

랫드에서 인체 재조합 적혈구 조혈인자, rHu-EPO의 아급성정맥독성시험

김형식 · 광승준 · 천선아 · 임소영 · 박현선 · 홍채영 · 김원배* · 김병문* · 안병옥* · 이병무
성균관대학교 약학대학 독성학교실, *동아제약 (주) 연구소

Subacute Intravenous Toxicity Study of Recombinant Human Erythropoietin(rHu-EPO) in Rats

Hyung Sik Kim, Seung Jun Kwack, Sun Ah Chun, So Young Lim, Hyun Sun Park, Chae Young Hong, Won Bae Kim*, Byoung Moon Kim*, Byoung Ok Ahn*, and Byung Mu Lee

Division of Toxicology, School of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University,
Kyunggi-Do, Suwon 440-746, Korea

*Dong-A Pharm. Co., LTD., 47-5, Sanggal-Ri, Kiheung-Up, Yongin-Gun,
Kyunggi-Do, 449-900, Korea

(Received August 14, 1996)
(Accepted September 5, 1996)

ABSTRACT : This study was conducted to investigate the subacute intravenous toxicity of rHu-EPO in Sprague-Dawley rats. rHu-EPO was daily administered to male and female rats for 30 days with different dose levels(100, 500, 2,500 unit/kg). After the administration period of 30 days, 5 males and 5 females rats per each dose group were assigned for recovery period of additional 30 days. There were no clinical signs compared with control group but slight decrease in spontaneous motor activities and locomotions were observed at high dose groups of males and females. In males, feed consumption was reduced at 500 unit/kg and body weight gain was retarded. In the administration sites of tail, focal congestion was observed in a few animals treated with rHu-EPO. No deaths were occurred during the course of study. In hematological examination, a significant increase of hemoglobin and hematocrit was observed in the males and females rats receiving high dose of rHu-EPO. rHu-EPO administration for 30 days showed a marked decrease in glucose concentration. At the highest dose groups, there was a significant increase in the weights of spleens in both sexes, but this was considered to be related to its pharmacological activity. These results indicate that rHu-EPO does not induce any significant toxic effect on Sprague-Dawley rats for 30 days.

Key Words : Subacute toxicity, rHu-EPO, Sprague-Dawley rats

I. 서 론

rHu-EPO(유전자 재조합 인간 erythropoietin)은 내분비성 성장호르몬인 glycoprotein이다. Erythropoietin은 대부분 신장의 peritubular 세포에서 생합성되어 순환계로 분비되며 일부는 간과 macrophage에서도 합성된다(Erslev 등, 1980). 일반적으로 erythrocytes의 생성 및 분화에는 erythropoiesis과정에 의해서 이루어지며 조직으로 산소공급을 원활하게 유지시켜 준다. 또한 erythrocyte의 differentiation은 조직의 hypoxia 상태에 의한 빈혈시 erythropoietin에 의해 유도된다고 한다. 인간 erythropoietin은 분자량이 30.4 KD으로 erythroid

burst-forming units(BFU-E)와 erythroid colony-forming units(CFU-E)의 분비와 증식을 촉진한다(Davis 등, 1987). 현재, EPO제제는 만성신장성 부전과 관련된 빈혈 및 혈우병환자에게 매우 효과가 있는 것으로 보고되어 있으며 HIV환자에서 2차적으로 유발되는 빈혈등에도 효과가 있는 것으로 보고되어 있다(Winearls, 1988; Evans 등, 1990).

최근 유전자재조합 기술의 발달에 따라 많은 종류의 생물학적 제제가 개발되어 있으나 이들 제제가 대부분 고가의 의약품에 속하며 대부분 장기간의 치료가 요구되어 그 사용에 제약이 많다. 본 제제인 rHu-EPO는 동아제약(주)에서 유전자재조합 기술에 의해 개발한

제제로 대량생산이 가능하게 되었다.

따라서 본 제제에 대한 전임상시험의 일환으로 랫드에서 아급성 정맥독성시험을 실시하여 안전성을 평가하고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질

시험물질인 rHu-EPO(DA3285)는 동아제약(주)으로부터 공급받는 즉시 -20°C에서 보관하였으며 희석용완충액은 냉장보관하였다. 시험물질은 무색, 무취의 액체이다.

2. 군분리 및 투여용량의 설정

Sprague-Dawley 랫드(체중 160~180 g)를 해은무역(주)으로부터 구입하여, 순화기간 중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 체중을 측정하고 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용, 군분리를 실시하였다. 시험물질인 rHu-EPO의 투여용량은 2,500 U/kg을 고용량군으로 하고 공비 5로 500 U/kg 및 100 U/kg의 3 용량군과 매체대조군을 설정하여 1군당 암,수 각각 15마리(시험군 10마리와 1개월 회복군 5마리)로하여 실시하였다. 본 시험물질에 대한 투여용량은 임상용량의 2, 10, 50배 이다.

3. 시험물질의 조제 및 투여

시험물질의 조제는 매일 투여직전에 희석용 완충액으로 희석하여 조제하였다. 투여는 미정맥으로 1일 1회 30일간 투여하였으며 투여량은 투여직전 체중의 변화에 따라 산출하였다.

4. 검사항목 및 검사방법

1) 증상관찰, 체중, 사료섭취량 및 물섭취량

증상은 매일 시험물질 투여후 일정시간에 관찰하였다. 체중은 시험시작전과 시험기간동안에는 주당 3~4일마다 측정하였으며, 사료 및 물섭취량은 매일 측정하여 3일간의 평균섭취량을 합하여 마리당 평균섭취량으로 하였다.

2) 안과학적검사

모든 동물에 대하여 투여개시전과 시험물질 투여후부터는 매주 및 부검전에 김안경을 사용하여 육안적으

로 검사하였다.

