

Original Article

방사면역 측정법에 의한 25-OH-VitD와 25-OH-VitD3의 비교 평가

서울아산병원 핵의학과

이영지 · 박지혜 · 임수연 · 천준홍 · 이선호

Comparative Evaluation of 25-OH-VitD and 25-OH-VitD3 by Radioimmunoassay

Young-ji Lee, Ji-hye Park, Soo-yeon Lim, Jun-hong Cheon and Sun-ho Lee

Department of Nuclear Medicine, ASAN Medical Center, Seoul, Korea

Purpose Vitamin D is essential for maintaining bone health, controlling cell proliferation or differentiation, strengthening immune function by controlling calcium metabolism in the body. Vitamin D deficiency can lead to increase the risk of rickets, osteoporosis, cardiovascular disease, diabetes and cancer. Especially, South Korea is one of the highest population proportion of vitamin D deficiency. Accurate determination of levels of 25-OH-VitD or 25-OH-VitD3 in blood serum is required for the diagnosis and treatment of vitamin D deficiency. In this study, radioimmunoassay of 25-OH-VitD and 25-OH-VitD3 was performed and compared to evaluate the effectiveness of Vitamin D radioimmunoassay.

Materials and Methods Serum 25-OH-VitD and 25-OH-VitD3 levels were measured using radioimmunoassay. The interrelationship, reproducibility and population distribution rate were evaluated. In addition, the internal quality control was performed at Asan Medical Center from April 2017 to June 2019 and the result of external quality control (Interagency proficiency evaluation) of first and second half of 2018 hosted by the Korean Society of Nuclear Medicine Technology (KSNMT). Both tests were measured by same manufacturer's reagent.

Results 25-OH-VitD showed a strong positive correlation on 97 samples, as $25\text{-OH-VitD} \times 0.9 + 0.3$ ($R > 0.9$). In repeated measurement, the average Diff(%) value of the reproducibility evaluation of 25-OH-VitD and 25-OH-VitD3 were 7.7% and 7.4%, respectively. Population distribution results showed no statistically significant differences ($p > 0.05$). The resultant value of internal quality control, which measured from April, 2017 to June 2019 in Blood test room of Nuclear Medicine at Asan Medical Center, showed average (CV%) 6.2% and 6.8%, respectively. As a result of the external quality control (interagency proficiency evaluation) Z value obtained under 2.0, as shown below;

Analytes	First half of 2018			Second half of 2018		
	Low	Medium	High	Low	Medium	High
25-OH-VitD	- 1.10	- 1.00	- 0.90	- 0.80	- 0.30	- 0.10
25-OH-VitD3	+ 0.22	+ 0.47	+ 1.10	- 0.01	+ 1.50	+ 1.30

Conclusion The interrelationship, reproducibility, population distribution rate, internal quality control and external quality control between 25-OH-VitD and 25-OH-VitD3 radioimmunoassay shows superior outcome. Radioimmunoassay, which can be alone measured in the blood as 25-OH-VitD or 25-OH-VitD3, is considered suitable screening tests for the diagnosis of vitamin D deficiency.

Key Words Radioimmunoassay, 25-OH-VitD, 25-OH-VitD3

• Received: October 12, 2019 Accepted: October 12, 2019
• Corresponding author: **Young-ji Lee**
• Department of Nuclear Medicine, ASAN Medical Center, Seoul, Korea
Tel: +82-2-3010-4574
E-mail: yjlee8702@naver.com

서 론

비타민D는 체내에서 칼슘 흡수를 촉진시키는 역할을 하여 뼈의 성장에 관여하고, 면역세포를 생산하는데 관여하여 면역기능을 강화하는데 도움을 줄 뿐만 아니라 세포의 증식 및 분화에도 기여하는 것으로 알려져 있다¹⁾.

골격을 유지하고 형성하는데 필수적인 비타민D가 부족하게 되면 유아에서 구루병이 유발되거나 성인에서 골다공증을 유발하게 되며, 천식이나 아토피 등과 같은 자가면역 질환의 위험성도 높아지는 것으로 알려져 있다.²⁾ 또한 심혈관계 질환, 당뇨병 등과 같은 만성질환 그리고 일부 암의 발병 위험도 증가하는 것으로 여러 논문에서 보고되어 있다³⁾.

