

## 천연형 인 적혈구 조혈인자의 변이원성시험

강경구\* · 조 현 · 김동환 · 백남기 · 김원배  
동아제약(주)연구소

### Mutagenicity Study of Recombinant Human Erythropoietin(rhEPO)

Kyung Koo KANG\*, Hyeon CHO, Dong Hwan KIM, Nam Gi BAIK, Won Bae KIM

47-5, Sanggal-ri, Kiheung-up, Youngin-si, Kyunggi-do, Korea 449-900  
Research Laboratories, Dong-A Pharmaceutical Co. Ltd.

(Received October 14, 1997; accepted December 29, 1997)

**Abstract** – Mutagenicity of recombinant human erythropoietin (rhEPO) was examined in the reverse mutation test on bacteria, in the chromosomal aberration test on cultured mammalian cells and in the micronucleus test on mice. The reverse mutation test was performed by a plate incorporation method with or without a metabolic activation system (S9 Mix) using *Salmonella typhimurium* strain TA100, TA1535, TA98 and TA 1537. The rhEPO did not significantly increase revertant colonies in any of the test strains under any conditions at dose levels ranging from 1000 IU/ml to 62.5 IU/plate, compared with the vehicle control. In the chromosomal aberration test using cultured Chinese Hamster Lung (CHL) cells, the number of aberrant cells was not increased in the presence or absence of S9 Mix at concentrations of 1000 IU/ml to 250 IU/ml, compared with the vehicle control. In the micronucleus test, male ICR mice were given rhEPO intraperitoneally at a dose level of 25000, 12500 and 6250 IU/kg. The incidence of bone marrow micronucleated polychromatic erythrocytes was not different from that of the vehicle control. From these results, rhEPO is considered to be non-mutagenic under the present test conditions.

**Keywords** □ rhEPO, Mutagenicity

Erythropoietin(EPO)은 분자량 약 30,000 dalton의 당단백질(glycoprotein)로서 90% 이상은 신장의 세뇨관 주변세포(peritubular cell)나 상피세포에서 생성되고 일부는 간장에서 생성된다(Anagnostou, 1985). 적혈구 생성이 호르몬에 의해 조절된다는 것은 1900년대 초에 알려졌다, EPO는 1977년 Miyake 등(1977)에 의해 처음으로 aplastic anemia 환자의 뇨에서 순수 분리되었다. 이후, 사람 EPO 유전자가 태아 간세포에서 cloning 되었으며 아미노산 배열의 확인(Recny 등, 1987)과 chinese hamster ovary(CHO) 세포 등에서 발현시킨 재조합 인 적혈구 조혈인자(recombinant human erythropoietin, rhEPO)의 대량생산은 근래에 이루어졌다(Jacobs 등, 1985; Lin 등, 1985; Goto 등, 1988). 이와 같은 rhEPO는 사람 뇨 유래의 천연형 EPO(urinary human erythropoietin, uhEPO)와 동일한 생리화학적, 면역학적, 약리학적 성질을 가지며(Egrie 등, 1986; Davis 등, 1987), 골

수에서 적혈구 전구세포의 분화, 증식 및 성숙을 촉진한다(Joseph과 John, 1989; Ridley 등, 1994).

EPO는 실혈이나 철분과 엽산의 결핍 혹은 성숙적혈구의 수명감소 등에 의한 빈혈과 만성 신부전에 의해 나타나는 빈혈의 치료제로 1987년 미국 FDA에서 승인되었으며, 최근에는 감염 및 갑상선 호르몬 결핍, 류마티스성 관절염과 같은 만성질환, 악성종양, 적혈구 미성숙, 자가 수혈, AIDS 또는 종양의 치료제로 쓰이는 세포독성 물질 등에 의한 빈혈과 겸상 적혈구성 빈혈(sickle cell anemia)과 같은 다른 원인에 의한 빈혈에 대한 치료효과도 보고되고 있다(Merrill, 1979; Vreugdenhil 등, 1993).

