



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](#)

의학박사 학위논문

건강한 한국인 여성에서 혈중 항뮐러관호르몬  
참고치 설정 및 관련 유전자 변이 확인

Reference Interval Determination for Anti-Müllerian  
Hormone Level and Confirmation of Related Genetic  
Variation in Healthy Korean Women

울산대학교대학원  
의학과  
지미숙

건강한 한국인 여성에서 혈중 항플리관호르몬  
참고치 설정 및 관련 유전자 변이 확인

지도교수 전사일

이 논문을 의학박사 학위논문으로 제출함

2020년 2월

울산대학교 대학원  
의학과  
지미숙

지미숙의 의학박사 학위논문을 인준함

심사위원 민 원 기 (인)

심사위원 전 사 일 (인)

심사위원 이 우 창 (인)

심사위원 윤 여 민 (인)

심사위원 김 광 례 (인)

울 산 대 학 교 대 학 원

2020 년 2 월

## 국문요약

**배경:** 항뮐러관호르몬 (Anti-Müllerian Hormone, AMH)는 여성의 난소 기능과 밀접한 연관을 보이는 것으로 알려져 있는 난소 예비능 지표이다. 가임기 초기에는 혈액 내 AMH가 높게 분비되지만 점차 감소하여 폐경이 되면 더 이상 검출되지 않는다. 이런 특성으로 인해 AMH 검사는 난소 기능 측정 및 관련 질환 진단 보조, 난임 치료 반응 예측 등을 위하여 활용되고 있다. 최근 자동화 AMH 검사가 국내 도입되어 사용되고 있으나 이를 이용한 한국여성 참고치 설정 연구는 아직 없는 상황이다. 따라서 본 연구에서는 건강한 여성에서 관련 유전자 변이 확인과 함께 AMH 참고범위를 설정하고자 하였다.

**대상 및 방법:** 국민건강영양조사사업 6기 및 7기 1차년도(2013-2016년) 대상자 중 인체유래물기증에 동의하고 당뇨, 고혈압, 고콜레스테롤혈증이 없으며 비흡연자인 1,500명을 연구대상자로 선정하였다. 대상자들은 19-24세, 25-29세, 30-34세, 35-39세, 40-44세, 45-49세, 50-54세의 7개 연령그룹으로 나누어졌으며, 2019년 1~2월 대상자의 인체유래물자원을 국립중앙인체자원은행으로부터 분양받았다. 난소 기능에 영향을 미칠 가능성이 있는 유전자 변이의 영향을 최소화하기 위하여 관련 유전자 중 대표적인 *bone morphogenetic protein 15 (BMP15)*에 대하여 DNA 자원으로 직접염기서열분석을 시행하여 임상적으로 중요한 변이 검출 여부를 확인하였다. 혈청 자원으로 Roche Elecsys AMH 및 progesterone 검사를 시행하여 연령대별 AMH 참고범위를 설정하고 생리주기에 대한 정보를 얻었다. 추가적으로 국민건강영양조사사업 역학조사 일부 항목과 AMH의 관련성을 분석하였다.

**결과:** 전체 대상자의 평균 연령은 37.4세(표준편차 10.4세)이었다. *BMP15* 유전자검사서 질병연관 변이(Disease-associated variant)는 관찰되지 않았으며 총 9종의 양성 변이가 검출되었다(Missense variant 5종, synonymous variant 2종, in-frame insertion 1종, 5'-untranslated region variant 1종). 전체 대상자 중 19.0%에서 *BMP15* 변이가 관찰되었으며, 그 중 c.783\_785TCT[3] (p.Leu263dup)와 c.852C>T (p.Ser284=) 변이가 동시에 존재하는 경우가 변이 양

성자 중 56.8% (162/285)에 해당하여 가장 흔하였다. 변이 양성율은 연령대별 AMH 사분위수 그룹 간 차이를 보이지 않았다. AMH는 전체적으로 좌경 분포를 보였으며 대상자의 30%에서 0.5 ng/mL 이하의 값을 나타내었다. 이상치 13개를 제거 후 계산된 연령그룹별 AMH 중간값은 19-24세 4.33 ng/mL, 25-29세 4.13 ng/mL, 30-34세 3.33 ng/mL, 35-39세 2.11 ng/mL, 40-44세 1.10 ng/mL, 45-49세 0.21 ng/mL, 50-54세 0.01 ng/mL이었다. AMH 값은 연령이 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였으며 40세 이후 급격히 감소하였다. AMH 하위 5 퍼센타일 값은 각각 1.77 ng/mL, 1.20 ng/mL, 0.43 ng/mL, 0.39 ng/mL, 0.07 ng/mL, 0.01 ng/mL, 0.01 ng/mL, 하위 2.5 퍼센타일 값은 각각 1.14 ng/mL, 0.84 ng/mL, 0.22 ng/mL, 0.23 ng/mL, 0.01 ng/mL, 0.01 ng/mL, 0.01 ng/mL이었다. Clinical Laboratory Standards Institute에서 추천하는 퍼센타일 방법에 따라 계산한 중간 90 퍼센타일 참고범위는 각각 1.74-10.52 ng/mL, 1.12-8.68 ng/mL, 0.41-8.83 ng/mL, 0.39-5.43 ng/mL, 0.06-4.40 ng/mL, 0.01-1.87 ng/mL, 0.01-0.29 ng/mL이었고, 중간 95 퍼센타일 참고범위는 1.11-11.37 ng/mL, 0.79-10.17 ng/mL, 0.16-10.98 ng/mL, 0.19-6.74 ng/mL, 0.01-5.03 ng/mL, 0.01-2.49 ng/mL, 0.01-0.54 ng/mL이었다. 생리 주기에 따른 AMH 값 차이는 보이지 않았다. 전체 대상자에서 국민건강영양조사사업 역학정보 분석 결과, 카드뮴( $r = -0.382$ ), 수은( $r = -0.272$ ), 납( $r = -0.208$ ) 등 중금속과 비타민 D ( $r = -0.126$ ) 등의 항목이 AMH와 약한 음의 상관관계를 보였으며 AMH 값이 1 사분위수 미만인 대상자의 고민감도C반응단백 값이 높은 경향을 보였다( $P = 0.075$ ).

**결론:** 이 연구에서 제시한 자동화 AMH 검사의 참고치와 퍼센타일 정보, *BMP15* 유전자 변이, 관련 역학정보 자료는 한국 여성의 난소기능 평가, AMH 검사결과 해석 및 임상적 활용도 확장에 기여할 것으로 사료된다.

**중심단어:** anti-Müllerian Hormone, reference interval, bone morphogenetic protein 15, KNHANES

## 목차

국문요약 .....	i
표 목차 .....	iv
그림 목차 .....	v
약어목록 .....	vi
서론 .....	1
1. 배경 .....	1
2. 연구필요성 및 연구목표 .....	3
연구대상 및 방법 .....	5
1. 연구대상자 .....	5
2. 국립중앙인체자원은행 인체자원 분양 .....	5
3. <i>BMP15</i> 유전자검사 .....	6
4. AMH 와 progesterone 검사 .....	11
5. 국민건강영양조사사업 역학정보 분석 .....	12
6. 통계분석 .....	17
연구결과 .....	18
1. AMH 와 progesterone 검사수행 및 AMH 병행검사 .....	18
2. 대상자의 연령 그룹별 특성 비교 .....	18
3. <i>BMP15</i> 유전자검사결과 및 변이 빈도 .....	21
4. AMH 농도분포 및 참고범위 설정 .....	31
5. Progesterone 검사결과 해석 .....	34
6. AMH 농도와 <i>BMP15</i> 변이의 관련성 탐색 .....	41
7. 국민건강영양조사사업 역학정보 분석 .....	42
고찰 .....	51
결론 .....	56
참고문헌 .....	57
영문초록 .....	61

## 표 목차

Table 1. Primers for <i>BMP15</i> gene direct sequencing .....	7
Table 2. <i>BMP15</i> variant list included in this study .....	9
Table 3. Variables for KNHANES data analysis .....	13
Table 4. Demographic and laboratory characteristics of study participants .....	19
Table 5. Major genetic variants of the <i>BMP15</i> gene .....	22
Table 6. Observed variants of the <i>BMP15</i> gene in this study .....	23
Table 7. Frequency of common <i>BMP15</i> variant by age group .....	30
Table 8. AMH upper and lower percentiles by the age group .....	35
Table 9. AMH reference interval by CLSI percentile method .....	36
Table 10. AMH concentrations of the participants below the age of 19 .....	37
Table 11. Age-specific AMH values in healthy Korean women .....	38
Table 12. Menstrual cycle phase based on the progesterone value .....	40
Table 13. General characteristics and daily nutrient intakes of the participants .....	47
Table 14. General characteristics and daily nutrient intakes of the participants with 19-39 years old .....	49



## 그림 목차

Fig. 1. AMH percentile chart by age group .....	14
Fig. 2. Electropherogram of the <i>BMP15</i> c.852C>T heterozygous variant .....	24
Fig. 3. Electropherogram of the <i>BMP15</i> c.783_785TCT[3]variant .....	25
Fig. 4. Electropherogram of the <i>BMP15</i> 5'-untranslated region variant .....	26
Fig. 5. Electropherogram of the <i>BMP15</i> c.598C>T variant .....	27
Fig. 6. Electropherogram showing the <i>BMP15</i> exon 2 novel variant .....	28
Fig. 7. AMH distribution of the entire study population .....	32
Fig. 8. AMH distribution of each age group after exclusion of outliers .....	33
Fig. 9. Scatter plot between laboratory test items and AMH from the KNHANES .....	43
Fig. 10. High-sensitivity C-reactive protein results according to AMH quartiles .....	45
Fig. 11. Serum cadmium levels according to the AMH quartiles from the KNHANES .....	46

## 약어목록

AMH, anti-Mullerian hormone

BMP15, bone morphogenetic protein 15

ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay

KNHANES, Korea National Health and Nutrition Examination Survey

KRG, Korea Reference Genome

PCOS, polycystic ovary syndrome

POF, premature ovarian failure

## 서론

### 1. 배경

항물리관호르몬(Anti-Müllerian Hormone, AMH)는 transforming growth factor beta superfamily에 속하는 당단백질로 Müllerian inhibiting substance 로도 알려져 있다. 남성에서는 태아 고환에서 생성되어 물리관을 퇴화시키는 역할을 한다. 여성에서는 난소 내 난포의 과립막세포(granulosa cell)에서 분비되는데 난포의 여러 단계 중 pre-antral follicle 및 small antral follicle (2-10 mm)에서 분비되어 성숙 난포 개수를 조절하는 역할을 한다<sup>1)</sup>. AMH 혈중 농도 측정을 통하여 난소가 보유하고 있는 난자의 primordial follicle pool이 얼마나 되는지 예측할 수 있다. 수치가 높다면 향후 배란 가능한 난포 수가 많다는 의미이며, 낮다면 난포 수가 적다는 의미이다. 가임기 여성에서 해당 연령대에 비해 AMH 값이 현저히 감소되어 있다면 조기난소부전(Premature Ovarian Failure/insufficiency, POF)등 난소 기능 저하 관련 질환을 배제하기 위하여 추가 검사가 필요할 수 있으며 폐경 여성에서는 정상으로 해석할 수 있다. 반대로 AMH가 매우 증가되어 있는 경우에는 다낭성난소증후군(Polycystic Ovary Syndrome, PCOS) 등을 의심해 볼 수 있다. 즉, AMH는 난자의 수(quantity)를 반영하며 여성의 난소 기능과 밀접한 연관성을 보여 난소 예비 지표(ovarian reserve marker)로 이용되고 있다. 여성의 연령이 증가함에 따라 수집 가능한 난자 수가 감소하여 난소 기능은 저하된다. AMH는 이를 잘 반영하여 연령에 따라 값에 큰 차이를 보이며, 가임기 초기에는 높게 분비되고 25세 이후에는 점차 분비량이 감소하여 폐경 시 더 이상 검출되지 않는다. AMH 결과를 정확히 해석하기 위해서는 전체 여성 대상이 아닌 세분화된 연령대의 AMH 데이터를 기반으로 값의 감소 또는 증가를 판단하여야 한다.

임상적으로 사용 중인 난소 예비 지표에는 AMH 이외에도 기저 난포자극호르몬(Follicle-Stimulating Hormone, FSH)와 동난포 수(Antral Follicle Count, AFC)가 있다. Basal FSH는 가장 사용 경험이 많고 널리 사용되어 온 혈액 검사이나 생리주기에 따른 측정치 변화가 심하여 특정 시기(생리주기 2,3일째)에만 검사가 가능하다는 단점과 함께 민감도가 낮다는 제한점이 있다. AFC는 질식 초음파를 통해서 직접 관찰(visual assessment) 하는 방법으로 검사 직후 바로 결과를

알 수 있으나 생리주기 내 변이가 심하여 특정 시기에만 검사가 가능하고 초음파 검사자 간 변이가 존재한다. 그에 비해 AMH는 생리주기에 따른 결과값 차이를 보이지 않아 언제든 측정이 가능하며, 가장 조기에 난소기능 변화를 감지하는 신뢰성 높고 민감한 지표로 판단되고 있다. AFC보다 객관적인 평가가 가능하고 기존 지표와 우수한 상관관계를 보인다는 것은 장점이나, 단점은 국제적으로 일치화가 확립되지 않았다는 점이다. 따라서 결과값 해석 시 주의가 필요하며 시약제조사 간 결과값에 차이를 보일 수 있다.

AMH는 여러 영역에서 임상적으로 활용되고 있다. 난임 상태 평가 시 난소 기능 저하(diminished ovarian reserve) 여부 판단에 AMH 값이 활용되며, 연령 특이 AMH 값은 불임 클리닉에 내원하는 여성에게 유용한 정보를 제공한다. 난임 치료 시 과배란 유도 후 0.5~0.8 ng/mL 미만 시 저반응군을, 2.8~3.5 ng/mL 초과 시 과반응군을 예측할 수 있다. 치료 반응 예측을 위한 기준값은 연구자 및 지침에 따라 다르다. PCOS 진단 보조에도 활용되는데 아직 AMH 증가를 판단하기 위한 통일된 기준(universal threshold)은 아직 확립되지 않았으나 대략 5.0 ng/mL를 초과 시 PCOS에 진단적 가치가 있는 것으로 평가되고 있으며 향후 PCOS 진단에 AMH가 중요한 기준으로 포함될 가능성이 있다<sup>1,2)</sup>. 그 외 연구목적으로 시도되고 있는 적응증으로 젊은 암 환자에서 가임력 보존을 위한 항암치료 전후 난소기능 평가에 대해 연구가 진행되고 있다. AMH를 이용한 폐경 나이 예측에 대해서도 연구가 지속되어 왔으며 자동화 시약을 이용한 한 연구에서 폐경에 임박한 여성의 AMH 농도는 0.042 ng/mL 였다<sup>3)</sup>. 추후 연구가 필요한 분야로는 공공 보건 영역에서의 활용 가능성이 있다. 최근 출산율 감소와 초산연령 고령화 추세에 힘입어 환자가 아닌 일반 가임기 여성군에서의 난소 예비능 스크리닝에 관심이 증가하고 있다. 이는 가임 능력이 30대 중반 이후 급격히 감소하는 것이 잘 알려져 있기 때문에 본인의 난소 예비능 정보를 인지 시 향후 출산계획을 세우는데 조금 더 적극적으로 대처할 것으로 예상되기 때문이다<sup>4)</sup>. 그러나 불안감 조성, 결과해석 상 오해 소지, 비용-효과이슈, 스크리닝 시작 시기에 대한 미합의 등 여러가지 이유로 시도되지는 못하고 있으며 추후 많은 연구 및 사회적 합의가 필요하겠다.

