

## 혈청 N-mid osteocalcin과 intact osteocalcin의 상관성 및 검체 안정성 조사

정민권 · 임영애 · 곽연식 \*

아주대학교 의과대학 임상병리학교실

경북대학교 의과대학 의료정보학교실 \*

## Stability of Specimens for N-mid Osteocalcin and Intact Osteocalcin Assays and Correlation of Results between the Two Assays

Min Kwon Jung, Young Ae Lim, and Yun Sik Kwak \*

*Department of Laboratory Medicine, Ajou University School of Medicine, Suwon;*

*Department of Medical Informatics, Kyungpook University School of Medicine, Taegu \* , Korea*

**Background :** Serum osteocalcin has been known to be the marker of bone metabolism. N-MID™ Osteocalcin One Step ELISA (BioTech A/S, Denmark, for N-mid OC) measures intact osteocalcin (1-49 a.a.) including N-terminal midfragments (1-43 a.a.) whereas NovoCalcin® (Metra Biosystems, USA, for intact OC) measures intact osteocalcin. We evaluated the stability of specimens and the correlation both assays.

**Method :** We used the sera of 189-women over 40 years old for the correlation of N-mid OC and intact OC. The following specimens were prepared to evaluate the stability of specimens: whole blood and serum specimens were allowed to stand at ambient temperature for 0, 3 and 6 hours. Pooled sera from 3 apparently healthy individuals were stored at 4°C, -20°C and -70°C and were then subjected to be assayed in 0, 1, 2, 4 weeks after the storage. The assays were done in triplicate in a single analytical batch.

**Results :** The means±S.D. (ng/ml) of N-mid OC and intact OC were  $9.79 \pm 5.76$  and  $6.43 \pm 3.71$ , respectively. The correlation of both assays were as follows,  $r=0.79$  ( $P<0.005$ ), and  $[\text{intact OC}] = 0.51 \times [\text{N-mid OC}] + 1.45$ . The storage of whole blood samples at room temperature showed gradual decrease of results from both assays, i.e. 91% and 89% of baseline value 3 and 6 hours after for N-mid OC and 79% and 75% for intact OC. However, the serum samples were stable at room temperature for the same duration; 107% and 98% for N-mid OC and 94% and 103% for intact OC, respectively. The results of 1, 2 and 4 weeks after storage of serum specimens at 4°C showed a significant decrease; 76%, 62% and 54% for N-mid OC and 21%, 9% and 0% for intact OC; those at -20°C showed 110%, 108% and 77% for N-mid OC and 111%, 85% and 105% for intact OC; and those at -70°C showed 108%, 107% and 92% for N-mid OC and 108%, 95% and 110% for intact OC.

**Conclusions :** The results of serum N-mid OC correlate well with that of intact OC. The serum specimens were stable at room temperature for 6 hours, but whole blood samples were unstable. Therefore, serum should be separated without delay after phlebotomy. Serum should be frozen at -70°C for storage longer than 1 week.

**Key Words :** N-mid osteocalcin, Intact osteocalcin, marker of bone metabolism, stability, storage

## 서 론

Bone Gla-protein으로 알려진 osteocalcin은 골아구세포(osteoblast)에 의해 생성되어 골기질(bone matrix)로 들어가나, 일부는 혈중으로 분비된다. 최근 검사실에서는 면역학적인 방법을 이용하여 혈중 osteocalcin 농도를 측정, 골대사의 지표로서 널리 사용하고 있다[1-5]. 그러나 이렇게 골대사의 지표로서 이용되는 osteocalcin은 검체의 보관 온도에 따른 영향을 상당히 받는 불안정성 때문에 검사전 검체 취급에 주의를 요하여 왔다. Intact osteocalcin(이하 intact OC로 약함)은 실온에서 6-24시간 혈청이 보관된 경우 50-70%의 면역반응성 소실이 관찰되는 등 분석전 오차로 인해서 검사결과의 정확도와 재현성에 영향을 미친다고 하였다[6, 7]. 이는 49개의 아미노산으로 구성되어 있는 intact OC 중 COOH-terminal 부위인 44-49 아미노산이 실온 환경에서 쉽게 분해되어 43개 아미노산의 N-terminal midfragment OC로 나뉘어 지기 때문이다[8]. 또한 OC는 참고 물질을 사용해도 면역이질성(immunoheterogeneity)이나 calcium에 의존적인  $\alpha$ -helical 구조때문에 검사실간 또는 검사시약간 측정치의 차이를 보여 주기도 한다[1, 9, 10].

본 검사실에서는 원래 intact OC를 측정하고 있었으나, N-terminal midfragment (1-43 아미노산)와 intact OC가 함께 측정되는 OC(이하 N-mid OC) 검사를 새로 도입하게 되었다. 이에 저자들은 N-mid OC와 intact OC의 상관성을 조사하고, 검체 보관조건에 따른 이들의 안정성을 알아보다 적절한 검체 분리시간 및 보관방법을 설정하여 정확한 골대사 지표측정에 도움을 주고자 하였다.

