

요 중 백혈구를 측정하기 위한 새로운 진단 시험지 개발에 관한 연구

朴秀民 · 朴貞五¹ · 張源哲*
단국대학교 자연과학대학 화학과
¹서울보건대학 임상병리과
(1998. 7. 20 접수)

Development of Novel Diagnostic Testing Strips for Measuring Leukocyte Levels in Urine

Soo-Min Park, Chung-Oh Park¹, and Won-Cheoul Jang*

Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Chungnam, 330-714, Korea

¹Department of Medical Technology, Seoul Health College, Sungnam, Korea

(Received July 20, 1998)

요 약. 백혈구는 인체가 세균이나 바이러스에 감염되면 그 숫자가 증가하게 되고 특히 요 중에 백혈구가 검출되면 비뇨기계나 생식기계의 감염을 의심하게 되어 이 계통의 질병을 진단하고 예후를 판단하는데 중요한 지표가 된다. 이에 본 연구에서는 백혈구내의 에스터라제의 활성을 측정함으로써 간접적으로 백혈구의 수를 측정하기 위하여 pentyl-3-thiophene-carboxylate(PTC), pentyl-8-quinolinecarboxylate(POC), 2-phenyl-4(N-tosylalanyloxy)-thiazole(PTT)의 에스테르 기질을 합성하였고 각 기질을 이용하여 백혈구 검출용 시험지를 제조하여 요 중의 백혈구를 측정하였다. 이 세 가지 기질을 사용하여 백혈구 측정을 한 결과 0.5% borate 완충용액 pH 8.0, 기질 0.03%, 0.1~0.8% PVP 안정제, 1% decanol의 구성비로 만들어진 PTT 시험지의 반응 색상이 다른 기질에 비교하여 안정하며 표준 비색표에 의한 육안적인 감별은 물론 요 화학 자동분석기에서의 응용성이 좋았다.

ABSTRACT. A number of leukocytes increases when infected by a germ or virus. Detection of leukocyte levels can indicate of such medical informations as urogenital tract infection or other dysfunction. In this study, pentyl-3-thiophene-carboxylate (PTC), pentyl-8-quinolinecarboxylate (POC), and 2-Phenyl-4(N-tosyl-alanyloxy)-thiazole (PTT) were synthesized, and the test strips were prepared with these substrates for quantifying leukocytes in urine. Among these substrates, the PTT test strip prepared in 0.5% borate buffer pH 8.0, 0.03% PTT, 0.1~0.8% PVP, and 1% decanol showed not only better color reaction but also an excellent application possibility to be used in automatic urine analyzer.

서 론

요(尿, urine)는 인체 내부로부터 생명을 유지하는 동안 대사 과정을 거쳐 끊임없이 형성되어 비뇨기계를 통하여 배설되는 분비물로서, 신장에서 여과, 재흡수, 분비 및 농축과정을 거쳐 수뇨관, 방광, 요도를 따라 배설된다.¹ 따라서, 요 중 성분의 분석 결과는 인체의 상태 즉, 건강유무는 물론, 질병의 진단과 치료의 경과 및 예후를 판정함에 여러 가지 의학적 정보를 얻을 수가 있다.² 그 중에서도 신장을 비롯한 비

뇨기계에, 임균성, 크라미디아성, 트리코모나스성 요도염과 신결핵 및 바이러스성 감염과 같은 특이적인 감염증과 장내 세균 등에 의한 신우 신염, 방광염, 전립선염 등의 비 특이적인 감염증, 또한, 요로의 결석, 종양, 약물과 중금속 중독 및 통풍성 신증 등에 의한 비 감염성 염증에 의해 요 중에 백혈구가 증가함은 물론, 다양한 형태의 백혈구가 출현하게 된다.³