동아제약(주) 연구소에서는 유전자재조합기술을 이용하여 BHK(baby hamster kidney) 세포에서 인 적혈구 조혈인자를 생산하였으며 만성신부전 및 기타 다른 원인에 의한 빈혈의 치료제로 개발예정이다. 본 연구에서는 rhEPO의 안전성 연구의 일환으로 세균을 이용한 복귀돌연변이시험과 포유류의 배양세포를 이용한 염색체이상시험 및 설치류

\* To whom correspondence should be addressed.

를 이용한 소핵시험을 실시하였다.

## 실험방법

### 시험물질

시험물질인 EPO(Lot No. B-003)는 무색의 투명한 액체로 동아제약(주) 연구소 생물공학연구실에서 동결상태로 공급받아 사용하였으며, SDS-PAGE분석에서 분자량은 약 36000 dalton이며 순도는 역상 HPLC법에 의한 분석으로 99% 이상이었으며 역기는 효소면역측정법으로 측정시 12,000 IU/ml이었다. 시험물질은 냉동보관 하였으며 사용시 용해하여 시험물질 전용매체에 희석하여 사용하였다.

### 대조물질

양성대조물질로 복귀돌연변이시험에서는 sodium azide(Sigma), 2-aminofluorene(Sigma), 9-aminoacridine(Sigma), 2-aminoanthracene(Sigma), 2-nitrofluorene(Sigma)을, 염색체 이상시험에서는 mitomycin C(MMC, Sigma), benzo[ $\alpha$ ]pyrene(Sigma)을 각각 증류수나 DMSO에 용해하여 사용하였고, 소핵시험에서는 MMC(Sigma)를 증류수에 용해하여 사용하였다. 음성대조물질로는 시험물질 전용매체를 사용하였다.

### 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

#### 시험균주

시험에는 histidine 영양 요구성의 *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 등 4균주를 이용하였다. 각 시험균주는 한국화학연구소에서 분양받아 -70°C에 동결보존한 것으로 histidine 영양 요구성, 자외선감수성, 막변화 특성(rfa), 약제내성인자(R-factor plasmid)의 유무, 자연복귀변이의 정도 등의 형질을 확인한 다음 시험에 사용하였다.

#### 배지

시험균주의 전배양은 2.5% nutrient broth No.2(Oxoid)를 이용하였다. 최소 glucose 한천평판배지(minimal glucose agar plate)는 1.5% bacto-agar(Difco)에 Vogel-Bonner medium E(50X)와 glucose(40%)를 각각 2% 및 5%되게 첨가한 것으로 plate당 20 ml씩 분주하여 사용하였다. Top agar는 bacto-agar 0.6%, NaCl 0.5% 용액에 0.5 mM L-histidine · HCl/0.5 mM D-biotin 수용액을 10:1의 비율(v/v)로 혼합하여 사용하였다. 그외 본 시험에서 사용한 배지는 Maron과 Ames(1983)의 방법에 준하여 제조하여 사용하였다.

#### S9 mix

S9 분획은 8-10주령의 수컷 Sprague-Dawley 랫드에서 Aroclor 1254를 효소 유도제로 사용하여 Ames 등(1975)의 방법에 따라 조제하여 시판하는 rat liver S-9 products (Organon Teknika corporation)를 구입하여 사용하였으며, S9용 cofactor는 시판 cofactor(Oriental 酵母工業株式會社)

를 구입하여 사용하였다. S9 mix는 cofactor 1 vial을 9 ml의 증류수에 용해한 후 S9 분획 1 ml을 사용직전에 혼합하여 조제하였다.

#### 시험균액

시험균액은 해동한 동결보존균액 0.1 ml을 취해 25 ml의 Nutrient broth 배지에 접종하여 차광된 배양기 내에서 37°C, 120 rpm의 조건으로 약 16시간 진탕배양한 후 시험에 사용하였다.

