

Original article

채혈 시간에 따른 부신피질 자극 호르몬 검사의 참고치 설정에 관한 고찰

박지혜, 최진주, 임수연, 유선희, 이선희*
서울아산병원 핵의학과

Consideration for Setting Reference Range for Adrenocorticotrophic Hormone Test according to Blood Collection Time

Ji-Hye Park, Jin-Ju Choi, Soo-Yeon Lim, Seon-Hee Yoo, and Sun-Ho Lee*
Department of Nuclear Medicine, Asan Medical Center, Seoul, Korea

*Corresponding Author: Sun-Ho Lee, Department of Nuclear Medicine, ASAN Medical Center, Seoul, 05505, Korea, Tel: +82-02-3010-4573, Fax: +82-02-3010-4588, E-mail: sunho@amc.seoul.kr

ABSTRACT

Purpose: The reference range described in Adrenocorticotrophic Hormone reagent used in our laboratory is 10-60 pg/mL at 8 a.m. to 10 a.m., and 6-30 pg/mL at 8 p.m. to 10 p.m. However, in the case of outpatients, blood is mainly collected between 10 a.m. and 6 p.m., accounting for 57.8% of the total. Therefore, This study is intended to help make a more accurate diagnosis by reevaluating the reference range provided by the manufacturer of the Adrenocorticotrophic Hormone reagent and setting split-timed reference range. **Materials and Methods:** The patients collected blood before 10 a.m. were group A (68 people), and the patients collected blood after 10 a.m. were set to group B (80 people). A T-test was performed between groups to test their significance. And it was confirmed whether it was necessary to set the gender classification as a subgroup. The method of setting the reference range was calculated by the Bayesian's method and the Hoffmann's method. **Results:** The reference range of Group A was 8.6 to 60.6 pg/mL by the Bayesian's method, and the Hoffmann's method was 3.6 to 61.3 pg/mL. The reference range of Group B was 6.9 to 50.5 pg/mL when applying the Bayesian's method, and the Hoffmann method's was 2.3 to 48.9 pg/mL. **Conclusion:** This study was concluded that it was necessary to set the split-timed reference range. Through this study, the later the blood collection time, the lower the level of Adrenocorticotrophic Hormone, indicating that blood collection time is important for patients with clinical significance. If a large number of subjects are selected and supplemented in the future, it is believed that systematic and accurate reference range can be set.

Key words: Adrenocorticotrophic Hormone, T-Test, Bayesian's Method, Hoffmann's Method

서론

부신피질 자극 호르몬(Adrenocorticotrophic Hormone, ACTH)은 뇌하수체 전엽에서 분비되는 호르몬으로 39개의 아미노산으로 된 분자량 4,500 dalton인 폴리펩티드 호르몬이다. ACTH는 칼슘 이온 존재 하에 부신에 작용하고 cortisol 등 스테로이드 합성 분비를 자극하며, 정신적 혹은 신체적 스트레스와 같은 자극에 대응한다. ACTH는 시상하부에서 분비하는 부신피질 자극 방출 호르몬(Corticotropin-releasing Hormone, CRH)에 의하여 오전 6시-8시에 가장 높고, 오후 8시-11시에 제일 낮다. ACTH 분비를 억제하는 것은 혈액 중 cortisol의 증가로 음성

되먹임에 의한 것이다(Fig. 1). 즉 ACTH는 시상하부, 뇌하수체 및 부신피질과 관련된 질환을 감별한다. ACTH는 cortisol 변화와 함께 판단해야 한다. ACTH가 증가되었다는 결과는 쿠싱병, 에디슨 병 또는 이소성 ACTH 분비 종양을 가지고 있다는 것을 의미할 수 있다. ACTH가 감소되었다는 것은 부신 종양, 스테로이드 약물, 뇌하수체 기능 저하증이 있다는 것을 의미한다[1].