요 중에 포함되어 있는 백혈구를 검출하는 방법으로는 원심 분리하지 않은 요와 요 침전물을 현미경

으로 직접 검정하여 백혈구의 수를 세는 방법이 이용되거나 백혈구의 리소좀에 함유되어 있는 효소의 활성을 측정하여 간접적으로 백혈구를 측정하는 방법이 소개되고 있다.^{4,5}

시험지를 이용한 dip and read 검사 방식을 채택한 전식 화학 분석법은 습식 분석법에 비해 시약 유출로 인한 환경오염의 폐해를 최소화시키거나 별도의 장치가 필요 없이 간단하게 설치하는 등 거의 문제점이 없어 오늘날의 분석기법으로 각광을 받고 있는 실정이다.⁶ 최근에는 백혈구 에스터라제의 활성을 측정하므로 간접적으로 백혈구를 측정하는 방법이 가장 많이 이용되고 있는 것이다.⁷ 백혈구 에스터라제의 활성을 측정하기 위해서 사용되고 있는 발색성 효소 기질(chromogenic enzyme substrates)은 백혈구 에스터라제에 의해 활성화되었을 때, 직접적으로 착색 색소를 형성할 수 있는 에스테르 화합물이어야 한다. 또한, 발색성 효소 기질로 무색의 에스테르 기질(ester substrate) 또는 약간 착색된 에스테르 기질과 가수분해 효소로서 백혈구의 에스터라제가 반응을 일으켜 착색의 산이 되거나 무색의 알코올이 생성된 후, 이 화합물이 디아조늄 염(diazonium salt)과 짝지음(coupling)반응을 일으켜 착색의 아조(azo)화합물로 변환시킨 후 그 반응성을 이용하여 간접적으로 요 중에 존재하는 백혈구를 측정하는 방법을 개발하였다.⁸ 이와 같은 기질의 개발로 요 중의 다른 성분에 대한 영향이 적고 반응결과에 대한 정확성, 감도 및 안정성은 높일 수 있었다. 따라서, 경제적으로 부담이 적고 안정성이 있으며 정확하고 감도가 높은 기질과 디아조늄 염을 개발함은 물론, 효소 반응에 최적 산도를 유지할 수 있는 완충제를 비롯하여 활성제, 안정제, 습윤제, 용매, 첨가 색소 및 시험지의 선택 등이 우선 해결해야 할 과제로서 그 연구가 계속되고 있는 것이다.

본 연구에서는 본 실험실에서 합성된(PTC, PQC, PTT) 각 각의 기질에 대한 백혈구 에스터라제의 활성화 감도 등을 검토한 후, 반응 특이성이 좋고 감도가 높은 기질을 선택하여, 요 중에 존재하는 백혈구 수를 간접적으로 측정함은 물론, 반응 단계에 따라 구분이 가능한 요 중 백혈구 측정용 시험지를 개발하여 키트(kit)화 하고자 하였다. 또한, 상품화된 기존의 아미노산 에스테르 기질과 비교 검토하여 그 차이가 발견되면 간편하고 경제성을 고려한 에스

터 기질을 개발함은 물론, 발색성 효소 기질의 결정을 보완하기 위하여 그 개선책을 검토하고자 한다.

실 험

시 약. 백혈구내의 에스터라제의 활성을 측정하기 위한 기질은 실험실에서 합성하였다. 아조 짝지음반응에 이용되는 디아조늄염 (2-methoxy-4(N-morpholino)-benzene diazonium tetrachlorozincate 및 촉진제인 alcohol류와 pyridine은 Aldrich Chemical Co.에서 구입하였다. 백혈구를 분리하기 위한 Hank's balanced salt solution(HBSS, pH 7.3), Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS, pH 7.5) histopaque 1119, histopaque 1083과 항응고제인 heparine-sodium 및 효소 표준 용액으로는 porcine liver에서 추출한 crude한 esterase(20,000 unit)를 Sigma사에서 구입하여 사용하였다. 또한, 정도 관리용 요는 KOVA trol I(Lot No. 35676, high abnormal), KOVA trol II(Lot No. 36114, low abnormal), KOVA trol III(Lot No. 35877, normal)는 HYCOR biomedical Inc. 제품을 사용하였고, 요 중 백혈구의 정도 관리용 시험지 chek-stix은 Miles Inc. 제품을 사용하였으며, 요 침전물중 백혈구를 현미경으로 관찰하기 위해서 검정용으로 표준화된 KOVA System은 ICL scientific사 제품을 이용하였다.