3) 혈액학적검사

30일간 투여종료후에 모든 동물에 대하여 ether로 마취하여 복대동맥으로부터 채혈하여 EDTA-3K로 항응고처리를 하고 coulter counter를 이용하여 적혈구수, hemoglobin량, hematocrit치, 평균적혈구헤모글로빈양(MCH), 평균적혈구용적(MCV), 평균적혈구혈색소농도(MCHC), 백혈구수, 및 혈소판수등을 측정하였으며, 혈액응고시간을 측정하기위해 따로 sodium citrate로 항응고 처리한 혈액으로부터 프로트롬빈시간(prothrombin time)과 활성화 부분 프로트롬빈시간(activated partial prothrombin time)을 측정하였다.

4) 혈액생화학학적검사

혈액학적검사와 동시에 혈청을 분취하여 총단백, albumin, 혈당, 총콜레스테롤, triglyceride, 요소질소, creatinine, 총 bilirubin, AST, ALT, ALP, LDH, sodium, potassium 및 calcium에 대하여 측정하였다.

5) 뇨검사

투여개시전 1회와 투여종료후에 1군당 5마리를 선별하여 신선뇨를 채뇨한 후(약 4~5 ml), 색조, pH, 당, 단백질, keton 체, bilirubin등을 측정하였다.

6) 장기중량측정

투여기간종료후 모든 동물을 ether로 마취하여 방혈치사시켜 부검하고 동시에 주요장기(심장, 간장, 비장, 신장, 췌장, 위, 폐, 부신, 정소, 난소, 뇌)에 대하여 중량을 측정하였다.

7) 병리조직학적검사

투여기간종료후 에테르 마취하에서 방혈거사하고 모든동물에 대해서 부검하여 전신의 주요한 장기를 적출하여 10% 중성완충포르말린액에 고정하였다. 먼저 고용량군 및 대조군에 대해 임파절, 골, 골수, 흉선, 폐 및 기관지, 심장, 갑상선, 위, 십이지장, 소장, 대장, 간장, 췌장, 비장, 신장, 부신, 정낭, 전립선, 정소, 난소, 뇌, 하수체, 척수, 및 부속기관을 검사하고 고용량에서 유의한 변화가 인정된 장기에 대해 중, 저용량으로 확대검사하였다.

5. 통계학적검사

체중, 혈액학적검사, 혈액생화학학적검사, 뇨검사 및

조군 사이에 유의한 차이를 나타내지는 않았다. 반면에 적혈구수의 변화에 있어서는 수컷과 암컷의 모든 군에서 대조군에 비해 증가하였다. 특히 수컷의 고용량군과 중간용량군 및 암컷의 고용량군에서 유의성있는 증가를 나타내었다. 또한 헤모글로빈 수치는 수컷과 암컷의 고용량군 및 중간용량군에서 모두 대조군보다 유의성있게 증가하였으며, 헤마토크리트치는 수컷의 고용량군과 암컷의 고용량군 및 저용량군에서 유의성있게 증가하였다.

MCV치는 모든 시험물질 투여군에서 대조군과 거의 유사하였다. MCV는 적혈구수에 대한 hematocrit의 비율로 상대적으로 증가된 적혈구수와 hematocrit치의 증가에 의한 것으로 본 시험에서는 영향이 없었다. MCH는 적혈구수에 대한 hemoglobin농도로 암컷

의 고용량투여군에서 감소하였으나 유의성은 없었으며 기타 다른 투여군에서도 대조군과 유의성있는 차이를 나타내지는 않았다. 이러한 감소는 hemoglobin 농도와 적혈구수의 불균형에 의해 나타날 수 있다. MCHC는 hemoglobin과 hematocrit와의 관계로 수컷의 고용량군과 중간용량군 및 암컷의 중용량군에서 감소하는 경향을 보였으나 대조군과의 유의성있는 차이는 없었다.

30일간의 휴약기간 후에 이와같은 차이는 모두 대조군과 유사한 경향을 나타내었으나 적혈구수의 변화에 있어서 암컷의 고용량군에서는 여전히 높은 수치를 나타내었다. 이것은 일반적으로 랫드에서의 erythrocyte의 half-life가 약 62일 정도로 매우 길어 시험물질인 rHu-EPO투여에 의해 과잉 생성된 적혈구가 회복기간

Table 2. Hematological findings of male rats daily treated with rHu-EPO for 30 days and after 30 days of recovery period.

Item	Sex Dosage (U/kg)	Male							
		After treatment				After recovery			
		CON ¹⁾	2,500	500	100	CON ¹⁾	2,500	500	100
WBC	(10 ³ /mm ³)	15.84±2.86	23.52*±6.05	14.93±3.52	17.94±4.93	10.08±2.28	14.96±2.28	12.40±2.77	13.16±2.19
RBC	(10 ⁶ /mm ³)	7.40±0.35	10.46*±0.95	11.86±3.99	7.41±1.72	7.38±0.17	7.38±0.17	7.10±0.45	7.20±0.37
HGB	(g/dl)	14.92±0.50	18.07*±1.79	18.16±1.33	15.74±1.54	14.60±0.42	14.60±0.42	13.96±6.95	13.58±0.67
HCT	(%)	41.86±1.35	57.98*±5.89	54.93±5.39	42.82±10.0	41.98±1.33	41.98±1.33	43.34±3.88	40.96±1.83
MCV	(fl)	56.65±1.25	55.36±1.47	55.63±2.06	52.72±0.77	56.86±1.68	56.86±1.68	53.54±1.50	55.56±2.07
MCH	(pg)	20.2±0.58	18.24±0.57	18.43±8.61	22.97±9.02	19.78±0.68	19.78±0.68	18.38±1.42	19.14±0.74
MCHC	(g/dl)	35.67±0.66	32.98±1.30	33.19±1.10	39.77±15.6	34.78±0.51	34.78±0.51	33.40±2.06	34.46±0.32
PLT	(10 ³ /mm ³)	996.2±92.22	1340.7±214.5	1152.0±236.7	779.9±352.0	912.8±106.2	912.8±106.2	1072±126.9	1048±199.9
Lymphocyte%	(%)	82.20±2.61	83.28±6.61	71.70±17.5	72.79±7.32	83.72±2.44	83.72±2.44	83.88±1.80	85.78±1.89
PT	(Sec.)	19.09±1.00	15.10*±0.83	17.00±0.73	16.01±1.01	14.66±0.38	14.66±0.38	19.92±1.00	15.00±0.90
PTT	(Sec.)	24.79±1.06	24.77±1.06	23.61±0.81	23.41±0.81	24.25±0.58	24.45±0.58	23.86±0.89	23.78±0.67

