

비글개에서 인체 재조합 적혈구 조혈인자, rHu-EPO의 아급성정맥독성시험

조명행 · 성하정 · 김형식¹ · 곽승준¹ · 임소영¹ · 천선아¹ · 김원배² · 김병문² · 안병옥² · 이병무^{1*}

서울대학교 수의과대학, ¹성균관대학교 약학대학, ²동아제약(주)연구소

Subacute Toxicity of Recombinant Human Erythropoietin (rHu-EPO) in Beagle Dogs

Myung Hang CHO, Ha Jung SEONG, Hyung Sik KIM¹, Seung Jun KWACK¹, So Young LIM¹,
Sun Ah CHUN¹, Won Bae KIM², Byoung Moon KIM², Byoung Ok AHN² and Byung Mu LEE^{1*}

College of Veterinary Medicine, Seoul National University,

¹Division of Toxicology, School of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University,

²Dong-A Pharm. Co., LTD.

(Received August 14, 1996; accepted October 22, 1996)

Abstract – A recombinant human erythropoietin (rHu-EPO), was administered intravenously to beagle dogs at doses of 100, 500 and 2,500IU/kg/day for 30 days. There were no significant clinical signs such as body weight, food intake, physical and ophthalmic examination, urine analysis, etc. Any toxic response was not observed except for enlarged spleen and extramedullary hematopoiesis. No observed adverse effect level (NOAEL) of rHu-EPO for 30 days was considered to be 100IU/kg/day in beagle dogs.

Keywords □ recombinant human erythropoietin, beagle dog, subacute toxicity

Erythropoietin은 신장에서 생성되는 당단백질 호르몬으로서 적혈구 전구 세포의 분열과 분화를 촉진하는 성장인자로 말기 신질환에서의 빈혈치료, 자가수혈, 약물치료나 방사선 치료에서의 회복 등 다방면의 임상적용 가능성 때문에 많은 주목을 받고 있다(Fisher, 1993).

최근 일본, 미국 등의 선진국에서는 신부전뿐만 아니라 azidothymidine이나 HIV와 관련된 빈혈 등의 임상적 치료에 recombinant human erythropoietin(rHu-EPO)이 적용되고 있다(Mino et al., 1990). 국내에서도 유전자 재조합 기술을 이용하여 erythropoietin을 대량생산할 수 있으며 이에 대한 독성시험도 보고되고 있다(Kim 등, 1994; Lim 등, 1994).

본 실험에서는 동아제약에서 분리 정제한 recombinant human erythropoietin (rHu-EPO)에 대하여 비글개에서 정맥내 4주 반복투여 아급성 독성시험을 실시하였다.

실험방법

시험물질

* To whom correspondence should be addressed.

본 실험에 사용한 시험물질인 rHu-EPO(DA3285)는 동아제약에서 제조한 인체 재조합 적혈구 생성인자(rHu-EPO)로서 24,450 IU/ml의 농도로 되어있으며 사용시 의뢰자가 제공한 매체에 희석하여 사용하였다.

실험동물

6개월령의 비글개(White Eagle Lab, 미국) 암수 각각 12마리를 1주간 기초사육한 후 각 3마리씩 저농도, 중농도 및 고농도군에 배치하였다. 실험기간중 사육실 환경조건은 실내온도 20±3℃, 상대습도 50±10%, 환기회수 10~12회/hr으로 하였으며, timer를 이용하여 12시간씩 명암을 주기적으로 교환하였고, 조도는 150~300 Lux로 하였다. 모든 동물은 철망케이지(60×40×45 cm, 명진)에서 사육하면서 애완견용 고형사료(제로니, 제일제당)와 상수도를 자유급여하였다.

시험군의 구성, 투여농도 및 용량

시험물질을 주사용증류수를 담체로하여 20%(w/v)용액으로 용시조제하여 사용하였다. 저용량군에는 100 IU/kg/day, 중용량군에는 500 IU/kg/day, 고용량군에는 2,500 IU/kg/day의 시험물질을 임상에서의 투여경로와 동일한 정맥내로 투여하기 위해 비글개의 요측피정맥을 통해 1일 1회 30일간

정맥내투여(투여속도는 10ml/분)하였다. 대조군은 고용량군과 동일한 투여용량의 주사용생리식염수를 투여하였다.

관찰항목

일반증상 관찰

투여개시전과 투여후 4시간까지는 연속하여, 그 이하는 2시간 간격으로 투여후 24시간까지 관찰하고, 투여일로부터 1일 1회, 30일간 관찰하였다. 임상증상(anorexia, salivation, diarrhea, vomiting, polyuria, anuria, fecal change)과 그 정도를 기록하였다.

체중측정

모든 동물에 대하여 투여개시일로부터 매주 2회이상 측정하였다(National Institute of Safety Research, 1994).

