

과산화효소를 이용한 백혈구 측정용 노 검사지 제조에 관한 연구

한국과학기술연구원 생명공학연구소, 대전 가톨릭성모병원*, 백제병원**, 한국과학 기술원***

송은영 · 이흥수 · 김희정* · 김종원** · 최인성 · 변시명*** · 정태화†

국문초록: 백혈구에 존재하는 과산화 효소를 이용하여 노 중 백혈구의 수를 간접적으로 측정하는 새로운 방법의 노 검사지를 개발하였다. 과산화 수소원으로서 포도당 산화효소와 포도당을, 색원체로서 tetramethylbenzidine을 처리하여 백혈구 측정용 노 검사지를 제조하였으며 검출한계는 10 cells/ μ l (5 cells/hpf)이었다. 개발된 백혈구 측정용 노 검사지로 노를 분석하였을 때 노 1 μ l당 10-25 cells의 백혈구가 존재할 경우에는 2분내에 연녹색을, 75-250 cells/ μ l에서는 녹색을 보였고 500 cells/ μ l 이상에서는 녹색을 보였다. 172명의 환자노를 대상으로 노중 백혈구 수치를 현미경 측정 결과와 본 연구에서 개발한 백혈구 측정용 노 검사지와 현재 수입 시판 중인 미국의 A사 제품과 B사 제품으로 분석 비교한 결과 좋은 상관관계를 보였다. 이와 같은 평가분석을 통하여 볼 때 본 연구에서 개발한 백혈구 측정용 노 검사지는 에스터라아제를 이용한 백혈구 측정용 노 검사지와 함께 노중 백혈구를 스크리닝 하는데 효과적임을 알 수 있었다.

서 론

노는 단백질과 핵산의 대사에 있어 최종물질 및 노소, 노산, 암모니아, 아미노산 같은 대사물질과 여러 유기, 무기물질, 비타민, 효소 등을 포함하는데 그 양적, 질적 변화에 따라서, 또는 단백질, 당, 아세톤체 같은 이상물질의 출현에 의해 신장과 노로의 질환, 심장, 간장등 여러기관의 기능을 알 수 있다. 일반적으로 정상인의 노에는 백혈구가 검출되지 않고 있으나 신장이나 비뇨기, 생식기에 이상이 생기면 백혈구가 노와 함께 배출된다. 그러므로 백혈구 검출은 신장이나 비뇨기, 생식기의 이상 유무를 판단하는 데 중요한 지표로 사용되어 진다.

백혈구의 검출방법으로 초기에는 원심분리하지 않은 노나 노 침전물을 현미경으로 직접 검색하여 백혈구의 숫자를 세어왔으나 그 숫자를 셀 수 없는 경우가 많았다. 특히 알카리성 노에서는

백혈구의 반감기가 60분 정도이므로, 그 이후에 노 안에 들어있는 백혈구의 숫자를 현미경으로 세는 경우 위음성으로 나타나게 된다. 그러므로 백혈구의 효소반응법이 연구되었다.

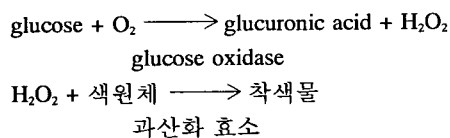
그 중 백혈구의 esterolytic activity를 이용하는 방법이 활발하게 연구되어 왔으며 무색의 ester substrate가 효소와 반응을 일으켜 착색의 산이 되거나 무색의 알콜이 되며 diazonium salt와 coupling을 일으켜 착색화합물로 변환시켜 그 반응성을 측정하여왔다^{4,5,8,11,13}. 에스터라아제에 대한 기질은 naphthol AS-D-Chloroacetate를 시작으로, bromphenol blue diacetate와 bromphenol blue dibenzoate같은 sulfonphthalein ester², N-acetyl-l-alanyl-l-alanyl-l-alanyl methyl ester, 1-naphtyl-N-acetyl-dl-alanine, 1-naphtyl butyrate, 1-naphtyl-l-alanyl-l-alanine같은 alanine ester, indoxyl 또는 thioindoxyl과 amino acid나 peptide의 ester 등이 사용되어 왔다. 현재 세계적으로 Miles Labs.과 Boehringer Mannheim(BM)에서 에스터라아제를 이용한 백혈구 측정용 노 검사지를 제품으로 생산되고 있으며 Miles Labs. Inc.(USA)은 derivatised pyrrole amino acid ester^{6,7}를, BM은 indoxyl

* 논문접수 1996년 10월 12일, 수정재접수 1996년 11월 15일.

† 별책요청 저자

alanine³⁾을 기질로 사용하고 있다. 이 방법들을 이용하여 백혈구를 측정할 경우 에스테라아제에 대한 기질을 합성하여야 하는 데, 합성 방법이 까다롭고 많은 시간과 고도의 기술이 필요하며, 합성된 물질이 불안정하다는 결점을 지니고 있다.

