



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

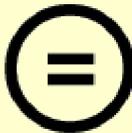
다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



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](#)

의학석사 학위논문

Non-HDL 입자 크기 분포별 두 가지 LDL

콜레스테롤 균질법의 추정평균회수율

Estimated mean recovery of two LDL cholesterol homogeneous
methods by non-HDL particle size distribution

울산대학교대학원

의학과

김재력

Non-HDL 입자 크기 분포별 두 가지 LDL
콜레스테롤 균질법의 추정평균회수율

지도교수 민원기

이 논문을 의학석사 학위 논문으로 제출함

2017년 12월

울산대학교대학원
의학과
김재력

김재력의 의학석사학위 논문을 인준함

심사위원장 전 사 일 (인)

심사위원 민 원 기 (인)

심사위원 이 우 창 (인)

울 산 대 학 교 대 학 원

2018 년 2 월

국문요약

배경: 저밀도 지단백(low-density lipoprotein) 콜레스테롤 농도는 심혈관 질환의 위험도 판정에 있어 중요한 역할을 한다. LDL 콜레스테롤 측정은 전통적으로 Friedwald 법이 이용되어 왔으나 최근 LDL 콜레스테롤을 직접 측정하는 균질(homogeneous)법이 개발되어 사용되고 있다. 본 연구에서는 Wako 법과 Roche 법 두 가지 균질법간 측정값 차이가 있는지 알아보고, 입자크기에 따라 분류한 non-HDL의 각 분획에서 두 가지 균질법의 추정평균회수율을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법: 2017년 4월에서 7월까지 서울아산병원 진단검사의학과에 저밀도 지단백 분획검사가 의뢰된 355개의 검체를 Lipoprint LDL system (Quantimetrix, CA, USA)을 이용하여 지단백 입자의 크기에 따라 12개의 세부 분획(VLDL, IDLC, IDLB, IDLA, LDL 1-7, HDL)으로 분류하였다. 잔여검체에 대해 Beckman coulter사의 AU5800과 Roche Diagnostics사의 Cobas8000으로 총 콜레스테롤, 중성지방, 저밀도지단백 콜레스테롤, 고밀도지단백 콜레스테롤을 측정하였다. 각 지단백 분획의 콜레스테롤 농도는 Lipoprint로 측정한 각 지단백 분획의 분율에 총 콜레스테롤을 곱하여 구하였다. 총 콜레스테롤은 AU5800과 Cobas8000으로 측정한 값의 평균을 사용하였다. 각 분획에서 균질법의 추정평균회수율(recovery, %)은 Lipoprint에서 계산된 콜레스테롤 분율과 균질법의 콜레스테롤 추정값의 분율간의 회귀직선의 기울기로 정의하였다. 각 분획에서 균질법의 콜레스테롤 추정값은 균질법으로 측정된 LDL 콜레스테롤 농도에서 Lipoprint로 계산한 나머지 분획의 콜레스테롤 농도를 빼어 계산하였다. 중성지방 농도 및 VLDL 분율과 Lipoprint에서 계산된 LDL 콜레스테롤 농도와 균질법으로 측정된 LDL 콜레스테롤 농도의 관계를 조사하였다.

결과: Lipoprint에서 계산된 LDL 콜레스테롤 농도가 증가할수록 Wako 법은 낮게 측정되는 반면, Roche 법은 높게 측정되었다. Wako 법과 Roche 법을 비교하였을 때, 낮은 LDL 콜레스테롤 농도에서는 Wako 법이 높게 측정되었으나 농도가 높아질수록 상대적으로 Roche가 높게 측정되었다. 각 분획별로 두 가지 균질법의 추정평균회수율을 보았을 때, IDL 분획에서는 Roche 법의 추정평균회수율(79.6%)은

Wako 법의 추정평균회수율(92.1%)보다 통계적으로 유의하게 낮았다($P < 0.01$). IDLC 분획에서 Roche 법의 추정평균회수율(53.7%)는 Wako 법의 추정평균회수율(89.7%)보다 통계적으로 유의하게 낮았으며($P < 0.01$), IDLB 분획에서 Roche 법의 추정평균회수율(55.5%)은 Wako 법의 추정평균회수율(100.9%)보다 통계적으로 유의하게 낮았다($P < 0.001$). IDLA 분획에서 Roche 법의 추정평균회수율(94.9%)과 Wako 법의 추정평균회수율(92.8%)은 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다($P = 0.880$). LDL 분획에서 Roche 법의 추정평균회수율(112.4%)은 Wako 법의 추정평균회수율(90.1%)보다 통계적으로 유의하게 높았다($P < 0.001$). Large LDL 분획에서 Roche 법의 추정평균회수율(104.9%)이 Wako 법의 추정평균회수율(88.6%)보다 통계적으로 유의하게 높았으나, small LDL 분획에서는 Roche 법의 추정평균회수율(106.3%)은 Wako 법의 추정평균회수율($y = 101.2\%$)과 통계적으로 유의한 차이가 없었다($P = 0.511$).

결론: 두가지 균질법은 지단백 분획에 따라 다른 추정평균회수율을 보였으며 중성지방 농도는 Wako 법의 LDL 콜레스테롤에만 영향을 미쳤다. 이러한 점들은 균질법간에 LDL 콜레스테롤의 측정값에 차이가 나는 원인을 설명할 수 있다. 균질법의 표준화를 위해 본 연구와 같이 Lipoprint 를 이용하여 비교적 간편하게 균질법의 회수율을 평가하는 방법이 유용하게 쓰일 수 있을 것이다.

중심단어: 저밀도지단백 콜레스테롤, 균질법, Lipoprint, 추정평균회수율

목 차

국문요약.....	i
목차.....	iii
표목차.....	iv
그림목차	v
서론.....	1
대상 및 방법.....	3
1. 검체 및 검사방법.....	3
2. Wako 법과 Roche 법의 LDL 콜레스테롤 측정값 비교	4
3. 각 분획에서 Wako 법과 Roche 법의 추정평균회수율.....	4
4. 중성지방 농도 및 VLDL 분율과 LDL 콜레스테롤 농도의 관계.....	5
5. 통계적 분석.....	5
결과.....	7
1. Wako 법과 Roche 법의 LDL 콜레스테롤 측정값 비교.....	7
2. 각 분획에서 Wako 법과 Roche 법의 추정평균회수율.....	9
3. 중성지방 농도 및 VLDL 분율과 LDL 콜레스테롤 농도의 관계.....	13
고찰.....	15
참고문헌.....	19

표목차

표 1 10

그림목차

그림 1	4
그림 2	8
그림 3	12
그림 4	14

서론

Low-density lipoprotein (LDL) 콜레스테롤은 많은 역학 및 임상연구를 통해 심혈관 질환 발생의 독립적인 위험인자로 인정받고 있다.¹⁻³⁾ 2013년 발표된 미국심장학회(American College of Cardiology, ACC)/미국심장협회(American Heart Association, AHA) 가이드라인⁴⁾은 LDL 콜레스테롤 농도를 고지질혈증의 일차적인 진단 및 치료 기준으로 제시하고 있다.