AMH를 측정하기 위한 검사법으로 서로 다른 별개의 항체를 이용하여 개발된 Immunotec 및 Diagnostic Systems Laboratory 검사가 전통적으로 사용되어 왔다

5). 두 검사 모두 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 기반의 수기법이었으며 결과의 정확도, 정밀도, 검사시간 등 성능이 다소 부족하였고 두 검사 간 결과값 차이도 컸다. 이후 2011년 두 검사를 통합하여 original second generation (Gen II) ELISA 검사가 개발되었으나 검사 성능 및 샘플 안정성 이슈가 있었다. 이에 2013년 프로토콜이 개선된 modified Gen II ELISA 검사 (Beckman Coulter)가 출시되었다. 이후 2015년경 자동화 플랫폼이 개발되어 기존 검사 대비 정밀도, 민감도, 측정범위, 검사시간 측면에서 개선되었으며 2013년 국내 도입되었다. 국내에서 시판 중인 AMH 검사에는 Roche Elecsys AMH와 Beckman Coulter Access AMH 두 종류가 있으며, Elecsys AMH의 시장 점유율이 더 높은 상태이다(2018년 미국 College of American Pathologist survey; Roche 55.3%, Beckman Coulter 30.8%). 기존 modified Gen II ELISA 검사와 비교 시 자동화 AMH 결과값이 10-30% 낮게 측정되는 것으로 보고되었다<sup>6)</sup>.

AMH 검사는 난소 예비능을 반영하기 때문에 실제로는 난임이 의심되는 환자에서 시행하는 경우가 흔하다. 난소기능이 40세 이전에 일시적으로 정지되는 것으로 정의되는 조기난소부전은 비가역적인 폐경과는 달리 난소의 기능이 회복될 가능성이 있기 때문에 젊은 여성에서 신체적, 정신적으로 중요한 질환이다. 조기난소부전, 다낭성난소증후군 등 난소기능 이상과 관련된 주요 유전자에는 *bone morphogenetic protein 15 (BMP15)*, *growth differentiation factor 9 (GDF9)* 등이 있으며 두 유전자는 난소발생 및 난포발생에서 매우 중요한 역할을 한다<sup>7,8)</sup>. *BMP15* 유전자에서 c.202C>T (p.Arg68Trp), c.226C>T (p.Arg76Cys), c.631C>T (p.Gln211Ter), c.704A>G (p.Tyr235Cys) 등이 Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) database에 등재되어 있다. 이 변이들은 임상적으로 질병연관 변이로 평가되어 중요도가 높다.

## 2. 연구필요성 및 연구목표

AMH 결과를 정확하게 해석하고 적절히 활용하기 위해서는 정상인에서의 참고범위 설정이 선행되어야 한다. 여성의 혈중 AMH 농도는 연령대(age group)에 따라 다르고 인종의 영향을 받을 가능성이 있으며 검사법에 따라 농도분포가 달라질 수 있다. 따라서 10대 후반에서 50대 중반까지의 넓은 연령대에서 한국인 건강인 여성을 선정하여 세분화된 연령별 AMH 참고치를 설정하는 것이 필요하다고

판단하였다. 자동화 AMH가 출시된 지 오래되지 않아 아직 이를 이용한 참고치 관련 연구가 많지는 않으며, 그 중 Beckman Coulter AMH 검사의 경우 몇몇 연구 결과와 함께 최근 중국인 건강인 여성에서의 대규모 참고치 설정 문헌이 발표된 바 있으나<sup>9)</sup>, Roche AMH 검사의 경우 1개 문헌이 있으며 서구인을 대상으로 평가하였고 한국인을 비롯한 아시아에서는 아직 평가되지 않았다<sup>10)</sup>. 기존 국내에서 보고된 참고치 설정에 관한 연구는 모두 ELISA 법으로 AMH를 측정하여 결과의 신뢰성 측면에서 다소 부족하고 최신 추세를 반영하지 못하고 있으며, 3개 연구 중 2개 연구가 불임 센터를 방문한 환자를 대상으로 하여 선택 편견이 존재할 가능성이 있다<sup>11-13)</sup>.

이에 본 연구에서는 건강인 한국인 여성에서 AMH를 평가하고자 하였다. 질병관리본부 주도 국민건강영양조사사업(Korea National Health and Nutrition Examination Survey) 대상자가 국내에서 대표성을 가진다고 판단하여 해당 검체를 국립중앙인체자원은행(바이오뱅크)에서 분양받아 참고치를 설정하는 직접선택기법을 시도하였다. 국민건강영양조사사업은 전반적인 건강과 영양 상태 및 그 추이에 대한 신뢰성 있는 통계 산출을 위해 대규모 일반인구 집단을 대상으로 코호트를 구축하여 사회, 경제, 질환, 식이, 운동, 음주, 흡연 등 건강 및 생활습관과 관련된 설문조사와 건강검진을 시행하고, 혈액 및 소변 등 인체자원을 수집하며, 장기 추적조사를 수행하는 사업이다. 1998년부터 1기 사업이 시작되었으며 이 사업을 통해 생산된 통계 자료는 국가 건강정책 수립 및 건강증진사업 수행결과 평가의 근간이 되고 있다. 국민건강영양조사사업에 참여 시 작성하게 되는 건강설문조사 항목 일부를 건강인 참고집단 선택을 위한 1차 기준으로 사용하였으며, 비흡연자이면서 고혈압, 당뇨병, 고콜레스테롤 혈증이 없는 54세 이하 여성을 분양대상자로 선정하고자 하였다. 흡연은 여러 기전으로 난포 수를 감소시켜 난소 기능에 유해한 인자로 알려져 있으며 흡연자의 AMH 농도는 비흡연자에 비하여 낮다<sup>14)</sup>. 따라서 흡연으로 인한 간섭을 배제하기 위하여 비흡연자만 포함하였다. 2차 기준으로 *BMP15* 유전자검사를 시행하여 임상적으로 중요한 변이가 관찰되지 않은 경우 연구대상자가 이로 인한 영향을 받지 않았음을 확인하였다. 혈청 검체로 AMH 및 progesterone을 측정하여 한국인에서 자동화 AMH 검사 참고치 및 퍼센타일 정보에 대한 기초 자료를 제공하고 결과해석 및 임상적 적용에 도움을 주고자 하였다.

## 연구대상 및 방법

### 1. 연구대상자

질병관리본부에서 수행하는 국민건강영양조사사업 6기(2013-2015년) 및 7기 1차년도(2016년) 참여자 중 인체유래물 기증에 동의하고 아래의 기준을 만족하는 여성 1,500명을 대상으로 하였다. 건강인 연구대상자 선정기준은 다음과 같다: (1) 혈청과 DNA가 동시 분양 가능함, (2) 만 54세 이하이면서 건강설문조사결과 비흡연자이고, 고혈압, 당뇨병, 고콜레스테롤혈증이 없음.

상기 기준을 만족하는 여성 대상자를 1: 19-24세, 2: 25-29세, 3: 30-34세, 4: 35-39세, 5: 40-44세, 6: 45-49세, 7: 50-54세의 7개 연령 그룹으로 나누어 각 그룹별로 120명 이상의 충분한 인원수가 포함되도록 하였다. 상대적으로 참여인원이 적어 인원 수 확보가 어려운 18세 이하는 50명만 포함하며, 농도 분포만 분석하고 참고 범위 설정은 하지 않았다. 건강인 선정을 위한 2차 기준은 인체자원은행에서 분양받은 DNA로 시행한 *BMP15* 유전자검사 결과를 이용하였다. 임상적으로 중요한 변이가 관찰되지 않은 경우 연구대상자가 이로 인한 영향을 받지 않았음을 확인하였다. 본 연구는 서울아산병원 임상연구심의위원회에서 심의 면제를 받았다(확인번호: 2018-0886, 2019-0211).

### 2. 국립중앙인체자원은행 인체자원 분양

질병관리본부 국립중앙인체자원은행 인체자원분양데스크를 통하여 혈청과 DNA 자원분양을 신청하였고 심의위원회의 승인을 받았다(분양관리번호: 2018-049). 이후 2019년 1~2월에 1,500명의 자원을 분양받았다. 혈청의 경우 매우 한정된 자원으로 1명 당 분양된 검체량이 300  $\mu$ L였다. DNA의 경우 62~550 ng/ $\mu$ L 범위의 농도였으며 96 well plate 형태로 최종 정도관리 완료 후 분양되었다. 분양 자원은 익명화된 상태로 수령하였으며 분양 후 검사 전까지 서울아산병원 진단검사의학과에서 -70°C deep freezer에 보관하였다.

### 3. *BMP15* 유전자검사

난소기능부전 관련 주요 유전자 *BMP15*에 대해 직접염기서열분석법으로 유전자 검사를 시행하여 주요 돌연변이 검출여부를 확인하고 그 빈도를 파악하고자 하였다. NCBI reference sequence는 NG\_012894.1, NM\_005448.2로 *BMP15* 유전자는 2개의 엑손으로 구성되어 있다. 기존 문헌을 검토하여 PCR 및 Sequencing을 위한 프라이머를 결정하였다. 검사에 사용된 프라이머 정보를 **Table 1**에 정리하였다<sup>15, 16)</sup>.



Table 1. Primers for *BMP15* gene direct sequencing

Primer name	Sequence	Primer size	PCR product
BMP15_E1F	CATGCTGCCTTGTCACCTTC	22mer	742 bp
BMP15_E1R	GTAGGCTTGGCGCTGGCTTCTC	22mer	
BMP15_E2F	ATCAAGACAGTTTATGAGGAAT	22mer	1002 bp
BMP15_E2R	TGGGAAACCTGATCTAGCCGTAC	23mer	

Abbreviation: bp, base pair.

PCR 과정은 initial denaturation 95°C 5분 시행 후, 95°C 30초, 56°C 30초, 72°C 1분의 denaturation, annealing, extension 32 cycle을 시행하였고 이후 final extension 72°C 5분 이후 종료하였다. 직접염기서열분석은 1번 엑손은 Forward 단방향으로, 2번 엑손을 양방향으로 수행하였다. PCR, Purification, Sequencing 과정은 마크로젠(MacroGen Inc., Seoul, Korea)에서 시행하였고 결과 판독 및 검증은 연구자가 수행하였다. 중요 변이는 c.202C>T (p.Arg68Trp), c.226C>T (p.Arg76Cys), c.631C>T (p.Gln211Ter), c.704A>G (p.Tyr235Cys) 등으로 이 변이들을 포함하여 분석에 포함된 variant list를 **Table 2**에 정리하였다.

**Table 2. *BMP15* variant list included in this study**

Location	Nucleotide variation	Amino acid variation	Protein domain	No. of Cases	Case	No. of Controls	Countries	Author (year)
Exon 2	c.704A>G	p.Tyr235Cys	Proregion	case report	NA	NA	Italy	Di Pasquale E et al. (2004) <sup>17)</sup>
Exon 1	c.202C>T	p.Arg68Trp	Proregion	1/160	POF	0/181	Italy	
Exon 1	c.308A>G	p.Asn103Ser	Proregion	11/160	POF	16/181	Italy	Di Pasquale E et al. (2006) <sup>18)</sup>
Exon 2	c.538G>A	p.Ala180Thr	Proregion	5/160	POF	0/181	Italy	
Exon 2	c.783_785TCT[3]	p.Leu263dup	Proregion	2/160	POF	5/95	Italy	
5'-UTR	c.-9C>G	NA	NA	44/133	POF	49/197	India	
Exon 1	c.226C>T	p.Arg76Cys	Proregion	3/133	POF	0/197	India	
Exon 1	c.308A>G	p.Asn103Ser	Proregion	13/133	POF	10/164	India	Dixit et al. (2006) <sup>19)</sup>
Exon 2	c.852C>T	p.Ser284Ser	Mature	9/133	POF	20/197	India	
Exon 2	c.631C>T	p.Gln211X	Proregion	1/133	POF	0/197	India	
Exon 2	c.783_785TCT[3]	p.Leu263dup	Proregion	4/133	POF	4/197	India	
Exon 2	c.443T>C	p.Leu148Pro	Proregion	1/203	POF	0/54	France	Laissue et al.

Exon 2	c.783_785TCT[3]	p.Leu263dup	Proregion	10/203	POF	9/54	France	(2006) <sup>20)</sup>
Exon 1	c.202C>T	p.Arg68Trp	Proregion	2/300	POF	0/216	Italy	Rossetti et
Exon 2	c.413G>A	p.Arg138His	Proregion	1/300	POF	0/216	Italy	al. (2009) <sup>21)</sup>
Exon 1	c.308A>G	p.Asn103Ser	Proregion	7/50	POF	25/214	Belgium	
Exon 2	c.443T>C	p.Leu148Pro	Proregion	1/50	POF	1/214	Belgium	Tiotiu et al.
Exon 2	c.538G>A	p.Ala180Thr	Proregion	2/50	POF	2/214	Belgium	(2010) <sup>22)</sup>
Exon 2	c.581T>C	p.Phe194Ser	Proregion	2/85	POF	1/214	Belgium	
Exon 1	c.308A>G	p.Asn103Ser	Proregion	1/216	PCOS	0/200	Chinese	Liu et al.
Exon 2	c.598C>T	p.His200Tyr	Proregion	1/216	PCOS	2/200	Chinese	(2011) <sup>16)</sup>
Exon 2	c.783_785TCT[3]	p.Leu263dup	Proregion	21/216	PCOS	30/200	Chinese	
Exon 2	c.598C>T	p.His200Tyr	Proregion	5/100	POF	1/100	Chinese	Wang et al.
Exon 2	c.783_785TCT[3]	p.Leu263dup	Proregion	5/100	POF	15/100	Chinese	(2010) <sup>15)</sup>
Exon 2	c.985C>T	p.Arg329Cys	Mature	1/100	POF	0/100	Chinese	
Exon 2	c.986G>A	p.Arg329His	Mature	1/35	POF	NA	Colombia	Patino et al. (2017) <sup>23)</sup>

Abbreviations: NA, not available; POF, premature ovarian failure; PCOS, polycystic ovary syndrome; UTR, untranslated region.