백혈구의 분리. 건강한 성인 헌혈자에게서 얻은 혈액을 heparin sodium salt으로 처리된 진공 채혈관으로 혈액 10 mL을 채취하였다. 채취된 혈액과 HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)을 동일한 부피로 섞어 희석한다. 사용된 HBSS의 구성성분은 Table 1과 같다. 원심 침전관에 희석된 혈액의 60~70% 부피의 ficoll을 가하고 여기에 희석된 혈액을 조심스럽게 넣

Table 1. Components of HBSS without calcium chloride, magnesium sulfate, phenol red and with sodium bicarbonate. Refrigerated 0~5 °C

Component	g/L
D-glucose	1.0
Potassium chloride	0.4
Potassium phosphate	0.06
Sodium chloride	8.0
Sodium phosphate dibasic[anhydrous]	0.04788
pH	7.3±0.3

는데 ficoll과 혈액이 섞이지 않게 ficoll 위에 혈액이 살짝 덮히게 한 후 실온에서 14,000 rpm의 속도로 40분정도 원심분리 한다. 세포층의 분리에는 위에서 부터 혈장, 백혈구, ficoll층, 적혈구층으로 분리되며 혈장과 ficoll층 사이의 얇은층을 취하여 다른 원심 침전용 falcon 플라스틱 침전관으로 옮긴다. 분리된 백혈구층의 3배정도의 용량의 HBSS를 가하고 실온에서 2,000 rpm으로 10분정도 원심분리하였다. 백혈구 침전물을 다시 HBSS로 희석하여 현탁액을 만들고 1200 rpm으로 실온에서 10분정도 원심분리시켰다. 이 과정을 2회 반복한 후 적당한 양의 HBSS를 가해 현탁액을 만든다. 혈구 자동 분석기와 hemocytometer로 용액속에 포함되어 있는 백혈구의 수를 측정한다. 백혈구가 담긴액을 노로 희석하여 적당한 세포의 백혈구가 존재하도록 한다.

백혈구측정용 시험지의 제조. 백혈구를 검출하기 위한 시험지는 borate-NaOH 완충용액(0.4 mole, pH 8.0)과 PVP(0.8 g)와 NaCl을 함유하는 100 mL의 1차침지 수용액에 Advantec No.2를 충분히 침지시킨다. 이 시험지를 열풍건조기에서 30분간 건조시킨다. 0.75 mM의 기질과 0.75 mM의 디아조늄염과 1% (V/V)decanol을 함유하는 acetone 용액에 침지시킨다. 그리고, 50°C에서 5분 정도 건조시킨다. 건조된 시험지를 한 변의 길이가 5 mm인 정사각형으로 자르고 polystyrene필름인 받침대위에 부착하고 백혈구 검출용 시험지를 제조하였다. 백혈구가 함유되어 있는 요 중에 백색을 띄고 있는 음성 시험지를 잠시 담갔다 꺼내면, 요 중에 존재하는 백혈구 수 또는 백혈구 에스터라제의 활성도에 따라 얼은 청색에서 짙은 청색으로 발색된다. 제조된 시험지는 습기에 민감하므로 실리카 겔 등의 제습체에 넣어 보관한다.