혈액학적 및 혈청생화학적 검사

일반 혈액학적 검사는 실험시작 전과 최종부검시에 적혈구수(RBC), 총백혈구수(WBC), 헤모글로빈(hemoglobin), 헤마토크리트(hematocrit), 평균적혈구 용적(MCV), 평균적혈구혈색소량(MCH), 평균적혈구혈색소농도(MCHC), 혈소판(platelet) 등을 검사하였다. 혈청생화학적 검사는 채취한 혈액의 일부를 실온에 30분간 방치하여 응고후 원심분리(3,000 rpm, 30 min)하여 얻은 혈청에 대해서 alanine transaminase(ALT), aspartate transaminase(AST), alkaline phosphatase(ALP), 총콜레스테롤(total cholesterol), 혈당(blood glucose), albumin, globulin, bilirubin, 총단백(total protein), 혈액요소질소(BUN), creatinine, latic dehydrogenase(LDH), γ -glutamyl transferase(GGT), creatine phosphokinase(CPK), Ca^{++} , Na^{+} 및 K^{+} 등을 각각 검사하였다.

혈액응고시간 검사

실험 시작전과 최종 부검시 전혈응고시간(coagulation time)은 Lee-White법(한홍률 등, 1990)을 이용하고, sodium citrate로 항응고처리한 혈액으로 프로트롬빈 시간(prothrombin time)과 활성화 부분 프로트롬빈 시간(activated partial prothrombin time) 등을 검사하였다.

뇨검사

모든 동물에 대하여 투여개시시와 시험종료 전일에 채뇨한 후, 그뇨에 대하여 외관과 색을 관찰한 다음, 즉시 뇨검사지를 사용하여 pH, leukocyte, nitrite, 단백(protein), ketone, urobilinogen, bilirubin, 비중, 포도당(glucose) 및 잠혈(blood)을 측정하였다.

장기 중량 및 크기 측정

전 시험동물에 대하여 간장, 비장, 췌장, 신장, 부신, 뇌하수체, 갑상선, 악하선, 자궁, 전립선, 난소, 고환, 흉선, 폐장 등의 절대중량과 체중에 대한 상대장기 중량 및 크기를 측정하였다.

병리조직검사

각 실질장기의 일부를 10% 완충 포르말린에 충분히 고정시킨 다음 통상적인 절차에 의하여 자동조직처리기로 조

직을 처리한 후 파라핀에 포매하였다. 파라핀 포매조직을 5 μ m의 두께로 절편한 다음 hematoxylin & eosin 염색을 실시하여 광학 현미경하에서 관찰하였다. 또 신장에 대해서는 Periodic acid-Schiff(PAS)염색을 하였다.

통계학적 방법

체중, 혈액학적 검사, 혈청생화학적 검사, 뇨검사 및 장기 중량 검사치에 대해서는 분산분석과 Student's t-test에 의해 동일시점에 대한 투여군과 대조군간의 유의차를 검정하였다.

실험결과

비글개에서 동아제약이 개발한 recombinant human erythropoietin(rHu-EPO)의 투여에 대한 아급성독성시험 국립보건안전연구원 고시 제 94-3호 '의약품 등의 독성시험기준'(1994년 4월 14일)에 따라 임상용량(50 IU/kg)의 50배인 2,500 IU/kg을 고용량으로 하고 공비 5로 하여 중간용량을 500 IU/kg, 저용량을 100 IU/kg로 하여 1일 1회, 30일간 정맥내로 연속투여하여 시험한 결과는 다음과 같다.

임상증상 및 폐사율

투여군 및 대조군 모두에서 시험기간중 폐사동물은 없었다. 식욕부진이 중용량군에서 1마리, 고용량군에서 2마리가 간헐적으로 관찰되었지만 그외의 시험물질 투여때문에 여겨지는 다른 임상증상은 관찰되지 않았다(Table I).

체중변화

전반적인 체중증가가 대조군과 투여군 모두에서 관찰되었다(Fig. 1). 대조군과 투여군 사이에 체중 변화에 차이는 없었다.

혈액학적 검사소견

적혈구수, 헤모글로빈 농도 및 헤마토크리트치가 대조군에 비해 투여군 모두에서 증가되었다(Table II, IV). 그러나 성별 및 투여군간의 차이는 없었다.

혈액응고시간

대조군에 비하여 투여군 모두에서 유의할만한 변화를 나

Table I. Mortality of Beagle dogs intravenously treated with rHu-EPO for 30 days.

Sex	Dosage (IU/kg)	Days					Final Mortality
		Start	Treatment period				
		7	14	21	30		
Male	2,500	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	
	500	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	
	100	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	
	CON ^a	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	
Female	2,500	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	
	500	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	
	100	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	
	CON	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	

^aCON: Treated with rHu-EPO dilution buffer.

