2.2.1. 분석 프로토콜:

샘플의 용량이 면역분석 결과에 미치는 영향을 파악하기 위해 0, 12.5, 25, 50, 100, 200, 500 및 1000 ng/mL 농도의 rhMMP-9을 10과 20 μ L 용량으로 키트에 적용하였다. 각 샘플의 농도는 PBS용액으로 rhMMP-9의 스톡 용액을 2배 계대희석하여 얻었다. 샘플은 마이크로피펫을 사용하여 샘플 컬렉터(collector)의 샘플링 플리스(fleece)에 정확히 적용되었다. 샘플 컬렉터와 테스트 카세트를 조립한 후, 마이크로피펫을 이용하여 버퍼 300 μ L를 흡수 팁에 도포하였다. 분석 프로토콜은 그림 1에 요약하였다.

그림 1. 분석 프로토콜과 키트 구성 요소 및 명칭.

A

Experimental procedures

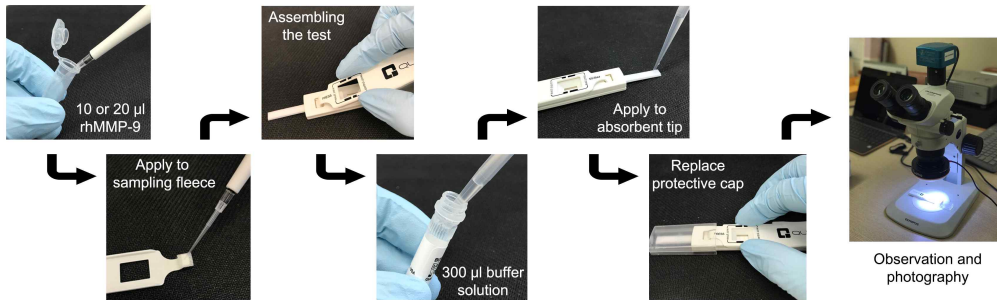


그림 1A. 분석 프로토콜.

B

Kit components and designations

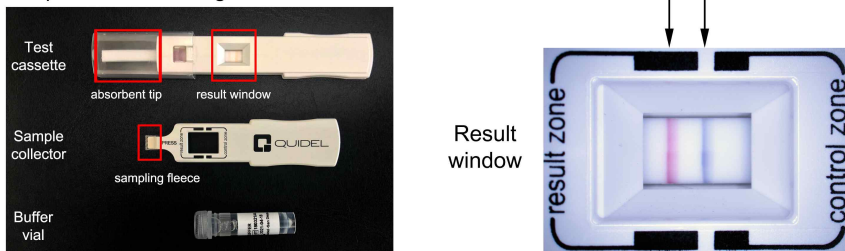


그림 1B. 키트 구성 요소 및 명칭.

2.2.2. 분석 결과의 시간 의존성:

시간 경과가 면역분석 결과에 미치는 영향을 알아보기 위해 스테레오 현미경 (SZ61TR, Olympus Corporation, Tokyo, Japan)을 사용하여 MMP-9 샘플을 키트에 적용 완료한 후 매 1분 간격으로 20분간 자동으로 결과 창을 촬영하였다. 모든 실험은 최소 세 번씩 반복 시행되었다. 실험실 내부와 현미경 광원의 조도를 조도계(TES1339 Light meter pro, TES Electronical Electronic Corporation, Taipei, Taiwan)로 측정했고 배경 조도는 400 Lux로, 현미경의 광원은 65000 Lux로 설정하였다.

2.2.3. MMP-9 밴드 밀도 측정:

각 이미지는 ImageJ(NIH, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 분석되었으며(19) 동일한 프로토콜을 사용하여 해석되었다. 촬영된 이미지는 흑백으로 변환하여 시계 방향으로 90도 회전하여 측정했다. 테스트 라인의 밴드 밀도 측정 면적을 관찰자가 같은 원칙에 따라 수작업으로 측정하였고 관찰자가 세 번 측정한 값에서 평균을 구하였다.

2.3. 검출한계평가:

2.3.1. 농도계에 의해 평가된 검출 한계:

분석의 검출 한계는 양성 테스트 라인(붉은색)을 생성하는 최저 농도로 정의하였다. 분석의 양성 테스트 라인 밴드 밀도 측정 플롯에서 피크가 검출되는 경우로 정의하였다.

2.4. 재현성:

2.4.1. 분석 간 변산성:

상용화된 MMP-9 현장검사는 분석 당 하나의 샘플만 사용할 수 있다. 따라서 분석 간 변산성을 평가하기 위해, 고농도(500 ng/mL) MMP-9 샘플을 포함하는 10 μ L와 저농도(200 ng/mL) MMP-9 샘플을 포함하는 20 μ L로 생성된 테스트 라인의 밴드 밀도를 측정하였다. 실험은 두 개의 별도 배치(batch)(Lot number 1804023, 샘플 컬렉터; Lot number 1805241, 테스트 카세트 및 Lot number 1804133, 샘플 컬렉터; Lot number 1805241, 테스트 카세트)를 사용하여 6일 동안 개별적으로 수행되었다. 12개의 서로 다른 분석에 사용된 12개의 샘플은 rhMMP-9의 여섯 개의 개별 분주로부터 얻은 것이다. 분석의 재현성은 키트 분석 능력의 일관성을 검증하는 데 필수적이기 때문에 변이계수(CV, %)는 다음과 같이 계산되었다.

$$\text{변이계수(CV, \%)} = \text{표준편차(SD)} / \text{평균} \times 100$$

2.4.2. 분석 내 변산성:

분석 내 변산성은 분석 간 변산성과 같은 프로토콜을 사용하여 실험하였으나, 단일 배치(Lot number 1804023, 샘플 컬렉터; Lot number 1805241, 테스트 카세트)만 사용되었고 같은 날 6번 반복 시행되었다. CV 또한 앞서 설명한 바와 같이 계산되었다.

2.5. 데이터 처리 및 통계:

통계분석은 개별 실험에서 수집된 데이터를 사용하여 시행되었다. 선형 용량-반응 패턴을 확인하기 위해 결정계수 R^2 을 사용하였고 용매에 의한 밴드 밀도 변화를 평가하기 위해 independent t-test를 사용하여 데이터를 분석하였다. 통계분석은 SPSS 버전 12.0(IBM, Chicago, IL, USA)을 사용하여 수행되었고 $p < 0.05$ 에서 통계학적 유의성을 검증하였다.