이전 연구에 따르면 한국 여성의 경우 세대별로 비타민D 영양상태가 매우 취약한 것으로 보고되고 있으며⁴⁾, 비타민D 부족 환자가 계속해서 증가하고 있어 비타민D 보충제를 복용할 필요성이 증가되고 있다. 따라서 비타민D 부족에 따른 진단 및 치료를 위해 혈중 비타민D의 정확한 측정이 요구된다. 비타민D를 측정할 수 있는 방법으로 방사면역측정법(Radioimmunoassay, RIA), 화학발광면역측정법(Chemiluminescence Immunoassay, CLIA), 액체 크로마토그래피-고분해능 질량 분석법(LC-MS, Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) 등이 있으며 본 연구에서는 혈중 비타민D를 측정하는 25-OH-VitD와 25-OH-VitD3 두 검사를 방사면역측정법으로 비교 평가하여 비타민D에 대한 정확한 진단 및 치료에 기여하고자 한다.

실험재료 및 방법

1. 연구대상

2019년 6월부터 7월까지 서울아산병원에서 내원 혹은 입원한 환자 중 25-OH-VitD3 검사를 시행한 97명을 대상으로 25-OH-VitD3와 25-OH-VitD의 결과값을 분석하였다.

2. 비교 평가 방법

방사면역측정법(Radioimmunoassay, RIA)으로 측정하는 25-OH-VitD와 25-OH-VitD3의 결과를 SPSS 통계 프로그램을 이용하여 상관성, 재현성, 모집단 분포도를 비교 평가하였다. 또한 2017년 4월에서 2019년 6월까지 서울아산병원 핵의학과 혈액검사실에서 시행한 내부정도관리와

대한핵의학기술학회에서 주관하는 2018년 상반기, 하반기 외부정도관리(기관간 숙련도 평가)에 참여한 결과를 비교 평가하였다.

25-OH-VitD 검사는 25OH Vitamin D Total RIA KIT (DIAsource ImmunoAssays SA, Belgium), 25-OH-VitD3는 25OH Vitamin D3 RIA KIT(DIAsource ImmunoAssays SA, Belgium)를 사용하였으며, Microlab AT plus+2(Hamilton Company, USA)과 COBRA II (Pakard Instrument Co. Inc, USA)를 사용하여 결과값을 측정하였다.

3. 검사 방법

25-OH-VitD의 검사 과정은 다음과 같다. Coating tube에 standard, control, sample을 25uL 분주 후 buffer를 500uL 분주하여 실온에서 2시간 동안 480 rpm 조건으로 반응한다. 그다음 tracer를 50uL 분주 후 실온에서 1시간 동안 480 rpm 조건으로 반응한다. 마지막으로 washing solution으로 2회 세척 후 감마 카운터에 1분간 계측한다.

25-OH-VitD3의 검사 과정은 추출과 반응 단계로 나뉘며 추출 과정은 test tube에 standard, control, sample을 100ul 분주 후 아세토니트릴을 500uL 분주한 다음 7초 동안 충분히 mix 후 실온에서 1500g 조건으로 5분 동안 원심 분리하여 이루어진다. 추출 과정 후 획득된 상층액 100uL를 coating tube에 분주하고, buffer 400ul와 tracer 50uL 분주하여 실온에서 2시간 동안 480 rpm 조건으로 반응한다. 마지막으로 washing solution으로 2회 세척 후 감마 카운터에 1분간 계측한다(Table 1).

Table 1. Differences between 25-OH-VitD and 25-OH-VitD3 inspection methods

(검사명)	25-OH-VitD	25-OH-VitD3
원리	RIA	RIA
분리방법	Coated tube	Coated tube
검체	25uL	100uL
아세토니트릴	-	500uL
원심분리(추출)	-	1500g 5분
상층액	-	100uL
Buffer	500uL	400uL
반응시간	2시간	-
Tracer량	50uL	50uL
반응시간	1시간	2시간
세척	2회	2회
계측	1분	1분

결 과

1. 상관성

97개의 검체를 방사면역측정법으로 측정한 결과 25-OH-VitD와 25-OH-VitD3의 상관계수는 0.9176로 상관계수가 0.90 이상인 강력한 양의 상관관계를 보였다(Fig. 1).

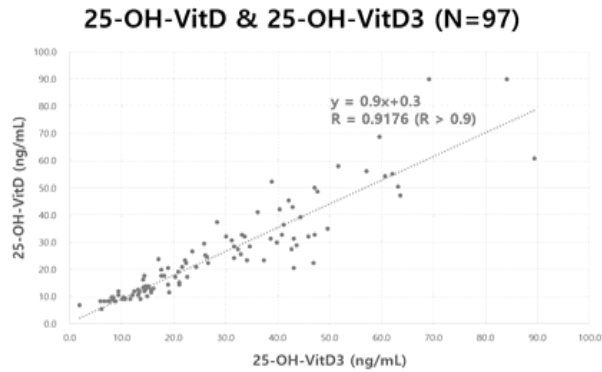


Fig. 1. Correlation between 25-OH-VitD and 25-OH-VitD3

2. 재현성

30개의 검체를 반복 측정하여 재현성을 평가한 결과 25-OH-VitD의 평균 diff(%) 값은 7.8%, 25-OH-VitD3는 7.5%으로 측정되었다. 두 검사 모두 재현성 평가의 평균 diff(%) 값이 10.0% 이하이므로 재현성이 우수한 것으로 판단된다(Table 2).