LDL 콜레스테롤 참고측정법(Reference method)은 초원심분리(ultracentrifugation)와 침전(precipitation)으로 지단백을 분리후 측정하는 β -quantification 이다.⁵⁾ β -quantification 은 1.006-1.063 g/ml 밀도의 “broad-cut” LDL 콜레스테롤을 측정하는 것으로 1.019-1.063 g/ml 밀도의 “narrow-cut” LDL 분획뿐만 아니라 IDL (1.006-1.019 g/ml) 및 Lp(a) (1.050-1.080 g/ml)도 측정에 포함된다⁵⁾. β -quantification 은 검사과정이 복잡하고 시간이 오래 걸리며, 숙련된 검사자가 필요하기 때문에 임상검사실에서 일상검사로 사용하지 않는다. 전통적으로 LDL 콜레스테롤 농도는 총콜레스테롤(Total cholesterol), 중성지방(Triglyceride), 고밀도 지단백(High-density lipoprotein,) 콜레스테롤 농도에서 계산하는 Friedewald 법⁶⁾이 이용되어 왔다.

최근에는 LDL 콜레스테롤을 직접 측정하는 균질(homogeneous)법이 개발되어 이용되고 있다. LDL 콜레스테롤 균질법은 LDL 과 non-LDL 을 분리하기 위해 지단백 입자의 전하(charge), 소수성(hydrophobicity) 등의 물리화학적 특성에 따라 선택적으로 반응하는 non-ionic surfactant, amphiphilic surfactant, polyanion, sugar compound, phosphate compound 등의 다양한 물질을 이용한다.⁷⁻¹⁰⁾ Miller 등⁽¹¹⁾은 8 가지 LDL 콜레스테롤 균질법을 참고측정법과 비교한 연구에서 검사방법에 따라 참고측정법과의 mean bias 가 -11.8% - 4.1%였다고 보고하여 균질법에서 측정되는 LDL 은 참고측정법에서 측정되는 LDL 과 차이가 있음을 알 수 있다. 또한 초원심분리로 지단백 분획을 분리한 후 균질법의 회수율(recovery)을 조사한 연구들^{12,13)}에 따르면 검사방법에 따라 VLDL 분획은 17-24%, IDL 분획은 31-69%, LDL 분획은 88-99%를 보여 검사방법간 측정에 포함되는 지단백이 다름을 알 수 있다.

LDL은 다양한 물리화학적 특성의 지단백 입자가 동시에 존재하는 비균질한 집단¹⁰⁾이므로 LDL 콜레스테롤 균질법에서 사용된 물리화학적 LDL 분리능을 평가하기 위해서는 LDL을 다수의 세부분획으로 나누어서 각 분획별 회수율을 조사하는 것이 필요하지만, 현재까지 Usui 등¹²⁾의 연구에서 사용한 5개의 분획이 가장 많은 분획이었다.

본 연구에서는 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동법(polyacrylamide gel electrophoresis)의 원리를 이용하여 입자의 크기에 따라 VLDL 1개, IDL 3개, LDL 7개, HDL 1개 분획으로 분리하는 Lipoprint LDL system (Quantimetrix, CA, USA)을 사용하여 11개의 non-HDL 지단백 분획별로 Wako 법과 Roche 법의 두 가지 균질법의 추정평균회수율을 조사하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 검체 및 검사방법

2017년 4월부터 2017년 7월까지 서울아산병원 진단검사의학과에서 LDL 분획검사를 시행한 355개의 혈청 검체를 대상으로 하였다. Lipoprint LDL system을 이용하여 지단백 분획을 지단백 입자의 크기에 따라 VLDL 1개의 분획, IDL은 IDLC, IDLB, IDLA의 3개 분획, LDL은 LDL 1-7의 7개 분획, HDL 1개의 분획으로 총 12개 세부분획으로 분류하였다. IDL과 LDL을 합하여 total LDL로, LDL1-2를 합하여 large LDL로, LDL3-7을 합하여 small LDL로 분류하였다 (Fig. 1). 각 지단백 분획의 콜레스테롤 농도는 각 지단백 분획의 분율에 총 콜레스테롤 농도를 곱하여 구하였다. 총 콜레스테롤 농도는 AU5800 (Beckman Coulter, CA, USA)과 Cobas 8000 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) 두가지 자동화 장비로 측정된 값의 평균을 사용하였다. LDL 지단백 분획 검사 후 남은 혈청은 -20°C 에서 냉동 보관 후 해동하여 AU5800과 Cobas 8000의 두가지 자동화 장비로 총 콜레스테롤, 중성지방, LDL 콜레스테롤을 측정하였다. 총 콜레스테롤의 측정에 사용한 시약은 AU5800은 CHOLESTEROL (Beckman Coulter, CA, USA)를, Cobas8000은 CHOL2(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)를 사용하였다. 중성지방의 측정에 사용한 시약은 AU5800은 TRIGLYCERIDES (Beckman Coulter, CA, USA)를, Cobas8000은 TRIGL (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)를 사용하였다. LDL 콜레스테롤의 측정은 균질법으로 검사하였으며 사용한 시약은 AU5800은 LDL-CHOLESTEROL (Beckman Coulter, CA, USA)를, Cobas8000은 LDL-Cholesterol plus Gen.2 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)를 사용하였다. LDL 콜레스테롤 시약의 경우 Beckman Coulter 사는 Wako Pure Chemical industries 사의 LDL protected/catalase 원리(이하 Wako 법)를 사용하였고 Roche diagnostics 사는 Kyowa Medex 사의 selective solubilization 원리(이하 Roche 법)를 사용하였다.