3. 성 적

3.1. MMP-9 농도가 양성 및 밴드 밀도에 미치는 영향:

3.1.1. ImageJ에 의한 검출 한계 분석 및 밴드 밀도 측정:

rhMMP-9을 10 μ L의 샘플 용량으로 키트에 적용하였을 때 각각 10분 및 20분 경과에서 모두 50 ng/mL의 농도에서부터 양성인 테스트 라인을 밴드 밀도 분석에서 확인할 수 있었다(그림 2A). 또한, 10 μ L의 샘플 용량을 적용하였을 때 각 농도에 따른 밴드 밀도의 결과는 선형 용량-반응 패턴을 보여주었다(그림 2C). rhMMP-9을 20 μ L의 용량으로 키트에 적용한 경우, 25 ng/mL의 농도에서부터 10분과 20분째 분석에서 모두 양성인 테스트 라인이 밴드 밀도 분석에서 검출되었다(그림 2B). 테스트 라인의 밀도는 10분과 20분에서 500 ng/mL 농도의 샘플까지 선형 증분 패턴(Linear incremental pattern)을 보였다(10분에서 $R^2=0.8529$, 20분에서 $R^2=0.8707$, 그림 2D). 반면 500 ng/mL 이상의 농도를 키트에 적용하였을 때 밴드 밀도는 포화하여 그 이상 증가하지 않았다(그림 2D). 그림 2의 E와 F는 각각 10분, 20분에 상이한 농도의 rhMMP-9(10 μ L, 20 μ L의 샘플 용량에서)에서 MMP-9 면역분석을 시각적으로 보여준다.

그림 2. 농도계에 의해 평가된 농도-밴드 밀도 관계.

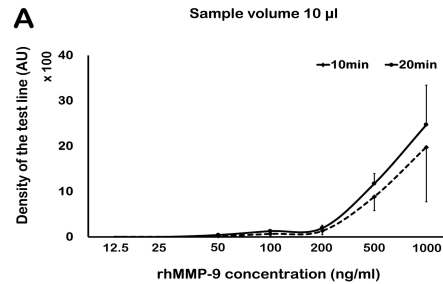


그림 2A. 10 μ L의 rhMMP-9를 사용하여 50 ng/mL 이상의 농도에서 양성 테스트 라인을 검출.

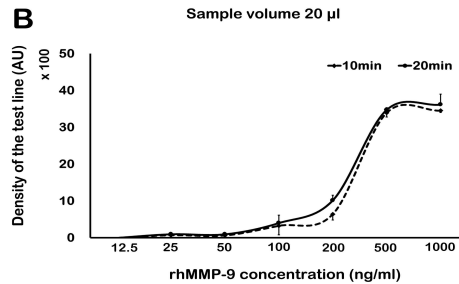


그림 2B. rhMMP-9 20 mL를 사용했을 때, 25 ng/mL 농도에서 양성 밴드가 검출 됨.

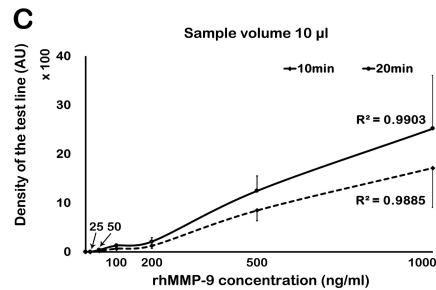


그림 2C. 10 μ L의 rhMMP-9를 사용하였을 때, 선형 용량-반응 관계(Linear dose-response relationship)를 보임(continued).

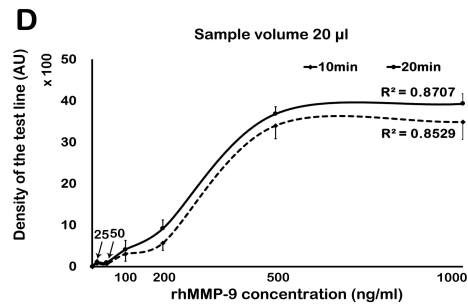


그림 2D. 20 μ L의 rhMMP-9를 사용하였을 때 500 ng/mL까지 선형 용량-반응 패턴을 보이다가 500 ng/mL 이상에서는 밴드 밀도가 포화되어 더 이상 증가되지 않는 양상을 보임.

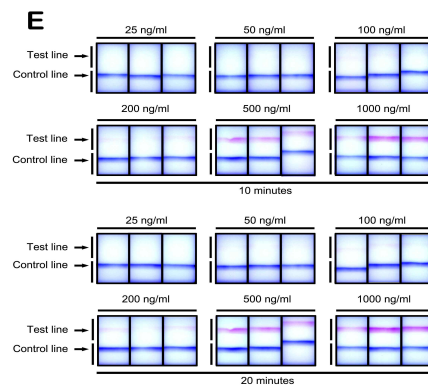


그림 2E. 10분과 20분에 MMP-9 면역분석 결과, 10 μ L의 샘플에서 rhMMP-9의 다른 농도의 대조와 테스트 라인의 촬영된 이미지.

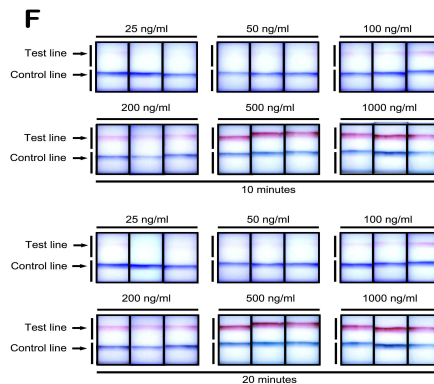


그림 2F. 10분과 20분에 MMP-9 면역분석 결과, 20 μ L의 샘플에서 rhMMP-9의 다른 농도의 대조와 테스트 라인의 촬영된 이미지.