Table 2. Reproducibility results for 25-OH-VitD and 25-OH-VitD3

25-OH-VitD (ng/mL)		
No	1	2
1	4.9	4.9
2	5.9	5.0
3	7.4	7.1
4	5.7	6.8
5	11.5	11.7
6	10.4	9.2
7	7.8	7.2
8	15.6	15.3
9	15.6	14.5
10	13.9	14.0
11	18.9	19.1
12	5.7	6.3
13	20.5	21.4
14	16.3	18.0

15	17.2	19.7
16	28.7	23.9
17	16.3	15.3
18	13.2	18.6
19	26.0	28.2
20	29.6	30.9
21	21.5	22.2
22	30.8	33.4
23	36.3	39.6
24	33.5	35.6
25	38.6	40.5
26	35.6	34.8
27	32.3	34.2
28	37.7	39.7
29	76.6	76.6
30	108.0	118.0

25-OH-VitD3 (ng/mL)		
No	1	2
1	4.1	3.3
2	7.7	7.4
3	8.3	7.8
4	10.1	11.1
5	13.5	12.6
6	12.2	13.1
7	11.3	11.2
8	17.1	15.9
9	17.4	17.4
10	16.6	15.9
11	21.9	20.9
12	15.3	18.0
13	20.1	21.2
14	20.0	24.1
15	22.4	21.7
16	22.1	25.2
17	23.2	24.1
18	28.6	33.5
19	29.0	27.9
20	30.7	31.9
21	35.8	31.5
22	44.6	45.4
23	46.0	45.9
24	51.9	53.5
25	51.8	43.8
26	50.1	52.7
27	68.8	73.3
28	73.0	78.7
29	81.1	90.4
30	127.0	133.0

Table 3. Internal quality control results of 25-OH-VitD and 25-OH-VitD3

검사명	QC (CV%)	17년 04월	17년 05월	17년 06월	17년 07월	17년 08월	17년 09월	17년 10월	17년 11월	17년 12월	18년 01월	18년 02월	18년 03월	18년 04월	18년 05월
25-OH-VitD	C-1	3.6	4.5	4.4	9.9	4.6	7.9	9.5	3.5	5.9	9.5	8.8	8.8	7.6	5.5
	C-2	3.5	2.6	5.8	7.5	4.0	8.2	6.1	5.3	3.4	8.3	5.4	5.5	7.8	9.1
25-OH-VitD3	C-1	5.8	4.2	8.2	5.4	5.9	6.9	6.0	4.4	4.7	4.2	6.5	8.2	7.9	6.2
	C-2	4.7	4.6	5.3	4.9	6.7	6.0	7.0	4.6	3.8	7.4	5.0	8.2	7.0	7.3

검사명	QC (CV%)	18년 06월	18년 07월	18년 08월	18년 09월	18년 10월	18년 11월	18년 12월	19년 01월	19년 02월	19년 03월	19년 04월	19년 05월	19년 06월	Me an
25-OH-VitD	C-1	9.7	7.7	4.7	9.3	4.3	6.7	4.5	7.0	2.9	2.9	5.2	7.3	7.3	6.4
	C-2	7.4	7.0	5.0	3.9	9.1	5.8	7.0	6.6	5.4	5.4	4.2	6.6	3.4	5.9
25-OH-VitD3	C-1	5.0	5.8	9.7	8.7	8.5	7.5	8.6	9.8	7.3	7.3	5.2	9.4	7.9	6.9
	C-2	8.9	6.3	9.6	8.0	7.9	8.2	7.9	7.9	5.9	5.9	8.4	8.8	6.9	6.8

3. 모집단 분포

본원에서 비타민D에 대한 진단 기준으로 25-OH-VitD 검사의 참고치는 10 ng/mL 이하는 결핍, 10 ~ 29 농도는 불충분, 30 ~ 100은 충분, 100 이상은 잠재적 독성 가능성으로 해석한다. 이는 제조사에서 제공하는 참고치와 동일하게 사용하고 있다. 하지만 25-OH-VitD3의 참고치는 본원에서 참고치 설정을 시행하여 획득한 8.9 ~ 48.1을 사용하고 있다.