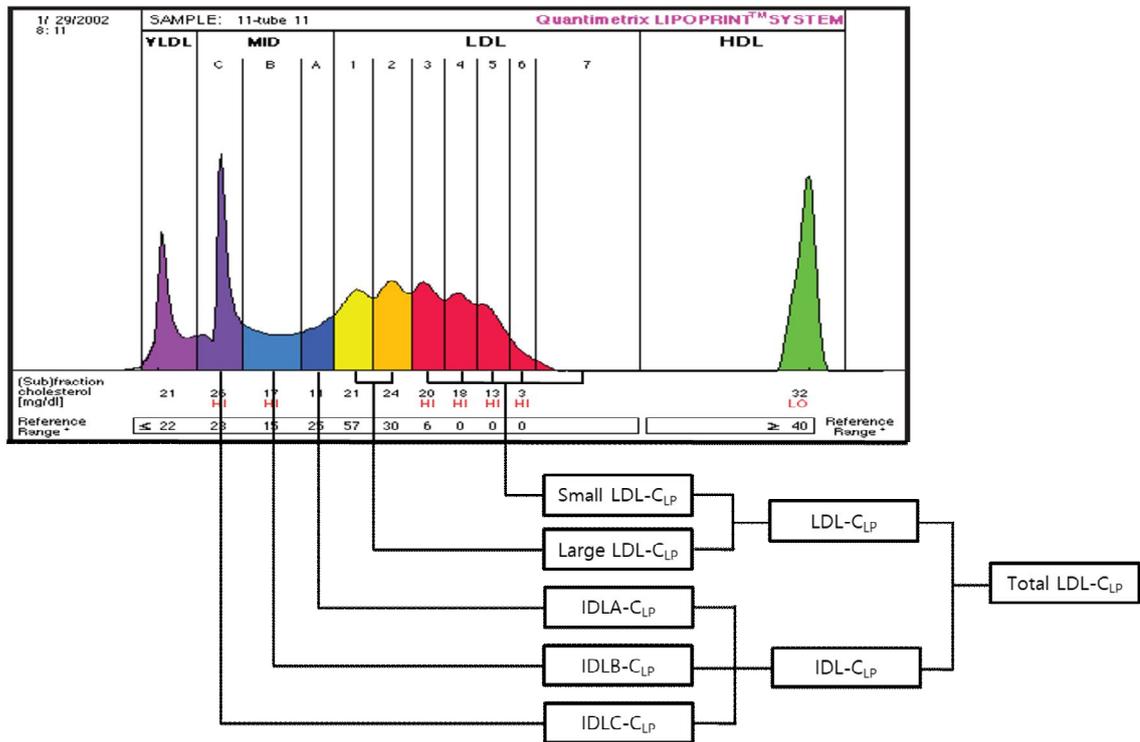


Fig. 1. Lipoprotein distribution by size using Lipoprint LDL system and calculation of cholesterol in each lipoprotein fraction.

2. Wako법과 Roche법의 LDL 콜레스테롤 측정값 비교

Roche 법으로 측정한 LDL 콜레스테롤 농도(Total LDL-C_{RD})를 x 축으로 하여 Wako 법으로 측정한 LDL 콜레스테롤 농도(Total LDL-C_{WK})와 % difference plot 으로 비교하였다. Lipoprint 에서 계산된 LDL 콜레스테롤 농도(Total LDL-C_{LP})를 x 축으로 하여 Total LDL-C_{WK} 및 Total LDL-C_{RD}와 % difference plot 으로 비교 하였다.

3. 각 분획에서 Wako법과 Roche법의 추정평균회수율

특정 지단백 분획에서 균질법으로 측정되는 콜레스테롤 농도는 균질법으로 측정한 Total LDL-C 에서 Lipoprint 로 계산한 나머지 분획의 콜레스테롤 농도를 빼서 계산하였다. IDLC 분획에서 Roche 법의 콜레스테롤 추정값(Estimated IDLC-C_{RD})은 Roche 법으로 측정한 LDL 콜레스테롤 농도(Total LDL-C_{RD})에서 Lipoprint

로 계산한 나머지 분획의 콜레스테롤 농도($IDLB-C_{LP} + IDLA-C_{LP} + LDL-C_{LP}$)를 빼서 계산하였다.

계산 1. $Estimated\ IDLC-C_{RD} = Total\ LDL-C_{RD} - (LDL-C_{LP} + IDLB-C_{LP} + IDLA-C_{LP})$.

이와 같이 IDL, IDLB, IDLA, LDL, large LDL, LDL1, LDL2, small LDL 분획 각각에서 분획에서 Wako 법과 Roche 법의 콜레스테롤 추정값을 구하였다.

각 분획에서 Lipoprint 에서 계산된 콜레스테롤 분율과 균질법의 콜레스테롤 추정값의 분율간 관계에서 구한 회귀직선의 기울기를 추정평균회수율(%)로 정의하였다. IDLC 분획에서 Roche 법의 추정평균회수율은 $(IDLC-C_{LP} / Total\ LDL-C_{LP})$ 을 x 축, $(Estimated\ IDLC-C_{RD} / Total\ LDL-C_{RD})$ 을 y 축으로 두어 분석한 회귀직선의 기울기로 정의하였다. 이와 같이 Wako 법과 Roche 법 추정평균회수율을 IDL, IDLC, IDLB, IDLA, LDL, large LDL, LDL1, LDL2, small LDL 분획에 대해 각각 구하였다. Lipoprint 에서 small LDL 분획의 분율이 0%인 38 건은 small LDL 분획의 분석에서 제외하였다.

4. 중성지방 농도 및 VLDL 분율과 LDL 콜레스테롤 농도의 관계

중성지방 농도를 x 축으로 하여 Total LDL- C_{LP} 와 Total LDL- C_{WK} 간, Total LDL- C_{LP} 와 Total LDL- C_{RD} 간의 % difference plot 을 그려 중성지방이 Wako 법과 Roche 법의 LDL 콜레스테롤 측정에 미치는 영향을 조사하였다. 중성지방 농도는 Cobas8000 과 AU5800 의 두 가지 장비로 측정한 값의 평균을 사용하였다. 또한 Lipoprint 로 구한 VLDL 분율(%)을 x 축으로 하여 Total LDL- C_{LP} 와 Total LDL- C_{WK} 간, Total LDL- C_{LP} 와 Total LDL- C_{RD} 간의 % difference plot 을 그렸다.

5. 통계적 분석

통계분석은 SPSS version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), MedCalc ® version 13.1.2.0 software for Windows (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium)을 이용하였다. Wako 법과 Roche 법의 평균 비교는 대응표본 T-test 를 수행하였다. 연속변수간의 상관관계는 Spearman correlation 을 이용하여 분석하

였다. 회귀분석은 일반선형 모델(GLM; general linear model)을 이용하였으며 회귀직선의 기울기 비교는 공분산분석(ANCOVA; analysis of covariance)를 이용하여 수행하였다. *P* value 가 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판단하였다.