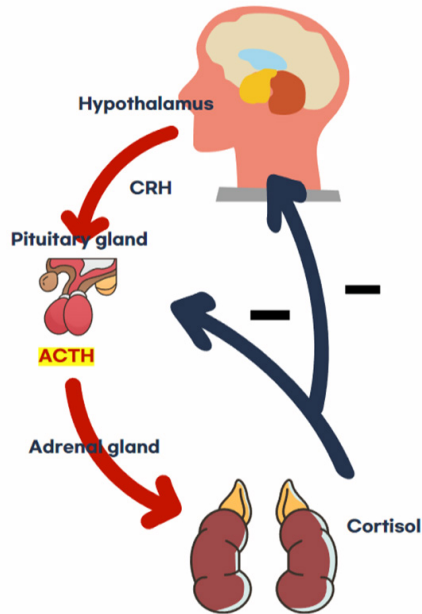


Fig. 1. Image shows the process of secretion and inhibition of Adrenocorticotrophic Hormone

본원에서 사용하는 ACTH 검사시약에 기재된 참고치는 오전 8시-10시 채혈 시, 10-60 pg/mL이고, 오후 8시-10시 채혈 시, 6-30 pg/mL이다. 그러나 외래 환자의 경우는 검사시약에 기재된 시간에 채혈이 이루어지지 않다는 것을 확인할 수 있었다. 2022년 8월부터 9월까지 본원의 외래환자 1,561명 중 904명이 오전 10시-오후 6시 사이에 채혈을 하였고 이는 전체 외래 환자 중 57.8%를 차지한다. 이에 본 연구에서는 ACTH 검사시약의 제조사에서 제공하는 참고치를 재평가하고 시간대별 참고치 구분 설정을 통해 임상에서 보다 정확한 진단을 내리는데 유용한 도움을 주고자 한다.

실험재료 및 방법

1. 검사대상

2022년 8월에서 9월 까지 본원에서 ACTH 검사를 시행한 외래환자 1,561명 중 성별, 나이 및 ACTH에 영향을 미치지 않는 148명은 표본 대상으로 분석하였고, 호르몬에 영향을 받지 않는 폐경 기준인 여성 55세 이상, 남성 20세 이상 성인을 대상으로 cortisol, aldosterone, estradiol, albumin, glucose, total calcium, aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), hemoglobin A1c (HbA1c), 빈혈, 호중구, 림프구 수치에서 정상 범위를 벗어난 자와 dexamethason을 복용한 환자, 쿠싱증후군 환자는 배제기준을 두어 대상에서 제외하였다.

1.1 ACTH 검사 측정 방법

표준액과 관리혈청, 검체를 각각 200 μ L 씩 항체가 피복 된 시험관에 넣은 후 완충액을 100 μ L 씩 넣고 잘 혼합하여 2500 rpm, 실온에서 2시간 $\pm$ 15분 동안 반응시켰다. 반응이 끝나면 세척액으로 3회 이상 세척했다. 세척 후 표지항체(Anti-ACTH)를 300 μ L 각각의 시험관에 넣어 잘 혼합한 후 4°C 냉장고에서 20시간 반응을 시켰다. 반응 후에 세척을 하고 세척된 시험관의 방사능을 감마선 계측기에서 1분간 계측했다.

1.2 분석방법 및 참고치 설정 방법

측정된 결과를 토대로 통계 분석을 위해 Medcalc 프로그램을 통해 측정 표본들의 정규분포와 T-검정을 시행했다. 참고치 설정 시 정규분포를 이루는 모집단에서 각각의 평균 값과 표준편차(Standard Deviation, SD)를 구한 후 평균 값에서 $\pm 3SD$ 를 벗어나는 검체는 제외시켰다. 제외시킨 값에서 다시 평균 값과 표준편차를 구한 결과들 중에서 2.5 percentile부터 97.5 percentile까지를 기준으로 참고치를 설정하는 Bayesian's method와 평균 값에서 $\pm 2SD$ 를 참고치로 설정하는 Hoffmann's method를 사용했다.

1.3 하위집단(Subgroup)의 참고치 구분설정 필요 유무

성별에 따른 하위집단과 측정값이 연령에 따른 하위집단간의 구분설정(Partitioning)이 필요한지 확인하기 위해 Medcalc 통계 프로그램을 통해 T-검정을 시행했다.

결과

1. 채혈 시간에 따른 비교 분석

외래환자 148명을 대상으로 오전 10시 이전에 채혈한 환자를 A 그룹($n=68$), 오전 10시 이후에 채혈한 환자를 B 그룹($n=80$)으로 구분하였다. A 그룹과 B 그룹을 표본수(50개 이상)가 많을 때 사용하는 검정 기법인 Kolmogorov-Smirnov를 이용하여 정규성 분포를 검토한다. A와 B 그룹 모두 $P>0.10$ 으로 정규성 분포를 나타냈다(Fig. 2). 또한 T-검정을 통해 양측 검정(Two-tailed probability)의 값이 $P=0.0017$ 로 $P<0.05$ 보다 작아 두 그룹간에 유의한 차이를 보였다.