Statistically significant from control (*P<0.05)

Each values represent mean ± S.D.

¹⁾CON: Treated with rHu-EPO dilution buffer.

Table 3. Hematological findings of female rats daily treated with rHu-EPO for 30 days and after 30 days of recovery period.

Item	Sex Dosage (U/kg)	Female							
		After treatment				After recovery			
		CON ¹⁾	2,500	500	100	CON ¹⁾	2,500	500	100
WBC	(10 ³ /mm ³)	15.95±0.05	15.54±0.40	15.69±0.07	15.74±0.10	12.92±2.21	13.68±2.20	12.22±1.43	11.36±3.14
RBC	(10 ⁶ /mm ³)	6.71±0.25	10.69*±1.43	9.12±2.48	8.13±0.77	7.18±0.38	7.60±0.52	7.25±0.57	7.21±1.44
HGB	(g/dl)	18.64±1.10	26.40**±1.57	23.61*±3.58	21.75±2.36	14.52±0.43	15.12±0.73	14.04±0.57	14.96±2.36
HCT	(%)	39.37±1.23	603.5**±9.84	51.79±14.9	51.38*±4.67	41.80±1.80	36.80±3.12	38.16±0.89	43.28±8.66
MCV	(fl)	58.66±1.85	56.23±2.78	56.66±3.01	62.84±1.29	56.94±1.74	52.32±1.23	52.61±1.30	58.06±1.70
MCH	(pg)	27.59±1.76	22.55±4.46	27.21±3.04	25.99±1.40	20.38±0.79	22.20±1.87	19.88±2.22	19.70±0.79
MCHC	(g/dl)	38.13±1.49	34.22±4.84	32.51±6.73	38.84±1.13	34.66±0.72	32.64±1.18	35.28±0.39	34.32±1.38
PLT	(10 ³ /mm ³)	804.3±119.4	1247.9±243.1	612.9±322.2	730.6±98.56	896.6±113.7	820.2±130.2	952.4±111.7	769.8±101.5
Lymphocyte%	(%)	92.08±2.30	90.53±0.70	90.51±1.30	90.13±0.69	88.06±2.54	86.12±2.88	86.38±3.29	85.42±3.75
PT	(Sec.)	19.63±0.69	14.77*±0.38	16.32±0.89	15.14±0.56	15.76±0.52	17.14±1.36	17.14±1.36	17.16±0.58
PTT	(Sec.)	24.45±0.79	24.42±1.02	23.89±0.83	24.13±0.79	23.74±0.75	25.02±1.25	25.02±1.25	24.34±0.77

Statistically significant from control (*P<0.05, **P<0.01)

Each values represent mean ± S.D.

¹⁾CON: Treated with rHu-EPO dilution buffer.

중에도 소실되지 않은상태로 남아있어 영향을 미친 것으로 판단된다.

시험물질 투여에 의한 프로트롬빈시간의 변화에 있어서는 수컷의 고용량군과 암컷의 고용량군에서 대조군에 비해 유의성있게 감소하였으며, 대체적으로 모든 시험물질투여군에서 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 활성화부분 프로트롬빈시간은 차이가 없었다 (Table 2, 3).

3. 혈액생화학적검사

혈액생화학적 소견에서 총단백질량은 대조군과 비교할 때 유의성 있는 차이를 나타내지는 않았다. 또한 albumin량에 있어서도 시험물질투여군과 대조군에서 모두 정상적인 범위내에 속하였다. AST는 수컷과 암컷의 고용량투여군에서 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. 반면에 ALT는 암컷과 수컷의 시험물질투여군

Table 4. Biochemical serum values of male daily treated with rHu-EPO for 30 days and after 30 days of recovery period.