본 연구에서는 백혈구에 존재하는 효소중 과산화 효소를 이용하여 백혈구의 수를 간접적으로 측정하는 방법을 연구하였다. 즉, 골수 과산화 효소(myeloperoxidase)는 다형핵 백혈구(polymorphonuclear leukocyte, PMN)에 다량으로 존재하는 효소로서 전체 세포 무게의 약 5%를 차지하는 데 백혈구 속에 존재하는 과산화 효소와 적혈구 속에 존재하는 과산화 효소의 양적 차이를 이용하여 백혈구 속에 존재하는 양만큼의 과산화 효소에 반응하는 과산화 수소와 반응시켜 발색 반응을 일으키게 하여 백혈구 수를 간접적으로 측정하며^{1,9,10)} 그 원리는 다음과 같다.



과산화물로는 일반적으로 유기 과산화물이 사용되나 이들은 공기중 불안정 할 뿐 아니라 백혈구의 과산화 효소보다 적혈구의 과산화 효소에 더 민감하다. 공기중에서 안정되고 백혈구에만 특이적으로 반응할 수 있는 양의 과산화 수소를 만들어 내기 위하여, 유기과산화물을 사용하는 대신 포도당 산화효소와 포도당을 반응시켰다. 포도당은 공기중에서 포도당 산화효소에 의해 glucuronic acid와 과산화 수소가 된다. 생성된 과산화 수소는 백혈구(polymorphonuclear leukocyte)에 존재하는 과산화 효소에 의해 색원체의 색을 변화시킨다. 과산화 효소를 측정하는 색원체로서 일반적으로 o-tolidine, o-dianisidine, o-phenylenediamine, 4-aminoantipyrin을 사용하고 있으나 이 시약들은 비특이적이어서 백혈구 세포와 적혈구 세포를 구별하지 못하며, 시약 자체가 암을 유발시키는 독성물질이므로 취급시 문제가 된다. 본 실험에서는 색원체로서 tetramethylbenzidine을 사용하였다.

에스테라아제를 이용하여 백혈구를 측정하는 노 검사지는 개발, 실용화되어 있는 반면 과산화 효소를 이용하여 백혈구를 측정하는 노 검사지

방법은 현재까지 개발되어 있지 않다. 본 연구에서 개발한 백혈구 진단용 노 검사지는 종래 방법의 단점을 보완하여 좀더 진보된 백혈구 측정용 노 검사지로서, 보다 신속하고 백혈구 수에 민감하게 반응하는 새로운 방법의 노 검사지이다.

재료 및 방법

재료

노 검사지를 제조하기 위한 시약으로 tri-sodium citrate, citric acid, EDTA · 4Na, SDS, polyvinylpyrrolidone(PVP), dimethyl sulfone, Triton X-100, tartrazine, glucose oxidase, glucose, tetramethylbenzidine 등은 Sigma Co.(U.S.A.)에서 구입하였다. 시약을 처리하기 위한 cellulose membrane은 Whatman Co. (England)에서 구입하였다. 백혈구를 분리하기 위한 시약으로 Hanks' balanced salt(HBSS)와 histopaque, methyl cellulose는 Sigma Co.(U.S.A.)에서 구입하였다. 백혈구 측정용 노 검사지를 비교하기 위하여 Miles Labs.의 Multistix[®], BM의 Chemstrip[®]을 구입하여 사용하였다. 백혈구는 건강한 성인의 혈액에서부터 분리하여 사용하였다. 사용된 기기로 현미경은 Microstar IV (Cambridge Instruments Inc., U.S.A.)를 사용하였고 원심분리기는 Beckman CPR centrifuge(U.S.A.)를 사용하였다.

방법

1. 백혈구 분리¹²⁾

건강한 성인에게서 얻은 헤파린 처리한 anticoagulated blood 14ml과 1% methyl cellulose 2.5ml를 가하고 20-30분간 45° 각도에서 기울려 혈장과 적혈구층을 분리시킨다. 원심분리용 시험관에 3ml의 ficoll 1120을 덜어 놓고 그위에 3ml의 ficoll 1080을 살짝 엮는다. 여기에 혈장을 조심스럽게 넣는다. 이 때 혈액과 ficoll이 섞이지 않도록 조심하고 ficoll 위에 살짝 덮힐 수 있도록 한다. 실온에서 40분간 1400rpm의 속도로 원심 분리한다. 위에서부터 혈장, 단핵세포층, ficoll 1080층, 다형핵 백혈구층, ficoll 1120, 적혈구층으로 분리되며 다형핵 백혈구층을 취하여 다른 원심분리용 관에 옮긴다. 분리된 백혈구층의 3배정도 용량이 되는 HBSS를 가하고 잘 섞은 후 실온에서 10분간 2000 rpm의 속도로 원심분리한다. 침전물을 다시 HBSS로 현탁시킨 후 실온에서

10분동안 1200rpm의 속도로 원심분리시킨다. 이 과정을 2회 반복한 후 적당한 양의 HBSS를 가해 현탁시킨다. Hemocytometer로 현탁액속에 존재하는 세포수를 측정한다. 백혈구가 담긴액을 노로 희석하여 적당한 수의 백혈구가 존재하도록 한다.