## 대상 및 방법

1. N-mid OC와 intact OC의 상관성 조사 : 1998년 3월부터 8월의 기간동안 아주대학교 병원 건강진단센터를 방문하여 N-mid OC와 intact OC검사가 의뢰되었던 40세 이후의 여성 189명을 대상으로 하였다. 대상군의 평균연령은  $53.0 \pm 7.1$ 세로 최고연령은 76세이고 최저연령은 40세로 폐경 여부는 구분하지 않았다. SST\*진공채혈관(Becton Dickinson, USA)에 전혈을 채혈하여 혈액이 응고된 뒤 즉시 원심분리하여 얻은 혈청을  $-20^\circ\text{C}$ 에서 냉동보관하였다. 보관한지 일 주일 이내의 검체에서 N-mid OC와 intact OC를 동시에 측정하였고, 이들의 상관성 조사를 위해 상관계수와 회귀방정식을 구하였다.

### 2. N-mid OC와 intact OC의 검체의 안정성 조사

#### 1) 혈청 분리 전과 후의 실온방치에 따른 영향

65세의 폐경 후 여성 1명으로부터 3개의 진공채혈관에 전혈을

채혈한후 이중 1개는 혈액응고후 즉시 혈청 분리하여 냉장 6시간 보관후 세검으로 측정한 N-mid OC와 intact OC의 평균농도를 100%로 하였다(검체 A). 나머지 2개의 전혈은 혈청 분리전 실온 방치시간에 따른 농도변화를 알아보기 위하여 각각 실온에 3시간(검체 B), 6시간(검체 C) 방치후 원심분리하여 혈청을 얻었다. 또한 혈청 분리한 검체의 실온 방치시간에 따른 농도변화를 알아보기 위하여, 즉시 혈청 분리한 검체(검체 A)의 일부를 2개로 나누어 각각 실온에 3시간(검체 D), 6시간(검체 E) 보관한후 동시에 5개의 검체(A-E)를 대상으로 N-mid OC와 intact OC를 동일한 날에 각각 세검으로 측정하였다. 실온방치 이후 검사 전까지는 검체를 냉장보관하였다.

#### 2) 장기 보관 온도 및 기간에 따른 영향

55세 이상의 폐경 후 여성 3명으로부터 진공채혈관에 동시에 채혈한 전혈을 혈액응고후 즉시 원심분리하여 얻은 혈청을 혼합한 뒤 즉시 세검으로 측정한 N-mid OC와 intact OC의 평균농도를 100%로 하였다. 이 혼합한 혈청을 9개로 나누어 이를  $4^\circ\text{C}$ ,  $-20^\circ\text{C}$ ,  $-70^\circ\text{C}$ 에서 각각 1 주, 2 주, 4 주간 보관한 뒤에 다시 세검으로 재측정하여 장기 보관 온도와 기간에 따른 농도 변화를 조사하였다.

3. Osteocalcin 측정 : N-mid OC는 N-mid™ Osteocalcin One Step ELISA (Osteometer BioTech A/S, Copenhagen, Denmark, two-site ELISA using biotinylated monoclonal antibody and peroxidase conjugated monoclonal antibody) 시약을 사용하였고, intact OC는 NovoCalcin® (Metra Biosystems, Inc., CA, USA, competitive enzyme immunoassay) 시약을 사용하여 각 시약내에 포함된 시약설명서에 준하여 검사를 실시하였다. N-mid OC와 intact OC의 최저 검출한계는 각각 0.5 및 0.4 ng/mL 이었다.

4. 통계학적 방법 : 자료정리 및 분석은 microsoft Excel 97을 이용하였고, 상관성 조사시는 Pearson 상관계수를 구하여 상관분석 및 회귀분석을 하였으며  $P < 0.05$ 를 통계학적으로 의의가 있는 것으로 간주하였다. 연령대별 osteocalcin 농도의 차이가 있는지 알아보기 위하여 통계 프로그램인 SPSS (version 6.0)를 이용하여 Duncan의 다중비교(Duncan's multiple range test)를 시행하였다. 검체안정성 조사시는 의학통계프로그램인 MedCalc (version 4.20)를 사용하여 비모수적방법인 Mann-Whitney 검정을 시행하였다.

## 결 과

### 1. N-mid OC와 intact OC의 상관성 조사

189명의 N-mid OC와 intact OC의 평균과 표준편차는 각각  $9.79 \pm 5.76$  ng/mL,  $6.43 \pm 3.71$  ng/mL이었으며, 상관계수(r)는 0.79 ( $P < 0.005$ )로 유의한 상관관계를 보였다. N-mid OC와 intact OC의 회귀방정식은 [intact OC] =  $0.51 \times$  [N-mid OC] + 1.45로, N-mid OC는 intact OC의 약 1.5배정도의 측정치를 보여 비례오차가 있음을 알 수 있었다(Table 1, Fig. 1).