Sex		Male							
Item	Dosage (U/kg)	After treatment				After recovery			
		CON ¹⁾	2,500	500	100	CON ¹⁾	2,500	500	100
TP	(g/dl)	6.59±0.37	6.57±0.32	6.62±0.29	6.91±0.36	6.62±0.22	6.70±0.20	7.38±0.19	6.84±0.33
ALB	(g/dl)	3.53±0.05	3.53±0.10	3.20±0.36	3.43±0.20	3.48±0.08	3.46±0.08	3.40±0.15	3.52±0.11
AST	(u/l)	92.7±15.8	128.9*±38.4	126.4±28.9	106.1±12.3	75.8±4.38	79.60±3.91	84.0±3.74	93.60±12.1
ALT	(u/l)	42.2±7.2	40.5±10.2	31.9±12.9	40.4±3.78	34.4±5.0	39.8±10.1	38.8±2.28	48.2±5.54
LDH	(u/l)	176.7±37.05	184.7±22.52	195.9±26.32	183.2±20.37	155.4±65.68	177.6±54.38	131.2±56.41	195.4±99.24
ALP	(u/l)	247.5±77.2	285.1±71.8	320.9±86.6	253.6±85.3	166.0±20.15	256.6±36.3	217.4±53.2	184.0±63.8
GLU	(me/dl)	187.2±17.1	156.3*±30.9	151.1*±24.5	168.6±11.9	184.4±9.99	190.2±17.8	197.0±12.9	195.6±8.44
CHOL	(me/dl)	44.7±5.93	43.0±5.14	47.30±14.7	49.7±6.11	46.2±9.23	47.0±6.55	45.0±4.18	46.0±4.30
TBIL	(me/dl)	0.44±0.08	0.59±0.06	0.52±0.13	0.50±0.08	0.48±0.11	0.49±0.08	0.42±0.16	0.42±0.11
BUN	(me/dl)	16.9±2.3	17.5±2.3	16.5±3.6	14.6±1.8	16.4±2.9	16.4±2.2	17.2±1.9	15.8±1.6
CREAT	(me/dl)	0.29±0.03	0.38±0.10	0.38±0.04	0.37±0.05	0.32±0.04	0.36±0.05	0.36±0.05	0.40±0.07
TG	(me/dl)	45.2±18.4	63.6*±19.2	56.2±23.7	35.0±15.9	84.6±56.9	56.4±20.7	40.2±3.42	86.4±66.3
Ca	(mmol/l)	10.76±0.27	11.0±0.3	10.81±0.75	10.99±0.43	10.36±0.23	10.6±0.2	10.56±0.05	10.30±0.41
Na	(mmol/l)	141.9±1.63	143.3±1.3	143.6±2.2	140.4±1.1	141.3±1.04	141.4±1.7	140.8±0.9	142.0±1.4
K	(mmol/l)	4.53±0.46	5.17±0.56	5.52±0.45	4.90±0.51	4.15±0.20	4.21±0.30	4.07±0.29	4.30±0.84

Statistically significant from control (*P<0.05)

Each values represent mean ± S.D.

¹⁾CON: Treated with rHu-EPO dilution buffer.

Table 5. Biochemical serum values of female daily treated with rHu-EPO for 30 days and after 30 days of recovery period.

Sex		Female							
Item	Dosage (U/kg)	After treatment				After recovery			
		CON ¹⁾	2,500	500	100	CON ¹⁾	2,500	500	100
TP	(g/dl)	7.04±0.32	6.75±0.39	6.99±0.35	6.97±0.36	7.58±0.30	7.56±0.34	7.44±0.35	7.56±0.24
ALB	(g/dl)	3.78±0.11	3.57±0.25	3.67±0.18	3.68±0.06	3.90±0.16	3.38±0.17	3.84±0.23	3.72±0.33
AST	(u/l)	94.5±11.7	163.0*±39.4	109.9±21.3	105.4±21.0	76.3±4.86	76.40±6.69	81.20±8.40	85.80±23.0
ALT	(u/l)	41.9±7.9	47.1±8.0	36.2±9.95	41.4±3.63	36.3±2.1	34.60±1.94	47.8±7.32	41.6±10.4
LDH	(u/l)	184.2±34.41	201.3±32.76	197.6±27.10	219.5±29.34	100.2±19.9	120.21±21.6	103.4±25.2	97.75±38.7
ALP	(u/l)	171.0±73.9	247.4±59.6	238.6±76.8	194.5±62.7	153.0±81.8	162.0±11.3	105.0±13.3	137.6±52.6
GLU	(me/dl)	171.4±14.2	141.3*±10.6	144.2±14.0	154.9±8.21	181.8±10.1	169.8±11.4	172.2±8.25	177.0±14.1
CHOL	(me/dl)	45.9±4.82	51.1±9.53	50.5±9.20	50.5±7.51	54.5±9.18	50.80±5.89	46.60±4.27	45.8±7.08
TBIL	(me/dl)	0.50±0.09	0.63±0.11	0.54±0.10	0.56±0.14	0.43±0.05	0.46±0.05	0.42±0.08	0.38±0.08
BUN	(me/dl)	20.2±1.9	21.5±2.7	21.1±3.2	21.3±2.1	17.8±2.2	19.4±2.07	19.8±3.56	18.4±2.07
CREAT	(me/dl)	0.37±0.05	0.44±0.05	0.41±0.03	0.40±0.00	0.40±0.00	0.41±0.00	0.42±0.08	0.42±0.04
TG	(me/dl)	75.7±38.2	78.2±27.7	81.0±54.6	51.1±14.6	62.5±40.0	60.40±7.12	35.2±15.6	73.5±24.8
Ca	(mmol/l)	11.40±0.25	10.9±0.42	11.17±0.33	11.44±0.26	10.98±0.34	11.30±0.44	10.96±0.16	10.88±0.28
Na	(mmol/l)	141.8±0.4	141.7±1.8	141.4±1.4	142.5±0.96	140.9±0.85	140.7±0.80	141.8±1.51	141.6±0.7
K	(mmol/l)	4.46±0.45	5.23±0.66	5.02±0.58	4.77±0.35	4.06±0.26	4.21±0.16	3.73±0.19	4.06±0.34

Statistically significant from control (*P<0.05)

Each values represent mean ± S.D.

¹⁾CON: Treated with rHu-EPO dilution buffer.

과 대조군 사이에 유의한 차이를 나타내지 않았다.

Glucose치는 시험물질투여군에서 대조군에 비해 모두 감소하는 경향을 나타내었다. 특히 수컷의 고용량군과 중용량군 및 암컷의 고용량투여군에서는 유의성있는 감소를 나타내었다. LDH는 시험물질 투여군의 고용량군 및 저용량군에서 1-2예가 높은 수치를 나타내었으나 전체적인 수치에 있어서는 대조군과 시험물질 투여군간의 유의성 있는 차이를 나타내지는 않았다. 이 효소는 적혈구 및 간에 있어서 중요한 역할을 하는 효소이다. Triglyceride는 수컷의 고용량군에서만 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. 총 빌리루빈은 고용량의 수컷과 암컷에서 약간 증가하는 경향을 나타냈으나 유의성은 없었다. BUN치는 고용량군에서 약간 증가하였으나 유의성은 없었다. 기타 Na, K, Ca 및 creatinine 등은 대조군과 시험물질 투여군간에 약간씩의 차이를 보였으나 모두 정상적인 범주내에 속하였으며 또한 용량에 의존하지 않았으므로 이러한 차이는 독성학적 측면에

서 중요성이 없는 것으로 간주되었다(Table 4, 5).