2. 백혈구 측정용 노 검사지 제조

Trisodium citrate 3.2g, citric acid 4.15g, EDTA · 4Na 10.0g, SDS 0.5g, polyvinylpyrrolidone 1.5g, dimethylsulfone 10.0g, 10% Triton X-100 1.5ml, tartrazine(0.1mg/dl) 4.0ml, 포도당 산화효소 375mg, sodium chloride 1.053g을 150ml의 증류수에 차례로 녹인다. 위의 혼합액을 cellulose membrane에 침적시키고 60℃온도에서 10분간 건조시켜 1차 시약층으로 만든 다음 2% polyvinylalcohol 수용액에 처리하여 건조시킨다. 포도당 120mg, potassium iodide 0.5mg을 증류수 50ml에 녹인 액과 tetramethylbenzidine 1g을 aceton 50ml에 녹인액을 혼합한 후 1,2차액이 처리된 cellulose membrane에 재 침적시키고 60℃온도에서 10분간 건조시킨다.

3. 백혈구 판정법

검노를 백혈구 측정용 노 검사지에 처리하였을 때 2분내에 발색된 양상에 따라 노중 백혈구의 수를 다음과 같이 유추한다.

노 1μl 당 백혈구수	발 색
0	연한 노란색(-)
10-25 개	노란색을 띤 녹색(T)
75-250 개	녹색(+)
500 개	녹청색(++)

4. 교차반응성 확인

제조된 노 검사지로 백혈구에는 음성이고 hemoglobin, protein, nitrite가 포함된 시료를 취하여 백혈구 측정용 노 검사지가 발색하는지 본다. 백혈구와 함께 hemoglobin, protein, nitrite가 포함된 시료를 취하여 백혈구 측정용 노 검사지의 발색을 비교한다.

결 과

백혈구 분리

건강한 성인에게서 얻은 anticoagulated blood 25ml를 분리하여 HBSS에 현탁시킨 후 hemocytometer로 액속에 존재하는 세포수를 측정한 결과 총 1.36×10^6 개였다. 이 현탁액을 정상노로 희석하여 적당한 수의 백혈구가 존재하도록 하였다.

Table 1. The optimum concentration of tetramethyl benzidine, glucose and glucose oxidase

Glucose (mg/dl)	Glucose oxidase (mg/dl)	Tetramethyl -benzidine (mg/dl)	Red blood cells		hemoglobin (mg/dl)			Leukocyte (135/uI)
			1:10 ²	1:10 ⁴	0-1.5	15	150	
500	50	100	++	±	-	-	-	±
	200		+	T	-	-	-	±
	500		±	-	-	-	-	+
	1000-2000		-	-	-	-	-	-
200	200	0	-	-	-	-	-	-
		200	-	-	-	-	T	±
		500	T	-	-	-	T	++
		1000-2000	±	-	-	-	+	++
250	500	5000	+	-	-	-	++	++
		250	±	-	-	-	-	+
		500	+	-	-	-	±	+
		1000	+	-	-	-	+	++
4000	++	-	-	-	++	++		

-: no response, T: yellow green, ±: pale green, +: green, ++: greenish blue.

백혈구 측정용 뇨 검사지 제조 조건

1. Tetramethylbenzidine, glucose, glucose oxidase의 적정 농도

백혈구의 과산화 효소의 함량차이를 이용하여 백혈구의 과산화 효소를 측정하는 것이므로 백혈구의 과산화 효소에만 반응할 만한 양의 과산화수소를 발생시켜야 한다. 그러므로 tetramethylbenzidine, 포도당, 포도당 산화효소를 적정량 사용하는 것이 중요하다. 적혈구나 hemoglobin과 반응하지 않으면서 백혈구와 반응하는 적정 tetramethylbenzidine, 포도당, 포도당 산화효소의 양을 조사한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다(Table 1).

실험결과 적정 포도당과 포도당 산화효소의 양은 200-500mg/dl, TMB의 양은 500-2000mg/dl이었다. 이와 같은 조건에서 뇨 검사지를 제조하였을 때 백혈구와는 2분내에 발색하였다. 전혈을 1:100으로 희석한 액에서는 반응초기에는 녹색으로 발색되나 곧 발색이 사라졌고 전혈을 1:10000으로 희석한 액에서는 발색되지 않았다. Hemoglobin의 경우 15mg/dl이하의 농도에서는 교차반응이 일어나지 않았다.