접 수 : 2000년 6월 5일

교 신 저 자 : 임영애

우) 442-721 경기도 수원시 팔달구 원천동 산 5번지

아주대학교 병원 임상병리과

전화 : 031-219-5786, FAX : 031-219-5778

Table 1. Serum osteocalcin levels according to the age in female

| Age   | N   | N-mid OC †  | Intact OC   |
|-------|-----|-------------|-------------|
| 40-45 | 189 | 1.87 ± 0.32 | 2.49 ± 0.05 |

\* p<0.05 compared to mean value from 40-45 age group (Duncan's multiple range test)

Abbreviations : OC, osteocalcin

† : osteocalcin including intact osteocalcin and N-terminal midfragment

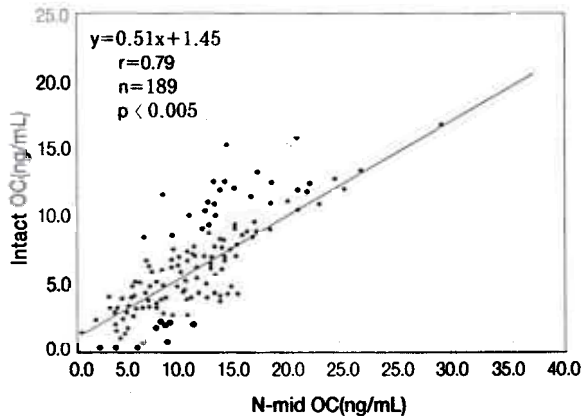


Fig. 1. Correlation between N-mid osteocalcin (OC) and intact osteocalcin (OC).

2. N-mid OC와 intact OC의 검체의 안정성 조사

1) 혈청 분리 전과 후의 실온방치에 따른 영향

전혈을 즉시 혈청 분리하여 냉장 6시간후 측정된 검체 A의 N-mid OC와 intact OC의 농도, 즉 N-mid OC 1.87 ± 0.32 ng/mL, intact OC 2.49 ± 0.05 ng/mL를 100%로 간주할 때 혈청 분리전 3시간 실온 방치한 검체 B와 6시간 실온 방치한 검체 C에서 각각 N-mid OC의 농도는 91% (1.71 ± 0.15 ng/mL, p > 0.1), 89% (1.67 ± 0.12 ng/mL, p > 0.1) 였으며, intact OC의 경우 79% (1.96 ± 0.59 ng/mL, p > 0.1), 75% (1.86 ± 0.54 ng/mL, p > 0.1)이었다. 즉시 혈청 분리후 냉장보관한 검체에 비하여 혈청 분리가 지연된 검체의 경우 실온 방치 시간에 비례하여 측정치가 감소하는 경향을 관찰할 수 있었으며 6시간 혈청분리가 지연된 검체의 경우 intact OC가 유의하게 감소하였다(Fig. 2).

전혈을 채혈 즉시 혈청 분리후 3시간 실온방치한 검체 D와 6시간 실온방치한 검체 E에서 각각 N-mid OC의 농도는 107% (2.00 ± 0.17 ng/mL, p > 0.1), 98% (1.84 ± 0.32 ng/mL, p > 0.1)이었고, intact OC는 94% (2.35 ± 0.13 ng/mL, p > 0.1), 103% (2.56 ± 0.23 ng/mL, p > 0.1)로 측정되어 혈청

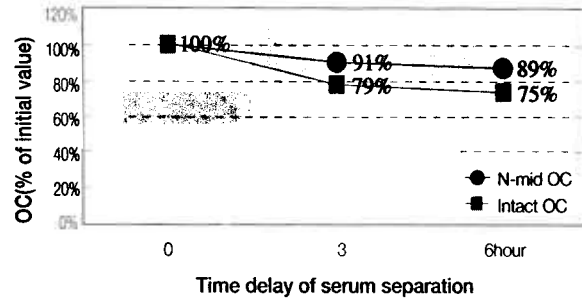


Fig. 2. Osteocalcin (OC) concentration change according to time delay of serum separation at room temperature(within-day run).

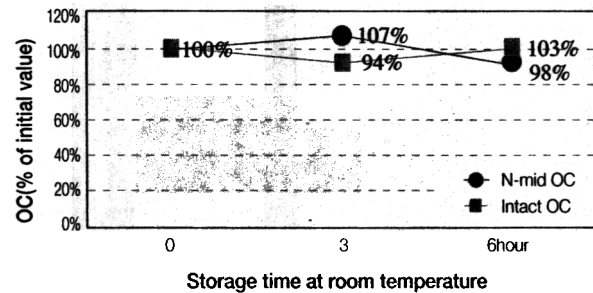


Fig. 3. Osteocalcin (OC) concentration change according to storage at room temperature after serum separation (within-day run).

분리후 6시간까지는 냉장보관한 검체와 비교하여 N-mid OC와 intact OC 모두 안정된 결과를 보여주었다(Fig. 3).