결과 및 고찰

시험지의 정도관리에 관한 관찰. 정도관리란 채뇨전 계, 기구 및 시약의 준비에서부터 채뇨와 측정 과정은 물론, 최종 결과의 해석까지 완전한 정도관리(total quality control)가 실시되어야 한다. 실험실에서 제조한 시험지의 평가수단으로 시간 변동과 백혈구 수에 따른 정도관리의 기대치가 Table 2와 같이 나왔고 이것은 기존의 시판되고 있는 시험지의 판정결과와 거의 일치하였다.

Table 2. Measurement of substrate sensitivity for leukocyte in quality controlled and self-prepared urine at room temperature

Item	Visual analysis	Clinitek 100, urine chemical analyzer
Control		
KOVA trol I leukocytes/HPF	Trace-Moderate 6~26	Small-Moderate
KOVA trol II leukocytes/HPF	Trace-Moderate 1~13	Small-Moderate
KOVA trol III leukocytes/HPF	Negative 0~5	Negative
Chek-stix	Trace-Moderate	Trace-Moderate
self-prepared urine control I	Trace-Moderate 5~25	Trace-Moderate
self-prepared urine control II	Negative 0~4	Negative

*Self-prepared urine at room temperature.

시험지의 평가. 제조된 시험지에 대하여 요 중에 존재하는 백혈구를 검출하는 능력을 평가하기 위하여 요 침전물의 현미경적 분석에 의해 판독된 S병원을 내원한 피검자의 뇨를 실험에 사용하였다. 기존에 개발되어 사용하고 있는 백혈구 검출용 시험지와 실험실에서 합성한 기질로 만든 시험지의 비교가 Table 3과 같았다. Thiazole 유도체와 아미노산 유도체로부터 만들어진 새로운 에스테르인 phenyl thiazole 아미노산 에스테르인 phenyl thiazole 아미노산 에스테르 기질이 기존의 상품과 비교했을 때 그 효능이 비슷하였다.

시험지 제조에 관한 개발

적정 완충용액에 관한 연구. 합성된 기질 중 감도가 가장 좋았던 phenyl thiazole 아미노산 유도체 기질

Table 3. Comparative studies on the test strips of ester substrate

Item	Substrate	Azo coupling dye	Reaction time (sec)	Sensitivity leukocyte (μL)
Co.				
A	3-TAPP	DANS	120	10~25
B	Indoxyl ester	MMBDT	60~120	10
C	Naphthol AS-C	CBMBD	120	20
D	8-PQC	MMBDT	360	10,000
E	2-PVP	MMBDT	240	10,000
F	PTT	MMBDT	90~120	5~25

을 이용하여 백혈구 검출용 시험지를 만들었다. 요 중 백혈구와 진단용 시약이 시험지에서 반응을 잘 일으킬 수 있는 최적의 조건을 조사하기 위해서 우선 조사하였으며, 1차 침지에 있어서 가장 기본이 되는 완충용액으로 많이 사용되는 borate buffer, carbonate buffer, CAPS(3-(N-cyclohexylamino)-1-propane-sulfonic acid), CES(2-(N-cyclohexylamino)ethane-sulfonic acid)

Table 4. Leukocytic reaction time of pH and types of buffer solution

Buffer solution	pH	Reaction time (sec) (leukocytes, $5.0 \times 10^6/\text{mL}$)
Borate	8	120
	9	100
	10	60
	11	60
Carbonate	9	150
	10	120
	11	90
CAPS	9	180
	10	180
	11	180
	11	180
CES	9	over 180
	10	180
	11	180
	11	180

Table 5. Comparison of reaction times between the variation of borate buffer solution and pH

Con. of borate (%)	pH	Stability of reagent strip		Reaction time (sec)
		Immediate	1day later	
0.1	8	-	-	over 240
	9	±	-	
	10	±	±	
	11	±	±	
0.5	8	+	+	120
	9	+	+	120
	10	+	+	90
	11	+	+	90
1.0	8	+	+	90
	9	+	+	90
	10	++	++	60
	11	++	++	60
1.5	8	+	+	30~50
	9	+	+	30~50
	10	++	++	immediately
	11	++	++	immediately