2. 완충액의 구성 성분

백혈구는 잘 반응하면서 hemoglobin이나 적혈구와는 반응을 막기위해 완충액의 조성을 달리하여 뇨 검사지를 만들어 반응을 살펴보았다(Table 2). 이때 1차 침지용액은 citrate완충액, 2, 3차 침지액은 포도당 100 mg/dl, 포도당 산화효소 500 mg/dl, TMB 1g/dl을 사용하였다. 일반적으로 6-methoxyquinoline, triethanolamineborate, dimethylsulfone, SDS는 잠혈 측정용 뇨 검사지를 만들 때 촉진제 및 안정제로 사용되는 시약이다. 백혈구 측정용 뇨

검사지 제조시 이들 시약을 첨가하였을 때 효과를 조사하였다. 6-methoxyquinoline을 첨가하면 적혈구나 hemoglobin이 반응하는 것을 촉진하지만 백혈구가 반응하는 것에는 역효과를 보였다. 한편 hemoglobin이나 적혈구와는 반응을 막고 백혈구 산화효소의 효소반응을 촉진시키기 위하여 triethanolamineborate, dimethylsulfone, SDS를 가하는 것이 좋았다. Triethanolamineborate가 있으면 뇨 검사지가 안정되었고 dimethylsulfone이 있어야 뇨 검사지의 발색이 좋았다.

3. 유기 과산화물의 영향

포도당과 포도당 산화효소를 반응시켜 과산화수소를 만들어 내는 대신 유기 과산화물을 직접 사용하여 백혈구를 측정할 수 있는 반응조건을 조사하였다(Table 3,4). 2,5 Dimethyl 2,5 dihydroxy hydroperoxide(DMDO)의 경우, 적혈구의 교차반응을 제거하기 위하여 아주 적은양의 2,5 dimethyl 2,5 dihydroxyhydroperoxide가 필요하며 (0.25mg/10dl 이하) 대부분의 경우 백혈구보다 적혈구에서 더 잘 반응하는 것을 볼 수 있다. 이때 TMB의 양이 많을수록 적혈구와의 교차반응을 억제시킬 수 있었다. 유기과산화물로 urea hydroperoxide를 사용시, 대부분 경우의 농도에서 낮은 농도의 hemoglobin과 반응하며, 그 반응정도가 백혈구와 비슷하여 특이성을 나타내지 못하였다.

4. Coating material의 효과

뇨 검사지의 안정도와 백혈구와의 반응을 촉진시키기 위하여 특정 polymer로 두 시약층을 coating처리하였다(Table 5, 6). 1차 침지용액은 포도당 500mg/dl가 포함된 citrate완충액, 2차 침지액은 coating material, 3차 침지액은 포도당 산화

Table 2. The effects of activator

SDS (g/150ml)	DS (g/150ml)	TA (g/150ml)	MQ (g/150ml)	Red blood cells		Hb(mg/dl)		Leukocyte(cells/ul)	
				1:2000	1:1 ⁴	0.03	75	50	125
1.5	-	-	-	-	-	-	+	-	+
1.5	-	10	-	-	-	-	+	-	+
1.5	10	-	-	-	-	-	++	+	++
1.5	10	10	-	-	-	-	+	+	++
1.5	10	10	0.1	+	T	-	+++	-	-
-	10	10	0.1	+	-	-	+++	-	-

-: no response, T: yellow green, ±: pale green, +: green, ++: greenish blue, +++: blue green

*DS: dimethylsulfon, TA: triethanolamineborate, MQ: 6-methoxyquinoline.

효소 500mg/dl과 TMB 1g/dl를 처리하였다.

Coating material로 gantrez, β -cyclodextrine을 사용한 뇨 검사지는 적혈구와 반응하여 위양성을 보인다. 백혈구와 반응성이 가장 적은 것은 ethyl-cellulose와 gelatin을 coating material로 처리한 경우이고 PVP, polyvinylalcohol(PVA), polyethyleneglycol (PEG)의 경우 백혈구가 쉽게 깨져 발색반응을 일으킨다. 뇨 검사지를 제조하여 1일간 보관 한 후에 반응을 관찰하였을 때 PEG, PVA, PVP의 순서로 반응성이 높았다.