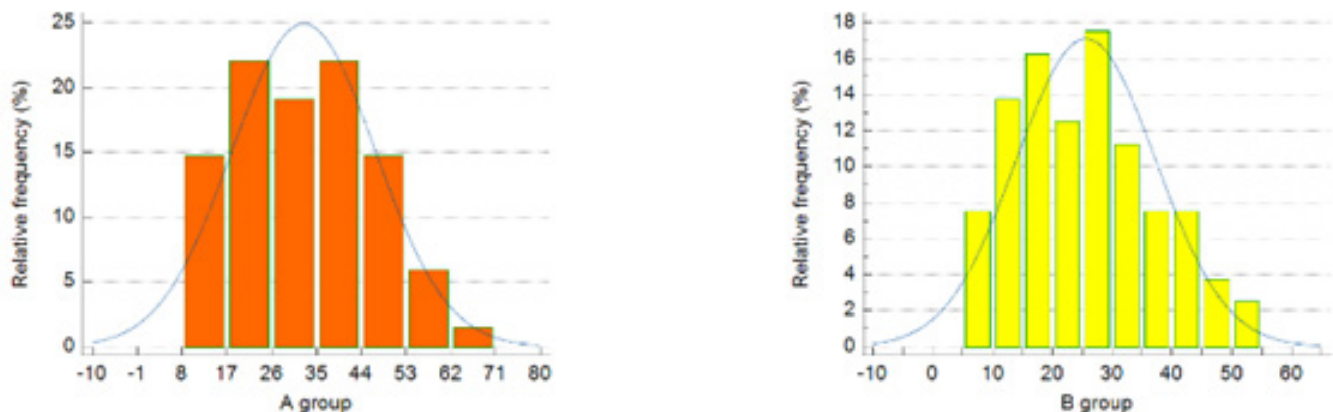


Fig. 2. The two graphs are histograms of the normality distribution of group A and group B.

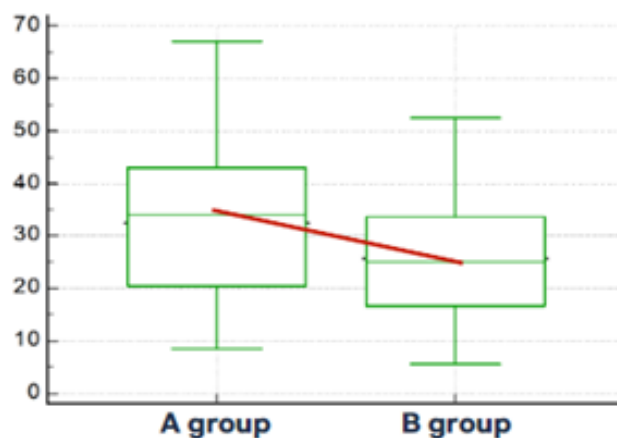


Fig. 3. Two box plots compare the mean and distribution of group A and group B. The red line represents the difference between the average values of the two groups as a slope.

A 그룹의 중앙 값(Median)은 34.1 pg/mL이며 표준편차는 14.4, 평균 값은 32.4 pg/mL이고 B 그룹의 중앙 값은 25.0 pg/mL이며 표준 편차는 11.7, 평균 값은 25.6 pg/mL로 산출되었다. 두 그룹의 평균 값의 차이는 6.8이다(Table 1).

Table 1. Comparison of ACTH according to Blood collection time (pg/mL)

Group	Time	Samples (n)	Minimum	Maximum	Median	Mean(M)	SD
A	A.M.6 - A.M.10	68	8.4	67.2	34.1	32.4	14.4
B	A.M.10 - P.M.6	80	5.6	52.4	25.0	25.6	11.7

2. 채혈 시간에 따른 참고치 설정

참고치 설정을 위해 측정 표본 대상은 총 148명으로 이 중 A 그룹의 평균값에서 $\pm 3SD$, 10.8-75.6 pg/mL를 벗어나는 값과 B 그룹의 평균 값에서 $\pm 3SD$, 0-60.7 pg/mL를 벗어나는 값은 제외하였다.