결과

1. Wako법과 Roche법의 LDL 콜레스테롤 측정값 비교

Total LDL-C_{WK}의 평균은 91.5±25.2 mg/dL (mean±SD), Total LDL-C_{RD}는 89.1±29.4 mg/dL (mean±SD)를 보였다. 두 균질법의 평균 차이(Total LDL-C_{WK} - Total LDL-C_{RD})는 2.4±6.2 mg/dL로 Wako법이 통계적으로 유의하게 높았다($P < 0.001$). Total LDL-C_{RD}(x)와 Total LDL-C_{WK}(y)의 % difference plot에서 회귀식은 $y = -0.222x + 24.428$ mg/dL로 LDL 콜레스테롤 농도가 높을수록 상대적으로 Total LDL-C_{WK}이 높았다(Fig. 2A).

Total LDL-C_{LP}(x)와 Total LDL-C_{WK}(y)의 % difference plot에서 회귀식은 $y = -0.109x + 18.367$ mg/dL로 LDL 콜레스테롤 농도가 증가할수록 Wako의 측정값이 낮았다($P < 0.001$)(Fig. 2B).

Total LDL-C_{LP}(x)와 Total LDL-C_{RD}(y)의 % difference plot에서 회귀식은 $y = 0.114x - 5.007$ mg/dL로 LDL 콜레스테롤 농도가 증가할수록 Roche의 측정값이 높았다($P < 0.001$)(Fig. 2C).

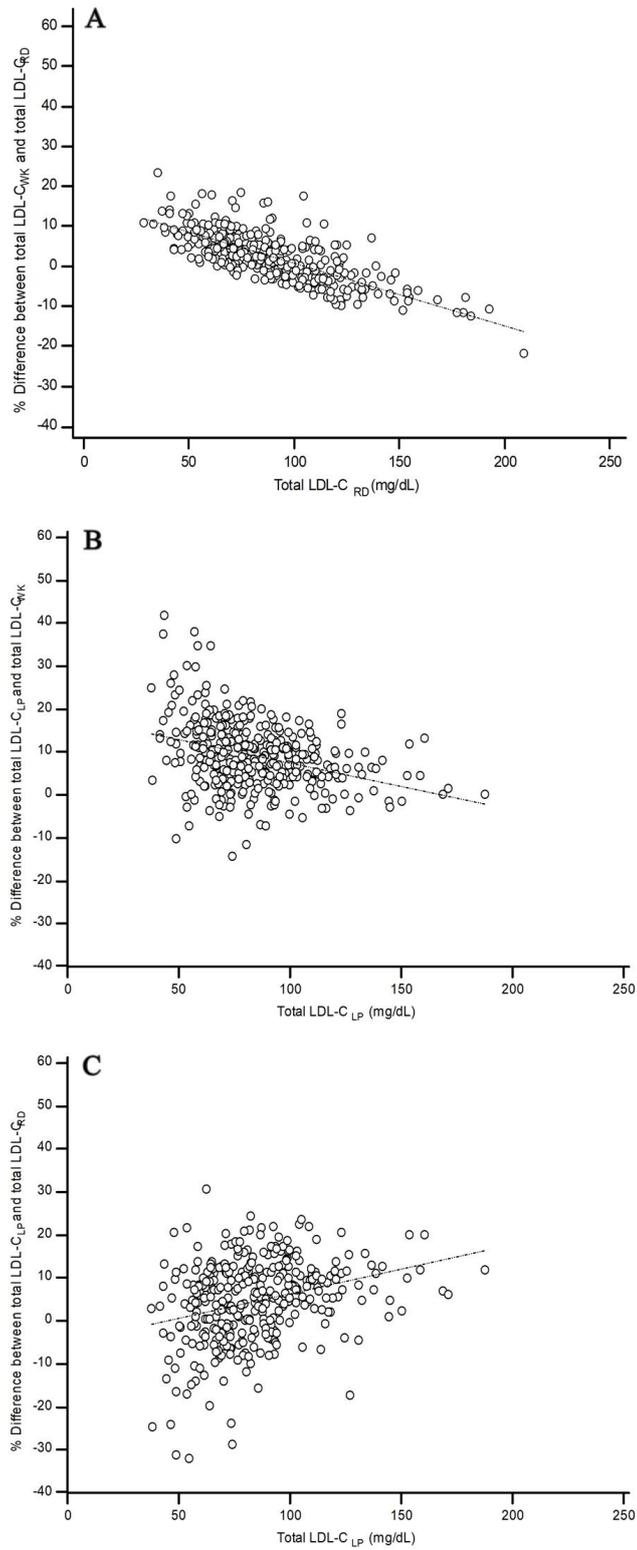


Fig. 2. Comparison of the total LDL-C_{LP} with total LDL-C_{RD} (A) and total LDL-C_{WK} (B), respectively, and total LDL-C_{WK} with total LDL-C_{RD} (C).

2. 각 분획에서 Wako법과 Roche법의 추정평균회수율

각 분획에서 Lipoprint 에서 계산된 콜레스테롤 분율과 균질법의 콜레스테롤 추정값의 분율간 관계는 Table 1. 및 Fig. 3 과 같다. IDL 분획에서는 Roche 법의 추정평균회수율 (79.6%)은 Wako 법의 추정평균회수율 (92.1%)보다 통계적으로 유의하게 낮았다($P < 0.01$). IDL 을 세부분획으로 나누어 비교했을 때 IDLC 분획에서 Roche 법의 추정평균회수율 (53.7%)는 Wako 법의 추정평균회수율 (89.7%)보다 통계적으로 유의하게 낮았다($P < 0.01$). IDLB 분획에서 Roche 법의 추정평균회수율(55.5%)은 Wako 법의 추정평균회수율(100.9%)보다 통계적으로 유의하게 낮았다($P < 0.001$). IDLA 분획에서 Roche 법의 추정평균회수율 (94.9%)과 Wako 법의 추정평균회수율(92.8%)은 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다($P = 0.880$).

LDL 분획에서 Roche 법의 추정평균회수율(112.4%)은 Wako 법의 추정평균회수율(90.1%)보다 통계적으로 유의하게 높았다($P < 0.001$). Large LDL 분획에서 Roche 법의 추정평균회수율(104.9%)은 Wako 법의 추정평균회수율(88.6%)보다 통계적으로 유의하게 높았다. LDL1 분획에서 Roche 법의 추정평균회수율(87.3%)은 Wako 법의 추정평균회수율(99.1%)과 통계적으로 유의한 차이가 없었다($P = 0.071$). LDL2 분획에서 Roche 법의 추정평균회수율(89.3%)은 Wako 법의 추정평균회수율(126.8%)보다 통계적으로 유의하게 낮았다. 그러나 small LDL 분획에서는 Roche 법의 추정평균회수율(106.3%)은 Wako 법의 추정평균회수율(101.2%)과 통계적으로 유의한 차이가 없었다($P = 0.511$).