#### 4. AMH와 progesterone 검사

분양받은 혈청 검체를 해동하여 서울아산병원 진단검사의학과에서 2019년 1~2월에 검사를 시행하였다. Cobas e602 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) 장비를 사용하였으며, 검사방법은 electrochemiluminescence immunoassay 법이었다. 검체량이 300  $\mu$ L 이하의 소량이어서 주 항목인 AMH 검사를 1회 시행하고 이후 잔여량으로 progesterone 검사를 시행하였다. 제조사가 제시한 Elecsys AMH 시약의 검출한계는 0.01 ng/mL, 정량 한계는 0.03 ng/mL, 측정 범위는 0.01-23 ng/mL이며, 최소 샘플 요구량은 50  $\mu$ L 였다<sup>24)</sup>. Elecsys AMH에는 특이도가 높은 1쌍의 마우스 단클론 항체가 이용되었는데, AMH mature region 부위를 인지하는 F2B/12H와 AMH pro-region 부위를 인지하는 F2B/7A로 구성되어 있으며 AMH Gen II ELISA 및 Beckman Coulter Access AMH와 동일한 항체가 사용되었다<sup>3,24)</sup>. F2B/12H는 비오틴화된 capture antibody, F2B/7A는 루테늄 복합체로 표지된 detection antibody 이다. Elecsys AMH 값은 Beckman Coulter AMH Gen II ELISA (unmodified version) 값에 소급성을 보인다. AMH Calset (two points)와 마스터곡선에 의해서 로트 특이 보정 곡선이 장비 별로 결정된다. 내부정도관리를 위해서는 Roche사의 PreciControl AMH Plus 물질을 사용하였다. 2019년 1월 및 2월 AMH 내부정도관리결과는 Level 1 각각 7.3%, 5.2%, Level 2 각각 3.2%, 2.9%였다. 가능한 동일 Lot 시약 확보를 위해 노력하였으나, 불가피하게 시약 Lot가 변경될 경우 병행 검사 및 Control 물질 (BioRad) 등을 사용하여 결과의 비교동등성을 평가하였다.

Progesterone 검사는 연구대상자의 생리주기(menstrual cycle phase)에 대한 정보를 얻기 위해서 시행되었다. Elecsys Progesterone 시약지시서에 제시된 자료를 참조하여 follicular phase 0.05-0.12 ng/mL, follicular or ovulatory 0.121-0.893 ng/mL, ovulatory 0.894-1.829 ng/mL, luteal or ovulatory 1.83-12.0 ng/mL, luteal phase 12.1-23.9 ng/mL로 판단하였다. 또한 23.9 ng/mL를 초과하는 경우 high progesterone 군으로, 45세 이상에서 0.057 ng/mL 미만일 경우 low progesterone 군으로 판단하였다. Progesterone 시약의 검출한계는 0.05 ng/mL이었다. 검사수행절차, 보정, 질관리, 장비유지보수, 문제해결 등에 익숙한 검사자가 검사를 시행하였다.

## 5. 국민건강영양조사사업 역학정보 분석

국민건강영양조사사업 참가자의 건강설문조사, 영양조사, 검진조사 항목 중 일부 자료에 대하여 연령그룹 별 비교 및 AMH 농도와의 관련성을 분석하였다. 대상자 신장, 체중, 체질량지수, 혈압 등의 신체계측 자료, 공복혈당, 콜레스테롤, 비타민 D, 고감도 C반응단백검사, 중금속 등 혈액 검사 자료, 1일 영양소 섭취량 중 일부를 분석하였다. 일부 혈액검사의 경우 특정 연도 또는 특정 연령대에서만 시행되었다. 영양조사의 경우 조사 1일전에 섭취한 음식에 대하여 식품섭취조사(개인별 24시간 회상조사)를 시행하여 수집된 자료를 영양소 섭취량의 형태로 가공한 자료를 이용하였다. 분석에 포함된 변수들을 **Table 3**에 정리하였다.

Table 3. Variables for KNHANES data analysis

구분	변수설명	변수명
기초	만나이, 조사연도, 동/읍면, 가구 소득 사분위수	age, year, town_t, ho_incm
여성건강	최소 1달 이상 경구피임약 복용 경험	LW_oc
영양	최근 1년간 식이보충제 복용 여부	LS_1YR
신체계측	신장, 체중, 허리둘레, 체질량지 수, 비만 유병여부, 최종수축기혈 압, 최종이완기혈압	HE_ht, HE_wt, HE_wc, HE_BMI, HE_obe, HE_sbp, HE_dbp
혈액검사(공 통)	혈색소, 빈혈 유병여부, 공복혈 당, 당화혈색소, 총콜레스테롤, HDL 콜레스테롤, 중성지방, 크레 아티닌	HE_HB, HE_anem, HE_glu, HE_HbA1c, HE_chol, HE_HDL_st2, HE_TG, HE_crea
혈액검사*	비타민 D, 고민감도C반응단백, 납, 수은, 카드뮴, 갑상선자극호 르몬, 유리티록신	HE_vitD, HE_hsCRP, HE_Pb, HE_Hg, HE_Cd, HE_TSH, HE_ft4
1일 영양소 섭취량(24시 간 회상조 사)	에너지, 탄수화물, 단백질, 지방, 식이섬유, 칼슘, 인, 철, 나트륨, 칼륨, 티아민, 리보플라빈, 나이 아신, 비타민C, 비타민A, 포화지 방산, 단일불포화지방산, 다가불 포화지방산, n-3계 지방산, n-6계 지방산, 콜레스테롤	N_EN, N_CHO, N_PROT, N_FAT, N_TDF, N_CA, N_PHOS, N_FE, N_NA, N_K, N_B1, N_B2, N_NIAC, N_VITC, N_VA, N_SFA, N_MUFA, N_PUFA, N_N3, N_N6, N_CHOL

\*특정 연도 또는 일부 연령대에서만 시행된 항목임.

국민건강영양조사사업 역학정보 분석을 위하여 관련 지침에 따라 질병관리본부 건강영양조사과에 학술연구자료 사용신청을 하였다. 원시자료 이용지침서 및 학술연구자료 이용 절차를 준수하여 연구제안서, 통계방법론 적용계획, 결과표 형태 등을 제출하였고 승인 절차 이후 질병관리본부 건강영양조사과 학술처리실을 방문하여 통계분석을 시행하였다. 세부내용은 다음과 같다.

(1) 19세 이상 전체대상자의 신체계측과 혈액검사 항목 결과가 연령그룹 별로 차이를 보이는지 비교하기 위하여 기술통계분석을 시행하였다. 연령, 신장, 체중, 허리둘레, 체질량지수, 혈압, 혈색소, 공복혈당, 당화혈색소, 총콜레스테롤, 중성지방, 크레아티닌, 빈혈유병여부, 비만유병여부 등의 변수를 연령그룹 별로 비교하였다. 평균, 표준편차 또는 빈도(%)로 결과를 표현하였다. 빈혈은 혈색소 12.0 g/dL 미만으로, 비만은 체질량지수 25.0 kg/m<sup>2</sup> 이상으로 정의되었다.

(2) 유효한 값이 존재하는 전체대상자 및 주요 가임기 연령대 19-39세에서 AMH 값과 체질량지수, 공복혈당, 총콜레스테롤, HDL 콜레스테롤, 중성지방, 비타민 D, 고민감도C반응단백(hsCRP), 납, 수은, 카드뮴, 갑상선자극호르몬, 유리티록신 등 여러 변수 간 Pearson 상관분석을 시행하여 상관성 유무를 조사하였다. 상관계수 및 *P* value를 통하여 상관성 유무를 판단하고 각 변수를 x축, AMH를 y축인 산점도를 작성하였다.

(3) 각 연령그룹 AMH 데이터를 이용하여 계산된 25, 50, 75 백분위수를 이용하여(Fig. 1.), 각 대상자들을 AMH 값에 따라 4개 그룹(quartile group)으로 분류하였다.



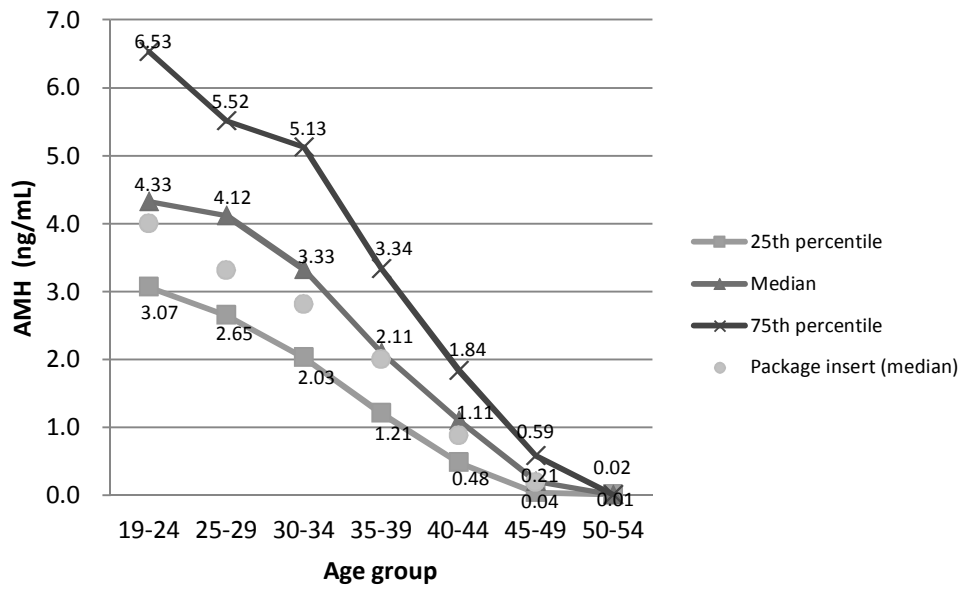


Fig. 1. AMH percentile chart by age group.

유효한 값이 존재하는 19세 이상 전체대상자 및 주요 가임기 연령대 19-39세에서 해당 연령그룹 1사분위수 미만인 경우 Q1, 1 사분위수 이상~중간값 미만인 경우 Q2, 중간값 이상~3 사분위수 미만인 경우 Q3, 3 사분위수 이상인 경우 Q4의 4개 그룹으로 코딩하였다.

(4) 유효한 값이 존재하는 전체대상자 및 주요 가임기 연령대 19-39세에서 AMH 사분위수 그룹 간 혈액검사 항목에 차이를 보이는지 분석하였다. 총콜레스테롤, 중성지방, HDL 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤, 비타민 D, hsCRP, 납, 수은, 카드뮴, 갑상선자극호르몬, 유리티록신 등의 농도가 사분위수 그룹 간 유의한 차이를 보이는지 분산 분석을 통하여 조사하였다. 필요한 경우 error bar graph (mean, 95% 신뢰구간)을 작성하였다. 공통 항목이 아닌 경우(비타민 D, hsCRP, HDL 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤, 중금속, 갑상선 관련 검사 등) 특정 연도 또는 특정 연령대에서만 시행되어 일부 대상자에 대해서만 값이 존재하였다.

(5) 유효한 값이 존재하는 전체대상자 및 주요 가임기 연령대 19-39세에서 AMH 사분위수 그룹 간 1일 영양소 섭취량에 차이를 보이는지 분석하였다. 영양소 섭취량에 영향을 미칠 가능성이 있는 거주지(동/읍면), 가구소득사분위수, 비만 유병여부, 최근 1년 동안 2주 이상 식이보충제 복용 여부 변수에 대하여 사분위수 그룹 간 유의한 차이를 보이는지 파악하기 위해 먼저 카이제곱 검정을 시행하였다. 이후 연령, 체질량지수, 에너지, 탄수화물, 단백질, 지방, 식이섬유, 칼슘, 인, 철, 나트륨, 칼륨, 티아민, 리보플라빈, 나이아신, 비타민C, 비타민A, 포화지방산, 단일불포화지방산, 다가불포화지방산, n-3계 지방산, n-6계 지방산, 콜레스테롤 섭취량 변수를 이용하여 분산 분석을 시행하였다.

(6) 만 19-54세 대상자의 AMH 값을 이용하여 연령별 대상자 수와 연령별 백분위수(5, 10, 25, 50, 75, 90, 95)를 계산하였다.

## 6. 통계 분석

주 항목인 AMH 히스토그램, 박스 플롯, 이상치 검출, 퍼센타일 계산, 참고범위 설정을 위해서 Med-Calc 통계프로그램 15.2.2 버전을 사용하여 분석하였다. 결과 분석 시 적절한 통계기법을 활용하였고 이상치가 있는 경우 제거 후 참고범위를 계산하였다. 이상치 검출을 위해 Tukey 방법을 사용하였으며<sup>25)</sup> far out value를 이상치로 정의하였다. Far out value는 above  $Q3 + 3 \text{ interquartile range (IQR)}$ , below  $Q1 - 3 \text{ IQR}$ 로 정의되었다. 퍼센타일 계산 시에는 rank  $r=p*n+0.5$  식을 따랐다. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) EP28 지침의 권장에 따라 비모수적 방법을 이용하여 rank  $r=p*(n+1)$ 에 따라 참고범위를 구하였고 90% 신뢰구간을 계산하였다<sup>26)</sup>. CLSI 방법의 경우 결과값 분포에 대한 가정이 필요없어 더 추천된다. Menstrual cycle phase에 따른 AMH 결과값의 차이를 분석하기 위하여 Med-Calc를 이용하여 Kruskal-Wallis test, Mann-Whitney test를 시행하였다. 국민건강영양조사사업 역학정보 분석을 위해서는 SPSS PASW Statistic 18 프로그램을 사용하였으며, 사용된 통계분석법은 “5. 국민건강영양조사사업 역학정보 분석” 항에 자세히 기술되어 있다.

## 연구결과

### 1. AMH와 progesterone 검사수행 및 AMH 병행검사

1차 수령분 혈청 882 vial에 대해 2019년 1월 29~31일, 2월 12~20일 사이에 AMH와 progesterone 검사를 수행하였다. 검사결과 AMH 값은 모두 얻었으나 progesterone 값을 얻지 못한 혈청이 2 vial 있었다. 2차 수령분 혈청 600 vial 및 3차 수령분 혈청 18 vial에 대해 2019년 2월 21~28일 사이에 검사를 수행하였다. 상기 618 vial 중 21 vial에서 AMH 및 progesterone 결과를 얻지 못하였으며, 검체량 부족, 방해물질 존재, 검체 상태 이상 등의 가능성이 있을 것으로 추정되었다. 1차 검사 882 vial과 2차 검사 중 50 vial은 AMH 시약 Lot 32941901로 수행되었고, 나머지 vial에 대해서는 Lot 36980101로 수행되어 중간에 시약 Lot 변경이 있었다. 신규 Lot 사용 전에 다양한 범위의 환자 검체 40개와 정도관리물질을 이용하여 병행 검사를 시행하였다. 기존 Lot과 신규 Lot 간 평균 결과값 차이는 +5.4%로 신규 Lot의 값이 기존 Lot 값에 비해 약간 높은 경향이 있었으나, 허용기준 10% 이내였다.