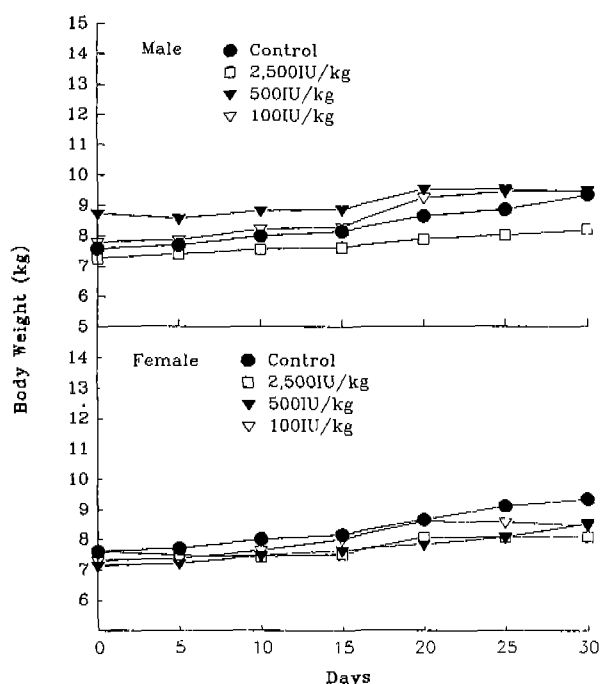


Fig. 1. Body weight changes in Beagle dogs intravenously treated with rHu-EPO for 30 days.

타내지 않았다(Table III, V).

혈청생화학 검사소견

대조군과 투여군 사이에 모든 측정항목에 있어서 차이가 없었다(Table VI, VII).

노검사 소견

대조군과 투여군 모두에서 이상을 발견할 수 없었다(Table VIII, IX).

각 장기의 체중에 대한 상대증량비

대조군과 투여군 사이에 상대증량비의 차이가 없었다(Table X, XI) 혈액학적 검사결과 적혈구수 및 그와 관련된 측정치가 rHu-EPO 투여후에 전투여군에서 용량의존적으로 증가되는 경향을 보였다.

병리조직검사 소견

특징적인 병리조직학적 변화는 비장에서만 관찰되었으며, 기타 다른 장기에서는 용매대조군과 비교해 볼 때 약물투여와 직접 관련된 특징적인 변화는 관찰할 수 없었다. 비장의 경우 대조군에 비해 중용량군 및 고용량군에 있어서 적수에 미만성으로 거핵구(megakaryocyte)와 적아구(erythroblast)가 현저하게 증가된 것을 관찰할 수 있었다. 한편 저용량군의 비장은 대조군과 유사하였다(Table XII, XIII).

Table II. Food consumption of Beagle dogs intravenously treated with rHu-EPO for 30 days.

Sex	Dosage (IU/kg)	Treatment period (days)										
		(kg/dogs)										
		1	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
Male	2,500	0.23	0.45	0.42	0.41	0.48	0.52	0.54	0.56	0.52	0.56	0.62
	500	0.21	0.42	0.45	0.47	0.51	0.52	0.53	0.58	0.57	0.62	0.61
	100	0.24	0.43	0.48	0.51	0.53	0.54	0.57	0.53	0.58	0.57	0.64
	CON ^a	0.23	0.48	0.47	0.49	0.54	0.56	0.57	0.53	0.59	0.62	0.61
Female	2,500	0.18	0.32	0.34	0.32	0.41	0.42	0.38	0.45	0.42	0.44	0.46
	500	0.16	0.35	0.32	0.37	0.34	0.45	0.44	0.42	0.45	0.48	0.47
	100	0.18	0.29	0.35	0.39	0.39	0.44	0.46	0.48	0.48	0.51	0.49
	CON	0.19	0.31	0.36	0.40	0.41	0.48	0.47	0.49	0.46	0.50	0.51

^aCON: Treated with rHu-EPO dilution buffer.

Table III. Hematological values of male Beagle dogs one day before and 30 days after intravenous treatment with rHu-EPO