Table 1. A summary of comparisons of cholesterol proportion between homogeneous method and Lipoprint, assessed by regression analysis of general linear model in each lipoprotein subfraction

Lipoprotein subfractions	n	Mean proportion (%) of subfractions (95% CI)	Method	Correlation coefficient	Slope (95% CI)	Intercept (95% CI)	P value for slope between methods
IDL	355	24.8 (24.3-25.3)	Wako	0.90	0.921 (0.875-0.967)	0.079 (0.058 to 0.100)	< 0.001
			Roche	0.80	0.796 (0.733-0.859)	0.112 (0.084 to 0.141)	
IDLC	355	13.0 (12.6-13.5)	Wako	0.66	0.897 (0.789-1.004)	0.083 (0.065 to 0.101)	< 0.001
			Roche	0.35	0.537 (0.384-0.689)	0.105 (0.080 to 0.131)	
IDLB	355	8.2 (8.0-8.4)	Wako	0.58	1.009 (0.860-1.157)	0.066 (0.043 to 0.088)	< 0.001
			Roche	0.26	0.555 (0.339-0.772)	0.096 (0.064 to 0.129)	
IDLA	355	7.7 (7.4-7.9)	Wako	0.52	0.928 (0.769-1.086)	0.078 (0.056 to 0.100)	0.880
			Roche	0.39	0.949 (0.717-1.182)	0.038 (0.005 to 0.071)	

Table 1. (Continued)

Lipoprotein subfractions	n	Mean proportion (%) of subfractions (95% CI)	Method	Correlation coefficient	Slope (95% CI)	Intercept (95% CI)	P value for slope between methods
LDL	355	31.5 (30.9-32.2)	Wako	0.93	0.901 (0.864-0.938)	0.090 (0.069 to 0.111)	< 0.001
			Roche	0.91	1.124 (1.068-1.179)	-0.056 (-0.087 to -0.024)	
Large LDL	355	26.3 (26.9-14.8)	Wako	0.91	0.886 (0.845-0.928)	0.095 (0.076 to 0.115)	<0.001
			Roche	0.87	1.049 (0.987-1.110)	-0.005 (-0.034 to 0.024)	
LDL1	355	14.4 (14.0-14.8)	Wako	0.79	0.873 (0.801-0.945)	0.091 (0.072 to 0.111)	0.071
			Roche	0.70	0.991 (0.885-1.097)	0.029 (0.000 to 0.057)	
LDL2	355	11.9 (11.6-12.3)	Wako	0.68	0.893 (0.793-0.993)	0.085 (0.063 to 0.107)	< 0.001
			Roche	0.67	1.268 (1.121-1.415)	-0.029 (-0.061 to 0.003)	
Small LDL	317	5.2 (4.7-5.7)	Wako	0.79	1.012 (0.926-1.098)	0.066 (0.055 to 0.077)	0.511
			Roche	0.69	1.063 (0.938-1.188)	0.029 (0.013 to 0.045)	

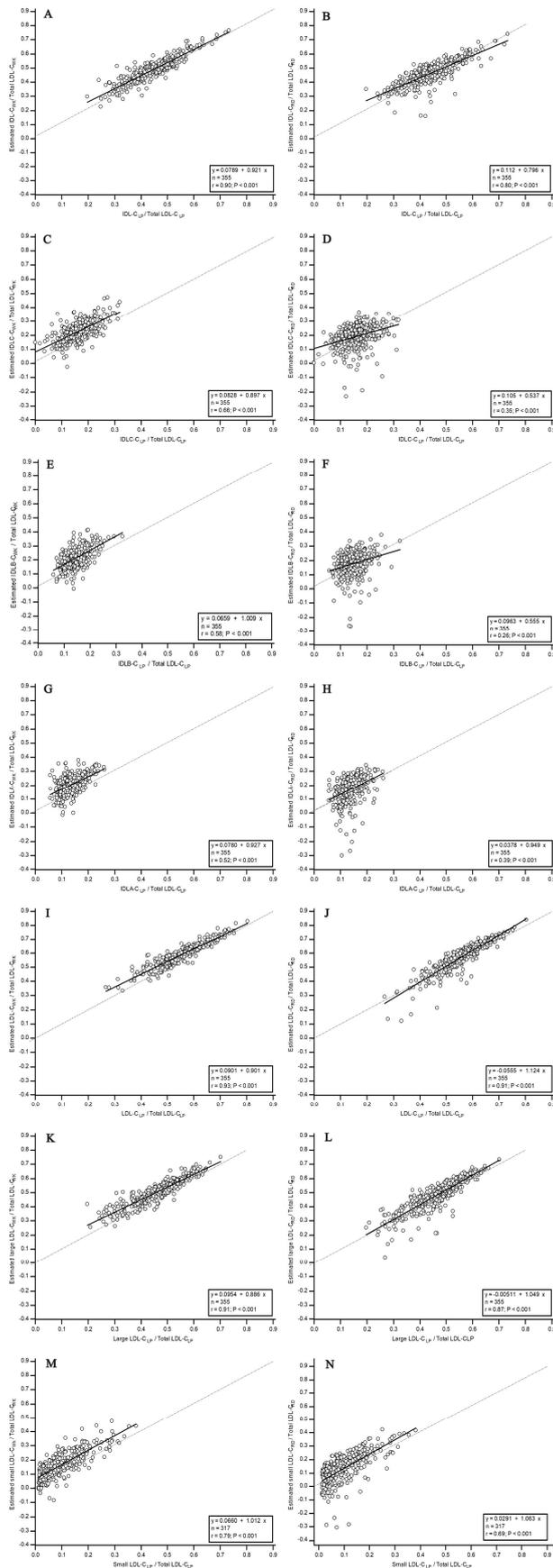


Fig. 3. The relationship between the cholesterol concentration calculated by lipoprint and the cholesterol concentration measured by two homogeneous methods in IDL (A, Wako; B, Roche), IDLC (C, Wako; D, Roche), IDLB (E, Wako; F, Roche), IDLA (G, Wako; H, Roche), LDL (I, Wako; J, Roche), large LDL (K, Wako; L, Roche), and small LDL (M, Wako; N, Roche) fraction.