Table 6. Leukocytic reaction with the variation of substrate concentration, borate buffer solution, and pH (positive control; 5,000 leukocytes/ μL)

Con. of substrate	Con. of borate (%)	pH	Reagent strip	Negative control	Positive control
0.5	0.5	8	±	-	++
		9	±	-	++
		10	±	-	++
		11	-	-	+
1.0	1.0	8	+	+	++
		9	+	+	++
		10	+	+	++
		11	±	±	++
0.03	1.5	8	+	±	+
		9	+	±	+
		10	±	-	±
		11	±	-	±
2.0	2.0	8	±	±	±
		9	±	±	±
		10	±	±	±
		11	+	±	±
0.5	0.5	8	±	-	+
		9	±	-	+
		10	±	-	+
		11	-	-	+
1.0	1.0	8	+	±	++
		9	+	±	++
		10	+	±	++
		11	±	-	++
1.5	1.5	8	+	±	++
		9	+	±	++
		10	±	±	+
		11	±	±	±
2.0	2.0	8	±	±	±
		9	±	±	±
		10	±	-	-
		11	-	-	-
0.5	0.5	8	-	-	±
		9	-	-	+
		10	-	-	±
		11	-	±	±
1.0	1.0	8	-	±	±
		9	-	±	+
		10	-	±	±
		11	±	±	±
0.09	1.5	8	±	±	±
		9	±	±	±
		10	±	±	±
		11	±	±	±
2.0	2.0	8	±	±	±
		9	±	±	±
		10	±	±	±
		11	-	±	±

-: Colorless ±: Pale blue ±: Blue +: Deep blue ++: Dark blue.

를 이용하였고 pH는 8~11까지 하였다(Table 4).⁹

위의 결과로 borate 완충용액에서 가장 빨리 반응을 나타내는 것을 관찰할 수 있었고 또한 염기도가 강해질수록 기질의 가수분해가 빨리 일어나 반응이 빨리 일어남을 관찰할 수 있었다. Borate의 농도(0.1~1%)와 완충용액의 pH를 8~11까지 변화를 주면서 시험지의 발색의 정도를 관찰하였다(Table 5). 백혈구에 존재하는 에스테라제의 최적 활성 pH는 8.5이고 합성된 에스테르 기질은 염기에 가까울수록 자동 가수분해되므로 완충용액의 pH는 8.0으로 정하였다.

안정제에 관한 검토. 백혈구 검출용으로 합성된 기질이 공기 중에서 매우 불안정하고 시험지 또한 불안정하므로 안정제의 처리가 필요하다. 안정제의 농도는 일반적으로 0.1~1%가 적당한 것으로 보고되어¹⁰ 있어서 본 실험에서는 borate 완충용액의 농도를 0.5~2.0%, pH 8~11, 기질의 농도를 0.03~0.09%로 하여 조사하였고 그 결과는 Table 6과 같다.^{11,12} 칩지 용액을 borate(pH 8.0) 0.5%, 기질 농도가 0.03%가 되도록 만들고 안정제인 PVP(0.1~1.6%), CMC(0.1~0.4%)를 농도별로 나누어서 시험지를 만들고 안정제가 미치는 영향에 대하여 관찰하였다. 그 결과는 Table 7과 같았으며 CMC보다는 PVP를 사용하는 것이 더 효과적인 것으로 나타났다.

촉진제에 관한 검토. 시험지 제조에 사용된 기질은 에스테라제가 작용하여 진행되는 가수분해 반응으로 친핵체에 의해서 활성화된다. 일반적으로 alcohol을 촉진제로 많이 사용하기 때문에 분자량이 적은 methanol, ethanol과 분자량이 중간정도인 heptanol 그리고 분자량이 큰 decanol과 비교하여 관찰하였다

Table 8. Variation of reaction times with the addition of activator of each 1% upon dipping into a HBSS of 300 leukocytes/ μ L.