3.2. 샘플의 양이 시간 경과에 따른 MMP-9 밴드 밀도의 변화에 미치는 영향:

샘플의 용량이 검사의 시간 경과에 따른 밴드 밀도에 미치는 영향을 확인하기 위해 10 μ L에서 200 ng/mL rhMMP-9과 20 μ L에서 100 ng/mL rhMMP-9의 두 가지 개별 실험 결과를 비교했다. 이는 동일한 용질의 rhMMP-9가 샘플 컬렉터에 적용되었으며 샘플의 용매량에만 차이가 있었다. 동일한 양의 용질이 적용되었지만, 측정된 밴드 밀도는 시간이 지남에 따라 상이한 결과를 나타냈으며 샘플 용량이 클수록 밀도가 빠르게 증가하며 높은 양상을 보였다. 200 ng/mL(10 μ L) 샘플을 적용한 결과는 20분까지 밴드 밀도는 완만하게 증가하며 약한 밴드를 보여주었다(그림 3A). 반면 100 ng/mL(20 μ L) 샘플의 결과는 20분에 더 높은 밴드 밀도를 보여주었고, 2분 후부터 즉각적으로 밴드가 관찰되었다(그림 3C). 또한, 시간에 대한 밴드 밀도의 그래프는 20분까지 곡선이 점차 평평해지는 전형적인 화학반응의 곡선을 보여주었다(그림 3B & 3D).

그림 3. MMP-9 면역분석의 시간 의존성 평가 및 용매량 의존성 양상.

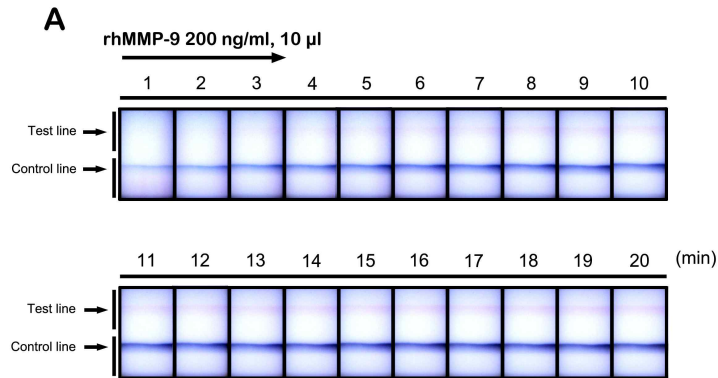


그림 3A. 밴드 밀도는 샘플의 양(용매량)이 더 많을 때 더 높은 양상을 보임. 샘플의 용매량이 많을수록 초기 측정에서부터 높은 밴드 밀도로 시작하여 이후 높은 수준으로 유지되는 양상을 보임.

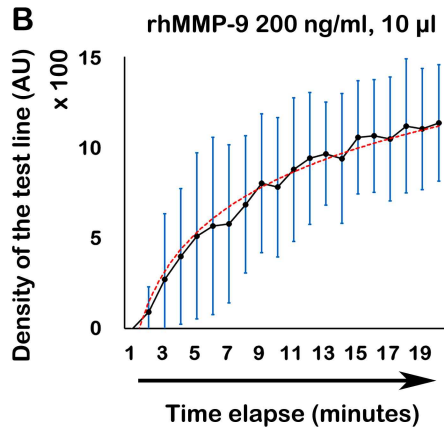


그림 3B. rhMMP-9 200ng/ml, 10 μ L 샘플의 시간에 따른 밴드 밀도의 증가 양상(continued).

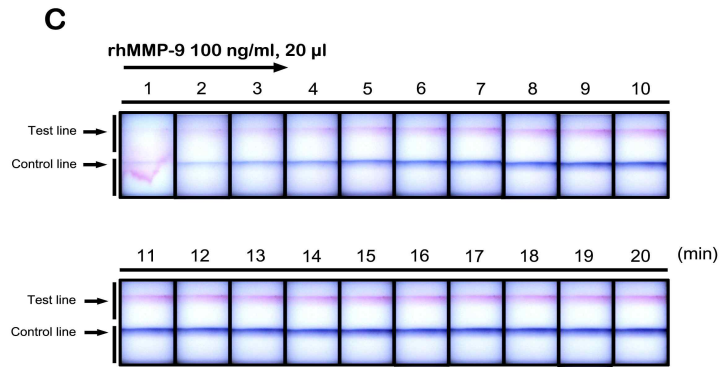


그림 3C. 분석에는 동일한 용질이 적용되었지만 샘플의 양이 많을수록 밴드 밀도 측정값이 더 높은 양상을 보임.

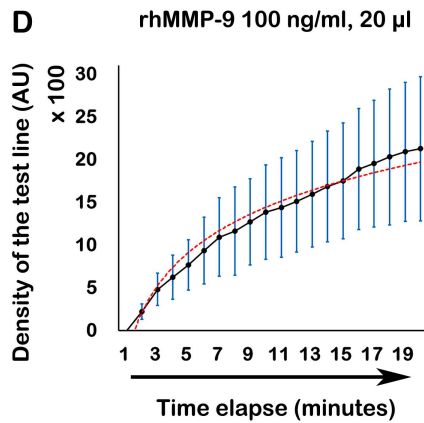


그림 3D. rhMMP-9 100ng/ml, 20 μ L 샘플의 시간에 따른 밴드 밀도의 증가 양상(continued).

E

10 min

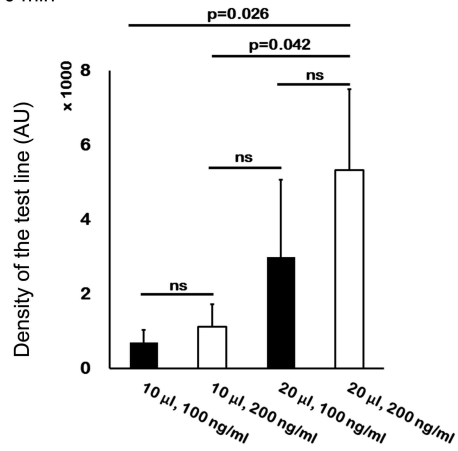


그림 3E. rhMMP-9 농도와 샘플 용량의 관계. 같은 농도이지만 샘플의 총량이 증가되면 밴드 밀도가 더 유의하게 증가하는 양상을 보임. 데이터는 평균 $\pm$ SD로 표시.