2) 장기 보관 온도 및 기간에 따른 영향

전혈을 채혈 즉시 원심분리하여 얻은 3명의 혈청을 혼합한 뒤 즉시 측정된 N-mid OC와 intact OC의 농도는 각각 17.55 ± 0.88 ng/mL, 13.83 ± 1.00 ng/mL로써 이를 각각 100%로 간주하였다. 4℃, -20℃, -70℃에서 각각 1주간, 2주간, 4주간 보관한 뒤에 다시 재측정한 결과를 비교하였다. 4℃에서 N-mid OC는 1주 경과시 76% (13.25 ± 0.61 ng/mL, p < 0.1), 2주 경과시 62% (10.88 ± 0.63 ng/mL, p < 0.1), 4주 경과시 54% (9.45 ± 0.13 ng/mL, p < 0.1)로 감소하였고, intact OC는 1주, 2주, 4주 경과시 각각 21% (2.91 ± 0.37 ng/mL, p < 0.1), 9% (1.21 ± 0.36 ng/mL, p < 0.1), undetectable level까지 심하게 감소하였다. -20℃에서는 1주, 2주, 4주 경과시 각각 N-mid OC는 110% (19.3 ± 0.60 ng/mL, p < 0.1), 108% (18.94 ± 0.43 ng/mL, p > 0.1), 77% (13.47 ± 1.21 ng/mL, p < 0.1)이었고 intact OC는 111% (15.35 ± 2.36 ng/mL, p > 0.1), 85% (11.76 ± 1.06 ng/mL, p > 0.1), 105% (14.52 ± 1.41 ng/mL, p > 0.1)로 측정되었다. -70℃에서는 1주, 2주, 4주 경과시 각각 N-mid OC는 108% (18.88 ± 0.95 ng/mL, p > 0.1), 107% (18.78 ± 0.56 ng/mL, p > 0.1), 92% (16.09 ± 1.56 ng/mL, p > 0.1)였으며 intact OC는 108% (14.94 ± 2.60 ng/mL, p > 0.1), 95% (13.14 ± 0.58 ng/mL, p > 0.1), 110% (15.21

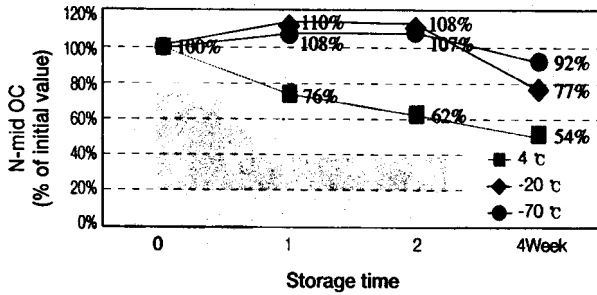


Fig. 4. Serum N-mid osteocalcin (OC) concentration change according to storage temperature and duration(mean between-day CV : 1.1%)

±2.55 ng/mL,  $p > 0.1$ )로 4°C, -20°C와 비교할 때 안정된 결과를 보여주었다(Fig. 4, Fig. 5).

4주 보관 동안 각각 실시하였던 정도관리물질의 검사일간 평균 변이계수는 N-mid OC가 1.1%(21.41±0.24 ng/mL), intact OC는 8.9%(20.50±1.82 ng/mL)이었다.

고 찰

대사성 골질환을 진단하거나 추적하기 위한 검사로는 골밀도 측정, 골생검 및 골대사의 생화학적 지표가 있다. 골밀도 측정은 측정당시의 골밀도만을 측정하기 때문에 정확한 골생성과 골흡수에 대한 역동학적인 정보를 제공해 주지는 못한다. 골생검이 이에 대한 정보를 준다 하여도 골생검 위치에 따라 결과에 영향을 미치고[11, 12], 조직 침습적인 방법이므로 일반적인 골다공증 환자의 치료시 추적검사로 사용하기에는 무리가 있어 그 이용이 제한되어 있다[1, 13]. 반면에 생화학적 지표들은 비침습적인 방법으로 손쉽게 골대사에 대한 정보를 제공하므로 골다공증 환자와 같은 골대사성 질환의 진단과 치료 및 추적검사에 널리 이용되고 있다. 골생성은 혈청내 골특이 alkaline phosphatase, osteocalcin, type I collagen extension peptide 등을 통하여, 반면 골흡수는 소변내 hydroxyproline, pyridinium cross-links, pyridinoline, deoxypyridinoline, 그리고 혈청내 tartrate-resistant acid phosphatase 활성도를 측정하여 간접적으로 알 수 있다[1]. 그중에서도 osteocalcin은 bone Gla-protein으로서 골아구세포에서 생성되는 비콜라겐성 단백질이고 골조직과 상아질(dentin)에 특이하다고 알려져 있다. 일단 새로이 합성된 부분은 혈중으로 분비되며 짧은 반감기를 갖고 신장에 의해서 배설된다. 따라서 혈청내 osteocalcin은 사춘기 골성장과 관련있으며 골대사가 증가되는 질환 즉, 원발성 및 이차성 부갑상선 기능항진증, 갑상선 기능항진증, 선단비대증(acromegaly), 파제트병(Paget's disease) 뿐만 아니라 만성 신부전, 일부 골다공증 등에서 혈중 농도가 증가되며 임신, 당류코르티코이드 치료 후나 갑상선기능저하증에서는 혈중 농도가 감소됨을 관찰할 수 있다[1, 14]. 또한 골생성과 골흡수가 균형을 이룰 때는 혈청 osteocalcin이 골대사의 유용한 지표이지만 균형을 이루지 못