4. 뇨검사

뇨분석은 시험개시전, 시험물질 투여후 및 회복기간후에 각 군당 5마리를 측정하였다. 뇨의 pH는 시험물질 투여후 암컷의 대조군에서 1예가, 회복기간후에는 대조군 1예 및 중용량군에서 1예가 8.0을 나타내었다. 단백질은 수컷의 저용량군 1예와 고용량군 1예에서 75 mg/dl로 높은 수치를 나타내었으며 대조군에 비해 약간 증가하는 경향을 나타내었다. 이들 수치는 회복기간후에는 정상적인 범위내로 회복되었으나 1-2예는 여전히 25 mg/dl의 범위에 속하였다. 또한 시험물질 투여후 회복기간에 ketone체가 수컷의 저용량 및 중용량군에서 각각 1예가 15 mg/dl의 수치를 나타내었다. 이외의 다른 항목들은 모두 대조군과 유사하였다(Table 6, 7).

Table 6. Urinalysis of male rats daily treated with rHu-EPO for 30 days and after 30 days of recovery period.

Sex	Dosage(U/kg)	Male											
		Before				After treatment				After recovery			
		CON ¹⁾	100	500	2,500	CON ¹⁾	100	500	2,500	CON ¹⁾	100	500	2,500
	No. of animals	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Specific gravity	1.010	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1
	1.015	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0
	1.020	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	1.025	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1.030	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
pH	6.0	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	6.5	4	3	4	4	4	3	3	4	3	4	4	4
	7.0	1	0	0	0	1	2	1	1	1	0	0	0
	7.5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0
	8.0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Protein	-	5	4	4	5	4	3	3	2	4	4	3	4
	25 mg/dl	0	1	1	0	1	1	1	2	1	1	2	1
	50 mg/dl	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	75 mg/dl	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
Glucose	normal	4	4	5	5	4	5	5	5	4	3	4	4
	50 mg/dl	1	1	0	0	1	0	0	0	1	2	1	1
	100 mg/dl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ketone	normal	4	4	5	4	4	4	5	4	4	4	4	4
	5 mg/dl	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1
	15 mg/dl	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0
Urobilinogen	normal	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4	5	4
	1 mg/dl	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
	4 mg/dl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nitrite	-	5	4	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5
	+	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
ERY	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	50 µl	0	0	0	0	0	0	5	0	5	0	0	5
	100 µl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

¹⁾CON; Treated with rHu-EPO dilution buffer.

Table 7. Urinalysis of female rats daily treated with rHu-EPO for 30 days and after 30 days of recovery period.

Sex	Treatment Period Dosage(U/kg)	Female											
		Before				After treatment				After recovery			
		CON ¹⁾	2,500	500	100	CON ¹⁾	2,500	500	100	CON ¹⁾	2,500	500	100
	No. of animals	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Specific gravity	1.010	1	1	0	4	1	1	1	0	2	0	1	2
	1.015	2	3	3	1	4	3	4	0	2	4	2	3
	1.020	2	1	2	0	0	1	0	0	1	1	2	0
	1.025	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1.030	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pH	6.0	1	2	2	3	0	1	1	1	0	0	0	0
	6.5	4	3	2	2	4	1	3	4	3	4	2	3
	7.0	0	0	1	0	0	2	1	0	1	1	2	2
	7.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8.0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
Protein	-	4	5	4	5	4	2	3	4	4	4	4	4
	25 mg/dl	0	0	1	0	1	2	1	1	1	1	1	1
	50 mg/dl	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
	75 mg/dl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glucose	normal	5	5	4	5	5	4	5	5	5	5	5	5
	50 mg/dl	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	100 mg/dl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ketone	normal	5	5	5	5	4	5	5	5	4	5	4	5
	5 mg/dl	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0
	15 mg/dl	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Urobilinogen	normal	5	4	5	5	5	5	5	5	4	4	5	5
	1 mg/dl	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
	4 mg/dl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nitrite	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ERY	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	50 µl	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	100 µl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

¹⁾CON; Treated with rHu-EPO dilution buffer.

Table 8. Microscopic findings of male rats daily treated with rHu-EPO for 30 days and after 30 days of recovery period.

Sex	Dosage (U/kg)	Male							
		After treatment				After recovery			
		CON ¹⁾	2,500	500	100	CON ¹⁾	2,500	500	100
	No. of rats	10	10	10	10	5	5	5	5
Adrenal Gland	L.	0	0	0	0	0	0	0	0
	R.	0	0	0	0	0	0	0	0
Brain		0	0	0	0	0	0	0	0
Heart		0	0	0	0	0	0	0	0
Liver		0	0	0	0	0	0	0	0
Kidney	L.	0	0	0	0	0	0	0	0
	R.	0	0	0	0	0	0	0	0
Lung		1	1	0	0	0	0	0	0
Hemorrhage		0	0	0	0	0	0	0	0
Spleen		0	0	0	0	0	0	0	0
Testis	L.	0	0	0	0	0	0	0	0
	R.	0	0	0	0	0	0	0	0
Ovary		0	0	0	0	0	0	0	0
Thymus		0	0	0	0	0	0	0	0
Stomach		0	0	0	0	0	0	0	0

¹⁾CON; Treated with rHu-EPO dilution buffer.

Table 9. Microscopic findings of female rats daily treated with rHu-EPO for 30 days and after 30 days of recovery period.