Parameter/Group	CON ^a (n=3)		100 IU/kg (n=3)		500 IU/kg (n=3)		2,500 IU/kg (n=3)	
	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
WBC (10 ³ /mm ³)	19.39±5.46	13.60±2.41	15.96±0.33	14.93±2.61	15.30±0.96	10.83±1.55	13.00±2.25	16.49±2.23
RBC (10 ⁶ /mm ³)	6.54±0.26	6.75±0.52	6.73±0.10	8.14±0.68	6.18±0.46	9.34*±0.25	6.64±0.83	9.45*±0.16
Hb (g/dl)	14.7±2.0	15.0±1.2	14.9±1.1	16.9±1.0	14.4±0.8	20.5±0.4	15.1±2.1	22.5±0.3
PCV (%)	42.0±3.6	45.3±3.4	44.4±1.2	50.6±2.8	41.2±1.5	60.8±1.1	43.8±5.8	67.4±1.0
MCV (fl)	62.9±2.1	67.4±0.6	66.0±1.8	64.2±1.8	66.8±2.5	63.8±1.3	65.9±0.9	63.4±2.5
MCH (pg)	21.5±0.9	22.4±0.1	22.1±1.5	22.1±0.6	23.3±0.4	21.7±0.6	22.7±0.2	21.6±0.6
MCHC (g/dl)	34.1±0.5	33.5±0.2	33.5±1.7	33.7±0.4	34.9±0.7	33.6±0.7	34.4±0.4	33.6±0.9
PLT (10 ³ /mm ³)	318.3±4.0	280.7±11.7	265.3±8.7	225.3±28.8	257.7±53.8	199.7±34.1	318.3±88.8	528.7±64.1

Each value represents mean±S.D. ^aCON: Treated with rHu-EPO dilution buffer.

*Significantly different from control (P<0.05).

Table IV. Coagulation and prothrombin time of male Beagle dogs one day before and 30 days after intravenous treatment with rHu-EPO

Parameter/Group	CON ^a (n=3)		100 IU/kg (n=3)		500 IU/kg (n=3)		2,500 IU/kg (n=3)	
	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
Coagulation time (min.)	3.05±0.18	3.81±0.48	3.33±0.74	4.68±0.22	4.55±0.67	5.18±1.13	3.79±1.35	4.32±0.68
Prothrombin time (sec.)	6.85±0.67	7.07±0.33	5.93±0.11	7.08±0.35	6.80±0.37	7.13±0.49	5.80±0.33	6.93±0.21
Activated PTT (sec.)	23.21±2.70	22.38±2.47	17.20±0.48	23.70±0.62	19.05±0.61	23.70±1.10	22.37±1.72	22.08±1.02

Each value represents mean±S.D. ^aCON: Treated with rHu-EPO dilution buffer.

Table V. Hematological values of female Beagle dogs one day before and 30 days after intravenous treatment with rHu-EPO

Parameter/Group	CON ^a (n=3)		100 IU/kg (n=3)		500 IU/kg (n=3)		2,500 IU/kg (n=3)	
	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
WBC (10 ³ /mm ³)	18.95±6.57	13.97±2.42	14.97±1.22	12.57±3.63	16.93±2.16	12.57±3.63	18.10±6.93	15.70±3.27
RBC (10 ⁶ /mm ³)	7.19±0.67	7.04±0.38	6.73±0.53	8.22±0.38	6.58±0.40	9.54*±1.03	7.00±0.50	9.48±1.12
Hb (g/dl)	15.6±1.4	15.2±1.0	14.6±0.5	17.9±1.3	15.2±1.0	19.8±1.8	16.1±1.1	21.2±0.7
PCV (%)	45.8±4.2	45.5±3.1	43.4±1.4	53.7±3.8	44.1±2.8	60.6±6.5	45.7±4.1	63.7±2.1
MCV (fl)	63.7±2.6	64.7±3.3	65.1±2.9	66.7±1.9	67.1±0.3	68.3±1.9	65.2±1.3	68.5±2.0
MCH (pg)	21.7±1.2	22.1±0.5	22.0±1.1	22.5±0.3	23.2±0.1	22.3±0.6	23.0±0.1	21.9±0.3
MCHC (g/dl)	34.1±0.5	33.4±0.2	33.8±0.3	32.6±1.0	34.6±0.0	32.7±0.5	35.3±0.8	32.3±0.8
PLT (10 ³ /mm ³)	319.7±3.7	278.7±11.4	321.5±38.3	361.7±42.8	279.0±45.1	246.7±40.4	376.0±36.3	318.7±16.0

Each value represents mean±S.D. ^aCON: Treated with rHu-EPO dilution buffer. *Significantly different from before treatment (P<0.05).

Table VI. Coagulation and prothrombin time of female Beagle dogs one day before and 30 days after intravenous treatment with rHu-

Parameter/Group	CON ^a (n=3)		100 IU/kg (n=3)		500 IU/kg (n=3)		2,500 IU/kg (n=3)	
	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
Coagulation time (min.)	2.97±0.34	4.73±0.52	5.33±0.62	3.97±0.11	6.57±3.44	6.97±1.25	3.43±1.38	5.20±1.18
Prothrombin time (sec.)	6.85±0.15	6.85±0.12	6.20±0.08	6.87±0.21	6.03±0.12	6.77±0.17	5.83±0.05	6.33±0.60
Activated PTT (sec.)	23.30±2.32	20.51±3.15	18.90±1.14	17.30±0.41	19.37±1.72	21.25±4.45	17.90±0.33	24.95±1.84

Each value represents mean±S.D. ^aCON: Treated with rHu-EPO dilution buffer.