본원의 건강검진센터에서는 비타민D3의 참고치가 20 이하를 비타민D 부족으로 해석하여 환자들에게 비타민제 복용을 권하고 있다. 20 이하를 비타민D의 부족으로 기준을 잡아 97개 검체를 대상으로 모집단 분포를 측정하였다. SPSS 통계 프로그램을 사용하여 McNamar 검정을 통해 모집단 분포율을 비교하였을 때 유의확률은 0.219로 유의한 차이를 보이지 않았다($p>0.05$). 참고치 20을 기준으로 모집단 분포를 비교한 결과 25-OH-VitD와 25-OH-VitD3는 비타민D의 부족의 판단에 일치하는 결과를 나타내었다.

McNemar 검정

교차표

25-OH-VitD & 25-OH-VitD3		
25-OH-VitD3	25-OH-VitD	
	.0	1.0
.0	40	1
1.0	5	51

결정 통계량^a

	25-OH-VitD & 25-OH-VitD3
N	97
정확한 유의확률(양측)	.219 ^b

a. McNemar 결정

b. 이항분포를 사용함.

Fig. 2. McNamar test results for 25-OH-VitD and 25-OH-VitD3

4. 내부정도관리

2017년 4월에서 2019년 6월까지 서울아산병원 핵의학과 혈액검사실에서 측정한 25-OH-VitD의 내부정도관리 결과 control 1의 평균값은 6.4%, control 2의 평균값은 5.9%로 우수한 성적을 보였다. 또한 25-OH-VitD3의 내부정도관리 결과 control 1의 평균값은 6.9%, control 2의 평균값은 6.8%로 우수한 성적을 보였다(Table 3).

5. 외부정도관리 (기관간 숙련도 평가)

대한핵의학기술학회에서 주관하는 2018년 상반기, 하반기 외부정도관리(기관간 숙련도 평가)에 참여한 수행평가 결과 두 검사 모두 Z 값이 2.0 이하의 적합한 결과를 얻었다(Table 4).

고 찰

비타민D는 D3와 D2로 구성되어 있으나 생리학적 특성상 D3가 우리 몸의 대부분을 차지하고 있어 비타민D 부족의 진단법으로 혈액 내 25-OH-VitD 또는 25-OH-VitD3를 측정한다. 동일한 환자 검체를 이용하여 방사면역 측정법에 의한 25-OH-VitD와 25-OH-VitD3 검사의 비교 평가 결과 두 검사 모두 상관성, 재현성, 모집단 분포율, 내부 정도관리, 기관간 숙련도 평가 등 5가지 분야에서 우수한 성적을 보였다. 하지만 상관성 분석 결과에서 높은 농도의 비타민D 검체에서는 다소 차이를 보이는 결과를 보였다. 이는 동일한 회사에서 생산되는 키트이지만 검사에 사용되는 항체가 25-OH-VitD 검사에는 다클론 항체(polyclonal antibody)이며, 25-OH-VitD 검사에는 단클론 항체(monoclonal antibody)를 사용하는 차이가

Table 4. Results of external quality control of 25-OH-VitD and 25-OH-VitD3 (Interagency Proficiency Evaluation)

Analytes	Units	2018년 상반기			2018년 하반기		
		1	2	3	1	2	3
25-OH Vit.D	ng/ml	-1.10	-1.00	-0.90	-0.80	-0.30	-0.10
25-OH Vit.D3	ng/ml	0.22	0.47	1.13	-0.01	1.51	1.33

있다. 또한 25-OH-VitD3 검사의 경우 추출이라는 특수한 단계가 있어 검사과정의 차이에 따라 결과에도 차이가 있는 것으로 사료된다.

본원에서는 방사면역측정법에 의한 25-OH-VitD의 정확도 측정을 위해 국제 외부정도관리 프로그램인 Vitamin D External Quality Assessment Scheme(DEQAS)에서 제공하는 물질을 구입하여 추가 연구를 진행하였다. 그 결과 DEQAS에서 제시하는 target 값과 비교했을 때 방사면역측정법에 의한 25-OH-VitD 결과는 80.0~100.2%의 백분율을 나타내었다. 본 연구를 통해 방사면역 측정법에 의한 25-OH-VitD는 비타민D 부족을 진단할 수 있는 스크리닝 검사로 적합한 것으로 보이며 각 검사실에서는 지속적인 평가를 통해 검사실 조건과 환경에 맞는 우수한 시약을 선정하여 사용한다면 다른 측정 방법들에 대응하여 방사면역 측정법의 시장 경쟁력을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

방사면역 측정법에 의한 25-OH-VitD와 25-OH-VitD3 검사의 비교 평가 결과 상관성, 재현성, 모집단 분포율, 내부정도관리, 기관간 숙련도 평가 5가지 분야에서 모두 우수한 결과를 보였다.