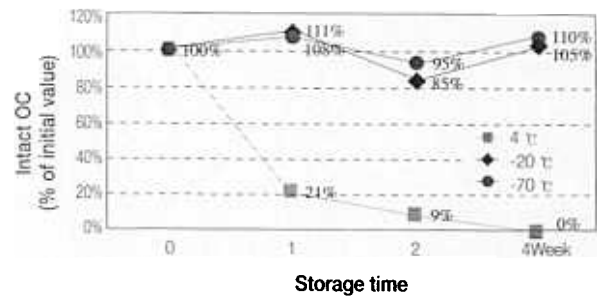


Fig. 5. Serum intact osteocalcin (OC) concentration change according to storage temperature and duration(mean between-day CV : 8.9%)

는 경우에는 골생성에 특이한 지표라는 보고도 있다[3, 15]

본 연구 결과 40세 이후의 189명 여성을 대상으로 측정된 혈청 intact OC 농도(6.43±3.71 ng/mL)는 97년 전 등이 보고한 40세 이후 한국인 여성에서의 혈청 osteocalcin의 농도 5.58±2.37 - 9.04±3.29 ng/mL와 유사하였다(Table 1)[16]. 본 연구에서는 대상을 폐경 전과 후 및 호르몬 치료 여부를 구분하지는 않았으므로 정확한 비교는 할 수 없으나, 95년 정 등[17]이 보고한 폐경 후 여성을 대상으로한 혈청 N-mid OC (22.4±0.9 ng/mL)와 intact OC (9.4±0.6 ng/mL) 농도를 비교했을 때는 본 연구 결과가 다소 낮게 측정되었다. 그러나 40세 이후 연령이 증가함에 따라 혈청내 osteocalcin의 농도가 증가하며 특히 폐경기가 시작되는 46-50세와 61세 이후 급격히 증가하는 추세를 보여주었다(Table 1). 폐경 후 여성에서는 에스트로젠 결핍으로 인하여 골의 remodeling과 골소실이 가속화 되며[18] 골다공증이 없는 정상 폐경 여성과 폐경 후 골다공증이 있는 여성 모두에서 혈청 osteocalcin이 증가한다고 한다[19, 20].

혈청의 osteocalcin은 3가지 다른 항원결정기(epitope)를 인식할 수 있는 단클론 항체를 사용하여 여러 가지 면역반응성이 결정될 수 있다. 49개의 아미노산으로 구성된 intact OC는 정상 성인의 혈청에서 총 면역반응성의 약 36%를 나타내며 새로이 합성된 osteocalcin의 19번과 20번 사이와 43번과 44번 아미노산 결합부위사이가 단백질 가수분해에 의해 분해되어 생성된 N-terminal midfragment (1-43 아미노산)가 약 30%, 1-19 (N-terminal), 20-43 (midfragment), 20-49 (mid-C-terminal) 아미노산으로 구성된 작은 분절이 그 나머지 1/3의 면역반응성을 나타낸다고 한다[14]. 이러한 분절의 분포는 골다공증환자와 파제트병환자에서도 유사하므로 분절이 골흡수동안에 골기질(matrix)에서 분비된 것이 아니라 효소분해에 의한 것임을 시사해준다[21, 22]. 또한 항체가 인식하는 항원결정기에 따라서 어떤 종류의 단클론항체나 다클론항체는 intact OC 뿐 만 아니라 분절까지 측정하기도 한다[23-25]. 이에 따라 동일한 검체라 할 지라도 사용한 시약이나 검사방법에 따라 상당히 다른 결과를 나타낼 수 있다[15, 26, 27]. 그러나 본 연구에서 N-mid OC와 intact OC의 상관관계수(r)는 0.79 ( $p < 0.005$ )로 비교적 좋은 상관관계를 보였으며 N-mid OC의 측정치는 intact OC 측정치의

약 1.5배 정도를 나타내는 관계를 보였다(Table 1, Fig. 1). 참고로 본원 검사실에서 사용하는 폐경전 여성의 intact OC의 참고치는 3.7 - 10.0 ng/mL이고 남성은 3.4 - 9.1 ng/mL이며 N-mid OC의 경우 폐경전 여성의 참고치는 10.3 - 23.3 ng/mL이며 남성은 10.5 - 23.7 ng/mL이다. 따라서 이러한 결과는 두 검사중 한가지 검사만으로도 나머지 검사의 결과를 예측할 수 있어 단독 측정만으로도 비용의 효율적인 면이나 의료비 상승예방의 면에서 유용하며, 또한 필요한 경우 두가지 검사를 모두 측정시에는 두 검사 결과간의 정확도나 신뢰도 점검시에도 도움을 줄 것으로 사료되었다.