Table VII. Serum biochemical values of male Beagle dogs one day before and 30 days after intravenous treatment with rHu-EPO

Parameter/Group	CON ^a		Low		Medium		High	
	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
TP (g/dl)	5.95±0.40	6.41±0.12	5.80±0.27	6.70±0.47	6.10±0.06	7.38±0.37	6.01±0.25	±7.87±0.59
Albumin (g/dl)	3.82±0.31	3.87±0.30	3.70±0.10	3.70±0.22	3.64±0.0	3.73±0.40	3.79±0.28	4.09±0.31
Globulin (g/dl)	2.27±0.08	2.40±0.18	2.10±0.24	3.00±0.65	2.45±0.15	3.65±0.72	2.23±0.08	3.78±0.37
Glucose (mg/dl)	74.33±10.66	53.67±3.40	101.50±30.06	25.50*±12.50	77.33±2.49	59.33±6.65	76.00±13.37	56.7±2.49
Chol. (mg/dl)	160.00±8.04	155.17±11.55	144.50±48.20	166.20±22.40	149.67±13.20	208.33±52.09	158.67±21.23	206.67±35.52
AST (IU/l)	40.50±2.27	45.17±5.63	28.50±12.27	57.50±18.61	30.00±4.08	86.33±15.63	34.67±4.50	140.67±22.88
ALT (IU/l)	29.67±6.13	34.17±2.09	31.50±6.12	26.50±12.50	36.00±7.48	42.33±4.11	32.33±3.30	36.00±4.32
GGT (IU/l)	15.67±1.25	4.27±0.52	9.50±4.30	14.50±4.71	9.00±4.97	11.33±4.78	8.00±2.94	9.33±2.87
ALP (IU/l)	281.50±29.80	298.67±27.35	312.00±94.62	328.50±96.94	285±67±6.80	377.67±55.10	273.67±96.70	278.33±80.33
LDH (IU/l)	330.00±64.44	434.33±83.88	197.00±52.43	355.50±83.27	233.33±78.42	255.07±62.19	296.33±61.11	364.67±84.70
Bilirubin (mg/dl)	0.02±0.01	0.83±0.08	0.02±0.01	0.80±0.12	0.02±0.01	0.64±0.06	0.02±0.00	0.62±0.12
BUN (mg/dl)	5.92±0.65	15.63±0.78	14.70±2.78	6.70±0.98	15.87±1.84	19.53±2.67	14.10±2.30	16.27±5.15
Creatinine (mg/dl)	0.75±0.07	0.77±0.06	0.60±0.05	0.70±0.14	0.66±0.05	0.77±0.07	0.60±0.07	0.77±0.09
CPK (IU/l)	329.83±23.26	332.50±90.01	243.00±80.51	302.00±40.91	237.00±24.59	272.33±89.63	293.00±53.91	255.33±17.91
Ca (mg/dl)	8.53±0.23	9.38±0.09	9.60±2.14	9.30±0.86	8.77±0.69	8.50±0.73	9.10±0.57	9.03±0.87
Na (mEq/l)	150.55±10.97	150.33±11.03	146.60±3.33	154.50±8.29	145.53±0.25	151.10±0.16	147.43±0.53	158.17±3.91
K (mEq/l)	5.58±0.22	5.62±0.34	5.60±0.46	6.60±0.18	5.58±0.18	6.28±0.78	5.90±0.16	6.93±0.18

Each value represents mean±S.D. ^aCON: Treated with rHu-EPO dilution buffer. TP, Total protein; Chol., Total cholesterol; AST, Aspartate transaminase; ALT, Alanine transaminase; GGT, Gamma glutamyl transferase; ALP, Alkaline phosphatase; LDH, Lactic dehydrogenase. *Significantly different from the control group (P<0.05).

Table VIII. Serum biochemical values of female Beagle dogs one day before and 30 days after intravenous treatment with rHu-EPO