### 2. 대상자의 연령 그룹별 특성 비교

대상자들의 연령 그룹별 신체계측 자료 및 공통 혈액검사 결과를 비교하였다 (Table 4). 평균연령은 거의 5세 간격이었고, 체질량지수의 경우 연령이 증가함에 따라 증가 추세를 보여 45세 이상에서는 평균값이 23 kg/m<sup>2</sup>이 넘었다. 그러나 전체 대상자에서 비만의 비율은 18.3%로 2013-2015년 국민건강영양조사사업 통계자료의 여성 비만 비율 26-30%에 비해서는 낮은 비율을 나타내었다. 혈압, 공복혈당, 총콜레스테롤, 중성지방 등의 항목의 경우에도 연령에 증가할수록 약간 증가하는 양상이었으나 그 폭이 매우 크지는 않았고 가장 연령대가 높은 그룹에서도 평균값은 정상 범위 이내였다. 빈혈 비율은 20대와 50대에서는 4.4-9.5%로 낮은 편이었으나 중간 연령대 35-49세 사이에는 17.5-19.1%로 높았다.

**Table 4. Demographic and laboratory characteristics of study participants\***

	Age group (number of participants)							Total
	19-24	25-29	30-34	35-39	40-44	45-49	50-54	
	(160)	(132)	(243)	(240)	(235)	(220)	(220)	(1,500)
Age (yr)	21.2 (1.6)	27.1 (1.4)	32.2 (1.4)	37.0 (1.5)	41.9 (1.5)	47.1 (1.5)	52.0 (1.5)	37.4 (10.4)
Height (cm)	161.6 (6.3)	160.9 (6.0)	161.3 (5.7)	160.4 (5.2)	160.4 (4.9)	158.0 (5.7)	157.0 (5.3)	159.9 (5.8)
Weight (kg)	56.9 (9.3)	58.3 (9.5)	57.6 (9.2)	58.2 (8.7)	58.0 (7.4)	58.0 (7.6)	57.2 (7.4)	57.8 (8.5)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	21.7 (3.4)	22.4 (3.2)	22.1 (3.5)	22.6 (3.3)	22.5 (2.8)	23.2 (2.7)	23.2 (2.7)	22.6 (3.2)
SBP (mmHg)	105 (9)	104 (8)	104 (9)	105 (9)	107 (11)	108 (11)	111 (12)	107 (10)
DBP (mmHg)	69 (7)	69 (7)	69 (8)	70 (7)	72 (8)	72 (8)	73 (8)	71 (8)
HbA1c (%)	5.3 (0.3)	5.3 (0.3)	5.4 (0.3)	5.5 (0.3)	5.5 (0.3)	5.5 (0.3)	5.6 (0.4)	5.4 (0.3)
Hb (g/dL)	13.2 (0.9)	13.3 (0.9)	13.0 (1.1)	12.9 (1.2)	12.8 (1.2)	12.7 (1.3)	13.2 (1.1)	13.0 (1.1)
Creatinine (mg/dL)	0.71 (0.09)	0.70 (0.09)	0.69 (0.09)	0.71 (0.08)	0.72 (0.09)	0.71 (0.09)	0.70 (0.10)	0.70 (0.09)
Fasting glucose (mg/dL)	88 (6.3)	88 (7.1)	90 (8.1)	90 (7.2)	92 (7.2)	92 (7.7)	94 (8.8)	91 (7.8)
Total chol (mg/dL)	169 (24)	181 (27)	177 (26)	177 (25)	183 (25)	189 (25)	193 (25)	181 (27)
Triglyceride (mg/dL)	78 (37)	86 (58)	86 (48)	85 (45)	97 (64)	101 (62)	114 (69)	93 (57)

Obesity (%)	13.1	17.6	20.1	15.8	15.3	23.2	21.8	18.3
Anemia (%)	4.4	7.6	11.5	17.5	19.1	18.6	9.5	13.2

---

\*Data was expressed as mean (standard deviation) or percentage.

Abbreviations: BMI, body mass index; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; chol, cholesterol.

### 3. *BMP15* 유전자검사결과 및 변이 빈도

2019년 4~10월 사이 대상자 1,500명의 DNA를 이용하여 *BMP15* 유전자 직접염기서열분석을 시행하였다. OMIM database에 등재되어 있으며 임상적으로 중요도가 높은 주요 변이를 포함하여 건강인 판단에 사용된 변이 리스트를 **Table 5**에 정리하였으며 주요 변이가 연구대상자에서 검출되지 않아서 이로 인한 영향을 받지 않았음을 확인하였다. 이 연구에서 관찰된 변이를 **Table 6**에 정리하였다.

총 9종의 변이가 285명에서 검출되었으며 변이의 종류는 missense variant 5개, synonymous variant 2개, in-frame insertion 1개, 5'-UTR 변이 1개였다. 대부분 heterozygous variant였고, c.852C>T 변이가 있었던 176명 중 3명(1.7%)에서 homozygous variant가 검출되었다. In-frame 삽입 변이인 c.783\_785TCT[3]와 c.852C>T heterozygous 변이가 동시에 존재하는 대상자가 162명으로 전체의 10.9%에 해당하여 가장 흔하였다(**Fig. 2, Fig. 3**). 그 다음으로 5'-UTR 부위의 c.-9C>G 변이가 5.8%의 빈도로 흔하게 관찰되었으며(**Fig. 4**), 2번 엑손의 c.598C>T 변이가 1.5%의 빈도를 나타내었다(**Fig. 5**). 2번 엑손 c.721A>G가 2명에서 검출되었는데 기존에 보고된 바 없는 새로운 변이였다(**Fig. 6**).

Table 5. Major genetic variants of the *BMP15* gene

Nucleotide (amino acid) change	rs number	Frequency	Clinical significance <sup>†</sup>
c.202C>T (p.Arg68Trp)*	rs104894763	Not detected	Conflicting interpretation of pathogenicity
c.226C>T (p.Arg76Cys)*	rs104894766	Not detected	Pathogenic
c.538G>A (p.Ala180Thr)* <sup>‡</sup>	rs104894767	Not detected	Likely benign
c.631C>T (p.Gln211Ter)*	rs137853320	Not detected	Pathogenic
c.704A>G (p.Tyr235Cys)*	rs104894765	Not detected	Pathogenic
c.443T>C (p.Leu148Pro)	rs114823607	Not detected	Likely benign
c.581T>C (p.Phe194Ser)	rs141218518	Not detected	Likely benign

\*Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) allelic variant.

<sup>†</sup>Clinical significance of variants was described in the OMIM ClinVar.

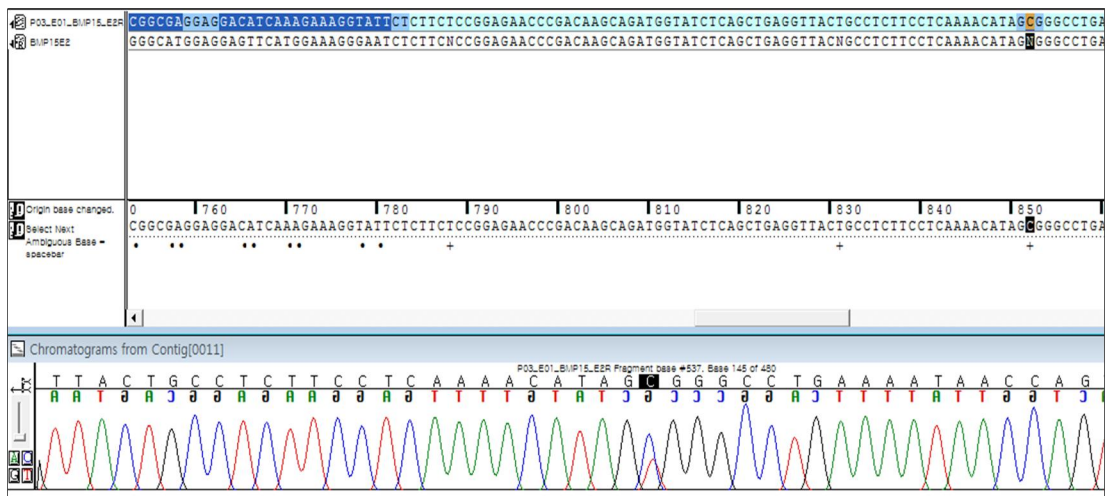
<sup>‡</sup>Important variant in a meta-analysis<sup>27)</sup>.



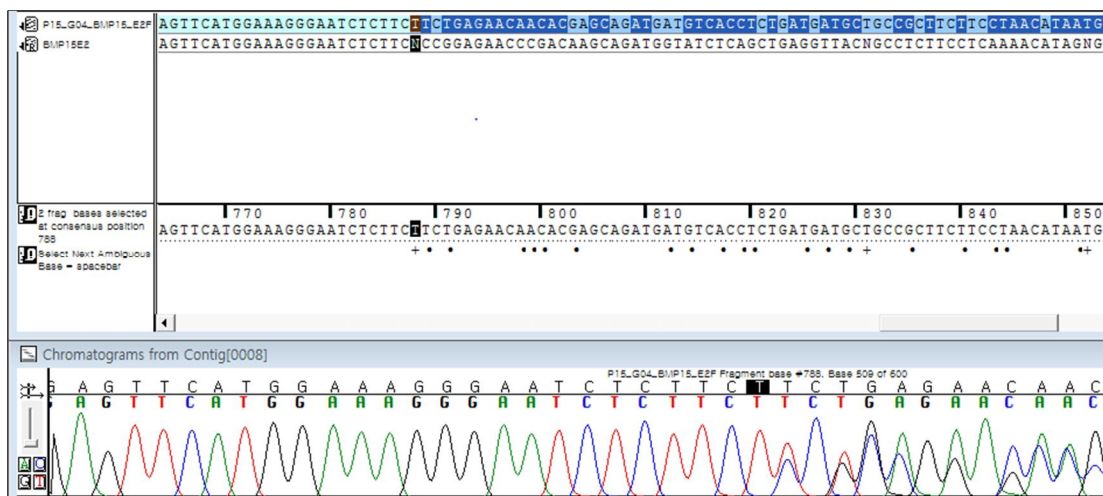
Table 6. Observed variants of the *BMP15* gene in this study

Location	Nucleotide (amino acid) change	rs No.	Frequency (%)	KRG frequency (%)	Comment
Exon 2	c.852C>T (p.Ser284=)	rs17003221	11.7	7.1	Common variant
Exon 2	c.783_785TCT[3] (p.Leu263dup)	rs371124071	11.6	5.0	Common variant
5'-UTR	c.-9C>G	rs3810682	5.8	2.7	Common variant
Exon 2	c.598C>T (p.His200Tyr)	rs202165852	1.5	1.1	Asian only 15,16,28)
Exon 2	c.728T>G (p.Ile243Ser)	rs782012739	0.3	0.1	Korean only <sup>28)</sup>
Exon 2	c.987C>T (p.Arg329=)	rs782003640	0.2	0.06	
Exon 1	c.308A>G (p.Asn103Ser)	rs41308602	0.1	NA	
Exon 2	c.778G>A (p.Glu260Lys)	rs782402356	0.1	0.1	
Exon 2	c.721A>G (p.Lys241Glu)	NA	0.1	NA	Novel variant

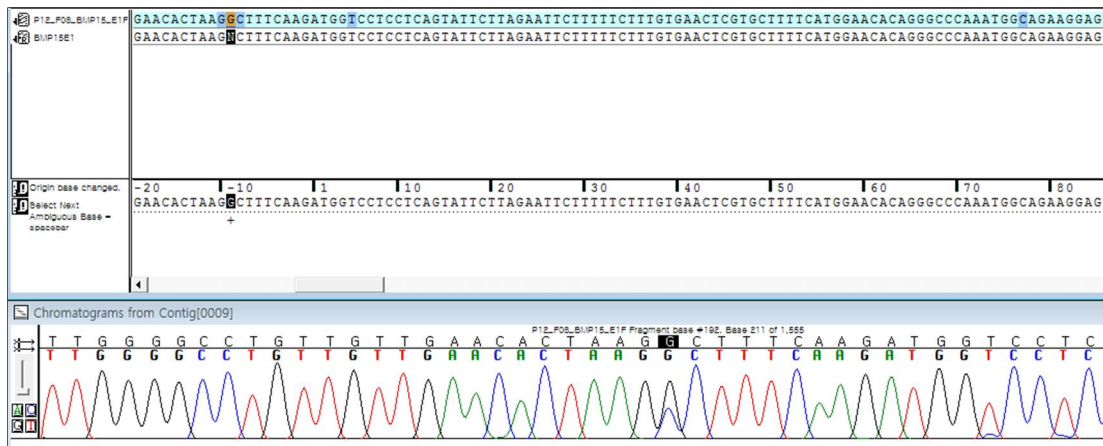
Abbreviations: KRG, Korea Reference Genome database; UTR, untranslated region; NA, not available.



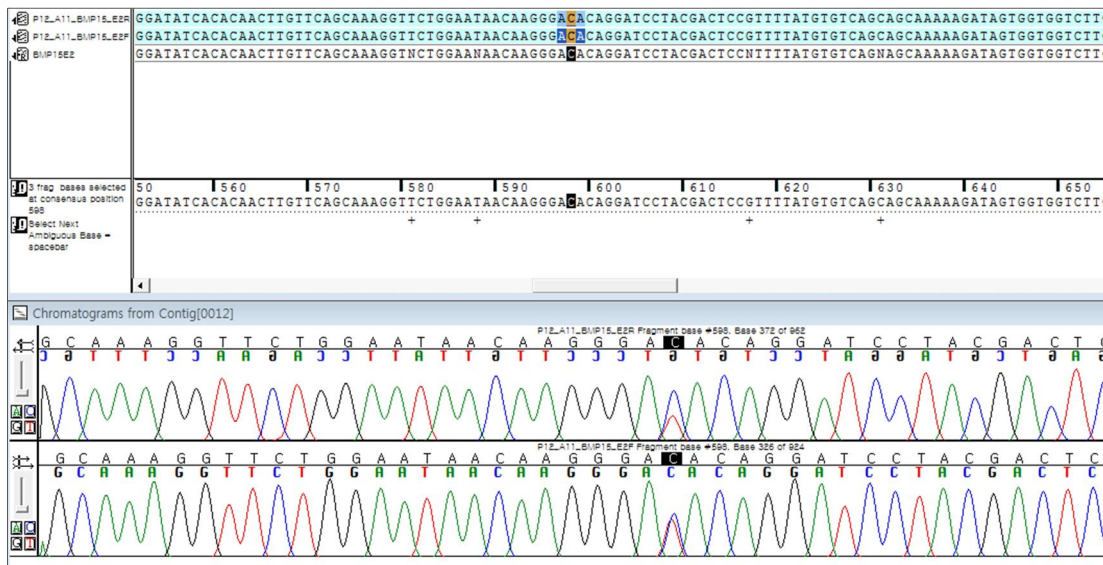
**Fig. 2.** Electropherogram of the *BMP15* c.852C>T heterozygous variant. A cytosine to thymine substitution at 852 nucleotide position was observed with no amino acid change (p.Ser284=). This variant was detected in 11.7% of the participants. In most cases, c.852C>T and c.783\_785TCT[3] variants were present at the same time in one individual.