따라서 25-OH-VitD와 25-OH-VitD3 측정은 비타민D 부족을 진단하는 목적이 같다고 할 수 있으며, 혈중 25-OH-VitD 혹은 25-OH-VitD3 만으로 단독 측정이 가능한 방사면역 측정법은 비타민D 부족에 대한 스크리닝 검사로 적합한 것으로 사료된다.

요 약

비타민D는 체내에서 칼슘 대사를 조절하여 뼈의 건강을 유지하며, 세포의 증식 및 분화의 조절, 면역 기능 등에 관여하는 중요한 역할을 한다. 부족 시 구루병, 골다공증의 위험이 높아지고 심혈관계 질환, 당뇨병, 일부 암 등의 발병 위험이 증가하는 것으로 보고되고 있다. 특히 한국은

비타민D 부족의 인구 비율이 매우 높은 국가 중 하나이다. 따라서 비타민D 부족의 진단 및 치료를 위해 혈중 25-OH-VitD 또는 25-OH-VitD3의 정확한 측정이 요구된다. 이에 본원에서 시행하고 있는 25-OH-VitD와 25-OH-VitD3 검사를 비교 평가하여 비타민D에 대한 정확한 진단 및 치료에 기여하고자 한다.

25-OH-VitD와 25-OH-VitD3의 결과를 전향적으로 측정하여 상관성, 재현성, 모집단 분포율을 구하였다. 또한 2017년 4월에서 2019년 6월까지 서울아산병원 핵의학과 혈액검사실에서 측정한 내부정도관리와 대한핵의학기술 학회에서 주관하는 2018년 상반기, 하반기 외부정도관리(기관간 숙련도 평가)에 참여한 결과를 비교하였다.

그 결과 97개의 검체를 대상으로 25-OH-VitD는 $25\text{-OH-VitD3} \times 0.9 + 0.3$ ($R > 0.9$)로 강력한 양의 상관관계를 보였다. 반복 측정을 통한 재현성 평가 결과 평균 diff(%) 값은 7.7%, 7.4%로 모두 우수한 성적을 나타내었다. 또한 모집단 분포를 비교한 결과 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다($p > 0.05$). 2017년 4월에서 2019년 6월까지 서울아산병원 핵의학 혈액검사실에서 측정한 내부정도관리 결과값은 평균(CV%) 6.2%, 6.8%를 나타내었다. 2018년 상반기 외부정도관리(기관간 숙련도 평가) 수행도 평가 결과 Z 값이 25-OH-VitD는 저, 중, 고농도에 대해 -1.10, -1.00, -0.90이며 25-OH-VitD3는 0.22, 0.47, 1.10이고 하반기 수행도 평가 결과는 각각 -0.80, -0.30, -0.10과 -0.01, 1.50, 1.30으로 모두 $Z \leq 2.0$ 의 적합한 결과를 얻었다.

방사면역 측정법에 의한 25-OH-VitD와 25-OH-VitD3 검사의 비교 평가 결과 상관성, 재현성, 모집단 분포율, 내부정도관리, 외부정도관리(기관간 숙련도 평가) 모두 우수한 성적을 보였다. 따라서 혈액 내 25-OH-VitD 또는 25-OH-VitD3로 단독 측정이 가능한 방사면역 측정법은 비타민D 부족에 대한 스크리닝 검사로 적합한 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Sylvia Christakos, Martin Hewison, David G. Gardner, Carol L. Wagner, Igor N. Sergeev, Erica Rutten, Anastassios G. Pittas, Ricardo Boland, Luigi Ferrucci, Daniel D. Bikle. Vitamin D: beyond bone. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2013;1287:45-58
2. Hanmin Wang, Weiwen Chen, Dongqing Li, Xiaoe Yin, Xiaode Zhang, Nancy Olsen, Song Guo Zheng. Vitamin D and Chronic Diseases. *Aging and Disease*. 2017;8:346-353
3. Aruna V. Krishnan, Donald L. Trump, Candace S. Johnson, David Feldman. The Role of Vitamin D in Cancer Prevention and Treatment. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2010;39:401-418
4. 박지영, 허영란. 한국 성인 여성의 비타민 D 영양상태와 비만지표와의 관계. *Journal of nutrition and health*. 2016;49:28-35