Parameter/Group	CON ^a (n=3)		100 IU/kg (n=3)		500 IU/kg (n=3)		2,500 IU/kg (n=3)	
	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
TP (g/dl)	6.20±0.23	6.50±0.18	5.80±0.23	6.70±0.53	6.10±0.33	6.72±0.47	6.31±0.24	8.24±0.59
Albumin (g/dl)	3.80±0.33	3.90±0.24	3.70±0.06	3.70±0.10	3.77±0.06	3.92±0.14	3.93±0.22	4.16±0.03
Globulin (g/dl)	2.40±0.11	2.50±0.07	2.10±0.20	3.00±0.45	2.33±0.39	2.80±0.35	2.38±0.04	4.09±0.57
Glucose (mg/dl)	73.00±15.58	55.00±7.79	101.50±4.95	25.50*±5.31	73.33±16.21	73.67±8.65	80.00±15.30	77.67±12.81
Chol. (mg/dl)	163.00±11.22	157.50±20.21	144.50±13.08	166.20±1.66	169.67±39.19	166.33±11.15	154.67±21.82	200.00±14.17
AST (IU/l)	41.00±2.16	42.50±9.33	28.50±1.87	57.50±4.14	39.67±5.73	63.67±17.44	42.33±5.25	73.67±11.67
ALT (IU/l)	30.00±3.56	33.50±6.94	28.50±4.71	26.50±1.78	37.67±6.65	31.67±5.31	43.33±10.08	36.00±17.68
GGT (IU/l)	14.00±1.4	4.00±0.24	9.50±3.40	12.50±2.68	8.00±2.94	10.00±4.24	8.67±2.36	11.00±2.16
ALP (IU/l)	281.50±11.11	299.00±6.48	312.00±55.12	328.50±28.31	362.33±66.59	364.67±109.42	230.00±55.90	275.00±37.66
LDH (IU/l)	350.00±124.16	416.00±142.13	197.00±57.59	355.00±42.36	349.33±80.08	393.33±30.27	316.33±82.66	292.00±40.41
Bilirubin (mg/dl)	0.00±0.00	0.70±0.07	0.01±0.01	0.80±0.03	0.02±0.00	0.73±0.01	0.03±0.00	0.58±0.08
BUN (mg/dl)	6.40±0.35	16.60±9.00	14.70±0.75	6.70±2.05	14.30±1.56	24.17±4.14	16.33±2.87	13.83±2.95
Creatinine (mg/dl)	0.70±0.10	0.80±0.07	0.60±0.04	0.70±0.06	0.60±0.07	0.75±0.09	0.66±0.02	0.76±0.04
CPK (IU/l)	344.50±74.39	351.50±72.14	243.00±30.23	302.00±44.64	362.33±132.17	610.00±81.30	358.67±62.70	240.00±98.80
Ca (mg/dl)	8.80±0.08	9.50±0.14	9.60±0.37	9.30±0.41	9.03±0.98	9.77±0.49	8.30±0.22	8.40±0.33
Na (mEq/l)	147.40±1.19	15.00±2.20	146.60±1.47	154.50±12.80	146.77±0.81	150.60±1.19	147.17±1.02	153.10±2.01
K (mEq/l)	5.30±0.17	5.80±0.40	5.60±0.12	6.60±0.16	5.76±0.30	6.18±0.73	5.50±0.36	6.47±0.34

Each value represents mean±S.D. ^aCON: Treated with rHu-EPO dilution buffer. TP, Total protein; Chol., Total cholesterol; AST, Aspartate transaminase; ALT, Alanine transaminase; GGT, Gamma glutamyl tranferase; ALP, Alkaline phosphatase; LDH, Lactic dehydrogenase. *Significantly different from the control group (P<0.05).

Table IX. Urinalysis of male Beagle dogs intravenously treated with rHu-EPO for 30 days

Parameter/Group	CON ^a (n=3)	100 IU/kg (n=3)	500 IU/kg (n=3)	2,500 IU/kg (n=3)
Leukocyte	-	-	-	-
Nitrite	-	-	+	+
pH	7	5	7	7
Protein (mg/dl)	6	6	5	8
Glucose (mg/dl)	30	30	30	30
Ketone body	-	-	30	30
Urobilinogen (mg/dl)	-	-	-	1
Bilirubin	-	-	-	-
Erythrocyte (Ery/μg)	5	-	5	5
Gravity	1.020	1.025	1.050	1.050
	1.020	1.035	1.035	1.020
	1.035	1.030	1.040	1.025

^aCON: Treated with rHu-EPO dilution buffer.

Table X. Urinalysis of female Beagle dogs intravenously treated with rHu-EPO for 30 days

Parameter/Group	CON ^a (n=3)	100 IU/kg (n=3)	500 IU/kg (n=3)	2,500 IU/kg (n=3)
Leukocyte	-	+	-	+
Nitrite	-	-	-	+
pH	7	6	5	5
Protein (mg/dl)	6	6	7	5
Glucose (mg/dl)	30	30	-	30
Ketone body	-	-	100	100
Urobilinogen (mg/dl)	-	-	-	-
Bilirubin	-	-	-	-
Erythrocyte (Ery/μl)	5	-	-	-
Gravity	5	5	50	5
	1.025	1.025	1.020	1.050
	1.020	1.030	1.020	1.030
	1.030	1.030	1.035	1.030

^aCON: Treated with rHu-EPO dilution buffer.