3. 중성지방 농도 및 VLDL분율과 LDL 콜레스테롤 농도의 관계

중성지방 농도(x)에 대한 Total LDL-C_{LP}와 Total LDL-C_{WK}의 % difference (y)의 회귀식은 $y = 0.290 x + 5.221$ ($r = 0.26$, $n = 355$)로 중성지방 농도가 증가할수록 Total LDL-C_{WK}이 Total LDL-C_{LP}에 비해 통계적으로 유의하게 높아졌다 ($P < 0.001$)(Fig. 4A). 중성지방 농도(x)에 대한 Total LDL-C_{LP}와 Total LDL-C_{RD}의 % difference (y)의 회귀식은 $y = -0.004 x + 5.175$ ($r = 0.03$, $n = 355$)로 중성지방 농도에 따라 Total LDL-C_{RD}와 Total LDL-C_{LP}는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다($P = 0.592$)(Fig. 4B).

VLDL 분율(x)에 대한 Total LDL-C_{LP}와 Total LDL-C_{WK}의 % difference (y)의 회귀식은 $y = 0.975 x - 8.544$ ($r = 0.65$, $n = 355$)로 VLDL 분율이 증가할수록 Total LDL-C_{WK}이 Total LDL-C_{LP} 비해 통계적으로 유의하게 높아졌다($P < 0.001$)(Fig. 4C). VLDL 분율(x)에 대한 Total LDL-C_{LP}와 Total LDL-C_{RD}의 % difference (y)의 회귀식은 $y = 0.349 x - 1.686$ ($r = 0.19$, $n = 355$)로 중성지방 농도가 증가함에 따라 Total LDL-C_{WK}이 Total LDL-C_{LP} 비해 통계적으로 유의하게 높아졌으나($P < 0.001$)(Fig. 4D), Wako 법에 비해 기울기가 낮았다.

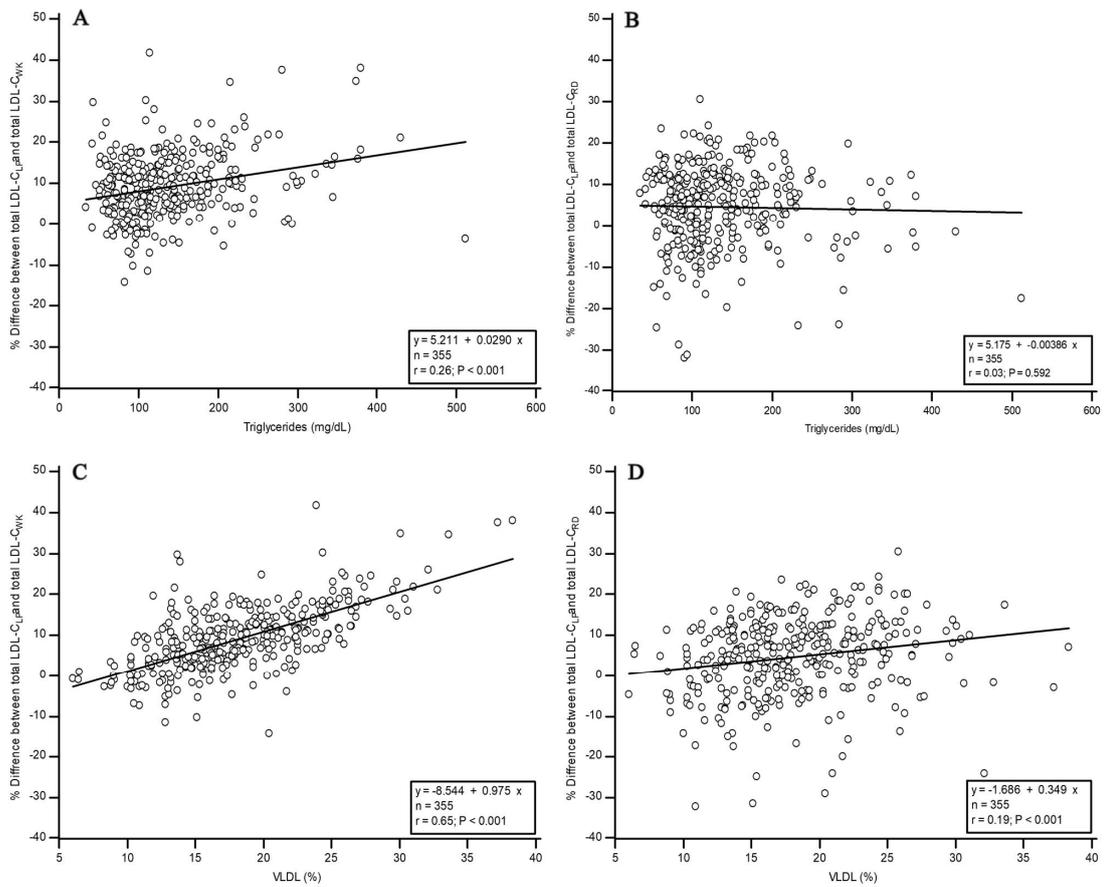


Fig. 4. The difference between total LDL-C_{WK} or total LDL-C_{RD}, and LDL-C_{LP} as a function of triglycerides (A, Roche; B, Wako) and VLDL percent (C, Roche; D, Wako).

고찰

본 연구에서 LDL 콜레스테롤 측정값의 평균은 Wako 법(91.5 ± 25.2 mg/dL)이 Roche 법(89.1 ± 29.4 mg/dL)보다 통계적으로 유의하게 높았다. Esteban-Salán 등¹⁴⁾은 313 명의 이상지질혈증 환자의 pooled serum 두 가지 농도에 대해 Wako 법은 156.5 ± 17.4 , 219.7 ± 20.6 mg/dL 로, Roche 법은 142.8 ± 16.2 , 205.7 ± 25.6 mg/dL 로 측정되어 Wako 법이 더 높게 측정되었다고 보고하였다. Miller 등¹⁵⁾은 60 명의 고지혈증 환자와 40 명의 정상인의 pooled serum 두가지 농도에 대해 Wako 법은 110.1, 198.9 mg/dL 로, Roche 법은 90.9, 174.6 mg/dL 으로 Wako 법이 더 높게 측정되었다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서 LDL 콜레스테롤 농도가 약 100 mg/dL 이상일때 Roche 법이 Wako 법보다 높게 측정되어(Fig. 2) 농도와 상관없이 Wako 법이 높게 측정된 기존 연구와는 다른 결과를 보였다. 이는 본 연구에서 사용한 Roche 법 시약이 기존 연구에서 사용한 1 세대 시약에서 조성을 보완한 2 세대 시약이기 때문일 수 있다.