1.1 Bayesian's method

제외시킨 값에서 A 그룹을 분석한 결과 2.5 percentile은 8.6 pg/mL이며 97.5 percentile은 60.6 pg/mL이다. 제외시킨 값에서 B 그룹을 분석한 결과 2.5 percentile은 6.9 pg/mL이며 97.5 percentile은 50.5 pg/mL이다. 따라서 Bayesian's method를 통한 ACTH 정상 참고치는 A 그룹이 8.6-60.6 pg/mL이고 B 그룹은 6.9-50.5 pg/mL이다(Table 2).

1.2 Hoffmann's method

제외시킨 값의 평균에서 $\pm 2SD$ 의 값을 참고치 범위로 설정하므로 A 그룹의 범위는 3.6-61.3 pg/mL이며 B 그룹의 범위는 2.3-48.9 pg/mL로 산출되었다. 따라서 Hoffmann's method를 통한 A 그룹과 B 그룹의 참고치 범위는 3.6-61.3 pg/mL, 2.3-48.9 pg/mL이다(Table 2).

Table 2. Range of reference values calculated by the Bayesian and Hoffmann methods for each group

Group	Bayesian's method	Hoffmann's method
A group(A.M. 6 – A.M. 10)	8.6-60.6 pg/mL	3.6-61.3 pg/mL
B group(A.M.10 - P.M. 6)	6.9-50.5 pg/mL	2.3-48.9 pg/mL

3. 성별 따른 비교 분석

오전 10시 이후에 채혈한 환자인 B 그룹 80명 중 여성 40명과 남성 40명을 표본으로 측정하였다. Kolmogorov-Smirnov로 검토한 결과, 여성과 남성 둘 다 $P>0.10$ 으로 정규성 분포를 나타냈다. 여성의 중앙 값은 22.6 pg/mL이고 표준편차는 10.3이다. 평균은 23.7 pg/mL로 나왔다. 남성의 중앙 값은 27.8 pg/mL이며 표준편차는 12.7이다. 평균은 27.6 pg/mL로 산출되었다. 성별간 평균 값 차이는 3.9이다(Table 3). T-검정을 통해 유의성을 측정한 결과 $P=0.1392$ 로 $P>0.05$ 보다 크므로 성별간 유의한 차이를 보이지 않았다.

Table 3. Comparison of ACTH according to Sex (pg/mL)

Sex	Samples (n)	Minimum	Maximum	Median	Mean (M)	SD
Female	40	5.6	51.4	22.6	23.7	10.3
Male	40	6.5	52.4	27.8	27.6	12.7

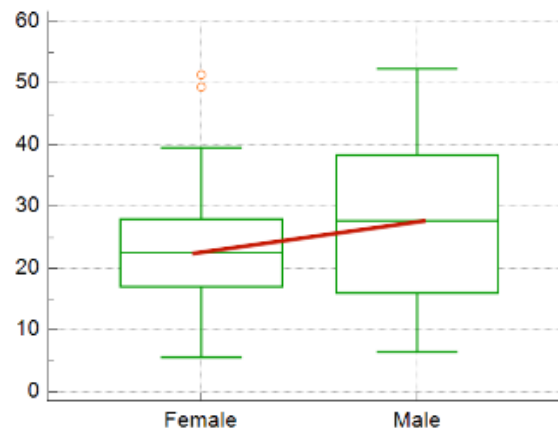


Fig. 4. Two box plots compare the mean and distribution of female and male. The red line represents the difference between the average values of the two groups as a slope.

고찰

본원에서 운영되는 채혈실과 병실에서의 마지막 환자 채혈 업무 시간이 오후 6시까지이다. 이번 연구에서 ACTH 검사 시약에 기재된 오후 8시-10시 사이의 6-30 pg/mL 참고치를 재평가 할 수 없다는 제한점이 있었다. 또한 ACTH는 단백질 분해로 매우 불안정하다. ACTH 검사 시에는 냉장고에 넣어둔 EDTA tube 사용이 권장되어야 하며, 채혈 후 2시간 동안 실온에서 방치될 경우 결과가 유의하게 감소할 수 있어 채취 후 신속한 원심분리가 필요하다[2]. ACTH 검사 특성상 채취 및 보관 방법이 민감하므로 기술적, 환경적 변동에 따라 참고치의 측정범위가 달라질 수 있다는 점도 고려해야 한다.