**Fig. 3.** Electropherogram of the *BMP15* c.783\_785TCT[3]variant. The in-frame insertion of 3 nucleotides (thymine-cytosine-thymine) made the duplication of leucine. This variant was mostly detected in combination with c.852C>T heterozygous variant.



**Fig. 4.** Electropherogram of the *BMP15* 5'-untranslated region variant. This variant was detected in 5.8% of the participants and a cytosine to guanine heterozygous substitution was noted at -9 nucleotide position.



**Fig. 5.** Electropherogram of the *BMP15* c.598C>T variant. This variant was detected in 1.5% of the participants. A cytosine to guanine heterozygous substitution was noted at 598 nucleotide position that changes histidine at codon 200 to tyrosine.



연령그룹 별 전체 변이 양성율과 다빈도 변이 3종의 빈도를 **Table 7**에 정리하였다. 전체 대상자 중 19.0%에서 *BMP15* 변이가 관찰되었으며, 다빈도 변이 3종이 대부분(259/285, 91%)를 차지하였다. 연령그룹 간 양성율에는 유의한 차이가 없었다( $P = 0.659$ ). 또한 변이 양성 및 음성인 대상자의 AMH 농도 및 사분범위는 각각 1.49 [0.24-3.61] ng/mL, 1.73 [0.25-3.72] ng/mL으로 유의한 차이를 보이지 않았다( $P = 0.621$ ).

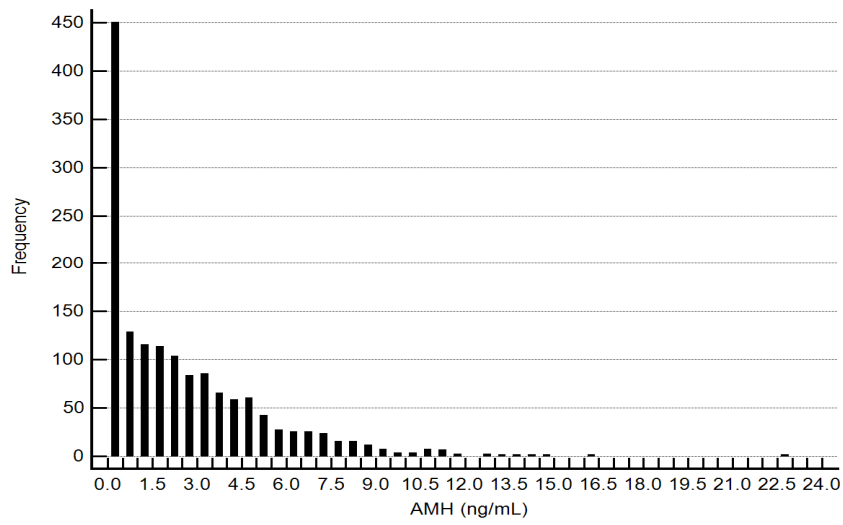
Table 7. Frequency of common *BMP15* variant by age group

Age group	Frequency (%)	N	High frequency variant (N)		
			c.783_785TCT[3] and c.852C>T (het)	c.-9 C>G (het)	c.598C>T (het)
<19	24.0	12	11	1	0
19-24	15.0	24	12	6	2
25-29	21.2	28	13	10	3
30-34	18.9	46	29	9	2
35-39	15.4	37	18	12	4
40-44	25.1	59	33	18	4
45-49	20.0	44	25	10	5
50-54	15.9	35	21	9	2
<b>Total</b>	<b>19.0</b>	<b>285</b>	<b>162</b>	<b>75</b>	<b>22</b>

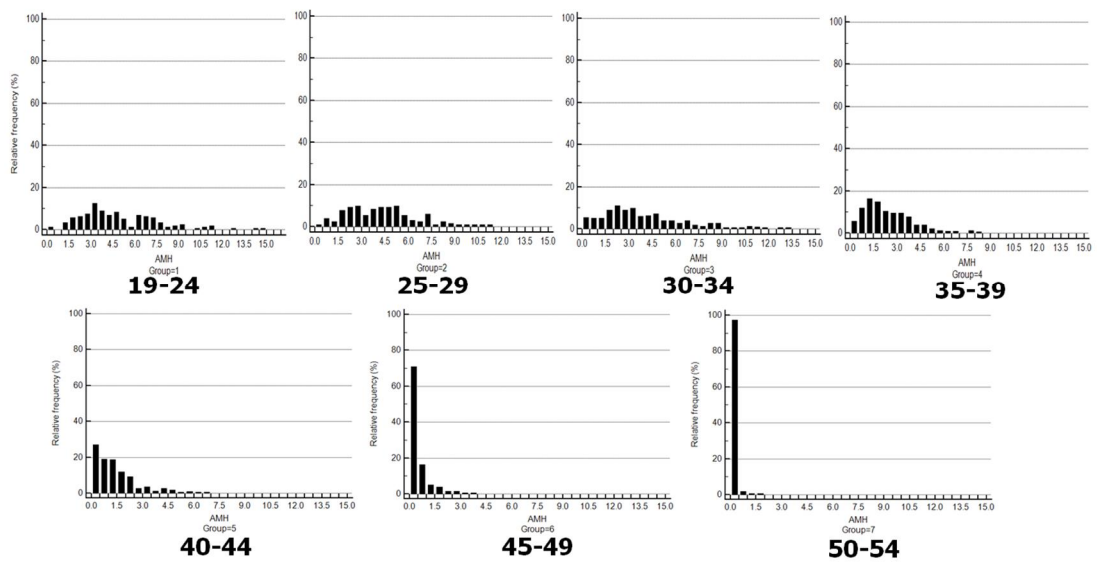


#### 4. AMH 농도 분포 및 참고범위 설정

전체 대상자의 이상치 제거 전 AMH 농도 분포를 Fig. 7에 나타내었다. 전체적으로 좌경 분포를 보였으며 대상자의 30%에서 0.5 ng/mL 이하의 값을 나타내었다. 연령 그룹별 상자 그림에서는 연령이 증가함에 따라 AMH값이 점점 감소하여 40세 이후 점차 검출한계(0.01 ng/mL) 근처로 수렴함을 확인할 수 있었다. AMH가 낮은 값 쪽으로 치우치는 분포를 가지고 있었기 때문에 far out value는  $Q3 + 3IQR$ 를 초과하는 극단값만 존재하였다. 각 연령그룹에서  $Q3 + 3IQR$ 를 초과하는 값을 이상치로 간주하여 제거하였다. 단, 40-44세, 45-49세, 50-54세 그룹의 경우 매우 극단적인 분포를 보이므로 AMH 시약지시서에 제시된 해당연령대 upper percentile의 95% 신뢰구간 내에 포함되는 경우에는 far out value이더라도 제거하지 않았다. 제거된 이상치의 개수는 19-24세에서 1개, 30-34세에서 1개, 35-39세에서 2개, 40-44세에서 5개, 45-49세에서 2개, 50-54세에서 2개로 총 13개의 값이 이상치로 제거되었다. 이상치 제거 후의 연령대별 AMH 분포를 Fig. 8에 제시하였다. 40-44세부터 0.5 ng/mL 이하 비율이 20%를 넘기 시작하였고, 45-49세에서는 70%, 50-54세에서는 90%를 초과하였다.



**Fig. 7.** AMH distribution of the entire study population. One bar represents 0.5 ng/mL.



**Fig. 8.** AMH distribution of each age group after exclusion of outliers. Group number (age range) is as follows; 1 (19-24), 2 (25-29), 3 (30-34), 4 (35-39), 5 (40-44), 6 (45-49), and 7 (50-54). From group 5, the percentage of participants showing  $\leq 0.5$  ng/mL of AMH value exceeded 20%. One bar represents 0.5 ng/mL.

20대에는 AMH 중간값이 4.0 ng/mL를 초과하였으나 30-34세가 되면서 3.0 ng/mL 근처로 감소, 이후 35세부터는 급격히 감소하여 1.0 ng/mL 근처로 감소하며 45세부터는 대부분 1.0 ng/mL 미만의 값을 나타내었다. 18세 이하 50명의 AMH 중간값은 3.89 ng/mL였다. 연령그룹 별 대상자 수 및 lower, upper percentile을 **Table 8**에, CLSI에서 권장하는 비모수적 방법으로 계산한 중간 90 퍼센타일(5-95th) 및 95 퍼센타일(2.5-97.5th) 참고범위를 **Table 9**에 정리하였다. 30-34세 그룹은 시약 지시서 값과 비교 시 lower percentile은 더 낮고, upper percentile은 더 높은 특성을 보였다. 즉, 이 그룹의 AMH 범위가 다른 연령대에 비해서 넓었다. 18세 이하 대상자 50명의 평균 연령은 15.5세였으며 AMH 농도값 분포를 **Table 10**에 나타내었다.

19-54세 대상자의 연령별 백분위수(5, 10, 25, 50, 75, 90, 95)를 계산하여 **Table 11**에 제시하였다. 연령별 평균 대상자 수는 39명이었다. 20대의 경우 대상자 수가 적어 일부 결과에 의해 백분위수가 영향을 받을 가능성이 있으므로 대상자 수를 표에 같이 표시하였다.

## 5. Progesterone 검사결과 해석

시약지시서에 제시된 참고 범위를 기준으로 분류한 각 menstrual cycle phase or condition에 해당하는 대상자수와 중간값을 **Table 12**에 정리하였다. 배란기는 개인별로 농도 범위가 매우 넓어 progesterone 결과 단독으로 정확한 판단은 어려우므로 중간 단계를 포함하여 follicular, follicular or ovulatory, ovulatory, luteal or ovulatory, luteal phase로 구분하였다. Luteal phase upper reference limit 23.9 ng/mL를 초과하는 경우 경구피임제 사용, 임신 등의 가능성이 있으며 high progesterone 군으로 판단하였다. 45세 이상에서 0.057 ng/mL 미만인 경우에는 폐경 가능성이 있으며 low progesterone 군으로 판단하였다. Follicular, follicular or ovulatory, ovulatory, luteal or ovulatory, luteal phase, high progesterone 군과 low progesterone 군 사이에는  $P < 0.000001$ 로 유의한 차이를 보였다. 다른 군에 비하여 low progesterone 군에서는 AMH 중간값이 검출한계 0.01 ng/mL미만으로 매우 낮았다. Menstrual cycle phase 간에는 유의한 AMH 값 차이를 보이지 않았으며, high progesterone 군과 그 밖의 군을 비교하였을 때도 AMH 값에 유의한 차이를 보이지 않았다.

Table 8. AMH upper and lower percentiles by the age group

Age group	N	Outlier value	2.5th	5th	Median	95th	97.5th
19-24	159	22.98	1.143	1.772	4.330	10.304	11.313
25-29	132		0.836	1.202	4.125	8.557	9.986
30-34	237	16.37	0.218	0.433	3.330	8.760	10.872
35-39	234	13.60, 11.50	0.227	0.394	2.105	5.326	6.494
40-44	226	9.05, 8.00, 7.87, 7.61, 7.30	<b>0.010</b>	0.067	1.100	4.380	4.794
45-49	214	7.61, 5.60	<b>0.010</b>	<b>0.010</b>	0.210	1.840	2.354
50-54	214	6.49, 3.75	<b>0.010</b>	<b>0.010</b>	<b>0.010</b>	0.275	0.512

Table 9. AMH reference interval by CLSI percentile method

Age group	Mid 90% tile (5-95th)	Lower limit 90% CI	Upper limit 90% CI	Mid 95%tile (2.5-97.5th)	Lower limit 90% CI	Upper limit 90% CI
19-24	<b>1.74-10.52</b>	1.11-1.95	8.89-11.37	<b>1.11-11.37</b>	0.14-1.74	10.52-14.85
25-29	<b>1.12-8.68</b>	0.76-1.70	7.43-10.29	<b>0.79-10.17</b>	0.08-1.22	8.35-11.12
30-34	<b>0.41-8.83</b>	0.29-0.76	8.41-10.74	<b>0.16-10.98</b>	0.01-0.41	9.38-12.93
35-39	<b>0.39-5.43</b>	0.27-0.62	4.88-6.11	<b>0.19-6.74</b>	0.06-0.37	5.62-7.73
40-44	<b>0.06-4.40</b>	0.01-0.14	3.59-4.81	<b>0.01-5.03</b>	0.01-0.06	4.42-6.12
45-49	<b>0.01-1.87</b>	0.01-0.01	1.45-2.31	<b>0.01-2.49</b>	0.01-0.01	1.91-3.33
50-54	<b>0.01-0.29</b>	0.01-0.01	0.14-0.50	<b>0.01-0.54</b>	0.01-0.01	0.29-1.39

Abbreviations: CLSI, Clinical Laboratory Standards Institute; CI, confidence interval.

Table 10. AMH concentrations of the participants below the age of 19

Age	N	Outlier value	5th	25th	Median	75th	95th
<19	50	-	1.18	2.48	3.89	5.05	8.35

Table 11. Age-specific AMH values in healthy Korean women

Age (yr)	Percentiles of AMH level (ng/mL)							N
	5th	10th	25th	50th	75th	90th	95th	
19	0.93	1.82	2.29	4.38	6.43	8.81	9.82	31
20	1.84	2.61	3.30	4.75	6.60	7.57	10.12	30
21	1.25	1.82	3.14	4.61	6.39	7.65	12.78	29
22	1.33	2.06	2.75	3.97	6.60	7.42	11.84	26
23	2.34	2.69	3.22	4.16	7.09	9.54	10.35	26
24	0.44	1.03	2.13	3.56	7.46	11.62	.	17
25	2.11	2.63	3.34	4.51	6.78	8.98	10.91	27
26	1.22	2.26	2.73	4.30	5.19	6.49	.	18
27	0.56	1.70	2.49	4.62	5.57	7.26	7.84	25
28	0.83	0.93	1.72	3.73	5.44	7.54	9.13	34
29	1.15	1.98	2.32	3.94	5.47	8.19	9.79	28
30	0.39	0.79	2.00	2.79	3.59	6.65	9.06	35
31	0.74	1.46	2.11	3.60	5.62	7.85	10.07	45
32	0.34	1.16	2.34	3.63	4.87	8.01	9.34	49
33	0.03	0.84	1.98	3.33	5.54	8.65	11.40	51
34	0.46	0.76	1.82	3.33	5.13	8.35	8.93	57
35	0.26	0.65	1.25	2.21	3.48	4.72	5.03	53
36	0.32	0.70	1.19	2.30	3.67	5.48	7.43	42
37	0.36	0.65	1.10	1.88	3.43	4.08	4.74	37
38	0.56	0.76	1.11	1.99	3.22	4.76	5.15	55
39	0.20	0.70	1.16	1.84	3.08	5.31	7.43	47
40	0.07	0.20	0.70	1.40	2.27	4.40	4.72	47
41	0.16	0.28	0.61	1.25	2.45	4.19	5.09	51
42	0.20	0.39	0.61	1.32	2.17	3.54	5.61	41
43	0.01	0.07	0.43	1.07	1.59	2.19	2.67	39



---

44	0.01	0.03	0.22	0.59	1.21	1.87	2.57	48
45	0.01	0.04	0.16	0.54	0.89	1.62	2.46	43
46	0.02	0.06	0.16	0.27	0.78	1.44	2.02	44
47	0.01	0.01	0.01	0.13	0.70	1.33	2.11	33
48	0.01	0.01	0.04	0.09	0.35	0.66	1.11	47
49	0.01	0.01	0.01	0.04	0.41	0.75	2.42	47
50	0.01	0.01	0.01	0.02	0.11	0.45	0.96	55
51	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.07	0.19	38
52	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.07	0.29	27
53	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.05	0.19	45
54	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	49

---

Table 12. Menstrual cycle phase or conditions based on the progesterone value

Menstrual cycle phase or condition	N	Median progesterone (ng/mL)	Reference range (ng/mL)
Follicular	207	0.089	0.050-0.120
Follicular or ovulatory	691	0.258	0.121-0.893
Ovulatory	94	1.20	0.894-1.829
Luteal or ovulatory	243	6.30	1.83-12.0
Luteal	169	15.7	12.1-23.9
High progesterone	28	26.8	>23.9
Low progesterone	45	0.05*	<0.057 (over 45 yr)

\*Limit of detection of Elecsys progesterone assay.