3.3. 용매의 양이 밴드 밀도에 미치는 영향:

용매의 양이 밴드 밀도에 미치는 영향을 평가하기 위해 10 μ L의 rhMMP-9 50 ng/mL와 10 μ L의 rhMMP-9 100 ng/mL를 사용하여 비교 실험을 진행했다. 각각의 실험은 10 μ L의 PBS를 샘플 컬렉터에 추가한 뒤 반복적으로 시행하였고 결과는 샘플 컬렉터에 10 μ L의 PBS를 추가하지 않고 50 ng/mL 및 100 ng/mL의 MMP-9을 사용한 실험에서 얻은 결과와 비교했다. 샘플 컬렉터에 10 μ L의 PBS를 추가하면 rhMMP-9 50 및 100 ng/mL를 포함하는 10 μ L 샘플의 밴드 밀도가 증가했다(그림 4A & 4B).

그림 4. MMP-9 면역분석의 부피 의존성.

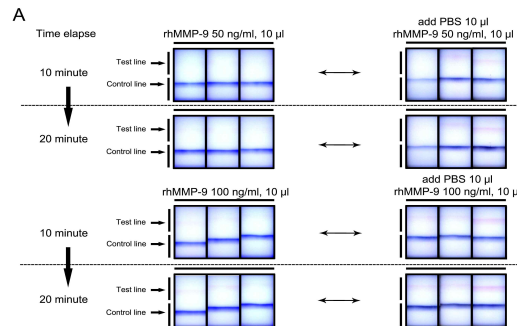


그림 4A. PBS 첨가 유무에 따른 MMP-9 면역분석의 시각적 양상의 차이.

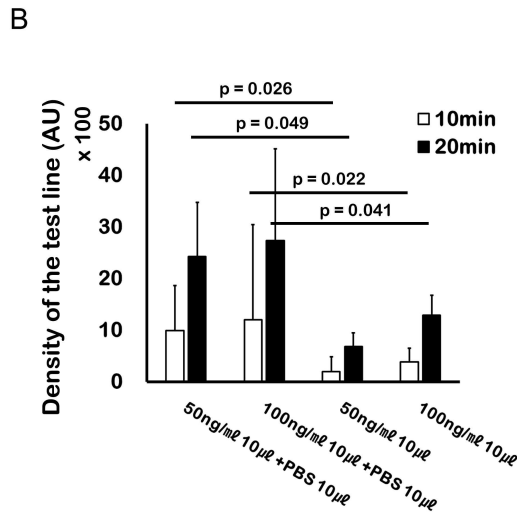


그림 4B. 샘플링 플리스에 10 µL의 샘플(50 또는 100 ng/mL의 rhMMP-9)을 처음 도포한 후 10 µL의 PBS를 추가. 추가된 PBS는 rhMMP-9의 밴드 밀도를 50 또는 100 ng/mL 증가시킴(n=3). 데이터는 평균 ± SD로 표시되고 paired t-test를 사용하여 평가.

3.4. MMP-9 면역분석의 재현성:

그림 5는 반복성 검증을 위한 시각적 표현과 계산된 매개변수를 보여준다. 계산된 분석 간 CV 최솟값과 최댓값은 28.4%와 39.4%였고, 분석 내 CV는 10분과 20분에 각각 24.7%, 51.4%로 나타났다(표 1).

그림 5. 재현성을 위한 실험 및 데이터.

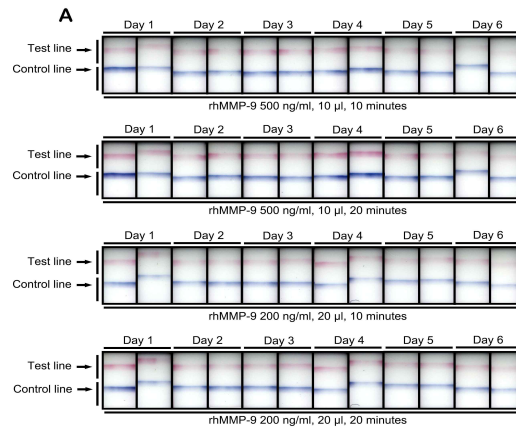


그림 5A. 서로 다른 샘플 농도와 용량(10 µL, 500 ng/mL rhMMP-9; 20 µL, 200 ng/mL rhMMP-9)에서 inter-assay의 정밀도를 평가하는 데 사용되는 MMP-9 면역분석의 시각적 외형.

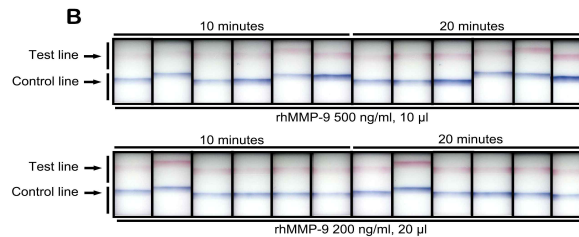


그림 5B. 서로 다른 샘플 농도와 용량(10 µL, 500 ng/mL rhMMP-9; 20 µL, 200 ng/mL rhMMP-9)에서 intra-assay의 정밀도를 평가하는 데 사용되는 MMP-9 면역분석의 시각적 외형.

표 1. 서로 다른 샘플 농도와 용량에서 inter-assay와 intra-assay coefficient of variation

Experiment	Sample volume ($\mu\ell$)	rhMMP-9 concentration (ng/ml)	Repeat	CV (%)	
				10 min	20 min
Inter-assay	10	500	12	38.2	39.4
	20	200	12	33.5	28.4
Intra-assay	10	500	6	51.4	41.6
	20	200	6	31.8	24.7

4. 고 찰

지난 수십 년간 안구건조증을 진단하는 다양한 진단법이 도입되었다. 현재까지 안구건조증의 진단과 분류는 증상과 징후에 의존했지만, 증상과 징후의 상관관계가 낮고 주관적 평가에 의한 편향이 발생하는 경향이 있었다(20,21). 따라서 안구건조증에 대한 표준화된 진단방법은 물론, 안구건조증 치료에 사용되는 약물의 치료 효능을 평가하는 보다 진보된 진단법의 확립이 필요하다(22). 이러한 이유로 안구건조증의 병리학적 변화를 기반으로 하는 눈물 고삼투압 및 눈물 MMP-9 현장검사(point-of-care test)가 주목을 받았다.