참고치를 설정함에 가장 중요한 단계는 참고 표본 군의 선정이다. 참고 표본 군의 전제는 ‘건강한 사람들’이다. 그래서 주로 건강검진센터에서 의뢰된 검체로 참고치 표본 군을 선정하지만 본원의 건강검진센터엔 ACTH 검사 의뢰가 없어 건강인의 혈장 시료를 구할 수 없다는 제한이 있었다. 그러나 참고치 설정의 신뢰성을 부여하기 위해 외래환자 중 부신 기능만 정상이라고 판단되는 환자들을 기준으로 표본을 선정했다. 이는 배제기준을 세밀하게 세워 표본 군을 선정했지만 온전한 건강인은 아니라는 점을 유의해야 한다. 참고치 설정은 지속적인 연구와 주기적인 분석을 수정할 필요가 있으며 참고치는 진단이나 치료방침을 결정할 때 중요한 지표가 되므로 신중히 결정해야 함을 강조한다.

결론

성별에 따른 참고치 구분설정에 대한 필요의 유무를 판단했을 때, $P>0.05$ ($P=0.1392$) 보다 크기 때문에 유의한 차이를 보이지 않았다. 즉, 하위집단인 성별로 참고치 구분설정은 필요하지 않은 것으로 나타났다. 시간에 따른 참고치 설정은 $P>0.05$ ($P=0.0017$) 보다 이하 값이 나옴에 따라 유의한 차이를 보인다. 이는 시간에 따른 참고치 구분설정이 필요함을 보여준다.

본원에서 사용하는 검사시약에 기재된 오전 8시-10시 참고치는 10-60 pg/mL이며 본 연구에서 오전 10시 이전에 채혈된 A 그룹의 Bayesian's method로 산출된 8.6-60.6 pg/mL과 유사한 값이 나왔다. 이를 통해 참고치가 기재되어 있지 않은 오전 10시-오후 6시 (Group B)도 Bayesian's method로 산출된 6.9-50.5 pg/mL 값으로 선정했다. 즉, 시간에 따른 참고치를 세분화했을 때, 오전 8시-10시 참고치는 10-60 pg/mL, 오전 10시-오후 6시는 6.9-50.5 pg/mL, 그리고 오후 8시-10시는 6-30 pg/mL라고 결론을 내렸다.

본 연구를 통해 채혈 시간대별 참고치 구분설정이 필요하며 채혈시간이 늦어질수록 ACTH 수치가 낮은 경향을 나타냄을 알 수 있었다. 이는 시상하부, 뇌하수체 및 부신피질 관련된 질환을 가진 환자들에겐 채혈시간의 중요함을 다시 한번 더 확인할 수 있었다. 또한 현재 본원에서 ACTH 검사를 위해 검체가 채취되는 시간이 임상적으로 의미가 있는 오전 시간대 채혈보다 오전 10시에서 오후 6시 사이에 채혈된 시간이 많으므로 임상적 의의를 가진 환자들에겐 정확한 진단을 내리기 어렵다고 판단된다. 이는 진료과와 협의를 통해 환자들의 채혈시간을 준수하는 방안을 모색하여 정확한 결과를 통해 치료방침을 구축할 수 있기를 바란다. 또한 본 연구의 제한 점들로 참고치를 적용하진 않았지만 추후 많은 수의 표본을 선정하여 보완한다면 체계적이고 정확한 참고치 설정이 가능할 것이라 사료된다.

REFERENCES

1. Ko CS, Seo IT. Nuclear Medicine. 3rd ed. Korea Med Publish; 1933. p.234-7.
2. Shin SY, Lee HJ, Min GS, Le HY. Preanalytical stability of adrenocorticotrophic hormone depends on time to centrifugation. Korean J Nucl Med Technol. 2009;13(1):116-9. Retrieved from <https://www.kjnm.org/view/13-1-22.pdf>
3. Kim WJ, Yoon PY, Shin YG, Yoo SH, Cho SM. Establishment of reference value of insulin using the statistical analysis. Korean J Nucl Med Technol. 2010;14(1):143-6. Retrieved from <https://www.kjnm.org/view/14-1-26.pdf>
4. Cha SA, Moon SD. Blood tests for the diagnosis of adrenal diseases. Korean J Med. 2018;93(6):532-7. DOI: <http://dx.doi.org/10.3904/kjm.2018.93.6.532>