Sex	Dosage (U/kg)	Male							
		After treatment				After recovery			
		CON ¹⁾	2,500	500	100	CON ¹⁾	2,500	500	100
	No. of rats	10	10	10	10	5	5	5	5
Adrenal Gland	L.	0	0	0	0	0	0	0	0
	R.	0	0	0	0	0	0	0	0
Brain		0	0	0	0	0	0	0	0
Heart		0	0	0	0	0	0	0	0
Liver		0	0	0	0	0	0	0	0
Kidney	L.	0	0	0	0	0	0	0	0
	R.	0	0	0	0	0	0	0	0
Lung		0	0	0	0	0	0	0	0
Hemorrhage		0	0	0	0	0	0	0	0
Spleen		0	0	0	0	0	0	0	0
Testis	L.	0	0	0	0	0	0	0	0
	R.	0	0	0	0	0	0	0	0
Ovary		0	0	0	0	0	0	0	0
Thymus		0	0	0	0	0	0	0	0
Stomach		0	0	0	0	0	0	0	0

¹⁾CON; Treated with rHu-EPO dilution buffer.

5. 육안적 소견 및 장기중량

시험물질을 30일간 투여후 관찰한 육안적 해부소견에서는 고용량의 시험물질 투여군에서 신장 및 비장에 서의 충혈이 일부 동물에서 관찰되었다. 이것은 대조군에서는 전혀 보이지 않은 소견으로 시험물질 투여에 의해 비장이 비대해진 결과에 의한 것으로 사려된다. 또한 폐의 해부소견에서는 수컷의 대조군 및 고용량군 1예에서 pneumonia소견이 관찰되었다. 이것은 시험물

질투여에 의한 소견으로는 인정되지 않았다(Table 8, 9).

장기중량의 변화에서는 시험물질 투여군에서 비장의 비대화가 용량의존적으로 증가하였다. 특히, 수컷 및 암컷의 고용량군에서는 3배이상의 증가를 나타내었다. 이들 소견은 30일간의 회복기간에서는 어느 정도 감소하였으나 고용량군에서는 여전히 비장의 비대가 관찰되었다. 기타 다른 장기에서는 대조군과 약간의 차이는 있었으나 모두 정상적인 범위내에 속하였다 (Table 10, 11).

Table 10. Organ weights of male rats daily treated with rHu-EPO for 30 days and after 30 days of recovery period.

Sex	Dosage(U/kg)	Organ	No. of rats	Male							
				After treatment				After recovery			
				CON ¹⁾	2,500	500	100	CON ¹⁾	2,500	500	100
				10	10	10	10	5	5	5	5
Adrenal Gland	R.			0.03±0.006	0.04±0.007	0.04±0.005	0.03±0.005	0.03±0.005	0.03±0.005	0.04±0.005	0.03±0.006
	L.			0.03±0.007	0.03±0.005	0.03±0.005	0.03±0.000	0.03±0.000	0.03±0.006	0.03±0.005	0.03±0.006
Kidney	R.			1.30±0.07	1.29±0.11	1.20±0.14	1.47±0.20	1.47±0.20	1.52±0.12	1.54±0.13	1.38±0.09
	L.			1.30±0.11	1.28±0.12	1.20±0.15	1.47±0.16	1.47±0.16	1.53±0.13	1.60±0.11	1.44±0.06
Brain				1.86±0.32	1.92±0.44	1.78±0.21	2.05±0.11	2.05±0.11	1.98±0.24	2.59±0.44	2.03±0.09
Heart				1.05±0.13	1.10±0.15	1.17±0.28	1.37±0.17	1.37±0.17	1.32±0.07	1.33±0.13	1.30±0.12
Liver				12.52±1.53	12.82±2.27	11.02±2.16	14.67±1.31	14.67±1.31	15.77±1.69	16.28±1.18	13.74±0.71
Lung				1.55±0.23	1.54±0.10	4.75±3.86	1.91±0.17	1.91±0.17	2.24±0.30	2.18±0.47	1.83±0.14
Spleen				0.76±0.09	2.50*±0.95	1.63**±0.55	0.72±0.09	0.72±0.09	1.47*±0.54	1.32*±0.19	1.24*±0.36
Testis	R.			1.58±0.15	1.68±0.12	1.47±0.25	1.58±0.04	1.58±0.04	1.71±0.09	1.68±0.21	1.66±0.08
	L.			1.65±0.23	1.63±0.13	1.45±0.24	1.62±0.080	1.62±0.080	1.65±0.08	1.68±0.21	1.61±0.11
Stomach				1.54±0.14	1.51±0.18	1.45±0.18	1.70±0.04	1.70±0.04	1.74±0.23	1.79±0.19	1.63±0.10
Pancreas				0.81±0.22	0.99±0.48	0.90±0.41	0.63±0.09	0.63±0.09	0.70±0.11	0.96±0.23	0.55±0.10

Statistically significant from control (*P<0.05, **P<0.01)

Each values represent mean ± S.D.

¹⁾CON: Treated with rHu-EPO dilution buffer.

Table 11. Organ weights of female rats daily treated with rHu-EPO for 30 days and after 30 days of recovery period.