혈청 osteocalcin의 농도는 검체보관시 자연적으로 분해되어 감소되는 것으로 알려져 있다[1]. 혈청분리에 따른 연구시는 1명에서 얻어진 검체만을 사용하여 결과 신뢰에 다소의 문제는 있을 수 있으나, 본 연구 결과 미리 혈청을 분리한 상태로 6시간까지는 실온 방치를 하여도 냉장보관한 검체에 비하여 N-mid OC가 98%, intact OC가 103%로 농도 차이가 거의 없었다(Fig. 3). Garnero 등[6]과 Banfi 및 Daverio[7]의 연구에 의하면 6-24시간 실온에서 혈청이 보관된 경우 intact OC의 50-70%의 면역반응성 소실이 관찰되는 불안정성을 보였다고 한다. 이러한 불안정성의 원인은 일차적으로는 6개의 아미노산으로 구성된 불안정한 COOH-terminal (44-49)이며, 이 구조는 실온상태에서 intact OC로부터 쉽게 떨어져 나가 N-terminal midfragment (1-43)을 형성하기 때문이다. 따라서 intact OC만을 측정하는 것보다는 N-terminal midfragment까지 측정하는 경우에 COOH-terminal 분해로 인한 영향을 덜 받을 수 있다[6, 8, 28]. Protease inhibitor 등을 사용하여 검체 보관온도와 기간에 따른 osteocalcin의 가수분해를 예방하거나 분해 속도를 늦추는 방법도 있다[6].

본 연구 결과 혈청을 분리하지 않은 채 전혈상태로 실온방치한 검체의 경우에는 시간이 지날수록 불안정하여 6시간이 지난 후에는 N-mid OC가 89%, intact OC는 75%까지 감소함을 관찰할 수 있었다. 혈청 분리를 지연시킴으로써 발생한 osteocalcin의 불안정성의 원인을 조사한 문헌이 없어 이에 대한 정확한 원인은 알 수 없었다. 본 연구에서 혈청 분리 전후의 실온방치에 따른 영향은 같은 시간에 검사를 실시하기 위하여 즉시 혈청 분리 후 6시간 냉장보관한 검체를 기본으로 조사하였으나, 혈청 분리 후 즉시 측정된 결과와 약간의 차이는 있을 것으로 여겨진다. 그러나 대부분의 검사실에서 환자 검체를 대상으로 검사를 시행하는 경우 일회 검사시마다 칼리브레이션을 시행하고 표준곡선을 작성해야 하므로 일정 수의 검체를 모은 후 실시하고 있다. 따라서 한 개의 검체마다 혈청 분리후 즉시 검사를 시행하는 것은 거의 불가능하므로, 본 연구의 혈청 분리후 6시간 동안의 냉장보관을 기본으로 한 것은 무리가 없는 것으로 여겨졌다.

장기간 검체 보관실험시 4주 보관 동안 각각 실시하였던 정도 관리물질의 검사일간 평균 변이계수는 N-mid OC가 1.1% (21.41±0.24 ng/mL), intact OC는 8.9%(20.50±1.82 ng/mL)였으며, 냉장온도에서 보관한 검체의 intact OC와 냉장

온도 및 -20℃에 보관한 검체의 N-mid OC는 불안정한 결과를 보여주었다. Intact OC의 경우 Mann-Whitney 검정 결과, -20℃에서 1주, 2주, 4주 모두 P value가 0.1보다 크므로 오히려 N-mid OC보다 안정된 결과값을 보였다. 그러나 본 연구의 intact OC의 CV는 N-mid OC보다 높으며, microplate well을 이용한 수기 면역법으로 인한 검사 오류의 가능성도 완전히 배제할 수는 없었으나, 이러한 결과의 차이가 단순히 OC의 intact form과 N-mid form 때문이 아닌 서로 다른 시약회사의 제품 특성상에서도 유래될 수 있을 가능성도 있으므로 매우 조심스러운 해석이 요구된다. 왜냐하면 비록 이러한 결과는 본 연구와 같이 온도에 따른 검체의 장기보관에 따른 보고가 거의 없었기에 비교할 수는 없으나, intact OC보다 N-mid OC이 실온에서는 검체의 안정성을 가지고 있다는 기존의 보고들[6, 7]과는 상이한 결과이기 때문이다. 또한 두가지 방법 모두에서 보관 1주시, 특히 N-mid OC에서는 유의한 차이까지 보였으나, 약 10%가량 오히려 증가한 결과를 보여주었다. 물론 microplate well을 이용한 수기 면역법으로 인한 검사 오류의 가능성도 완전히 배제할 수는 없으나, 1주까지는 검체가 비교적 안정하여 증발의 효과로 인하여 상대적으로 결과값이 증가하고, 시간이 증가하면 증발의 효과보다 검체의 불안정성이 더 커지기 때문이 아닌가 의심된다. 검체수도 적고, 이에 대한 비교 자료가 없어 정확한 원인 규명은 할 수 없었다. 따라서 상기에 언급된 문제들을 해결하기 위해서는 온도에 따른 장기보관에 관한 추가적인 연구가 더 진행되어야 할 것으로 여겨졌다. 반면 -70℃에서는 N-mid OC와 intact OC 모두 4주까지 비교적 안정된 결과를 보였다( $p>0.1$ ). 따라서 두 검사 모두 1주 이상의 장기간 검체보관시에는 -70℃에서 보관하는 것이 가장 바람직하다고 사료되었다.