#### 초기독성시험(용량설정시험)

본 시험의 용량설정을 위하여 예비 용량설정시험을 *Sal. typhimurium* TA 100을 이용하여 실시하였다. EPO는 1000 IU/plate를 최고용량으로 하고 이하 공비 2로 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125 IU/plate까지 8개 용량으로 시험을 실시한 결과, 대사활성계의 유무에 관계없이 모든 용량군에서 대조군과 비교하여 복귀변이 colony수의 증가가 인정되지 않았다. 따라서, 본시험에서는 1000 IU/plate부터 공비 2로 62.5 IU/plate 까지 5개 용량을 설정하였다.

#### 시험방법

시험은 식품의약품안전본부의 “의약품등의 독성시험기준”에 준하여 대사활성계를 적용한 경우와 대사활성계를 적용하지 않은 2가지 경우에 대하여 평판법(direct incorporation method)으로 실시하였다. 시험물질용액 0.1 ml, S9 mix(비대사활성계의 경우 D.W.) 0.5 ml, 균 배양액 0.1 ml 와 top agar 2 ml를 45°C로 예열한 멸균 tube에 혼합하고 즉시 vortex mix로 2-3초간 진탕한 후 minimal glucose agar plate에 증충하였다. 음성대조군은 전용매체 0.1ml를, 양성대조군은 각 균주의 양성대조물질 용액 0.1 ml를 시험물질 대신 가하여 동일한 방법으로 실시하였다. 증충한 top agar 가 굳은 후 37°C에서 48시간 배양한 다음 출현한 복귀변이 colony수를 계측하고 생육저해 및 시험물질의 침전여부 등을 관찰하였다. 시험물질 각 용량군당 3개의 plate를 이용하였다. 복귀변이 colony 수의 평균치가 용매대조군에 비하여 용량의존적으로 증가하고 그 수가 음성대조군의 2배 이상 이거나 통계학적 유의성을 나타낼때 변이원성이 있는 것으로 판정하였다.

#### 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

##### 세포 및 배지

시험에는 Chinese hamster lung(CHL, JCRB 0030) 세포를 이용하였다. 세포의 배양은 Eagle's MEM(Gibco) 배지에 FBS(Fetal bovine serum, Gibco)를 10%(v/v)되게 첨가한 배지를 사용하여, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 포화수증기 상태의 항온배양기에서 배양하였다.

##### S9 mix

S9 분획은 8-10주령의 수컷 Sprague-Dawley 랫드에서 Aroclor 1254를 효소 유도제로 사용하여 Ames 등(1975)의 방법에 따라 조제하여 시판하는 rat liver S-9 products

(Organon Teknika corporation)를 구입하여 사용하였으며, S9용 cofactor는 시판 cofactor(Oriental 酵母工業株式會社)를 구입하여 사용하였다. S9 mix는 cofactor 1 vial를 7 ml의 증류수에 용해한 후 S9 분획 3 ml을 사용직전에 혼합하여 조제하였다.

#### 세포독성시험(용량설정시험)

본시험의 용량설정을 위한 예비시험으로 세포독성시험을 실시하였다. 예비시험에서 EPO는 1000 IU/ml를 최고농도로 하고 이하 공비 2로 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125 IU/ml의 8개 용량으로 24시간 처리 직접법으로 실시하였다. 직경 35 mm petri-dish(배양액 2 ml)에  $1.2 \times 10^4$  cell/ml의 세포를 파종하여 3일간 배양한 후 각 용량의 시험물질로 처리하여 1일간 배양하였다. 배양 종료후, 0.25% Trypsin-EDTA 용액을 처리하여 세포를 분산 수거한 다음 trypan blue로 염색하고 hemocytometer를 이용하여 생세포수를 계수하여 시험물질의 세포에 대한 독성발현여부를 관찰하였다. 시험결과 시험가능한 최고농도인 1000 IU/ml 이하의 모든 용량군에서 대조군과 비교하여 세포증식억제가 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험에서는 1000 IU/ml을 최고농도로 하고 이하 공비 2로 500, 250 IU/ml까지 3개 용량군으로 설정하였다.