최근 안구건조증의 정성 진단을 위해 눈물 MMP-9 현장검사인 InflammDry가 도입된 이후 보고된 연구들에서는 본 검사가 안구건조증에 대한 정확한 진단을 제공한다고 제시했지만, InflammDry와 같은 눈물 기반 진단법은 제한된 눈물량에서 정확한 결과를 제시할 수 있어야 한다는 상당히 어려운 제한점이 있다(7,16,22,23). 특히 중증의 안구건조증 임상 양상을 보이는 쇼그렌 증후군, 안구 이식편대숙주병, 스티븐-존슨 증후군 등은 대부분 환자에서 눈물 분비가 극히 감소하여 추가적인 조작 없이 충분한 눈물 표본을 얻는 것이 매우 어렵다(24-28).

InflammDry는 직접적인 샘플링 미세 여과법을 기반으로 하는 일종의 측방 유동 면역분석법이다. LFIA는 시료 혼합물에서 특정 분석 물질을 검출하는 데 사용되는 종이 기반 플랫폼으로 샘플은 테스트 스트립에 배치되고 결과는 5-20분 이내에 표시된다(29). 이 검사는 소변, 타액, 땀, 혈액(30-33) 등 다양한 임상 샘플의 적용에 적합하며 특정 항원, 항체, 유전자 증폭제 등을 검출할 수 있다(34-36). 시료를 샘플 패드에 놓고 접합된 검출 항체와 접촉하면 항체는 표적 분석 물질과 결합하여 테스트 라인의 위치로 이동한다. 접합된 표적 분석 물질은 테스트 라인에서 항-분석 항체에 의해 포착된다. 이러한 유형의 분석은 액체 샘플에 대한 저렴하며 빠르고 간단한 현장검사 결과를 제공하지만, 소량 또는 샘플의 유형에 따라 분석

신뢰성이나 결과가 매우 상이하게 변화할 수 있다(29). InflammDry 면역 분석은 샘플링 플리스를 하안검 결막에 6-8회 두드린 후 추가로 5초간 부드럽게 눌러 플리스를 포화시키는 방식으로 진행된다. 아래 눈물 띠의 부피가 약 2.25 μL (37)인 것을 고려하면 이 지침은 적절한 것으로 판단된다. 10분 후 테스트 라인에서 양성을 확인하면 일차적인 결과를 해석할 수 있는데 임상 의사가 테스트 라인을 식별할 수 없는 경우, 키트의 사용지침서에는 해석을 진행하기 전에 추가로 5분에서 10분 정도 기다리도록 권장한다.

저자는 이 부분에서 몇 가지 의문을 가졌는데 첫 번째로, 밴드 밀도에 대해 양성으로 읽을 수 있는 농도 한계 기준의 정확성이다. 일관적이고 강한 양성 밴드는 쉽게 양성으로 해석할 수 있지만, 매우 희미한 밴드는 검사자의 주관에 따라 양성 또는 음성으로 다르게 해석될 수 있다. 두 번째는 샘플 수집 후 용매를 추가하면 밴드의 밀도가 더 높아지는가 하는 것이다. 또 농도계를 사용하여 밴드 밀도를 정량적으로 평가할 수 있는가 하는 점이다. 분석 결과가 신뢰할 수 있고 재현 가능한 정량적 정보를 제공하는 경우 임상 의사는 그 결과에 따라 다양한 항염증 치료를 시도할 수 있다.

본 연구에서 저자는 용질의 양이 같을 때 용매의 양이 다르면 다른 결과를 낼 수 있음을 발견하였다. 면역분석에서 rhMMP-9 10 μL (200 ng/mL)와 rhMMP-9 20 μL (100 ng/mL)를 테스트하였다. 분석 물질의 총량이 2ng으로 동일하기 때문에 밴드 밀도가 동일하여야 하지만, rhMMP-9 20 μL (100 ng/mL)의 밴드 밀도는 rhMMP-9 10 μL (200 ng/mL)의 두 배 가까이 증가된 결과를 보였다. 또한, 샘플 채취 후 샘플링 플리스에 10 μL 의 PBS를 추가하였을 때 테스트 라인의 밴드 밀도가 크게 증가하였다. 이러한 것에 대한 이유를 추정해 보면 LFIA에서 항원-항체 반응이 균등하게 일어나기 위해서는 샘플과 그 성분이 샘플링 플리스에 고르게 분포되어야 한다. 그러나 샘플의 양이 분석에 필요한 양보다 적으면 항원은 샘플링 플리스의 패드에 고르지 않게 흡수된다. 이 경우 항원-항체 반응의 효율성이 저하되고 비색 반응이 약해지게 된다. 따라서 샘플링 플리스에 용매를 첨가하면 샘플에 존재하는 MMP-9가 플리스의 패드에 고르게 분포되어 항원-항체 반응의 효

율이 높아져 좀 더 강한 비색 반응을 일으키게 된다(29). 이러한 결과는 두 가지를 시사하는데, 하나는 눈물의 양이 매우 적으면 눈물 내의 MMP-9의 농도가 높더라도 음성 또는 약양성의 결과가 나올 가능성이 크다는 것이다. 다양한 안구건조증 유형 중에서 쇼그렌 증후군, 안구 이식편대숙주병, 스티븐-존슨 증후군은 심각한 눈물 고갈을 유발하게 된다. 따라서 이러한 환자들에서 MMP-9 현장검사는 눈물 내 MMP-9의 농도가 높음에도 불구하고 음성 또는 매우 약한 양성 결과를 산출할 수 있다. 두 번째로, MMP-9 면역분석 수행 시 점안 마취제를 사용할 수 없으므로 각막과 플리스의 접촉으로 인한 통증으로 반사성 눈물분비를 유발할 수 있다. 이 경우 밴드 밀도가 인위적으로 증가하기 때문에 눈물 내 MMP-9의 농도가 40 ng/ml 이하라도 그 이상 농도의 밴드 밀도를 만들어 낼 수 있으므로 거짓 양성의 결과로 해석될 수 있다. 이러한 분석 시 부피 의존성은 정확한 해석을 위해 환자의 눈물 양 평가에 세심한 주의를 기울여야 함을 의미한다. 또한, 개인이 생성하는 모든 눈물 샘플의 양이 일관적이지 않기 때문에 분석에서 정량적 결과를 생성할 가능성은 거의 없다고 볼 수 있다(29,38). 본 연구의 실험 결과와 이전에 보고된 논문의 임상 결과(Lanza et al.)를 비교분석했을 때 안구건조증 그룹과 정상 그룹 간의 MMP-9 양성에 차이는 발견되지 않았던 것도 이러한 이유일 것으로 추측된다. 또 통계적으로 유의한 차이는 없었지만 MMP-9 면역분석 양성 그룹에 대한 쉬르머 테스트 점수가 음성 환자 그룹보다 높다는 것을 발견했다(39,40). 이러한 결과는 MMP-9 면역분석에서 생성된 양성 결과에서 눈물의 양이 중요한 역할을 한다는 것을 보여주는 본 연구의 결과와 일치한다.