실제로 임상에서 전혈을 채혈한 후 검사 시행전 검체 처리과정 및 보관 온도나 기간이 적절하지 않는 경우가 흔히 발생할 수 있으므로 정확한 osteocalcin의 농도를 측정코자 할 때는 반드시 검사시행전 검체 보관온도와 기간에 유의하여야 정확한 골대사 지표측정의 분석전 오차를 줄일 수 있다고 여겨진다.

## 요 약

배경 : 골대사의 지표인 osteocalcin(=OC)농도 측정시 intact OC는 1-49 아미노산을 측정하며, N-mid OC는 N-terminal midfragment (1-43 아미노산)와 intact OC까지 측정한다. 이에 저자들은 N-mid OC와 intact OC의 상관성과 검체보관조건에 따른 안정성을 알아보려고 하였다.

방법 : N-mid OC와 intact OC의 상관성 조사시는 40세 이후의 여성 189명에서 N-mid OC와 intact OC를 측정 비교하였다. 검체의 안정성 조사시는 1명의 혈청을 분리하여 냉장 6시간 후 보관한 결과와 혈청 분리 전, 후의 실온방치에 따른 영향을 알아보았다. 또한 3명의 혈청을 혼합 후 즉시 측정된 결과와 검체 보관 온도 및 기간에 따른 영향도 알아보았다. N-MID™ Osteocalcin one step ELISA (BioTech A/S, Denmark, N-

mid OC로 약함)와 NovoCalcin® (Metra Biosystems, USA, intact OC로 약함) 시약을 사용하였고, 안정성 조사시는 모두 세검으로 측정하였다.

결과 : N-mid OC와 intact OC의 평균과 표준편차는 각각  $9.79 \pm 5.76$  ng/ml,  $6.43 \pm 3.71$  ng/ml이었다. 두 검사간 상관 계수(r)는 0.79였으며( $p < 0.005$ ) 회귀방정식은  $[Intact OC] = 0.51 \times [N-mid OC] + 1.45$ 이었다. 즉시 원심분리하여 냉장 6시간 후 측정된 검체의 N-mid OC와 intact OC의 농도를 각각 100%로 하였을 때, 혈청 분리전 3시간, 6시간 실온방치한 검체에서 N-mid OC의 농도는 91%, 89%이었으며, intact OC는 79%, 75%로 혈청 분리전 시간이 지연됨에 따라 측정치가 감소하였다. 혈청 분리후 3시간, 6시간 실온방치한 검체에서 N-mid OC의 농도는 107%, 98%이었고, intact OC는 94%, 103%였다. 혈청을 혼합한 뒤 즉시 측정된 N-mid OC와 intact OC의 농도를 100%로 하여 1주간, 2주간, 4주간 보관한 뒤에 다시 측정한 결과 4℃에서 N-mid OC는 76%, 62%, 54%로 감소하였으며, intact OC는 21%, 9%, undetectable limit까지 심하게 감소하였다. -20℃에서 N-mid OC는 110%, 108%, 77%이었고 intact OC는 111%, 85%, 105%로 측정되었다. -70℃에서는 N-mid OC는 108%, 107%, 92%였으며 intact OC는 108%, 95%, 110% 였다.

결론 : N-mid OC와 intact OC는 비교적 좋은 상관관계를 보여 단독 측정만으로도 유용하다고 판단되었다. OC 측정시 검체 채취후 즉시 혈청 분리를 하여야 하고, 분리후에는 실온방치 6시간까지 보관가능하였으나, 1주 이상의 장기보관시는 -70℃에서 보관하는 것이 바람직하다고 사료되었다.