#### 시험방법

시험은 식품의약품안전본부의 “의약품등의 독성시험기준”에 준하여 대사활성제를 적용하지 않은 직접법과 대사활성제를 적용한 대사활성화법 2가지로 실시하였다.

##### (1)직접법

직경 60 mm의 petri-dish(배양액 5 ml)에  $1.0 \times 10^5$ 개의 세포를 파종하고 2일간 배양하여 단층세포(monolayer cell)를 만든 후, 각 용량군의 시험물질로 처리하여 24시간 배양한 다음 세포를 수거하여 염색체 표본을 제작하였다. 이때 세포 수거 2시간전에 colcemid를 최종농도 0.2  $\mu\text{g/ml}$ 이 되게 첨가하여 세포분열을 정지시켰다. 음성대조군에는 전용매체를, 양성대조군에는 MMC 0.05  $\mu\text{g/ml}$ 을 시험물질 대신 가하여 동일한 방법으로 시험하였다.

##### (2)대사활성화법

직접법과 동일하게 배양한 단층세포에 S9 mix 1 ml과 각 용량군의 시험물질이 혼합된 배양액 4 ml로 처리하여 6시간 배양한 다음, 정상 배지로 교환하여 18시간 배양한 후 24시간째 세포를 수거, 염색체 표본을 제작하였다. 세포수거 2시간전에 직접법에서와 동일하게 colcemid를 처리하였다. 음성대조군에는 전용매체를, 양성대조군에는 Benzo[ $\alpha$ ]pyrene 20  $\mu\text{g/ml}$ 을 시험물질 대신 가하여 동일한 방법으로 시험하였다.

##### (3)염색체표본의 제작 및 표본의 관찰

시험물질 처리가 종료된 후 0.25% Trypsin-EDTA 용액을 처리하여 세포를 분산 수거한 다음 원심분리(1000 rpm, 5

min.)하여 세포를 모았다. 이 세포에 저장액인 0.075M KCl을 가하여 37°C에서 15분간 반응시킨 후 methanol:acetic acid(3:1, v/v) 용액으로 고정시켜 원심분리 하였다. 수거된 세포에 다시 냉각 고정액을 가하여 원심분리하는 동일한 조작을 3회 반복하여 세포를 완전히 고정시키고 최종적으로 적당한 밀도의 세포부유액을 만든 다음, 고정된 세포부유액을 slide glass 위에 1방울씩 떨어뜨려 상온에서 완전히 건조시켰다. 건조된 슬라이드는 5% Giemsa액에서 20분간 염색하여 수세 후 광학현미경( $\times 1000$ )으로 관찰하였다. 표본의 관찰은 슬라이드당 100개의 분열중기상 염색체에 대하여 염색체 및 염색분체의 구조이상(Structural aberrations: Chromatid gap, Chromatid break, Chromatid exchange, Chromosome gap, Chromosome break, Chromosome exchange)과 수적이상(Numerical aberrations: Polyploid, Endoreduplication)으로 나누어 관찰하였고, 이상의 종류를 1개 이상 가진 세포를 양성세포 1개로 계수하여 그 종류와 비율을 구하였다.

#### (4)결과판정

CHL 세포의 이상세포의 출현빈도는 통상 5% 미만으로, 이상세포의 출현빈도가 5% 미만일 경우는 음성, 5-10%일 경우는 의양성, 10% 이상일 경우는 양성으로 판정하였으며, 이와 같은 양성반응이 하나 이상의 용량단계에서 재현성있게 출현하거나 혹은 음성대조군과 비교하여 이상세포의 출현빈도가 유의성있게 용량 의존적으로 증가하는 경우를 변이원성이 있는것으로 판정하였다.