이번 연구에서 연구자들은 각 non-LDL 분획에서 LDL 콜레스테롤 균질법의 시약 종류에 따라 추정평균회수율이 다르다는 것을 확인하였다. IDL 분획에서 Wako 법(92.1%)의 추정평균회수율이 Roche 법(79.6%)의 추정평균회수율보다 높았다. IDL 분획을 세분화하여 추정평균회수율을 비교하였을 때, VLDL 과 인접한 IDLC 분획에서는 Wako 법(89.7%) 이 Roche 법(53.7%)보다 높았으며, IDLB 분획에서 Wako 법(100.9%)이 Roche 법(55.5%)보다 높았으나, LDL 과 인접한 IDLA 분획에서 Wako 법(92.8%)과 Roche 법(94.9%)간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 균질법의 회수율을 평가한 기존연구 중 Roche 법과 Wako 법을 평가한 연구는 없었지만, Roche 법과 같은 selective solubilization 원리를 이용하는 Kyowa 법과 다른 균질법들을 초원심분리를 이용하여 비교한 연구들은 몇몇 보고되었다.^{12-13, 16)} Sakaue 등¹⁶⁾은 정상인 검체의 IDL 분획에서 세 가지 균질법의 회수율이 Kyowa 법 64%, Daiichi 법 47%, Denka 법 31%로 균질법간 유의미한 차이를 보였다고 보고하였다. Fei 등¹³⁾은 정상인 검체의 IDL 분획에서 2 가지 균질법의 회수율이 Kyowa 법 52.4%, Daiichi 법 31.2%로 Kyowa 법이 통계적으로 유의미하게 높은 회수율을 보였다고 보고하였다. Usui 등¹²⁾은 정상인 검체 및 고지혈증 환자 검체에 대해 IDL 분획에서 회수율이 Kyowa 법 71.7%, Daiichi 법 68.9%로 두 방법간 유의

한 차이가 없었지만 Daiichi 법과 달리 Kyowa 법은 HPLC (High-performance liquid chromatography)의 용출시간에 따라 회수율을 차이를 보여 Kyowa 법의 회수율은 지단백의 입자크기에 의존적일 수 있다고 보고하였다. 본 연구에서도 Lipoprint 를 이용하여 입자크기에 따라 IDLC, IDLB, IDLA 분획을 나누었을 때, Kyowa 법과 같은 원리를 이용하는 Roche 법의 경우 Wako 법과 달리 IDLC, IDLB 분획과 IDLA 분획간 추정평균회수율의 차이를 보였다. Selective solubilization 법은 alpha-cyclodextrin sulfate 를 이용하여 VLDL 이 효소반응에 참가하지 않도록 차단하는데 IDL 분획중 VLDL 과 유사한 물리화학적 특성을 가진 지단백 입자가 alpha-cyclodextrin sulfate 에 의해 함께 차단되어^{9, 16-17)} IDLC 와 IDLB 분획의 회수율이 낮을 수 있다.

본 연구에서 LDL 분획의 추정평균회수율이 Roche 법(112.4%)이 Wako 법(90.1%)보다 높았다. LDL 분획을 세분화하여 추정평균회수율을 비교하였을 때, LDL1 과 LDL2 를 합한 large LDL 분획에서 Roche 법(104.9%)이 Wako 법(88.6%)보다 높았다. LDL1 분획에서 Roche 법(99.1%)과 Wako 법(89.3%)간에 통계적으로 유의한 없었지만 LDL2 분획에서 Roche 법(126.8%)이 Wako 법(89.3%)보다 높았다. Sakaue 등¹⁶⁾은 정상인 검체에서 “narrow-cut” LDL(1.019-1.063 g/ml) 분획의 회수율이 Kyowa 법 86%, Daiichi 법 87%, Denka 법 95%이므로 균질법간 차이를 보였다고 보고하였다. Usui 등¹²⁾은 정상인 검체 및 고지혈증 환자 검체에서 LDL 중 가장 많은 비중을 차지하는 1.019-1.040 g/ml 밀도의 분획의 회수율이 Kyowa 법 88.4-92.0%, Daiichi 법 95.6-98.7%로 Daiichi 법이 통계적으로 유의미하게 높았다고 보고하였다. 기존 연구에서 LDL 분획에서 Roche 법과 같은 원리를 사용하는 Kyowa 법이 다른 방법들에 비해 회수율이 낮았지만, 본 연구에서는 Roche 법이 Wako 법보다 높은 추정평균회수율을 보였다. 이는 Roche 법이 Kyowa 법과 기본적으로 같은 원리를 이용하지만, 본 연구에서 사용한 2 세대 Roche 법은 기존 연구가 이루어졌던 당시의 Kyowa 법과 시약의 구체적인 성분 및 조성이 다르기 때문일 것이다.

본 연구에서 중성지방 농도가 높을수록 Lipoprint 에서 계산된 LDL 콜레스테롤 농도에 비해 Wako 법은 높게 측정되었으나 Roche 법은 차이가 없었다. Sugiuchi 등⁹⁾은 Roche 법에서 사용하는 selective solubilization 법은 중성지방 농도가 높아도 β - quantification 와의 bias 가 없었다고 보고하였다. Miller 등¹¹⁾은

중성지방 농도가 증가함에 따라 균질법과 β - quantification 의 bias 가 Wako 법 > Daiichi 법 > Denka 법 순으로 유의하게 차이났지만 Roche 법은 유의한 bias 를 보이지 않았다고 보고하였다. Esteban-Salán 등¹⁴⁾은 중성지방 농도가 700 mg/dL 까지는 Wako 법과 Roche 법 모두 유의한 bias(<5%)를 보이지 않았지만 그 이상의 농도에서는 유의한 bias 를 보였는데, Wako 법은 positive bias 를, Roche 법은 negative bias 를 보였다. 이와 같이 이전 연구들도 본 연구와 마찬가지로 Wako 법은 중성지방의 간섭(interference)이 있는 것으로 나타났으나 Roche 법은 간섭이 없거나 적었다. 이는 지단백 입자의 중성지방 함량에 따라 지단백입자의 크기, 전하 등의 물리화학적 특성이 변하여¹⁷⁾ 균질법간 다른 반응도를 보이기 때문일 것이다.

본 연구에서는 Lipoprint 검사를 시행후 혈청 검체를 -20 도에서 냉동 후 해동하여 균질법으로 측정하였다. Sakaue 등¹⁶⁾은 -20 도에서 12 개월간 보관후 해동하여 Roche 법으로 검사하였을 때 측정값의 유의한 변화가 없었다고 보고하였다. 또한 Nauck¹⁸⁾등은 -20 도와 -40 도에 두달간 보관 후 해동하여 Wako 법과 Roche 법으로 검사하였때 두 방법 모두 측정값의 유의한 변화는 없었다고 보고하였다. 이와 같이 냉동 후 해동한 검체를 균질법균질 측정했을 때 측정값은 유의한 변화가 없는 것으로 알려져 있지만, Zivkovic 등¹⁹⁾은 냉동 보관후 해동시 지단백의 지질 조성이 바뀌었다고 보고하였다. 따라서 혈청을 냉동보관후 해동시 신선혈청과 지단백분획비율이 변할 수 있기 때문에 신선혈청 검체에 대해 균질법으로 측정하는 추가 연구가 필요할 것이다.