이전 연구에서는 안구 표면 염증이 확인된 안구건조증 환자에서 항염증 치료에 대한 반응을 예측하기 위해 면역분석의 유용성을 조사하였다(16). 이 연구에서는 염증의 중증도를 구분하기 위해 밴드 밀도의 반정량적 평가를 사용했다. MMP-9 면역분석의 밴드 밀도가 안구 표면의 염증 정도에 비례하여 증가하는지 확실하지 않기 때문에 rhMMP-9의 정량적 측정 방법으로 농도계의 사용에 대하여 검토하였다. 10 μ L의 샘플량에 대한 분석 결과, 밴드 밀도는 선형 농도-의존적(Linear concentration-dependent) 증가

양상을 보였다. 그러나 밴드 밀도는 20 μL 의 샘플량에서 500 ng/mL 이상의 농도에서 완전히 포화 되었다. 이러한 테스트 라인에서 특정 농도를 초과하는 항-분석 항체의 완전 포화는 LFIA의 일반적인 한계점이다. 앞서 언급한 바와 같이 샘플의 양은 수집 방법이나 검사자의 숙련도, 기저질환 등에 따라 달라지기 때문에 밴드 밀도는 눈물 내 MMP-9의 정확한 농도를 반영하지 않는다. 게다가 우리의 결과는 낮은 재현성을 보여 샘플의 양을 세밀하게 통제하더라도 밴드 밀도가 MMP-9의 높거나 낮은 수준을 정확하게 반영하지 못한다는 것을 보여준다. 그러나 환자에게서 보인 강한 밴드는 높은 MMP-9 농도 또는 환자의 심한 안구 표면 염증의 존재를 간접적으로 시사하므로 신속한 항염증 치료가 뒤따라야 한다. LFIA 기반 테스트 장치는 질병 선별, on/off(양성/음성) 검사, 제한된 반정량적 평가를 위한 적절한 전략으로 인식되므로, 이러한 목적으로만 본 검사를 사용하는 것이 바람직하다.

InflammaDry 키트 지침은 반응 시간을 크게 강조하지 않는다. 그림 3과 같이, 20분간의 테스트 후에도 밴드 밀도의 지속적인 증가가 관찰되었다. 따라서 거짓 양성을 줄이기 위해 검사를 수행할 때 20분을 초과하지 않는 것이 적절할 수 있다.

검체의 부피 의존성으로 인해, 시판되는 눈물 MMP-9 면역분석법인 InflammaDry는 눈물의 MMP-9 농도에 대한 제한된 정량 정보를 제공한다. 샘플의 양은 일반적인 대상에서도 40 ng/mL 이상의 농도에서 MMP-9를 적절하고 정확하게 검출하는 데 가장 중요한 요소가 된다. 10 μL 미만의 눈물 샘플은 거짓 음성 결과를 생성할 수 있지만, 20 μL 이상의 눈물 샘플은 거짓 양성 결과를 생성할 수 있다. 따라서 임상적 결과의 정확한 해석을 위해서 눈물의 양이 중요하다는 점을 명심해야 한다.

5. 요약

안구건조증을 객관적으로 진단하기 위해 새롭게 개발된 InflammaDry는 눈물에서 활성형 및 잠재형 금속단백분해효소 9(Matrix Metalloproteinase 9, MMP-9)을 검출하도록 설계된 일회용 면역분석법이다. 이는 10 μ L의 눈물로 10분 이내에 40 ng/mL 이상의 MMP-9을 검출하여 안구건조증을 진단하게 되어 있다. InflammaDry가 MMP-9의 눈물 내 농도를 정량적으로 반영할 수 있다면 염증의 경중을 판단하는 데 효과적인 역할을 할 수 있으며 단순한 진단을 넘어 환자의 치료결과를 판단할 수 있다. 본 연구에서는 검사에 소요되는 시간과 MMP-9의 농도, 검체량이 검사의 결과에 미치는 영향을 조사하여 본 검사의 특성을 분석하고자 하였다.

재조합 인간(Recombinant human, rh) MMP-9를 PBS로 계대희석하여 각 농도의 rhMMP-9을 10, 20 μ L의 검체량으로 키트에 적용했다. 각 결과의 밴드 사진을 촬영하고 각 이미지는 ImageJ 프로그램으로 밴드의 밀도를 측정하였으며 동일한 프로토콜로 해석하였다.

10 μ L의 샘플량에서는 전형적인 선형 용량-반응 증가 패턴을 보였고 20 μ L의 샘플량에서는 선형 용량-반응 패턴을 보이다가 500 ng/mL부터 발색반응이 포화되는 양상을 보였다. 같은 용질의 rhMMP-9을 적용하였을 때 밴드 밀도는 용매의 양에 비례하여 유의하게 증가하였다. 또한, rhMMP-9의 용질의 양이 같더라도 용매의 양이 많으면 밴드 발색반응이 더 빠르게 일어났다.

본 연구에서는 샘플량이 검출 한계에 영향을 미친다는 것을 확인하였으며 용질의 양이 같지만, 용매의 양이 다르면 다른 결과가 도출됨을 발견하였다. 따라서 안구건조증 환자의 MMP-9 현장검사 시행 시 정확한 결과해석을 위해 환자의 눈물량을 반드시 고려하여야 한다.