#### 설치류를 이용한 소핵시험

##### 시험동물

시험에 사용된 동물은 6주령의 수컷 ICR계 특정병원체 부재(SPF) 마우스로 40마리를 Charles River Japan사로 부터 공급받아 1주일간의 순화사육을 거친뒤 7주령의 동물을 사용하였다. 사육환경은 온도  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도  $55 \pm 15\%$ , 조도 150-300 Lux, 조명시간 12시간(07:00-19:00)의 조건을 유지하였으며, 마우스용 polycarbonate 케이지에 6마리씩 수용하였고 사료(마우스용 방사선멸균 고형사료, 제일제당)와 물(자외선 멸균 상수도수)은 자유섭취시켰다.

##### 투여량설정 및 표본채취시간 결정

일반적으로 소핵시험에서 시험물질의 투여량은 LD<sub>50</sub>의 1/2양을 최고용량으로하는 것이 권장되고 있다. 투여량 설정을 위한 예비 시험에서 EPO는 마우스에 정맥으로 25000 IU/kg의 용량을 투여한 경우에도 독성을 나타내지 않아 LD<sub>50</sub>는 25000 IU/kg 이상으로 판단되었으므로, 급성독성시험의 최고용량인 25000 IU/kg를 본 시험의 최고용량으로 설정하였다. 소핵다염성적혈구 출현의 적합한 시간대를 결정하기 위한 예비시험에서는 6마리의 마우스에 EPO 25000 IU/kg를 복강으로 투여한 후 각각 2마리씩을 24, 48 및 72 시간에 골수를 채취하여 소핵다염성적혈구 수와 정

염성적혈구와 다염성적혈구의 비율을 구하였다. 시험결과 소핵다염성 적혈구나 정염성적혈구와 다염성적혈구의 비율 모두 유의한 변화가 관찰되는 시간대를 발견할 수 없었으므로 표본의 채취시간은 일반적으로 많이 이용하는 시간대인 시험물질 투여 후 24시간(Salmon 등, 1980)으로 결정하였다.

**시험방법**

본 시험은 식품의약품안전본부의 “의약품 등의 독성시험 기준”에 준하여 실시하였다. EPO는 25000 IU/kg을 고용량 군으로 하고 중용량군은 12500 IU/kg을, 저용량군은 6250 IU/kg을 각각 투여하였으며, 대조군을 포함하여 모두 10 ml/kg의 액량으로 복강내로 단회 투여하였다. 음성대조군에는 매체대조물질을, 양성대조군에는 MMC 2 mg/kg을 복강내로 단회투여 하였다. 투여 후 24시간에 각 군 동물을 경추탈구로 도살한 다음 대퇴골을 분리하여 양골단을 절단하고 1 ml의 FBS(fetal bovine serum)로 골수를 분리한 후 1000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 분리된 상층액을 버리고 남은 침전물을 고르게 현탁하여 슬라이드에 도말하였다. 건조된 도말표본은 methanol에 5분간 고정한 후 2.5% modified Giemsa액(Sigma)에 50분간 염색하여 광학현미경으로 1000배 배율에서 관찰하였다. 1000개의 다염성적혈구(polychromatic erythrocyte, PCE)를 관찰하여 소핵을 가진 다염성적혈구(micronucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE)의 수를 세고 동시에 동일 시야에 존재하는 정염성적혈구(normochromatic erythrocyte, NCE)의 수를 세어 정염성적혈구와 다염성적혈구의 비율을 구하였다.

**통계학적 처리**

소핵다염성적혈구의 출현빈도는 Kastenbaum과 Bawman

의 방법(1970)에 의하여 유의성을 검정하였고 정염성적혈구와 다염성적혈구의 비율(NCE/PCE)의 각 구간 유의차는 student's t-test( $\alpha=0.05$ )로 검정하였다.