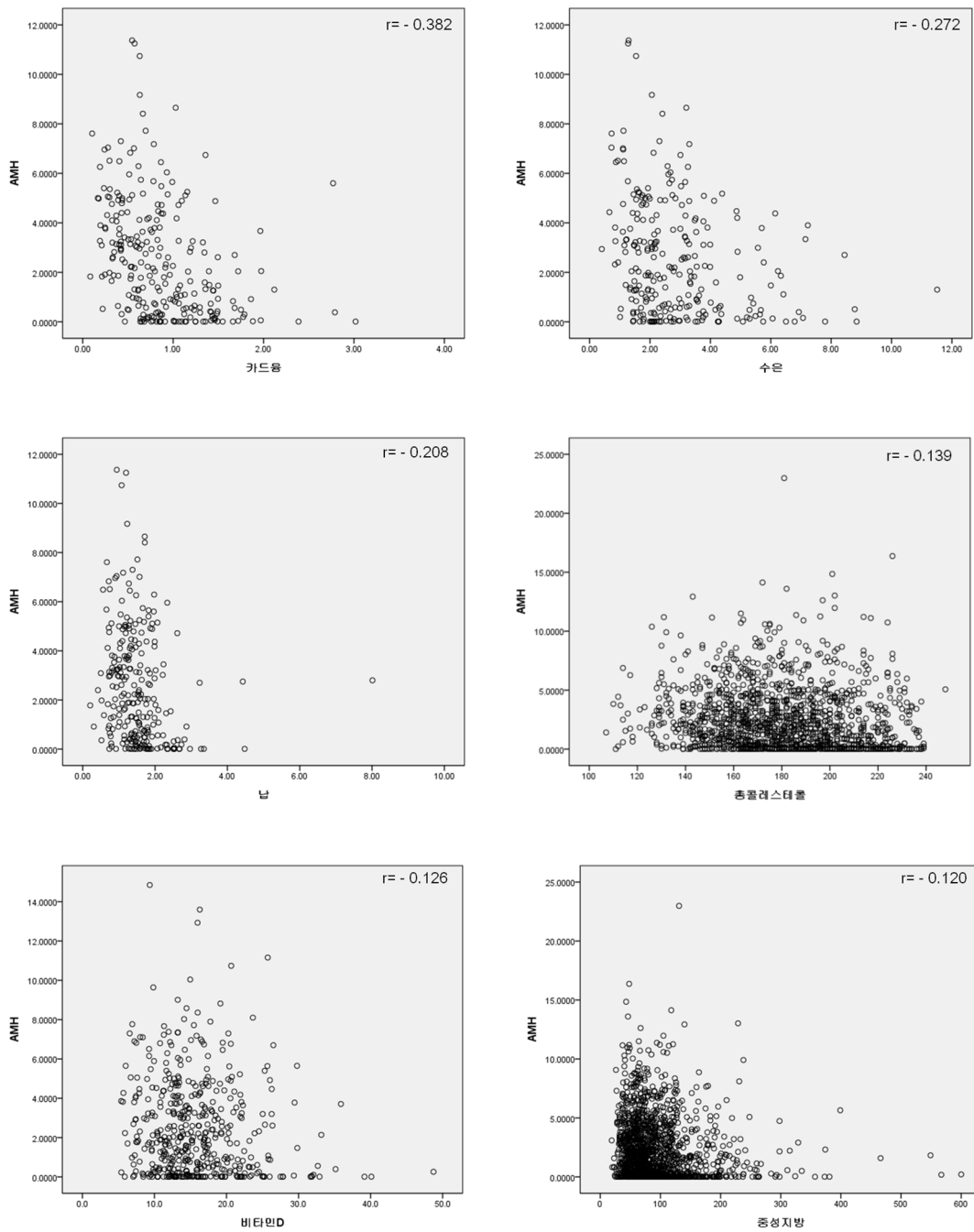
## 6. AMH 농도와 *BMP15* 변이의 관련성 탐색

AMH 농도와 *BMP15* 변이 빈도와의 관련성 탐색을 위하여 AMH 사분위수 그룹(Q1-Q4) 변이 양성율을 비교하였다. 19-54세 대상자에서 Q1, Q2, Q3, Q4 각각의 변이 양성율은 20.3%, 21.1%, 16.5%, 19.2%로 AMH 사분위수 그룹 간 양성율에는 유의한 차이가 없었다( $P = 0.444$ ). 50-54세 군의 경우 AMH 검출한계 0.01 ng/mL 미만인 대상자 수가 145명으로 대다수여서 Q1, Q2는 계산 불가하여 사분위수 그룹에 포함되지 못하였고 계산에서 제외되었다. 18세 이하 50명과 AMH 결과를 얻지 못한 21명도 제외하였다. 주요 가입 연령대 19-39세로 범위를 좁혀 분석하였을 때 AMH 사분위수 그룹의 변이 양성율은 Q1 18.7%, Q2 18.7%, Q3 12.8%, Q4 19.1%였으며, 그룹 간 양성율에는 통계적 차이가 없었다. 추가적으로 연령그룹별 AMH percentile에 따라 중간 90 퍼센타일(5-95)에 포함되는 대상자와 5 퍼센타일 미만 또는 95 퍼센타일 초과인 대상자 2군으로 나누어 변이 양성율을 비교하였다. AMH 값이 5 퍼센타일 미만 또는 95 퍼센타일 초과인 124명 중 양성율은 25.8%, 5-95 퍼센타일 사이에 포함되는 1293명 중 양성율은 18.3%로 Pearson 카이제곱 검정 결과 유의한 차이를 보였다( $P = 0.040$ ).

## 7. 국민건강영양조사사업 역학정보 분석

AMH 값과 다양한 역학정보 변수와의 관련성 여부를 확인하기 위하여 관계분석을 시행하였다. 유효한 값이 존재하는 19세 이상 전체대상자 1479명에서 분석하였을 때 통계적으로 유의한 항목을 상관계수와 함께 나열하였다; 카드뮴( $r = -0.382$ ), 수은( $r = -0.272$ ), 납( $r = -0.208$ ), 총콜레스테롤( $r = -0.139$ ), 비타민 D( $r = -0.126$ ), 중성지방( $r = -0.120$ ), HDL 콜레스테롤( $r = 0.062$ ). 기타 항목들은 통계적으로 유의하지 않았다. 중금속(카드뮴, 수은, 납) 및 비타민 D의 경우 각각 257명, 472명의 일부 대상자에서만 검사가 시행된 항목으로, AMH와 약한 음의 상관관계를 보였다. 총콜레스테롤과 중성지방의 경우에도 약한 음의 상관관계를 보였다. 상기 항목과 AMH 농도값의 산점도 및 상관계수를 **Fig. 9**에 나타내었다.

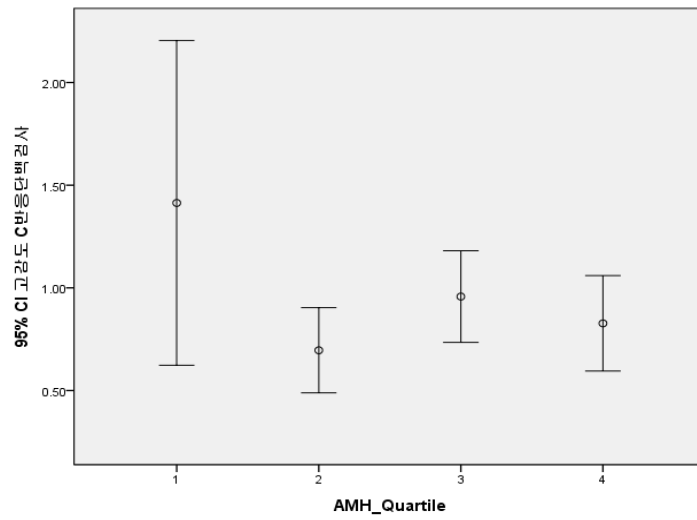
주요 가임기 연령대 19-39세 766명을 대상으로 분석하였을 때 통계적으로 유의한 항목은 카드뮴( $r = -0.217$ )과 수은( $r = -0.199$ ) 이었다. 이 항목들은 142명의 일부 대상자에서만 검사가 시행된 항목이었다. 전체대상자 분석결과와 달리 비타민 D 등 그 외 항목은 세부분석에서 통계적으로 유의하지 않았다.



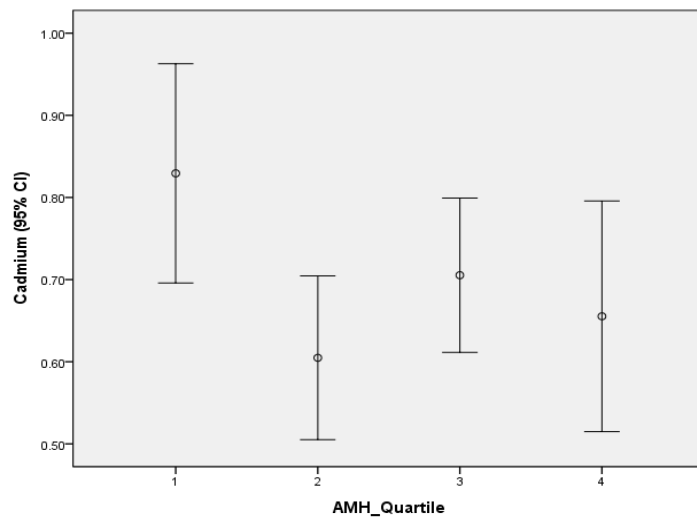
**Fig. 9.** Scatter plots between laboratory test items and AMH (ng/mL) from the KNHANES. Serum cadmium ( $\mu\text{g/L}$ ), mercury ( $\mu\text{g/L}$ ), lead ( $\mu\text{g/dL}$ ), 25-hydroxyvitamin D (ng/mL), total cholesterol (mg/dL) and triglyceride (mg/dL) were presented with Pearson correlation coefficients.

AMH 사분위수 그룹 간에 차이를 보이는 변수를 확인하기 위하여 분산분석을 시행하였다. 유효한 값이 존재하는 19세 이상 전체대상자 1479명에서 분석 시 통계적으로 유의한 항목은 없었다. 다만 383명에서만 시행된 hsCRP 항목의 경우 1Q 군의 hsCRP 값이 2Q 군보다 더 높은 경향을 보였다( $P = 0.075$ , **Fig. 10**). 주요 가임기 연령대 19-39세 766명을 대상으로 분석 시 카드뮴 농도가 사분위수 그룹 간 통계적으로 유의한 차이를 보였다( $P = 0.039$ ). 카드뮴은 142명에서 검사가 시행된 항목이었다. 사후 분석 결과 1Q 군의 카드뮴 농도가 2Q 군보다 더 높았다(**Fig. 11**).

AMH 사분위수 그룹 간 1일 영양소 섭취량에 차이가 보이는지 확인을 위하여 전체대상자 및 19-39세에서 분산분석을 시행하였으며 통계적으로 유의한 항목은 없었다 (**Table 13**, **Table 14**). 다만 인 섭취량 항목의 경우 1Q 군이 2Q 군에 비해 약간 높은 경향을 보였다(1005 mg vs. 904 mg,  $P = 0.086$ ).



**Fig. 10.** High sensitive C-reactive protein levels (mg/L) according to the AMH quartiles from the KNHANES. Mean and the 95% confidence interval of each AMH quartile are presented.



**Fig. 11.** Serum cadmium levels ( $\mu\text{g/L}$ ) according to the AMH quartiles from the KNHANES. Mean and the 95% confidence interval of each AMH quartile are presented.



**Table 13. General characteristics and daily nutrient intakes of the total participants\***

	AMH quartile group (number of participants)				<i>P</i>
	1Q (305)	2Q (304)	3Q (316)	4Q (359)	
Age (yr)	36.0	35.7	36.4	37.7	0.015
Obesity (%)	17.2	17.2	21.5	17.0	NS
Residential area (%, Rural)	16.7	14.5	12.3	14.2	NS
Household income (%, Low)	5.6	6.3	6.0	4.7	NS
Dietary supplement use (%, Yes)	46.6	49.1	48.5	46.1	NS
Energy (Kcal)	1919	1776	1818	1804	NS
Carbohydrate (g)	285	267	279	273	NS
Protein (g)	67	61	64	64	NS
Fat (g)	49	45	46	44	NS
Dietary fiber (g)	21	20	21	21	NS
Calcium (mg)	442	434	467	457	NS
Phosphate (mg)	1002	930	995	983	NS
Iron (mg)	14.6	14.0	14.4	15.2	NS
Sodium (mg)	3582	3318	3487	3407	NS
Potassium (mg)	2860	2679	2811	2810	NS
Thiamin (mg)	1.86	1.78	1.82	1.85	NS
Riboflavin (mg)	1.32	1.24	1.32	1.34	NS
Niacin (mg)	15.4	14.9	14.6	15.3	NS
Vitamin C (mg)	100	100	95	99	NS
Vitamin A (µgRE)	720	617	712	685	NS

SFA (g)	14.4	13.4	13.4	12.9	NS
MUFA (g)	15.8	14.6	14.4	14.5	NS
PUFA (g)	11.8	10.6	11.1	10.6	NS
n-3 (g)	1.56	1.44	1.52	1.44	NS
n-6 (g)	10.3	9.3	9.6	9.2	NS
Cholesterol (mg)	261	230	267	253	NS

---

\*Data was expressed as mean (standard deviation) or percentage.