참 고 문 헌

1. Bron AJ, de Paiva CS, Chauhan SK, Bonini S, Gabison EE, Jain S, et al.: TFOS DEWS II pathophysiology report. Ocul Surf 2017; 15: 438-510.
2. Craig JP, Nichols KK, Akpek EK, Caffery B, Dua HS, Joo CK, et al.: TFOS DEWS II Definition and Classification Report. Ocul Surf 2017; 15: 276-83.
3. Sambursky R, Davitt WF 3rd, Friedberg M, Tauber S: Prospective, multicenter, clinical evaluation of point-of-care matrix metalloproteinase-9 test for confirming dry eye disease. Cornea 2014; 33: 812-8.
4. Benelli U, Nardi M, Posarelli C, Albert TG: Tear osmolarity measurement using the TearLab Osmolarity System in the assessment of dry eye treatment effectiveness. Cont Lens Anterior Eye 2010; 33: 61-7.
5. Jacobi C, Jacobi A, Kruse FE, Cursiefen C: Tear film osmolarity measurements in dry eye disease using electrical impedance technology. Cornea 2011; 30: 1289-92.
6. Sambursky R, Davitt WF 3rd, Latkany R, Tauber S, Starr C, Friedberg M, et al.: Sensitivity and specificity of a point-of-care matrix metalloproteinase 9 immunoassay for diagnosing inflammation related to dry eye. JAMA Ophthalmol 2013; 13: 24-8.

7. Kaufman HE: The practical detection of mmp-9 diagnoses ocular surface disease and may help prevent its complications. *Cornea* 2013; 32: 211-6.
8. Shetty R, Ghosh A, Lim RR, Subramani M, Mihir K, Reshma AR, et al.: Elevated expression of matrix metalloproteinase-9 and inflammatory cytokines in keratoconus patients is inhibited by cyclosporine A. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015; 56: 738-50.
9. Aragona P, Aguenouz M, Rania L, Postorino E, Sommario MS, Roszkowska AM, et al.: Matrix metalloproteinase 9 and transglutaminase 2 expression at the ocular surface in patients with different forms of dry eye disease. *Ophthalmology* 2015; 122: 62-71.
10. Sakimoto T, Ohnishi T, Ishimori A: Simultaneous study of matrix metalloproteinases, proinflammatory cytokines, and soluble cytokine receptors in the tears of noninfectious corneal ulcer patients. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2014; 252: 1451-6.
11. Horwitz V, Dachir S, Cohen M, Gutman H, Cohen L, Fishbine E, et al.: The beneficial effects of doxycycline, an inhibitor of matrix metalloproteinases, on sulfur mustard-induced ocular pathologies depend on the injury stage. *Curr Eye Res* 2014; 39: 803-12.
12. Acera A, Vecino E, Duran JA: Tear MMP-9 levels as a marker of ocular surface inflammation in conjunctivochalasis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54: 8285-91.

13. Petznick A, Madigan MC, Garrett Q, Sweeney DF, Evans MD: Contributions of ocular surface components to matrix-metalloproteinases (MMP)-2 and MMP-9 in feline tears following corneal epithelial wounding. *PLoS One* 2013; 8: e71948.
14. Iovieno A, Lambiase A, Micera A, Stampachiacchiere B, Sgrulletta R, Bonini S, et al.: In vivo characterization of doxycycline effects on tear metalloproteinases in patients with chronic blepharitis. *Eur J Ophthalmol* 2009; 19: 708-16.
15. Chotikavanich S, de Paiva CS, Li de Q, Chen JJ, Bian F, Farley WJ, et al.: Production and activity of matrix metalloproteinase-9 on the ocular surface increase in dysfunctional tear syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50: 3203-9.
16. Park JY, Kim BG, Kim JS, Hwang JH: Matrix Metalloproteinase 9 Point-of-Care Immunoassay Result Predicts Response to Topical Cyclosporine Treatment in Dry Eye Disease. *Transl Vis Sci Technol* 2018; 7(5): 31.
17. Koczula KM, Gallotta A: Lateral flow assays. *Essays Biochem* 2016; 60: 111-20.
18. Giannaccare G, Pellegrini M, Taroni L, Bernabei F, Senni C, Grendele A, et al.: Corneal biomechanical alterations in patients with chronic ocular Graft Versus-Host Disease. *PLoS One* 2019; 14: e0213117.

19. Hartig SM: Basic image analysis and manipulation in ImageJ. Curr Protoc Mol Biol 2013; Chapter 14: Unit 14-15.
20. The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop [editorial]. Ocul Surf 2007; 5: 75-92.
21. Bartlett JD, Keith MS, Sudharshan L, Snedecor SJ: Associations between signs and symptoms of dry eye disease: a systematic review. Clin Ophthalmol 2015; 9: 1719-30.
22. Pinto-Fraga J, Enríquez-de-Salamanca A, Calonge M, González-García MJ, López-Miguel A, López-de la Rosa A, et al.: Severity, therapeutic, and activity tear biomarkers in dry eye disease: An analysis from a phase III clinical trial. Ocul Surf 2018; 16: 368-76.
23. Sambursky R: Presence or absence of ocular surface inflammation directs clinical and therapeutic management of dry eye. Clin Ophthalmol 2016; 10: 2337-43.
24. Chen Q, Zhang X, Cui L, Huang Q, Chen W, Ma H, et al.: Upper and lower tear menisci in Sjogren's syndrome dry eye. Invest Ophthalmol Vis Sci 2011; 52: 9373-8.
25. Kaye SB, Sims G, Willoughby C, Field AE, Longman L, Brown MC: Modification of the tear function index and its use in the diagnosis of Sjogren's syndrome. Br J Ophthalmol 2001; 85: 193-9.

26. Pathak M, Diep PP, Lai X, Brinch L, Ruud E, Drolsum L: Ocular findings and ocular graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation without total body irradiation. *Bone Marrow Transplant* 2018; 53: 863-72.
27. Qiu Y, Hong J, Peng R: Manifestation of Clinical Categories of Ocular Graft-versus-Host Disease. *J Ophthalmol* 2018; 2018: 6430953.
28. Jain R, Sharma N, Basu S, Iyer G, Ueta M, Sotozono C, et al.: Stevens-Johnson syndrome: The role of an ophthalmologist. *Surv Ophthalmol* 2016; 61: 369-99.
29. Phung L, Lollett IV, Goldhardt R, Davis JL, Young L, Ascherman D, et al.: Parallel ocular and serologic course in a patient with early Sjogren's syndrome markers. *Am J Ophthalmol Case Rep* 2017; 8: 48-52.
30. Moreno ML, Cebolla Á, Muñoz-Suano A, Carrillo-Carrion C, Comino I, Pizarro Á, et al.: Detection of gluten immunogenic peptides in the urine of patients with coeliac disease reveals transgressions in the gluten-free diet and incomplete mucosal healing. *Gut* 2017; 66: 250-7.
31. Carrio A, Sampedro C, Sanchez-Lopez JL, Pimienta M, Campoy P: Automated Low-Cost Smartphone-Based Lateral Flow Saliva Test Reader for Drugs-of-Abuse Detection. *Sensors (Basel)* 2015; 15: 29569-93.