제조된 뇨 검사지를 여러 온도에서 일주일간 보관하여 뇨 검사지의 안정도를 확인한 결과 60°C 와 70°C 에서 뇨 검사지를 보관한 경우에는 모든 뇨 검사지가 하루만에 변질되었으며, 50°C 에서 뇨 검사지를 보관한 경우에는 PEG

로 처리한 뇨 검사지는 2일간 안정되었으나 나머지는 모두 하루만에 변질되었고, 37°C 에서 뇨 검사지를 보관한 경우에는 PEG로 처리한 뇨 검사지는 2일간 안정되었고, PVA로 처리한 뇨 검사지는 3일간 안정되었고, 그외의 뇨 검사지는 하루만에 변질되었으며, 실온에서 보관한 뇨 검사지는 coating material을 처리한 모든 뇨 검사지는 일주일간 안정하였고, 4°C 의 건조기안에서 보관한 뇨 검사지는 coating material 처리에 상관없이 모든 뇨 검사지가 일주일간 안정하였다. 이로부터 coating 물질로 PVA를 사용할 경우 뇨 검사지의 가장 안정함을 확인할 수 있었다.

5. Potassium iodide의 효과

산화, 환원 반응을 촉진시키기 위해 potassium iodide(KI)를 첨가시켰다. KI첨가후 그 반응속도

Table 3. The optimum concentration of 2,5 dimethyl 2,5 dihydroxy hydroperoxide (DMDO) and tetramethylbenzidine

DMDO (mg/dl)	Tetramethylbenzidine (g/dl)	Red blood cells		Hemoglobin (mg/dl)		Leukocyte (cells/ul)	
		1:2000	1:10 ⁴	0-7.5	34-67	135	270
0.025		-	-	-	-	-	-
0.25		-	-	-	-	-	±
2.5	1	+	+	-	-	-	±
25		++	++	-	-	-	±
100-500		++	++	-	±	±	±
	0.2	±	-	-	-	-	±
0.25	1	±	-	-	-	+	+
	2	±	-	-	±	+	+

-: no response, T: yellow green, ±: pale green, +: green, ++: greenish blue.

Table 4. The optimum concentration of urea hydroperoxide and tetramethylbenzidine(TMB)

Urea-hydroperoxide (mg/dl)	TMB (g/dl)	Red blood cells			Hemoglobin(mg/dl)			Leukocyte (135/ul)
		1:200	1:2000	1:10000	0.03	0.75	7.5	
0		-	-	-	T	T	-	T
0.01		-	-	-	T	-	-	T
0.1	1	-	-	-	T	-	-	T
1		-	-	-	T	-	-	T
10		-	-	-	T	-	-	±
100		-	-	-	±	T	T	+
	0.2	-	-	-	+	-	-	T
100	1	-	-	-	+	-	-	+
	5	-	-	-	+	-	-	±

-: no response, T: yellow green, ±: pale green, +: green, ++: greenish blue.

는 촉진되었으나 뇨 검사지의 안정성이 나빠지는 경향이 있었으므로, KI의 양 및 포도당의 양을 재조정할 필요가 있었다(Table 7). KI를 0.001-0.01 % 사용하면 그 반응성이 촉진되었다. KI를 0.001 % 사용할 때 포도당은 100 mg/dl, 포도당 산화효소는 500-1000 mg/dl가 적정 농도였으며, 0.1 %의 KI를 사용할 때는 포도당을 가능한 한 적게 사용하여야 한다.

6. 교차반응성

Protein, nitrite, pH, hemoglobin이 백혈구 측정용 뇨 검사지에 미치는 영향을 조사하였다. Protein, nitrite, hemoglobin의 표준시약을 백혈구 측정용 뇨 검사지에 반응시켰을 때 protein 400mg/dl, nitrite 100mg/dl 이상인 용액에서 백혈구 측정용 뇨 검사지와 반응하였으며, 적혈구 1:2000 이상의 희석액, hemoglobin 75mg/dl 이상에서도 간접반응을 일으켰다.

에스터라아제를 이용한 백혈구 측정용 뇨 검사지의 경우 알칼리 뇨에서 pH에 의해 에스테르화되어 위양성을 보이는 수가 있으나 과산화 효소를 이용한 백혈구 측정용 뇨 검사지의 경우 pH의 영향은 없었다(Table 8).

임상실험

환자의 뇨 172개를 대상으로 현미경으로 백혈구의 수치를 조사한 후, 본 연구에서 개발한 뇨 검사지로 뇨중 백혈구의 수치를 판정하였다. (Table 9). 현미경으로 백혈구의 수치를 측정된 결과 high per field당 5개 미만인 환자는 152명, 5-10개인 환자는 7명, 11-15개인 환자는 5명, 20개 이상인 환자는 8명이었다. 이 뇨 시료를 본 연구에서 개발한 백혈구 측정용 뇨 검사지로 분석하였을 때 현미경상 백혈구의 수치가 5개 미만인 152명 중 149명이 음성으로 3명이 trace로 판명되었으며, 5-10개인 7명중 trace가 2명, + 이 4명, ++ 가 1명이었다. ++로 확인된 환자의 뇨를 다른 항목으로 분석한 결과 protein이 1000mg/dl 이 나왔다, 이로부터 이 환자의 경우 protein으로 인하여 과잉반응 된 것을 알 수 있었다. 11-15개인 5명 중 4명이 trace로 1명이 + 로 판명되었으며, 20개 이상인 8명 중 1명이 음성으로 7명이 양성으로 판명되었다. 음성으로 판명된 1명의 뇨를 분석한 결과 ascorbic acid가 40mg/dl 측정되었다. 이로부터 ascorbic acid의 영향을 받았음을 알