Abbreviations: NS, not significant; SFA, saturated fatty acid; MUFA, monounsaturated fatty acid; PUFA, polyunsaturated fatty acid.

**Table 14. General characteristics and daily nutrient intakes of the participants with 19–39 years old\***

	AMH quartile group (number of participants)				<i>P</i>
	1Q (193)	2Q (191)	3Q (190)	4Q (192)	
Age (yr)	30.7	30.5	30.5	30.4	NS
Obesity (%)	16.3	15.3	20.0	16.2	NS
Residential area (%, Rural)	14.0	14.7	13.2	12.5	NS
Household income (%, Low and moderately low)	28.1	26.2	33.9	31.8	NS
Dietary supplement use (%, Yes)	43.4	47.0	43.6	42.9	NS
Energy (Kcal)	1952	1764	1850	1866	NS
Carbohydrate (g)	280	259	275	273	NS
Protein (g)	69	61	67	65	NS
Fat (g)	52	47	50	50	NS
Dietary fiber (g)	19	17	19	19	NS
Calcium (mg)	447	415	450	453	NS
Phosphate (mg)	1005	904	990	992	NS
Iron (mg)	14.2	13.2	13.5	14.2	NS
Sodium (mg)	3600	3092	3593	3421	NS
Potassium (mg)	2727	2470	2683	2664	NS
Thiamin (mg)	1.89	1.69	1.80	1.84	NS
Riboflavin (mg)	1.35	1.23	1.35	1.39	NS
Niacin (mg)	15.4	14.3	14.8	15.5	NS
Vitamin C (mg)	86	81	83	84	NS

Vitamin A (µgRE)	707	567	742	697	NS
SFA (g)	15.7	14.2	14.4	14.6	NS
MUFA (g)	16.9	15.3	15.6	16.4	NS
PUFA (g)	12.1	10.4	12.0	11.5	NS
n-3 (g)	1.48	1.34	1.55	1.47	NS
n-6 (g)	10.6	9.2	10.5	10.0	NS
Cholesterol (mg)	287	249	293	280	NS

---

\*Data was expressed as mean (standard deviation) or percentage.

Abbreviation: See Table 13.

## 고찰

항물리관호르몬(AMH)는 난소 기능과 밀접한 연관을 보이는 난소예비능 지표로, 난임 평가 및 치료반응 예측 등에 사용되며 향후 공공 보건 영역에도 활용될 가능성이 있는 중요한 검사이다. 2015년 자동화 AMH 검사가 도입되어 현재 그 활용도가 증가하고 있으나 건강인 여성, 특히 아시아에서의 세분화된 연령대별 참고치 데이터는 거의 없는 실정이다. 많은 연구에서 제시하고 있는 AMH 결정치는 과거의 ELISA 검사결과를 기반으로 하고 있다. 따라서 본 연구에서는 질병관리본부 주도 국민건강영양조사사업 참여자를 대상으로 건강한 19-54세 여성 1,500명의 인체유래물을 분양받아 국내 최초로 자동화 AMH 검사의 연령그룹 별 참고범위를 설정하고 AMH 농도 분포를 확인하였으며 각 연령별 백분위수를 제시하였다. AMH와 함께 측정된 progesterone 값에 근거하여 생리 주기에 대한 정보를 얻었으며, 생리 주기에 따른 AMH 값 차이는 보이지 않았다. 이는 AMH의 특성으로 기존 연구와 일치하는 소견이다.

이상치로 제거된 결과는 13개로 모두 연령그룹별 3분위수에 IQR의 3배수를 더한 값을 초과하는 높은 값이었다. 이상치가 모두 높은 값인 이유는 AMH의 분포가 정규 분포가 아니고 낮은 값 쪽으로 치우쳐져 있으며 특히 연령이 증가함에 따라 검출한계 근처로 수렴하는 특성을 보이기 때문이다. 이상치는 AMH 검사의 random error 발생 또는 대상자 혈청 내 존재하는 방해물질 때문일 가능성이 있으며, AMH 값에는 문제가 없으나 임상적으로 PCOS 환자일 가능성이 있다. 본 연구에서는 생리주기 확인 및 초음파 검사 등 산부인과적 평가는 시행하지 못하였으나 이상치 제거를 통하여 PCOS 가능성을 배제하려고 노력하였다.

AMH는 연령이 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였으며 35세 이후 감소하기 시작하여 40세부터는 lower reference limit 농도가 검출한계인 0.01 ng/mL 근처까지 급격히 감소하였다(Table 8, Table 9). 특히 각 연령별 백분위수 자료에서는 43세부터 확연히 검출한계 근처까지 감소한 것을 확인할 수 있었다(Table 11). 이러한 자료들은 실제 환자진료 시 본인의 난소 기능에 해당하는 나이에 대한 정보를 제공할 수 있다<sup>12,13)</sup>. 특징적으로 한국인 30-34세의 경우 서구인에 비해 lower percentile은 낮고 upper percentile은 다소

높은 낮은 범위의 값을 나타내었다. 이상치 제거 후의 연령그룹 별 한국인의 AMH 중간값은 서구인을 대상으로 한 시약지시서 제시값에 비해 약간 높은 값을 나타내었으며, 이는 중국 건강인을 대상으로 한 Beckman Coulter 자동화 AMH 평가 결과와 유사하였다<sup>9)</sup>. 이는 19-34세 사이에서 명확하였고 전체적으로 AMH 값이 감소 추세를 보이는 이후 연령대에서는 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 1).

자동화 AMH에는 대표적으로 Beckman Coulter와 Roche 시약이 있으며, 두 검사 간에는 일치도가 매우 우수한 것으로 보고되었다<sup>3,6)</sup>. 기존 국내에서 수행된 AMH 참고치 설정 문헌에서는 Immunotec 또는 modified Gen II ELISA로 검사하였고 불임센터 방문 여성을 대상으로 하였다<sup>11-13)</sup>. 결과비교 시 비슷한 연령대에서 AMH 값이 본 연구결과에 비하여 더 높은 값을 나타내었다. 결과값의 차이는 참고 집단의 차이와 함께 주로 검사법의 차이가 영향을 미쳤을 것으로 추정되며 ELISA 검사 대비 자동화 AMH 검사값이 10-30% 낮게 측정된다는 기존 보고와 비슷한 맥락이다<sup>6)</sup>.

본 연구에서 난소기능이상 관련유전자 *BMP15*에 대해 직접염기서열분석을 시행한 결과 임상적 중요성이 높다고 판단되는 5종의 질병연관 변이는 발견되지 않아 해당 변이가 영향을 주었을 가능성은 배제할 수 있었으며 기존 문헌에서<sup>14-22)</sup> 보고된 바 있는 6종류를 포함하여 총 9종의 변이가 검출되었다. c.-9C>G, c.308A>G, c.783\_785TCT[3] (과거 문헌에는 c.788insTCT로 표시되어 있음), c.852C>T 변이의 경우 여러 문헌에서 POF나 PCOS 환자가 아닌 대조군에서도 높은 빈도로 보고된 바가 있어 대부분 benign variant로 생각되었다. c.598C>T 변이의 경우 중국 및 한국 문헌에서만 보고되었고<sup>15,16,28)</sup> KRG database에도 1.1%의 빈도를 보여 민족 간 차이를 보였다. c.728T>G의 경우에도 한국 문헌에서만 보고된 바 있는 변이었다<sup>28)</sup>. 변이가 존재하는 군과 변이가 없는 군 간에 AMH 농도에는 차이를 보이지 않았으나, AMH 농도 퍼센타일에 따라 중간 5-95 퍼센타일 및 양 극단값(5 퍼센타일 미만 또는 95 퍼센타일 초과)의 두 군으로 분류하여 변이 빈도를 조사한 결과 양 극단값 군의 변이 빈도가 더 높았다(18.3% vs.25.8%). AMH 농도와 *BMP15* 유전자 사이에 일정 부분 간접적으로 관련이 있을 것으로 추정되나 이 연구에서는 난소 기능 이상 질환군을 포함하지 않았으므로 향후 POF나 PCOS 환자군에서 folliculogenesis 관련 다양한 유전자들을 포함하는 연구가 필요하리라 생각된다<sup>29)</sup>.

다양한 생물학적, 환경적, 사회적 인자들이 AMH 결과값에 영향을 줄 수 있으며 결과값 해석 시 이에 대한 고려가 필요하다<sup>1,14)</sup>. 전술한 연령, POF나 PCOS 등의 산부인과 질환, 검사방법 외에도 경구피임제 복용, 성선자극호르몬-분비호르몬 작용제(GnRH agonist) 투여 등은 AMH 농도를 감소시킬 수 있으며, 과립막세포 종양은 AMH 농도를 증가시킨다. 또한 현재 흡연 중이거나 항암치료 중인 환자, 비타민 D 감소자에서 낮은 AMH 농도를 보이는 것이 알려져 있다. 인종에 따라 다른 값을 보일 수 있으며, 비만의 영향은 연구 간 일치하지 않는 것으로 보고되었다.

국민건강영양조사사업 변수와 AMH와의 관련성을 탐색한 결과 중금속(카드뮴, 수은, 납) 농도가 AMH와 약한 음의 상관관계를 나타내었다. 특히 카드뮴과 수은 항목은 분석 대상을 주요 가임기 연령대인 19-39세로 한정하였을 경우에도 통계적으로 유의하였다. 중금속 항목은 일부 대상자에서만 시행되어 전체 데이터를 반영한다고 보기는 어려우나, AMH가 해당 연령그룹 1사분위수 미만인 19-39세 대상자들의 카드뮴 농도가 2사분위수 대상자보다 유의하게 높다는 점은 임상적으로 의미가 있다고 생각된다. 카드뮴 노출은 다양한 기전으로 생식계 독성을 유발할 수 있으며, 비록 연구결과들이 일치하지는 않았으나 카드뮴이 여성 건강에 미치는 영향에 대해 몇몇 연구에서 보고된 바가 있다<sup>30)</sup>. 최근 한 연구에서는 카드뮴 노출이 AMH 농도에 영향을 줄 수 있음을 보고하였는데, 폐경 전 한국 여성에서 AMH와 혈중 카드뮴 농도가 음의 상관성을 보여 본 연구와 비슷한 소견을 나타내었다<sup>31)</sup>.

추가적으로 통계적으로 유의하지는 않았으나 염증 지표 hsCRP 값이 AMH가 25 퍼센타일 미만으로 낮은 대상자에서 높은 경향을 보였다. 동맥경화증, 만성폐질환, 암 등의 개시와 진행에 염증이 중요하다는 사실은 잘 알려져 있다. 그러나 AMH와 염증 지표와의 관련성에 대해서는 아직까지 별로 연구된 바가 없다. 관련 연구로 대규모 남성 코호트를 대상으로 수행된 한 연구에서 AMH와 CRP 간 음의 상관관계를 보였다는 보고와<sup>32)</sup>, 면역매개 만성염증질환인 전신홍반성 루푸스 환자에서 AMH 농도가 대조군에 비해 감소되어 있었다는 보고가 있다<sup>33)</sup>. 따라서 난소 기능 저하와 염증 지표와의 관련성에 대하여 추후 연구로 확인하는 것이 필요하다.

비타민 D 항목의 경우 AMH 농도에 영향을 줄 수 있는 것으로 보고되었으나

아직 일치된 의견은 없는 상태로 계절성 변동을 보이는 특성을 보인다. 본 연구에서는 전체대상자를 대상으로 분석하였을 때 비타민 D와 AMH는 약한 음의 상관관계를 나타내었다. 기존 연구결과들은 양의 상관관계를 보이거나 음의 상관관계를 보이기도 하고 또는 관련성이 없는 것으로도 보고되어 일치하지 않았다<sup>14,34,35</sup>). 아직 AMH와 영양 상태의 관련성에 대해서는 연구에 따라 다양한 결과를 보이고 있으며 일치된 결과는 없다. 지금까지 난소 지표와 영양 관련 항목과의 관계 분석을 위하여 사용된 지표는 주로 지방, 식이섭유, 콩류, 비타민 D 농도 등이었다<sup>36</sup>). 이 연구에서 처음으로 다양한 종류의 1일 영양소 섭취량과의 관련성에 대해 분석을 시행하였으며 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

일반적으로 참고범위 설정을 위해서는 검사 후 남은 잔여 검체를 이용하는 경우가 흔하다. 그러나 이 연구에서는 잔여 검체가 아닌 건강한 가임기 여성의 검체를 분양받아 직접 측정하여 연구를 수행하였다는 강점이 있다. 또한 국민건강영양조사사업 대상자의 혈청 자원을 국립중앙인체자원은행에서 최초로 분양받았다는 점은 이 연구가 공공성을 가진다는 의미로 해석할 수 있을 것이다. 이 연구에서 대상자 선정의 한계점은 다음과 같다. 이 연구에서는 사업 참여자 중 고혈압, 당뇨병, 고콜레스테롤혈증 등의 만성질환의 병력이 없고, 비흡연자이면서 *BMP15* 주요 변이가 관찰되지 않은 경우 대상으로 선정하였다. 그러나 대상자 선정기준에 생리 주기에 대한 정보(규칙성, 정상 생리주기 여부 등), 현재 경구피임약 복용 여부, 임신력, 부인과 검진 소견 등 여성 건강과 관련된 항목이 포함되지 못했다. 이 항목들은 국민건강영양조사사업 설문조사 또는 검사 항목에 포함되지 않아 정보를 얻을 수 없는 항목이었다. 따라서 PCOS 환자 등이 대상자에 일부 포함되었을 가능성이 있으며, 이상치로 제거되었을 것으로 추정되나 완전히 배제하였다고 하기는 어렵다. 또한 19세 이상 전체 대상자에서 AMH 사분위수 그룹 별 혈액검사결과, 영양소섭취량 등을 분석하였는데 AMH 값이 전체적으로 낮아지는 경향을 보이는 40세 이상에서는 AMH의 분포가 혼선 요인으로 작용할 수도 있다고 생각된다. 이에 전체대상자 이외에 주요 가임 연령대인 19-39세를 대상으로 추가 분석을 시행하여 비교하였다.

이 연구에서 제시한 자동화 AMH 검사의 참고 범위 데이터와 퍼센타일 정보, 관



런 역학정보 자료는 한국 여성의 난소기능 평가 및 유관 임상 진료 시 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다. 또한 AMH 농도와 관련유전자 *BMP15* 유전자 일부 변이는 서구인 데이터와 차이를 나타내어 인종간 차이를 보임을 확인할 수 있었다. 연구 결과는 관련 연구 수행을 위한 기초 자료 제공과 함께 한국인 또는 아시아인에서 AMH 검사의 해석 및 활용도 확장에 기여할 것으로 사료된다.