Sex	Dosage(U/kg)	Organ	No. of rats	Female							
				After treatment				After recovery			
				CON ¹⁾	2,500	500	100	CON ¹⁾	2,500	500	100
				10	10	10	10	5	5	5	5
Adrenal Gland	R.			0.03±0.007	0.03±0.01	0.03±0.008	0.03±0.007	0.04±0.006	0.02±0.015	0.03±0.006	0.04±0.00
	L.			0.03±0.006	0.04±0.01	0.03±0.007	0.03±0.007	0.04±0.016	0.03±0.016	0.04±0.008	0.03±0.006
Kidney	R.			0.90±0.08	0.88±0.06	0.88±0.17	0.94±0.06	0.95±0.07	0.95±0.07	1.05±0.34	0.97±0.09
	L.			0.90±0.08	0.90±0.07	0.88±0.17	0.97±0.08	0.94±0.09	0.94±0.09	1.03±0.17	0.94±0.12
Brain				0.93±0.06	1.56±0.18	1.59±0.18	1.69±0.14	1.97±0.12	1.97±0.12	2.02±0.11	1.89±0.06
Heart				1.79±0.06	0.75±0.06	0.76±0.14	0.80±0.13	0.93±0.10	0.93±0.10	0.97±0.11	0.88±0.10
Liver				9.16±0.74	9.42±1.16	8.55±1.26	8.62±0.88	9.04±1.54	9.04±1.54	10.35±1.02	8.95±0.26
Lung				1.23±0.15	1.40±0.40	2.19±1.86	1.41±0.24	1.32±0.13	1.32±0.13	1.56±0.26	2.33±0.70
Spleen				0.59±0.08	1.80**±0.27	0.97*±0.46	0.86*±0.14	0.95*±0.06	0.95*±0.06	0.78±0.06	0.74±0.13
Testis	R.			0.05±0.005	0.06±0.01	0.05±0.008	0.05±0.01	0.06±0.01	0.06±0.01	0.06±0.11	0.06±0.006
	L.			0.05±0.007	0.05±0.008	0.05±0.009	0.05±0.01	0.06±0.02	0.06±0.02	0.06±0.02	0.05±0.007
Stomach				1.32±0.13	1.29±0.12	1.17±0.13	0.96±0.40	1.32±0.07	1.32±0.07	1.48±0.10	1.29±0.16
Pancreas				0.59±0.11	0.46±0.08	0.51±0.23	0.62±0.13	0.84±0.15	0.84±0.15	0.64±0.15	0.56±0.18

Statistically significant from control (*P<0.05, **P<0.01)

Each values represent mean ± S.D.

¹⁾CON: Treated with rHu-EPO dilution buffer.

Table 12. Histopathological findings in male rats daily treated with rHu-EPO for 30 days and after 30 days of recovery period.

Sex	Dosage (U/kg)	Male					
		After treatment			After recovery		
		CON ¹⁾	500	2,500	CON ¹⁾	500	2,500
	No. of rats	10	10	10	5	5	5
Adrenal							
Gland	L.	0	0	0	0	0	0
	R.	0	0	0	0	0	0
Brain		0	0	0	0	0	0
Heart		0	0	0	0	0	0
Liver		0	0	0	0	0	0
Kidney	L.	0	0	0	0	0	0
	R.	0	0	0	0	0	0
Interstitial Pneumonia		1	0	1	0	0	0
Calcification							
Spleen		0	0	0	0	0	0
Testis	L.	0	0	0			
	R.	0	0	0			
Thyroid gland		0	0	0	0	0	0
Inflammation & Fibrosis							
Stomach		0	0	0	0	0	0

¹⁾CON: Treated with rHu-EPO dilution buffer.**Table 13.** Histopathological findings in female rats daily treated with rHu-EPO for 30 days and after 30 days of recovery period.

Sex	Dosage (U/kg)	Female					
		After treatment			After recovery		
		CON ¹⁾	500	2,500	CON ¹⁾	500	2,500
	No. of rats	10	10	10	5	5	5
Adrenal							
Gland	L.	0	0	0	0	0	0
	R.	0	0	0	0	0	0
Brain		0	0	0	0	0	0
Heart		0	0	0	0	0	0
Liver		0	0	0	0	0	0
Kidney	L.	0	0	0	0	0	0
	R.	0	0	0	0	0	0
Interstitial Pneumonia		0	0	0	0	0	0
Calcification							
Spleen		0	0	0	0	0	0
Testis	L.	0	0	0			
	R.	0	0	0			
Thyroid gland		0	0	0	0	0	0
Inflammation & Fibrosis							
Stomach		0	0	0	0	0	0

¹⁾CON: Treated with rHu-EPO dilution buffer.

6. 병리조직학적검사

육안적 해부소견에서 이상이 있었던 결과와 유사하게 폐에서 환경적 요인에 의한 pneumonia 소견이 관찰되었으며, 기타 다른 장기에서도 대조군과 비교할 때

약물투여에 의한 직접적인 결과로 인정되는 소견은 없었다. 반면에 비장의 비대에 따른 결과와 동일하게 시험물질의 고용량투여군에서 erythroblast의 현저한 증가가 관찰되었다(Table 12, 13).

IV. 고 찰

시험물질인 rHu-EPO(DA3285)를 Sprague-Dawley 랫드에 2,500 IU/kg, 500 IU/kg 및 100 IU/kg으로 1일 1회 30일간 정맥투여하고 체중의 변화, 일반증상관찰, 뇨검사, 혈액학적검사, 혈액생화학적검사 및 병리조직학적검사를 국립보건안전연구원 고시에 따라 관찰하였다(National Institute of Safety Research, 1994).

시험물질투여에 따른 외견상의 임상소견은 발견되지 않았으며 또한 체중 및 사료섭취량, 물섭취량에 있어서도 대조군과 유의성 있는 차이를 나타내지는 않았다. 그러나 수컷의 중간용량투여군에서 대조군에 비해 점차 감소하는 경향을 나타내었다. 이 결과는 고용량투여군에서는 대조군과 유사한 경향을 나타냈으므로 시험물질 투여에 의한 영향이라기보다는 시험물질 투여시 과도한 stress가 체중증가를 억제한것이라고 사료되었다. 혈액학적소견에서 적혈구수의 증가가 시험물질투여군의 수컷과 암컷에서 모두 대조군보다 증가하였다. 또한 헤모글로빈 및 헤마토크리치의 증가도 수컷과 암컷의 고용량투여군에서 유의성 있게 증가하였다. 이것은 Mino(1990) 및 Spicer와 Wisler(1990) 등의 보고에서와 같이 rHu-EPO투여에 의해 나타나는 일반적인 약리 현상으로 평가되었다.