Table XI. Relative organ weights of male Beagle dogs intravenously treated with rHu-EPO for 30 days (Unit: g%)

Parameter/Group	CON ^a (n=3)	100 IU/kg (n=3)	500 IU/kg (n=3)	2,500 IU/kg (n=3)
Weight (kg)	9.33±0.28	9.37±1.08	9.46±0.09	8.20±0.28
Liver	3.26±0.24	4.27±0.31	3.56±0.12	3.31±0.37
Spleen	0.25±0.02	0.57*±0.06	0.48*±0.02	0.63*±0.14
Pancreas	0.35±0.01	0.35±0.09	0.25±0.02	0.38±0.14
Kidney	0.58±0.01	0.73±0.06	0.49±0.01	0.47±0.07
Adrenal gland (mg%)	14.54±2.23	14.11±4.25	13.03±0.95	13.24±0.82
Ovary	0.12±0.00	0.26±0.01	0.20±0.01	0.16±0.00
Uterus	0.10±0.01	0.11±0.16	0.04±0.22	0.03±0.03
Lung	0.60±0.19	1.05±0.16	0.87±0.22	0.68±0.03
Heart	0.93±0.03	1.21±0.07	0.69±0.11	0.77±0.12
Thymus	0.10±0.02	0.11±0.04	0.05±0.01	0.09±0.01
Thyroid gland (mg%)	12.84±1.46	10.57±2.85	10.17±0.47	16.52±4.80
Submandibular	0.16±0.01	0.18±0.04	0.11±0.04	0.10±0.05
Pituitary gland (mg%)	4.45±0.06	6.30±0.18	6.00±0.50	5.60±0.60

Each value represents mean ± S.D. *Significantly different from control (P<0.05). ^aCON: Treated with rHu-EPO dilution buffer.

Table XII. Relative organ weights of female Beagle dogs intravenously treated with rHu-EPO for 30 days (Unit: g%)

Parameter/Group	CON ^a (n=3)	100 IU/kg (n=3)	500 IU/kg (n=3)	2,500 IU/kg (n=3)
Weight (kg)	9.35±0.28	8.67±0.36	8.53±2.42	8.45±0.49
Liver	2.13±0.19	2.49±0.24	2.37±0.20	2.42±0.14
Spleen	0.22±0.03	0.25±0.03	0.25±0.03	0.55*±0.08
Pancreas	0.35±0.04	0.35±0.06	0.25±0.02	0.38±0.14
Kidney	0.43±0.01	0.48±0.01	0.49±0.03	0.53±0.01
Adrenal gland (mg%)	10.72±0.11	12.47±2.19	18.97±0.90	13.54±0.08
Ovary	0.09±0.01	0.11±0.01	0.04±0.01	0.03±0.04
Uterus	0.18±0.04	0.11±0.08	0.16±0.02	0.16±0.03
Lung	1.04±0.14	1.01±0.06	0.89±0.06	1.09±0.13
Heart	0.78±0.05	0.81±0.03	0.94±0.10	0.82±0.05
Thymus	0.92±0.30	1.41±0.27	0.92±0.12	0.76±0.02
Thyroid gland (mg%)	8.11±5.81	1.72±0.09	1.46±0.04	13.39±0.02
Submandibular	0.16±0.01	0.18±0.03	0.11±0.04	0.10±0.05

Each value represents mean ± S.D. *Significantly different from control (P<0.05). ^aCON: Treated with rHu-EPO dilution buffer.

Table XIII. Histopathological findings in Beagle dogs intravenously treated with rHu-EPO for 30 days

Organ and findings (N=3 ^b)	Dose (IU/kg)				Sex			
	CON ^a	100	500	2,500	CON ^a	100	500	2,500
Spleen								
hemosiderosis	0	1	1	2	0	1	1	1
extramedullary hematopoiesis	0	2	3	3	0	2	3	3
megakaryocyte	0	0	3	3	0	1	3	3
Heart								
focal fibrosis	0	0	0	0	0	0	0	0
thrombosis	0	0	0	0	0	0	0	0
Lungs								
focal pneumonia	0	0	0	0	0	0	0	0
hemorrhage	0	0	1	1	0	0	1	1
Liver								
microgranular	0	0	0	0	0	0	0	0
focal necrosis	0	0	0	0	0	0	0	0
congestion	0	0	0	1	0	0	0	1
Kidneys								
focal tubular regeneration	0	0	0	0	0	0	0	0
cell infiltration	0	0	0	0	0	0	0	0
thrombosis	0	0	1	1	0	0	0	2

^aCON: Treated with rHu-EPO dilution buffer. ^bNo. of animals.