Table 5. The effect of coating materials on the response with leukocytes

Coating material	Red blood cells		Hemoglobin 0-75(mg/dl)	Leukocyte	
	1:2000	1:10 ⁴		125	500
PVP	-	-	-	+	++
PEG	-	-	-	+	++
PVA	-	-	-	+	++
Ethylcellulose	-	-	-	±	++
Gantrez	±	-	-	+	++
β-cyclodextrin	T	-	-	+	++
Gelatine	-	-	-	±	++

∴ no response, T: yellow green, ±: pale green, +: green, ++: greenish blue
PVP: polyvinylpyrrolidone, PVA: polyvinylalcohol, PEG: polyethyleneglycol.

Table 6. The effect of coating materials on the stability of strip #of days

Coating material	Temp.	70-60℃	50℃	37℃	R.T.	4℃
	-		1	1	1	7
PVP		1	1	1	*	*
PVA		1	1	3	*	*
PEG		1	2	2	*	*

* stable within 1 week, PVP: polyvinylpyrrolidone, PVA: polyvinylalcohol, PEG: polyethyleneglycol.

Table 7. The effect of potassium iodide

Glucose oxidase (mg/dl)	Glucose (mg/dl)	Potassium iodide (%)	Normal urine	Leukocyte (125/ul)	Hb 15mg/dl
		0	-	±	-
250	250	0.001	-	+	-
		0.01	-	+	-
		0.1	T	T	T
			-	±	±
250	100	0.001	-	+	T
500-1000			T	++	T
2000					
1000	600	0.1	T	++	T
	100		-	+	-

-: no response, T: yellow green, ±: pale green, +: green, ++: greenish blue.

Table 8. The study of interference materials

	Level	Negative sample	Leukocyte (125/ul)
Protein	20 mg/dl	-	-
	100 mg/dl	-	+
	400 mg/dl	+	+
Nitrite	1 mg/dl	-	+
	10 mg/dl	-	+
	100 mg/dl	T	+
pH	5	-	+
	6	-	+
	7	-	+
	8	-	+
Occult blood	0 mg/dl	-	+
	0.75 mg/dl	-	+
	7.5 mg/dl	-	+
	75 mg/dl	+	+

-: no response, T: yellow green, +: green.

수 있었다. 전반적으로 현미경으로 관찰시 백혈구가 5개 미만인 시료는 본 연구에서 개발한 백혈구 뇨 검사지로 분석하였을 때 음성으로 판명되고, 5-15개인 경우는 trace나 + 로, 20개 이상인 경우에는 + 이나 ++로 나타났다. 172명의 환자료를 시료로하여 에스테라아제를 이용한 strip A, B와 과산화 효소를 이용한 뇨 검사지의 결과를 비교하였다(Fig 1, Table 10). A사의 경우 같은 단계로(same block)에서 반응을 보인 것이 166 시료 중 158개 (95 %), 한 단계차이(one color block)에

서 반응을 보인 것이 166개 시료 중 162개 시료 (98 %)였다. B사의 경우 same block에서 반응을 보인 경우가 172 시료 중 156개 시료(91 %), one color block에서 반응을 보인 경우가 172개 시료 중 166개 시료(97 %)였다. 또한 172명의 환자료 중 적혈구수를 현미경으로 측정하여 20개 이상인 뇨를 대상으로 백혈구 측정에 미치는 영향을 조사하였으며 백혈구 측정에 큰 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다(Table 11).

Table 9. Comparison of the results obtained by our developed leukocyte urine strips(Lab) and microscopic examinations

Microscoe (cells/hpf)	Lab	N
>5	-	149
	T	3
5-10	T	2
	+	4
	++	1 (protein+++ , occult blood +)
11-15	T	4
	+	1
<20	-	1 (ascorbic acid 40 mg/dl)
	+	4
	++	3

-: no response, T: yellow green, ±: pale green, +: green, ++: greenish blue.