Activators	Reaction time (sec)
Comparative formulation without activator	160
Pyridine	130
Methanol	140
Heptan-1-ol	100
Decan-1-ol	80

*The test strips change from colourless to pale and deep blue.

(Table 8).¹³ 분자량이 큰 alcohol이 휘발성이 적을뿐 더러 활성화하는데도 더 효과가 있는 것으로 관찰되었고 시험지 제조에 바람직한 것으로 사료된다. 또한 pyridine도 사용하여 보았는데 decanol보다는 activator로서의 역할이 떨어지는 것으로 관찰되었다.

결론

백혈구내의 에스테라제의 활성을 측정하는 방법은 신속 정확하고 간편하다는 장점을 가지고 있어 백혈구 검출용 시험지의 개발은 수입에 의존하는 이 분야의 국산화에 기여하는데 목적을 두고 고찰하였다. 본 연구에서 여러 가지 기질들이 합성되어 백혈구 검출용 시험지의 기질로 사용되었는데 그 중에서도 thiazole 유도체에 아미노산을 결합하여 만든 에스테르 화합물이 다른 합성된 기질보다 감도와 안정성이 뛰어났고 기존의 제품과도 비슷한 감도를 갖는

Table 7. Effects of PVP and CMC on determination leukocyte

Kinds of stabilizer (%)	The day			1 week later		
	Reagent strip	Negative control	Positive control	Reagent strip	Negative control	Positive control
PVP (0.1)	-	-	+	-	-	+
PVP (0.2)	-	-	+	-	-	+
PVP (0.4)	-	-	+	-	-	+
PVP (0.8)	-	-	+	-	-	+
PVP (1.6)	-	-	±	-	-	±
CMC (0.1)	-	-	±	±	±	±
CMC (0.2)	-	-	+	±	±	+
CMC (0.4)	-	-	+	±	±	+

*leukocytes 5,000/ μ L.

것을 관찰하였다. 시험지 개발에 있어서 고려하여야 할 백혈구 현탁액의 제조, 완충용액의 선택 및 최적 pH, 안정제 여러 가지 사항들을 고찰함으로써 백혈구 검출용 시험지의 감도나 안정성 등에 관한 중요한 정보들을 얻을 수 있었고 앞으로 더욱 활발한 연구가 계속 진행된다면 좋은 성과가 있을 것으로 사료된다.

인 용 문 헌

1. Newall, R. G.; Howell R. *Clinical Analysis: Ames Division, Miles Limited* 1990.
2. Kass, E. H. *American Association of Physicians* 1956, 69, 56-63.
3. Marks, V. *Ann. Clin. Biochem.* 1988, 25, 220.
4. U. S. Patent, 4,331,760. Boehringer Mannheim GmbH. Mannheim, FRG. 1982, 5:25.
5. U. S. Patent 4,657,855. Miles Labs Inc. Elkhart, Ind. Indiana, 1987, 4, 14.
6. Schumann, G. B.; Schweitzer S. C. Examination of urine, In Henry J. B. *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Method* (18th ed.), Philadelphia, Saunders W. B. Co. 1991.
7. Cochrane, C. G.; Aiken, B. S. *J. Exp. Med.* 1966, 124, 733.
8. Janoff, A.; Basch, R. S. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1971, 136, 1045.
9. Braunsteiner, H.; Rindler, R. *Blut.* 1972, 27, 26.
10. Sweetman, F.; Ornstein, L. *J. Histochem. Cytochem.* 1974, 22, 327.
11. Little, P.; Brit, F. *J. Urol.* 1964, 36, 360.
12. Janoff, A.; Blondin, J. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1971, 136, 1050.
13. Folds, J. D.; Welsh, I. R. H.; Spitznagel, J. K. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1972, 139, 461.