고 찰

인체 재조합 적혈구 조혈인자(rHu-EPO)의 비글개에서의 정맥내 투여에 대한 아급성독성시험을 실시한 결과, 최고 2,500 IU/kg/day까지 30일간 연속투여하였을 때, 시험기간 중 사망동물은 없었으며 체중변화, 음수 및 사료섭취량 변화를 비롯한 특이한 임상증상을 나타내지 않았다. 혈액학 및 혈청생화학 검사결과 rHu-EPO 투여군에서 특이할 만한 변화는 없었으며, 혈액응고시간, 뇨검사 등에서도 대조군에 비하여 유의적인 변화를 관찰할 수 없었다. 또한 비장의 병리조직학적 검사에서 500 IU/kg/day이상군에서 현저한 혈구증식상이 관찰되었으며 다른 주요장기에서는 어떠한 병리적인 변화를 관찰할 수 없었다. 병리조직검사결과 중용량군과 고용량군의 비장에서 거핵구와 적아구가 중심이 되어 골수의 조혈이 현저하게 나타났다. 그러므로 혈액학적 검사결과를 참조하면 비장의 현저한 골수의 조혈은 rHu-EPO의 약리작용일 것으로 사료된다. erythropoietin 투여와 관련하여 나타난 독성학적 현상중의 하나로 혈전의 발생을 보고하였다(Kim 등, 1994; Sevitt, 1973). Sevitt(1973)는 중용량과 고용량(>400 IU/kg) 투여시에 과도한 적혈구 생성에 의하여 혈액의 점도가 상승하고 그에 따라 정맥혈류 속도가 지연되어 혈전이 심장과 신장의 미세혈관에서 생성된다고 하였다(Sevitt, 1973). 그러나 본 시험에서는 매일의 약제투여시 투여개시 2주후부터 중용량 및 고용량군에서 혈액의 점도증가를 감지할 수 있었지만 투여종료 후 병리조직학적 소견에서 주요 장기의 미세혈관내 혈전형성은 관찰할 수 없었다.

Yajima 등(1993)은 erythropoietin이 세망적혈구와 소핵다염성 적혈구를 증가시키는 유전독성을 유발할 수 있다고 하였다(Yajima 등, 1993a; Yajima 등, 1993b). 그러나 본 실험의 아급성독성시험에서 적혈구수의 증가는 있었지만 평균적혈구용적의 변화는 관찰할 수 없었다.

Erythropoietin은 조혈기능에 영향을 주는 여러 요인들 중의 하나로 말기 신질환에서의 빈혈치료, 자기수혈, 약물치료나 방사선 치료에서의 회복 등 다방면에서 조혈장애의 치료제로 주목되고 있고, 이 erythropoietin은 주로 후기적아구계 전구세포의 분화단계의 세포에 작용, 그 분화증식을 촉진시켜, 적혈구의 생산을 조절하는 내인성 호르몬으로 신장의 renal peritubular cell에서 생산된다고 생각되는 만큼 그 생산의 저하는 만성 신부전에 합병하는 빈혈의 주

원인이라 생각되고 있으며 심각한 조혈장애를 유발한다. 따라서 erythropoietin의 임상적 적용에 관해 많은 관심이 모아져 왔는데 최근에는 신부전 뿐아니라 다른 질환과 관련된 빈혈 등의 임상적 치료에 recombinant erythropoietin의 적용이 다각도로 주목되고 있다(Mino 등., 1990; Okumura 등, 1990).

이상의 결과로 보아 비글개에서 rHu-EPO의 30일간 정맥내 연속투여는 최고 100 IU/kg까지 독성을 나타내지 않는 것으로 사료된다. 따라서 유전자 재조합 방법에 의해 생산된 본 시험물질인 rHu-EPO는 매우 안전한 물질로 평가된다.

참고문헌

- 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.
- 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.
- Lim, D. M., Jeong, S. M., Cho, H. J., Kim, D. H., Park, K. H., Oh, M. S. and Kim, H. S. (1994). Acute toxicity of recombinant human erythropoietin. *Korean J. Toxicol.* **10**, 237-241.
- 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.
- Okumura, K., Aoki, S., Sugino, T., Ono, T., Nagano, N. and Iba, Y. (1990). Metabolic fate of erythropoietin (TYB-5220). *藥理と治療*, **18**, 2009~2019.
- Sevitt, S. (1973). Vascularization of deep-vein thrombi. *J. Path.* **111**, 1~11.
- Yajima, N., Kurata, Y., Imai, E., Sawai, T. and Takeshita, Y. (1993a). Gonotoxicity of genetic recombinant human erythropoietin in a novel test system. *Mutagenesis* **8**, 231~ 236.
- Yajima, N., Kurata, Y., Sawai, T. and Takeshita, Y. (1993b). Induction of micronucleated erythrocytes by recombinant human erythropoietin. *Mutagenesis* **8**, 221~229.
- 한홍률 외 2명 (1990). *수의임상병리*. p 130. 2판, 기전연구소, 서울.