32. Pacifici R, Farré M, Pichini S, Ortuño J, Roset PN, Zuccaro P, et al.: Sweat testing of MDMA with the Drugwipe analytical device: a controlled study with two volunteers. *J Anal Toxicol* 2001; 25: 144-6.
33. Schramm EC, Staten NR, Zhang Z, Bruce SS, Kellner C, Atkinson JP, et al.: A quantitative lateral flow assay to detect complement activation in blood. *Anal Biochem* 2015; 477: 78-85.
34. Boisen ML, Oottamasathien D, Jones AB, Millett MM, Nelson DS, Bornholdt ZA, et al.: Development of Prototype Filovirus Recombinant Antigen Immunoassays. *J Infect Dis* 2015; 212 Suppl 2: S359-67.
35. Nielsen K, Yu WL, Kelly L, Bermudez R, Renteria T, Dajer A, et al.: Development of a lateral flow assay for rapid detection of bovine antibody to *Anaplasma marginale*. *J Immunoassay Immunochem* 2008; 29: 10-8.
36. Rohrman BA, Leautaud V, Molyneux E, Richards-Kortum RR: A lateral flow assay for quantitative detection of amplified HIV-1 RNA. *PLoS One* 2012; 7: e45611.
37. Cerretani CF, Radke CJ: Tear dynamics in healthy and dry eyes. *Curr Eye Res* 2014; 39: 580-95.
38. Hsieh HV, Dantzler JL, Weigl BH: Analytical Tools to Improve Optimization Procedures for Lateral Flow Assays. *Diagnostics (Basel)* 2017; 7(2): 29.

39. Lanza NL, McClellan AL, Batawi H, Felix ER, Sarantopoulos KD, Levitt RC, et al.: Dry eye profiles in patients with a positive elevated surface matrix metalloproteinase 9 point-of-care test versus negative patients. *Ocul Surf* 2016; 14: 216-23.
40. Schargus M, Ivanova S, Kakkassery V, Dick HB, Joachim S: Correlation of Tear Film Osmolarity and 2 Different MMP-9 Tests With Common Dry Eye Tests in a Cohort of Non-Dry Eye Patients. *Cornea* 2015; 34(7): 739-44.

Experimental Evaluation of Tear Matrix Metalloproteinase 9 Point-of-care Test

Kim, Ha Rim

Department of Ophthalmology

Graduate School

Keimyung University

(Supervised by Professor Jun, Jong Hwa)

(Abstract)

This experiment, using by a commercially available tear MMP-9 in-situ immunoassay, validated the tear matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) point-of-care test and elucidate the characteristics of assay that could affect the results of its interpretation *in vitro*. To elucidate the effect of sample volume, 10 and 20 μ L of recombinant human (rh) MMP-9 diluents at concentrations of 0, 12.5, 25, 50, 100, 200, 500, and 1000 ng/mL were applied. Test line of result window was photographed with a stereomicroscope mounted camera at every minute for 20 minutes and each image was analyzed by ImageJ densitometry. After applying 10 μ L of test sample, all positive result of test lines were identified at 50 ng/mL concentration after 10 and 20 minutes. With 20 μ L of sample volume, all test line were identified

a concentration of 25 ng/mL by ImageJ after 20 minutes. With 10 μ L of sample volume, densitometry results of bands showed linear dose-response pattern. By 20 μ L sample, bands showed linear pattern increment until 500 ng/mL, but fully saturated after 500 ng/mL. MMP-9 in-situ immunoassay showed sample volume dependency on detecting same concentration of rhMMP-9. To interpret the result of MMP-9 in-situ immunoassay properly, tear volume must be regarded.

눈물 기질 금속단백분해효소 9 현장면역 검사의 실험적 검증

김 하 림

계명대학교 대학원

의학과 안과학 전공

(지도교수 전 종 화)

(초록)

본 저자는 눈물 MMP-9 현장검사를 실험적으로 검증하고 이의 결과 또는 해석에 영향을 미칠 수 있는 요인을 식별하고자 하였다. 이 실험은 상용화된 눈물 MMP-9 현장검사인 InflammDry 를 사용하여 수행되었다. 샘플의 용량에 의한 영향을 조사하기 위해 10 또는 20 μ L 용량의 rhMMP-9 을 0, 12.5, 25, 50, 100, 200, 500, 1000 ng/mL 농도로 키트에 적용하였다. 키트 결과창의 시험선(test line)을 입체현미경에 결합된 카메라를 통해 매분, 20 분까지 촬영하였고 각각의 이미지는 ImageJ 프로그램을 이용하여 분석하였다. 또한, 키트의 검출 한계와 분석 재현성도 함께 조사하였다. 50 ng/mL 농도의 rhMMP-9 10 μ L 를 키트에 적용하였을 때 ImageJ 밴드 밀도측정결과는 10 분, 20 분에 모두 양성으로 확인되었다. 10 μ L 의 MMP-9 을 농도별로 키트에 적용하였을 때 밴드 밀도측정계는 선형 용량-반응 패턴(Linear dose-response pattern)을

나타내었다. 20 μL 의 MMP-9을 농도별로 키트에 적용하였을 때 밴드 밀도 측정 결과는 500 ng/mL의 농도까지 선형 용량-반응 패턴을 보이다가 500 ng/mL부터 발색반응이 더 이상 증가하지 않는 포화 양상을 보였다. 동일한 용질을 포함하는 MMP-9 시약에서 용매의 양이 두 배가되었을 때 밴드 밀도의 측정 결과는 크게 증가하였다. 결론적으로 MMP-9 현장 면역검사의 밴드 밀도 측정 결과는 샘플의 양에 따라 크게 변동되는 양상을 보였고 임상적으로 MMP-9 현장 면역검사 결과를 해석함에 있어 눈물량에 주의를 기울여야 한다.