Table 10. Comparison of our developed leukocyte urine strip with other commercial products

Total n=173

Labs	Commercial products		N
	A Co.	B Co.	
-	-	-	152
-	-	-	1
-	-	T	1
-	-	+	1
-	++	++	1 (As 40)
T	-	-	3
T	-	-	1
T	-	+	1
T	T	+	1
+	-	T	3
+	-	-	2
+	++	+	1
++	T	+	1 (Pro+++ , Glu 0.5, OB+)
++	++	+	1
++	++	++	2

-: no response, T: yellow green, ±: pale green, +: green, ++: greenish blue, +++: blue green.
As: ascorbicacid, Pro: protein, Glu: glucose, OB: occult blood

고 찰

일반적으로 정상인의 뇨에는 백혈구가 측정되지 않고 있으나 신장이나 비뇨기, 생식기에 이상이 생기면 백혈구가 뇨와 함께 배출된다. 그러므로 백혈구 측정은 신장이나 비뇨기, 생식기의 이상 유무를 판단하는 데 중요한 지표로 사용되어

진다. 본 연구에서 개발한 뇨 검사지는 백혈구 속에 존재하는 과산화 효소와 적혈구 속에 존재하는 과산화 효소의 양적 차이를 이용하여 백혈구 속에 존재하는 양만큼의 과산화 효소에 반응하는 기질과 반응시켜 발색 반응을 일으키게 하여 백혈구 수를 간접적으로 측정할수 있도록 제조되어 있으며 이를 이용하면 특별한 측정 기술

n=163

Lab.	++		1		3
	+	2			1
	trace	3	1		
	-	154			1
		-	trace	+	++

commercial product A

n=173

Lab.	++			2	2
	+	2	3	1	
	trace	4		2	1
	-	153	1	1	1
		-	trace	+	++

commercial product B

Fig. 1. Comparison of our developed urine strips and other commercial products. The number of patients responding to the assay system was marked in the each block. (Lab.: our developed urine strip for the detection of leukocytes).

◇ Correlation of commercial product A (made by A Co.): responses within the same block was 95% and within one block was 98%.

◇ Correlation of commercial product B (made by B Co.): responses within the same block was 91% and within one block was 97%.

Table 11. The effect of red blood cells in clinical samples

Microscope (cells/hpf)		Lab	N
Red blood cells	Leukocytes		
15-20	>5	-	7
	5-10	-	1
	>5	T	1
<20	>5	-	3
	5-10	-	3
	10-15	+	1
	many	++	1

Lab: our developed urine strip for the detection of leukocyte.

과 기기가 없이도 현장에서 백혈구의 측정이 가능하다. 백혈구 세포를 얻기위해 건강한 성인에게서 anticoagulated blood 25ml를 취하여 ficoll 처리하여 백혈구층을 분리한 후 HBSS에 현탁시키고 hemocytometer로 액속에 존재하는 세포수를 측정하였다. 평균적으로 25ml blood당 총 1.36×10^6 개의 백혈구를 얻을수 있었고 문헌치는 ml당 4×10^6 개의 백혈구가 있다고 보고되고 있다¹⁹⁾. 처리액에 포도당 산화 효소와 포도당을 함께 cellulose membrane에 건조 처리하면 포도당 산화 효소와 포도당과 즉각 반응하여 과산화 수소를 발생하고 포도당은 완전 분해되어 백혈구 세포와의 효소 반응이 일어나지 못하게 되어 뇨 검사지의 안정성을 떨어뜨린다. 뇨 검사지의 안정도

와 백혈구와의 반응을 촉진시키기 위하여 특정 polymer로 두 시약층을 coating처리하였다

포도당과 포도당 산화효소를 반응시켜 과산화 수소를 만들어 내는 대신 유기 과산화물을 직접 사용하여 백혈구를 측정하는 방법도 연구하였다. 2,5 Dimethyl 2,5 dihydroxy hydroperoxide의 경우, 적혈구의 교차반응을 제거하기 위하여 아주 적은양의 2,5 dimethyl 2,5 dihydroxy hydroperoxide가 필요하며 대부분의 경우 백혈구보다 적혈구에서 더 잘 반응하는 것을 볼 수 있었다. urea hydroperoxide를 사용시, 대부분 경우에 농도에서 낮은 농도의 hemoglobin과 반응하며, 그 반응정도가 백혈구와 비슷하여 특이성을 나타내지 못하였다.

제조된 백혈구 측정용 뇨 검사지로 뇨중의 백혈구 수를 측정했을 때 120초 이내에 뇨 검사지가 연한 노란색에서 녹색으로 발색하였다.

적혈구와 헤모글로빈의 교차 반응성을 확인한 결과 혈액에서 분리된 적혈구 층을 정상뇨로 1:2000 이상 희석시, 75mg/dl 이하의 hemoglobin에서 반응하지 않는 것을 확인하였다. 문헌상 적혈구 (RBC)은 1ml 혈액당 5×10^9 으로 보고¹⁹⁾되고 있으며 현미경으로 측정한 결과 약 1.02×10^8 /ml 을 얻었다. 그러므로 전혈 1:2000희석액에는 . μ l당 약 50개의 적혈구가 있다고 볼 수 있다. 또한 protein 400mg/dl, nitrite 100mg/dl 이하에서도 간섭효과를 보이지 않았으며 pH의 영향을 받지 않았다.