본 연구에서 LDL 콜레스테롤 농도가 낮을때 Wako 법이 높게 측정되고 높을 때는 Roche 법이 높게 측정되었다. 또한 IDL 분획에서 Roche 법이 Wako 법보다 평균 회수율이 낮았으나, LDL 분획에서는 높았다. 이는 LDL 콜레스테롤 농도가 낮을때는 상대적으로 IDL 분획이 비중이 높기 때문에 Roche 법에서 과소평가되지만, LDL 콜레스테롤 농도가 높아질수록 LDL 분획의 비중이 높아져 Roche 법이 과대평가된 것으로 설명할 수 있다. 이와 같이 균질법간 측정값이 차이나는 것은 각 지단백 분획에서 균질법간 반응도가 다르기 때문이며, calibration 의 결과로 정상농도보다 낮은 농도 또는 높은 농도에서 측정값의 차이가 더 커질수 있다. 또한 중성지방 농도가 높은 검체 등 비정상 지단백이 포함된 환자 검체에 대해 균질법간 측정값의 차이가 발생할 수 있다. 균질법의 표준화를 위해서는 각 지단백 분획에 대한 회수율과 중성 지방의 간섭을 확인하는 것이 필요하지만 초원심분리와 같이 복잡한 방법이 요구

되어 제한적으로 연구가 이루어져 왔다. 본 연구와 같이 Lipoprint 를 이용하여 비교적 간편하게 간접적으로 회수율을 평가하고 중성지방의 간섭을 확인 하는 방법이 유용하게 쓰일 수 있을 것이다.

참고문헌

1. Larosa JC, Chambless LE, Criqui MH, Frantz ID, Glueck CJ, Heiss G, et al. Patterns of dyslipoproteinemia in selected North American populations. The Lipid Research Clinics Program Prevalence Study. *Circulation*. 1986;73(1 Pt 2):112-29.
2. Cutler JA, Grandits GA, Grimm RH, Thomas HE, Billings JH, Wright NH, et al. Risk factor changes after cessation of intervention in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Preventive medicine*. 1991;20(2):183-96.
3. Werner RM, Pearson TA. LDL-cholesterol: a risk factor for coronary artery disease--from epidemiology to clinical trials. *The Canadian journal of cardiology*. 1998;14:3B-10B.
4. Stone NJ, Robinson J, Lichtenstein AH, Merz CNB, Blum CB, Eckel RH, et al. 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults. *Circulation*. 2013;01. cir. 0000437738.63853. 7a.
5. Myers GL, Kimberly MM, Waymack PP, Smith SJ, Cooper GR, Sampson EJ. A reference method laboratory network for cholesterol: a model for standardization and improvement of clinical laboratory measurements. *Clinical chemistry*. 2000;46(11):1762-72.
6. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972;18(6):499-502.
7. Sugiuchi H, Uji Y, Okabe H, Irie T, Uekama K, Kayahara N, et al. Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated alpha-cyclodextrin. *Clinical chemistry*. 1995;41(5):717-23.
8. Okada M, Matsui H, Ito Y, Fujiwara A, Inano K. Low-density lipoprotein cholesterol can be chemically measured: a new superior method. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1998;132(3):195-201.
9. Sugiuchi H, Irie T, Uji Y, Ueno T, Chaen T, Uekama K, et al. Homogeneous assay for measuring low-density lipoprotein cholesterol in serum with triblock copolymer and α -cyclodextrin sulfate. *Clinical chemistry*. 1998;44(3):522-31.
10. Nauck M, Warnick GR, Rifai N. Methods for measurement of LDL-cholesterol: a

critical assessment of direct measurement by homogeneous assays versus calculation. *Clinical chemistry*. 2002;48(2):236-54.

11. Miller WG, Myers GL, Sakurabayashi I, Bachmann LM, Caudill SP, Dziekonski A, et al. Seven direct methods for measuring HDL and LDL cholesterol compared with ultracentrifugation reference measurement procedures. *Clin Chem*. 2010;56(6):977-86.

12. Usui S, Kakuuchi H, Okamoto M, Mizukami Y, Okazaki M. Differential reactivity of two homogeneous LDL-cholesterol methods to LDL and VLDL subfractions, as demonstrated by ultracentrifugation and HPLC. *Clinical chemistry*. 2002;48(11):1946-54.

13. Fei H, Maeda S, Kirii H, Fujigaki S, Maekawa N, Fujii H, et al. Evaluation of two different homogeneous assays for LDL-cholesterol in lipoprotein-X-positive serum. *Clinical chemistry*. 2000;46(9):1351-6.

14. Esteban-Salán M, Guimón-Bardesi A, De La Viuda-Unzueta JM, Azcarate-Ania MN, Pascual-Usandizaga P, Amoroto-Del-Río E. Analytical and clinical evaluation of two homogeneous assays for LDL-cholesterol in hyperlipidemic patients. *Clinical chemistry*. 2000;46(8):1121-31.

15. Miller WG, Waymack PP, Anderson FP, Ethridge SF, Jayne EC. Performance of four homogeneous direct methods for LDL-cholesterol. *Clinical Chemistry*. 2002;48(3):489-98.

16. Sakaue T, Hirano T, Yoshino G, Sakai K, Takeuchi H, Adachi M. Reactions of direct LDL-cholesterol assays with pure LDL fraction and IDL: comparison of three homogeneous methods. *Clinica chimica acta*. 2000;295(1):97-106.

17. Sparks DL, Chatterjee C, Young E, Renwick J, Pandey NR. Lipoprotein charge and vascular lipid metabolism. *Chem Phys Lipids*. 2008;154(1):1-6.

18. Nauck M, Rifai N. Analytical performance and clinical efficacy of three routine procedures for LDL cholesterol measurement compared with the ultracentrifugation-dextran sulfate-Mg²⁺ method. *Clinica Chimica Acta*. 2000;294(1-2):77-92.

19. Zivkovic AM, Wiest MM, Nguyen UT, Davis R, Watkins SM, German JB. Effects of sample handling and storage on quantitative lipid analysis in human serum. *Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society*. 2009;5(4):507-16.