## 참 고 문 헌

1. Woo J, Henry JB. Metabolic intermediates and inorganic ions. In : Henry JB, ed. Clinical diagnosis and management by laboratory methods. 19th ed. Philadelphia : WB Saunders, 1996:177-8.
2. Blumsohn A, Hannon RA, Eastell R. Apparent instability of osteocalcin in serum as measured with different commercially available immunoassays. Clin Chem 1995;41:318-9.
3. Brown JP, Delmas PD, Malaval L, Edouard C, Chapuy MC, Meunier PJ. Serum bone Gla-protein: A specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis. Lancet 1984; i:1091-3.
4. Ismail F, Epstein S, Pacific R, Droke D, Thomas SB, Avioli LV. Serum bone Gla protein (BGP) and other markers of bone mineral metabolism in postmenopausal osteoporosis. Calcif Tissue Int 1986;39:230-3.
5. Price PA, Parthemore JG, Deftos LJ, Nishimoto SK. New biochemical marker for bone metabolism. Measurement by radioimmunoassay of bone Gla protein in the plasma of normal subjects and patients with bone disease. J Clin Invest 1980;66:878-83.
6. Garnero P, Grimaux M, Deguin P, Delmas PD. Characterization of immunoreactive forms of human osteocalcin generated in vivo and in vitro. J Bone Miner Res 1994;9:255-64.
7. Banfi G, Daverio R. In vitro stability of osteocalcin. Clin Chem 1994;40:833-4.
8. Rosenquist C, Qvist P, Bjarnason N, Christiansen C. Measurement of a more stable region of osteocalcin in serum by ELISA with two monoclonal antibodies. Clin Chem 1995;41:1439-45.
9. Hauschka PV, Lian JB, Gallop PM. Direct identification of the calcium-binding amino acid gamma-carboxyglutamic acid in mineralized tissue. Proc Natl Acad Sci USA 1975;72:3925-9.
10. Hauschka PV, Carr SA. Calcium-dependent  $\alpha$ -helix structure in osteocalcin. Biochemistry 1982; 21:2538-47.
11. Duda RJ, O' Brian JF, Katzmann JA, Peterson JM, Mann KG, Riggs BL. Concurrent assays of circulating bone Gla-protein and bone alkaline phosphatase: Effects of sex, age, and metabolic bone disease. J Clin Endocrinol Metab 1988;66:951-7.
12. Ashton-Key M, Gallagher PJ. The value of simple morphometric techniques in the diagnosis of osteoporosis. Path Res Pract 1992;188:616-9.
13. Bettical P, Moro L, Robins SP, Taylor AK, Talbot J, Singer ER, et al. Bone-resorption markers galactosyl hydroxylysine, pyridinium cross-links, and hydroxyproline compared. Clin Chem 1992;38:2313-8.
14. Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover: I. Theoretical considerations and clinical use in osteoporosis. Am J Med 1993;95(suppl 5A):S11-S15.
15. Delmas PD, Demiaux B, Malaval L, Chapuy MC, Edouard C, Meunier PJ. Serum bone gamma carboxyglutamic acid-containing protein in primary hyperparathyroidism and in malignant hypercalcemia: Comparison with bone histomorphometry. J Clin Invest 1986;77:985-91.
16. 전사일, 기창석, 김수정, 안중모, 김대원, 김종원. 중장년에서의 혈청 osteocalcin과 요 deoxypyridinoline의 연령 및 성별에 따른 변이. 대한임상병리학회지 1997;17:245-51.
17. 정윤석, 송민경, 박덕배, 김현만, 임영애, 곽연식, 이득주. 폐경 후 여성에서 생화학적 골대사지표 검사의 비교. 대한골대사학회지 1995;2:120-6.
18. Christiansen C, Riis BJ, Rodbro P. Prediction of rapid bone loss in post-menopausal women. Lancet 1987;1:1105-7.
19. Delmas PD, Stenner D, Wahner HW, Riggs BL. Serum bone Gla-protein increases with aging in normal women:

- Implications for the mechanism of age-related bone loss. *J Clin Invest* 1983; 71:1316-21.
20. Delmas PD, Wahner HW, Mann K, Riggs BL. Assessment of bone turnover in postmenopausal osteoporosis of serum bone Gla-protein. *J Lab Clin Med* 1983;102:470-6.
21. Garnero P, Grimaux M, Demiaux B, Preaudat C, Seguin P, Delmas PD. Measurement of serum osteocalcin with a human-specific two-site immunoradiometric assay. *J Bone Miner Res* 1992;12: 1389-98.
22. Garnero P, Grimaux M, Borei O, Seguin P, Delmas PD. Immunoreactive forms of circulating human osteocalcin. *J Bone Miner Res* 1992;7:S155.
23. Gundberg C, Weinstein RS. Multiple immunoreactive forms in uremic serum. *J Clin Invest* 1986; 77:1762-7.
24. Tracy RP, Andrianorivo A, Riggs BL, Mann KG. Comparison of monoclonal and polyclonal antibody-based immunoassays for osteocalcin. A study of sources of variation in assay results. *J Bone Miner Res* 1990;5:451-61.
25. Taylor AK, Linkart S, Mohan S, Chnstenson RA, Singer FR, Baylink D. Multiple osteocalcin fragments in human urine and serum a detected by a midmolecule osteocalcin radioimmunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70:467-72.
26. Power MJ, Fottrell PF. Osteocalcin: Diagnostic methods and clinical applications. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1991;28:287-335.
27. Diaz Diego EM, Guerrero R, de la Piedra C. Six osteocalcin assays compared. *Clin Chem* 1994;40:2071-7.
28. Dessauer A. Analytical requirements for biochemical bone marker assays. *Scand J Clin Lab Invest* 1997;57(Suppl 227):84-9.