## 결론

본 연구에서는 국민건강영양조사사업 대상자 혈청과 DNA 자원을 국립중앙인체 자원은행으로부터 분양받아 건강한 한국여성에서 Roche Elecsys AMH 검사의 연령대별 참고범위를 설정하였다. AMH는 전체적으로 낮은 값 쪽으로 치우친 좌경 분포를 보였으며 대상자의 30%는 AMH가 0.5 ng/mL 이하였다. 연령대별 AMH 중간값은 19-24세 4.33 ng/mL, 25-29세 4.13 ng/mL, 30-34세 3.33 ng/mL, 35-39세 2.11 ng/mL, 40-44세 1.10 ng/mL, 45-49세 0.21 ng/mL, 50-54세 0.01 ng/mL로 연령이 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였다. AMH 하위 5 퍼센타일 값은 19-24세 1.77 ng/mL, 25-29세 1.20 ng/mL, 30-34세 0.43 ng/mL, 35-39세 0.39 ng/mL, 40-44세 0.07 ng/mL, 45-49세 0.01 ng/mL, 50-54세 0.10 ng/mL로 40세부터 AMH 농도가 급격히 감소하였다. 하위 2.5 퍼센타일 값은 각각 1.14 ng/mL, 0.84 ng/mL, 0.22 ng/mL, 0.23 ng/mL, 0.01 ng/mL, 0.01 ng/mL, 0.01 ng/mL이었다. 제시된 한국인 AMH 참고치 및 퍼센타일 정보는 검사결과 적용을 위한 필수적인 기초 자료로 결과해석 및 임상적 활용에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다. 또한 이 연구에서는 난소기능이상 관련유전자 *BMP15* 유전자형 검사 데이터를 생성하였으며 총 9종의 변이가 검출되었다. AMH가 극단적으로 낮거나 높은 대상자에서 *BMP15* 유전자변이의 빈도가 더 높았다. 국민건강영양조사사업에 포함된 일부 혈액검사 항목과 AMH 농도와의 관련성을 탐색한 결과 AMH가 낮은 대상자들에서 카드뮴, 수은, 납 순으로 농도가 상대적으로 높았고 AMH와 약한 음의 상관관계를 보이는 것을 확인하여 건강한 여성에서도 중금속 축적과 AMH 저하와의 연관성이 관찰되었다. AMH 농도가 낮은 대상자들에서 hsCRP가 상승된 것은 원인불명 난소기능저하환자에서 원인규명을 위한 새로운 시도가 필요함을 시사한다. 비타민 D가 AMH농도와 약한 음의 상관관계를 나타내어 난소에서 비타민 D의 역할에 관한 연구가 향후 필요하다. 또한 국민건강영양조사사업 대상자에서 다양한 영양정보 분석을 시도하여 난소기능 저하와 관련된 유전적, 환경적 관련인자를 조명하게 되는 주요한 연구결과를 얻게 된 것이 본 연구에서 큰 의의로 사료된다.

## 참고문헌

1. Tal R, Seifer DB. Ovarian reserve testing: a user's guide. *Am J Obstet Gynecol.* 2017;217(2):129-40.
2. Teede H, Misso M, Tassone EC, Dewailly D, Ng EH, Azziz R, et al. Anti-Müllerian Hormone in PCOS: A Review Informing International Guidelines. *Trends Endocrinol Metab.* 2019;30(7):467-78.
3. van Helden J, Weiskirchen R. Performance of the two new fully automated anti-Müllerian hormone immunoassays compared with the clinical standard assay. *Hum Reprod.* 2015;30(8):1918-26.
4. Azhar E, Seifer DB, Melzer K, Ahmed A, Weedon J, Minkoff H. Knowledge of ovarian reserve and reproductive choices. *J Assist Reprod Genet.* 2015;32(3):409-15.
5. Broer SL, Broekmans FJ, Laven JS, Fauser BC. Anti-Müllerian hormone: ovarian reserve testing and its potential clinical implications. *Hum Reprod Update.* 2014;20(5):688-701.
6. Nelson SM, Pastuszek E, Kloss G, Malinowska I, Liss J, Lukaszuk A, et al. *Fertil Steril.* 2015;104(4):1016-21 e6.
7. Persani L, Rossetti R, Di Pasquale E, Cacciatore C, Fabre S. The fundamental role of bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and its involvement in female fertility disorders. *Hum Reprod Update.* 2014;20(6):869-83.
8. Belli M, Shimasaki S. Molecular Aspects and Clinical Relevance of GDF9 and BMP15 in Ovarian Function. *Vitam Horm.* 2018;107:317-48.
9. Cheng X, Zhang Q, Liu M, Li S, Tao Z, Ichihara K, et al. Establishing age-specific reference intervals for anti-Müllerian hormone in adult Chinese women based on a multicenter population. *Clin Chim Acta.* 2017;474:70-5.
10. Anckaert E, Öktem M, Thies A, Cohen-Bacrie M, Daan NM, Schiettecatte J, et al. Multicenter analytical performance evaluation of a fully automated

anti-Müllerian hormone assay and reference interval determination. *Clin Biochem*. 2016;49(3):260-7.

11. Yoo JH, Kim HO, Cha SW, Park CW, Yang KM, Song IO, et al. Age specific serum anti-Müllerian hormone levels in 1,298 Korean women with regular menstruation. *Clin Exp Reprod Med*. 2011;38(2):93-7.

12. Lee JE, Park DS, Kim M-L, Yoon BS, Song T, Kim MK, et al. Age-related distribution of anti-Müllerian hormone levels in 2,879 Korean women with regular menstruation. *Korean J Obstet Gynecol* 2012;55(12):920-8.

13. Lee JY, Ahn S, Lee JR, Jee BC, Kim CH, Seo S, et al. Reference Values for the Revised Anti-Müllerian Hormone Generation II Assay: Infertile Population-based Study. *J Korean Med Sci*. 2017;32(5):825-9.

14. Shahrokhi SZ, Kazerouni F, Ghaffari F. Anti-Mullerian Hormone: genetic and environmental effects. *Clin Chim Acta*. 2018;476:123-9.

15. Wang B, Wen Q, Ni F, Zhou S, Wang J, Cao Y, et al. Analyses of growth differentiation factor 9 (GDF9) and bone morphogenetic protein 15 (BMP15) mutation in Chinese women with premature ovarian failure. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010;72(1):135-6.

16. Liu J, Wang B, Wei Z, Zhou P, Zu Y, Zhou S, et al. Mutational analysis of human bone morphogenetic protein 15 in Chinese women with polycystic ovary syndrome. *Metabolism*. 2011;60(11):1511-4.

17. Di Pasquale E, Beck-Peccoz P, Persani L. Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *Am J Hum Genet*. 2004;75(1):106-11.

18. Di Pasquale E, Rossetti R, Marozzi A, Bodega B, Borgato S, Cavallo L, et al. Identification of new variants of human BMP15 gene in a large cohort of women with premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(5):1976-9.

19. Dixit H, Rao LK, Padmalatha VV, Kanakavalli M, Deenadayal M, Gupta N, et al. Missense mutations in the BMP15 gene are associated with ovarian failure. *Hum Genet*. 2006;119(4):408-15.

20. Laissue P, Christin-Maitre S, Touraine P, Kuttenn F, Ritvos O, Aittomaki K, et al. Mutations and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. *Eur J Endocrinol*. 2006;154(5):739-44.
21. Rossetti R, Di Pasquale E, Marozzi A, Bione S, Toniolo D, Grammatico P, et al. BMP15 mutations associated with primary ovarian insufficiency cause a defective production of bioactive protein. *Hum Mutat*. 2009;30(5):804-10.
22. Tiotiu D, Alvaro Mercadal B, Imbert R, Verbist J, Demeestere I, De Leener A, et al. Variants of the BMP15 gene in a cohort of patients with premature ovarian failure. *Hum Reprod*. 2010;25(6):1581-7.
23. Patiño LC, Walton KL, Mueller TD, Johnson KE, Stocker W, Richani D, et al. BMP15 Mutations Associated With Primary Ovarian Insufficiency Reduce Expression, Activity, or Synergy With GDF9. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(3):1009-19.
24. Gassner D, Jung R. First fully automated immunoassay for anti-Mullerian hormone. *Clin Chem Lab Med*. 2014;52(8):1143-52.
25. Tukey JW, *Exploratory data analysis*. 1977: Addison-Wesley.
26. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), *Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline - Third Edition*. 2010, CLSI document EP28-A3c.
27. Pu D, Xing Y, Gao Y, Gu L, Wu J. Gene variation and premature ovarian failure: a meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2014;182:226-37.
28. Sohn IS, Kim SN, Lee KY, Lee JY, Lee S-J, Kwon HS. Mutation Analysis of Bone Morphogenetic Protein-15 Gene in Premature Ovarian Failure. *J Menopausal Med*. 2008;14(2):149-59.
29. Convissar S, Armouti M, Fierro MA, Winston NJ, Scoccia H, Zamah AM, et al. Regulation of AMH by oocyte-specific growth factors in human primary cumulus cells. *Reproduction*. 2017;154(6):745-53.
30. Pollack AZ, Ranasinghe S, Sjaarda LA, Mumford SL. Cadmium and

Reproductive Health in Women: A Systematic Review of the Epidemiologic Evidence. *Curr Environ Health Rep.* 2014;1(2):172-84.

31. Lee YM, Chung HW, Jeong K, Sung YA, Lee H, Ye S, et al. Association between cadmium and anti-Mullerian hormone in premenopausal women at particular ages. *Ann Occup Environ Med.* 2018;30(1):44

32. Kadariya D, Kurbanova N, Qayyum R. Association of Anti-Mullerian Hormone with C-Reactive Protein in Men. *Sci Rep.* 2019;9(1):13081.

33. Martins NFE, Seixas MI, Pereira JP, Costa MM, Fonseca JE. Anti-müllerian hormone and ovarian reserve in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol.* 2017;36(12):2853-4.

34. Moslehi N, Mirmiran P, Tehrani FR, Azizi F. Current Evidence on Associations of Nutritional Factors with Ovarian Reserve and Timing of Menopause: A Systematic Review. *Adv Nutr.* 2017;8(4):597-612.

35. Bednarska-Czerwińska A, Olszak-Wąsik K, Olejek A, Czerwiński M, Tukiendorf AA. Vitamin D and Anti-Mullerian Hormone Levels in Infertility Treatment: The Change-Point Problem. *Nutrients.* 2019;11(5). pii: E1053.

36. Moslehi N, Mirmiran P, Tehrani FR, Azizi F. Current Evidence on Associations of Nutritional Factors with Ovarian Reserve and Timing of Menopause: A Systematic Review. *Adv Nutr.* 2017;8(4):597-612.

## Abstract

**Background:** Anti-Müllerian Hormone (AMH) is the one of the most reliable markers of ovarian reserve, which is widely used in variable clinical settings. Blood AMH levels decline with age and become undetectable after menopause. AMH can be used for the assessment of diminished ovarian reserve in the evaluation of female infertility, aid to diagnosis of polycystic ovary syndrome, and the determination of therapeutic response during the assisted reproductive techniques. Automated AMH assay was introduced in Korea since 2016, but reference value study has not performed yet for Korean population. The aim of this study was to determine the age specific reference values for AMH and the confirmation of related genetic variations in apparently healthy Korean women.

**Materials and methods:** A total of 1,500 subjects were selected among the National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES) 2013 - 2016 female participants based on the followings: no previous history of diabetes mellitus, hypertension, or hypercholesterolemia and non-smoker. Those ranging from 19 to 54 years were divided into 7 age groups at 5-year intervals: 19-24 years, 25-29 years, 30-34 years, 35-39 years, 40-44 years, 45-49 years and 50-54 years. From January to February 2019, serum and DNA samples of study participants were distributed from the National Biobank of Korea. For the elimination of possible genetic influences associated with ovarian function, *bone morphogenetic protein 15 (BMP15)* polymorphisms were tested by polymerase chain reaction with direct sequencing of 2 exons using DNA samples. Also serum AMH and progesterone were measured by the Roche Elecsys assay and age specific reference interval for AMH was established. Besides we examined the association between KNHANES data and obtained AMH values.

**Results:** The mean age of the participants was  $37.4 \pm 10.4$  years. In the *BMP15* analysis, disease-associated variants were not detected. Nine benign variants were observed; 5 missense, 2 synonymous, 1 in-frame insertion and 1 5' -untranslated region variants. The frequency of *BMP15* variant was 19.0% among total participants, and the most common type was the presence of c.783\_785TCT[3] (p.Leu263dup) and c.852C>T (p.Ser284=) variants simultaneously. Variant positivity showed no distinction according to the AMH value status. AMH showed left-skewed distribution and 30% of participants were less than 0.5 ng/mL. Thirteen outliers were excluded from the analysis. The median AMH level of each age group was 4.33 ng/mL, 4.13 ng/mL, 3.33 ng/mL, 2.11 ng/mL, 1.10 ng/mL, 0.21 ng/mL, and 0.01 ng/mL, respectively. AMH levels decreased with increasing age, especially after 35 years old. The AMH values in the lower 5th percentile of each age group were 1.77 ng/mL, 1.20 ng/mL, 0.43 ng/mL, 0.39 ng/mL, 0.07 ng/mL, 0.01 ng/mL, and 0.01 ng/mL, respectively. The AMH values in the lower 2.5th percentile of each age group were 1.14 ng/mL, 0.84 ng/mL, 0.22 ng/mL, 0.23 ng/mL, 0.01 ng/mL, 0.01 ng/mL, and 0.01 ng/mL, respectively. The mid 90 percentile AMH reference interval of each group by Clinical Laboratory Standards Institute was 1.74-10.52 ng/mL, 1.12-8.68 ng/mL, 0.41-8.83 ng/mL, 0.39-5.43 ng/mL, 0.06-4.40 ng/mL, 0.01-1.87 ng/mL, and 0.01-0.29 ng/mL. The mid 95 percentile AMH reference interval was 1.11-11.37 ng/mL, 0.79-10.17 ng/mL, 0.16-10.98 ng/mL, 0.19-6.74 ng/mL, 0.01-5.03 ng/mL, 0.01-2.49 ng/mL, and 0.01-0.54 ng/mL. AMH levels were not associated with menstrual cycle phase, which was based on the progesterone results. Of the KNHANES data, blood cadmium ( $r = -0.382$ ), mercury ( $r = -0.272$ ), lead ( $r = -0.208$ ), 25-hydroxyvitamin D ( $r = -0.126$ ) showed weak negative correlation with AMH. High-sensitivity C-reactive protein levels were relatively higher in participants with low AMH values, which correspond to AMH value below the 25th percentile of each age group, although not statistically significant ( $P = 0.075$ ).



**Conclusion:** Our data showed reference values of serum AMH in healthy Korean women and provided the basic information for interpretation and clinical implication of automated AMH assay. It remains unclear whether nutritional status or inflammatory marker can influence the AMH levels and this would be an interesting issue for further research.