30일간의 휴약기간 후에 이와같은 차이는 모두 대조군과 유사한 경향을 나타내었으나 적혈구수의 변화에 있어서 암컷의 고용량군에서는 여전히 높은 수치를 나타내었다. 이것은 일반적으로 랫드에서의 erythrocyte의 half-life가 약 62일 정도로 매우 길어 시험물질인 rHu-EPO투여에 의해 과잉 생성된 적혈구가 회복기간 중에도 소실되지 않은상태로 남아있어 영향을 미친 것으로 사료된다.

혈액생화학적 소견에서 glucose치가 시험물질투여군에서 대조군에 비해 모두 감소하는 경향을 나타내었다. 특히 수컷의 고용량군과 중용량군 및 암컷의 고용량투여군에서는 유의성있는 감소를 나타내었다. 이와 같은 glucose의 감소는 적혈구의 증가에 따라 상대적으로 glucose 소비를 증가시켜 혈중 glucose치를 감소시키는 것에 기인한다고 사료되며, 또한 rHu-EPO 투여에 의해 유도된 growth hormone이 insulin growth factor의 분비를 활성화시켜 상대적으로 혈중 glucose치를

저하시키는 것으로 사료된다. 혈중 glucose의 감소는 30일간의 회복기간후에는 모두 대조군과 유의한 차이를 나타내지는 않았다.

Kim(1994)등은 시험동물인 랫드에 rHu-EPO를 4주간 투여할 때 혈중 glucose의 함량이 유의성있게 증가하였다고 보고한바 있다. 이 결과는 rHu-EPO의 부형제로 이용되는 albumin이 혈중 glucose함량을 증가시킨 것으로 평가하였으며, 용매대조로 albumin을 투여한 시험군에서도 혈중 glucose함량이 높게 나타난 결과와 일치하였다.

노분석 결과에서 뇨의 pH는 시험물질 투여후 암컷의 대조군에서 1예가, 회복기간후에는 대조군 1예 및 중용량군에서 1예가 8.0을 나타내었다. 단백질은 수컷의 저용량군 1예와 고용량군 1예에서 75 mg/dl로 높은 수치를 나타내었으며 대조군에 비해 약간 증가하는 경향을 나타내었다. 그러나 이들 수치는 시험물질 투여에 의해 용량의존적인 반응을 나타내지 않았으며 또한 회복기간후에는 모두 정상적인 범위에 속하였으므로 시험물질에 의한 영향으로 판단되지 않았다.

시험물질을 30일간 투여후 관찰한 육안적 해부소견에서는 고용량의 시험물질 투여군에서 신장 및 비장에서 충혈이 일부 동물에서 관찰되었다. 이것은 대조군에서는 전혀 보이지 않은 소견으로 시험물질 투여에 의해 비장이 비대해진 결과에 의한 것으로 사료된다. 장기중량의 변화에서는 시험물질 투여군에서 비장의 비대화가 용량의존적으로 증가하였다. 이들 소견은 30일간의 회복기간에서는 어느 정도 감소하였으나 고용량군에서는 여전히 비장의 비대가 관찰되었다. 이들 소견은 모두 시험물질 투여에 따른 erythroblast의 현저한 증가에 의한 원인으로 평가되었다.

본 실험결과 시험물질인 rHu-EPO를 정맥으로 30일간 투여할 때 고용량군 및 중간용량군에서 일반적으로 EPO의 투여에 의해 나타날 수 있는 항목들에 변화가 있었으나 30일간 회복기간후에는 대부분이 정상적인 범위로 회복되었다. 따라서 본 제제는 랫드에 대한 아 급성정맥독성시험에서 임상적으로 유의한 독성효과는

없는 것으로 판단되었다.

참고문헌

- Davis, J.M., Arakawa, R., Strickland, T.W. and Yphantis, D.A. (1987): Characterization of recombinant human erythropoietin production in Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry*, **26**, 2633-2638.
- Erslev, A.J., Caro, J., Kansu, E. and Silver, R. (1980): Renal and extrarenal erythropoietin production in anaemic rats. *Br. J. Haematol.*, **45**, 65-72.
- Evans, R.W., Rader, B., Manninen, D.L. and the Cooperative Multicenter EPO Clinical Trial Group (1990): The quality of life of hemodialysis recipients treated with recombinant human erythropoietin. *JAMA*, **263**, 825-830.
- Fisher, J.W. (1993): Recent advances in erythropoietin research. pp. 293~311. in : *Progress in Drug Research*, Vol. 41. eds. Ernst Jucker, Birkhauser Verlag Basel, Switzerland. pp 293-331.
- Kim, D.H., Lim, D.M., Cho, H.J., Park, K.H., Ha, B.J. and Kim, H.S. (1994): Subacute toxicity of recombinant human erythropoietin in rats. *Korean J. Toxicol.*, **10**, 243-254.
- Lorke, D. (1983): A new approach to practical toxicity testing. *Arch. Toxicol.*, **54**, 275-287.
- Mino, T., Ohmura, T., Hiraoka, Y., Sugino, T. and Hayashi, H. (1990) : General Pharmacological studies of erythropoietin(TYB-5220). *藥理と治療*, **18**, 953~ 971.
- National Institute of Safety Research (1994): Toxicity test guideline for safety evaluation of drugs for human use, No. 94-3 Korea.
- Spicer, E.J.F. and Wisler, J.A.(1990): Acute subcutaneous and intravenous toxicity studies in rats and monkeys with TYB-5220. *藥理と治療*, **18**(suppl. 5), 973-1034.
- Winearls, C.G. (1988): Treatment of the anemia of chronic renal failure with recombinant human erythropoietin. *Drugs*, **38**, 342-345.