본 연구를 통하여 뇨로 배출되는 백혈구를 반

정량적으로 측정할 수 있는 노 검사지가 개발되었다. 이로써 지금까지는 생산할 수 없었던 백혈구 측정용 노 검사지의 국내 제조 판매가 가능하여졌으며 타 외국 제품과의 경쟁력을 지닐 수 있게 되어 국내 시장뿐 아니라 수출에도 큰 이익을 담당할 수 있으리라 사료된다.

참 고 문 헌

1. Alfred HF, Helen MF, and Elkhart (1963): Chemical test for differentiating leucocyte from erythrocytes. *US Pat*, 3, 087, 794.
2. Berger D, Braun F, Frey G, Guthlein W, Werner W (1982): Diagnostic agent for the detection of leukocytes and chromogens useful therein. *US Pat*, 4, 331, 760.
3. Berger D, Braum F, Guthlein W, Kuhr M, Werner W (1981): Diagnostic agent for the detection of proteolytic enzymes. *US Pat*, 4, 278, 763.
4. Berger D, Frey G, Kuhr M, Werner W (1981): Diagnostic agents for the detection of leukocytes in body fluids. *US Pat*, 4, 299, 917.
5. Burstone MS (1957): The cytochemical localization of esterase. *J National Cancer Institut*, **18(2)**: 167-172.
6. Corey PF (1987): Novel compounds for detecting the presence of hydrolytic analytes in a test sample. *US Pat*, 4, 704, 460.
7. Corey PF, Skjoid AC, Pendergrase JH (1987): Composition and test device for determining the presence of leukocytes, esterase and protease in a test sample. *US Pat*, 4, 657, 855.
8. Li CY, Lam KW, and Yam LT (1973): Esterases in human leukocytes. *J Histochemistry and Cytochemistry*, **21(1)**: 1-12.
9. Meiatini F(1991) : Reagent useful for detection and quantitative determination of leucocyte in biological fluids and method of using it. *European Pat*, 0418486 A2.
10. Meiatini F(1992) : Reagent useful for detection and quantitative determination of leukocytes in biological fluids. *US Pat*, 5, 128, 265.
11. Moloney WC, Mc Pherson K and Fiegelman L (1959): Esterase activity in leukocytes demonstrated by the use of naphthol AS-D chloroacetate substrate. *Department of Clin. Pathology*, 200-207.
12. Pendergrass JH, Skjold AC, Cattell JA, and Stover LR (1986): A control system for monitoring the performance of leukocyte strip tests. *Clin Chem*, **32(7)**: 1400-1402.
13. Yam LT, Li CY, Hubert JW, Patrick WM, La JC (1974): Histochemical study of acute leukemia. *Arch Pathol*, **97**: 129-135.
14. Abbas AK, Lichtman Alt, Pober JS(1991); Cellular and molecular immunology., W.B. Saunders company, Philadelphia 9914-33

=Abstract=

**Development of Urine Strip for Detection of Leukocytes
in Urine using Peroxidase**

Eun-Young Song, Hong Soo Lee, Hee Jung Kim*, Jong Wan Kim,
In Seong Choe, Si Myung Byun*** and Tai-Wha Chung†**

*Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, P.O. Box 115, Yusong,
Taejon, Korea., Catholic University Daejon St. Mary's Hospital*, Taejon, Korea.,
Bakjae General Hospital**, Seusan, Korea., Dept. of Life Science, Korea Advanced Institute of
Science and Technology(KAIST), Kuseong Dong 373-1 Yuseong Gu, Taejon 305-701, Korea*

A new test strip to detect leukocytes using the myeloperoxidase in urine was developed. The reagent strip contains tetramethylbenzine, glucose and glucose oxidase. The detection limit was between 10 cells per 1 μ l urine(5 cells/hpf), showing greenish yellow color in the range of 10-25 cells/ μ l, green color in the range of 75-250 cells/ μ l, greenish blue color in the range of 500 cells/ μ l. The result can be obtained within two minute. The performance of the new method was evaluated by comparing the results of microscopic examination and other commercial products. Good correlations were shown between the values obtained by our urine strip and those by other commercial products with 172 urine samples. The results were proven that new methods were useful as primary screening reagents to detect leukocytes in urine.

Key Words: Leukocyte, Peroxidase, Urine strip.

[Korean J. Biomed. Lab. Sci. 2(2): 199-209, December 1996]

†Corresponding author