**실험결과**

**세균을 이용하는 복귀돌연변이시험**

시험결과는 Table I과 같다. 시험에 사용한 4균주 모두 대사활성제의 유무에 관계없이 복귀변이 colony수는 음성대조군의 복귀변이 colony수와 비슷한 범위에 속하였으며, 용량의존적으로 증가하거나 음성대조군의 2배 이상의 증가를 나타내지 않았다. 또한, EPO를 처리한 모든 용량군에서 세균의 치사효과나 시험물질의 침전 등의 독성도 나타나지 않았다. 한편, 각 균주의 양성대조물질은 각각의 균주에 대하여 2배 이상의 현저한 복귀변이 colony수의 증가를 나타내었다.

**포유류 배양세포를 이용하는 염색체이상시험**

염색체이상시험 결과, EPO를 처리한 모든 농도군에서 대사활성제의 유무에 관계없이 염색체의 구조적 이상세포나 배수성 이상세포의 출현율은 5% 미만으로 음성대조군과 비교하여 증가하지 않았다. 한편, 양성대조물질인 MMC(비대사활성화법)의 경우에는 24시간 처리시 염색체 이상을 보인 세포의 비율은 27%로 나타나 음성대조군과 비교하여 유의성있는 증가를 나타내었으며(Table II), benzo[a]pyrene(대사활성화법)의 경우에도 염색체에 이상을 보인 세포의 출현비율은 30%로 현저한 증가를 나타내었다(Table III).

**설치류를 이용하는 소핵시험**

EPO의 소핵시험 결과는 Table IV와 같다. 시험물질 투여

**Table I.** Number of colonies per plate in the reverse mutation test of EPO

Test materials	Dose (/plate)	Revertants/plate <sup>a</sup>							
		TA 100		TA 1535		TA 98		TA 1537	
		-S9 <sup>b</sup>	+S9 <sup>c</sup>	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
Vehicle <sup>d</sup>	-	100±7	94±6	8±2	14±1	25±2	24±6	6±3	14±2
EPO	1000 IU	89±7	83±6	9±2	16±4	23±3	24±3	6±1	14±3
	500 IU	81±5	83±2	7±3	13±1	24±3	22±2	8±1	17±9
	250 IU	91±12	80±6	8±3	16±2	26±5	23±1	6±4	18±4
	125 IU	87±4	82±5	7±2	16±1	27±2	24±4	9±4	14±7
	62.5 IU	82±2	88±7	8±2	13±2	23±3	25±4	6±2	15±4
SA <sup>e</sup>	1 µg	617±62	-	520±24	-	-	-	-	-
2-AA <sup>f</sup>	1(2) <sup>g</sup> µg	-	163±16	-	377±32	-	-	-	330±6
2-NF <sup>h</sup>	1 µg	-	-	-	-	180±7	-	-	-
2-AF <sup>i</sup>	1 µg	-	-	-	-	-	271±22	-	-
9-AA <sup>j</sup>	50 µg	-	-	-	-	-	-	440±27	-

<sup>a</sup>Values are the mean±S.D. of the data from three plates. <sup>b</sup>Without metabolic activation system(S9 Mix). <sup>c</sup>With metabolic activation system(S9 Mix). <sup>d</sup>Buffer. <sup>e</sup>Sodium azide. <sup>f</sup>2-aminoanthracene. <sup>g</sup>2-nitrofluorene. <sup>h</sup>2-aminofluorene. <sup>i</sup>9-aminoacridine. <sup>j</sup>This dosage(2 µg/plate) was used only in *Sal. typhimurium* TA 1537.

**Table II.** Chromosomal aberration test of EPO on CHL cell without S9 mix

Test Compound	Dose (IU/ml)	Treatment time (hr)	No. of cells observed	No. of cells having aberrant chromosome(%)	Type of aberration <sup>c</sup>								
					ctg	csg	ctb	csb	cte	cse	pol	end	
Vehicle <sup>a</sup>	-	24	100	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
EPO	1000	24	100	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	500	24	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	250	24	100	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
MMC <sup>b</sup>	0.05 $\mu$ g/ml	24	100	27	15	11	2	1	12	1	1	1	0

<sup>a</sup>Buffer, <sup>b</sup>Mitomycin C, <sup>c</sup>ctg: Chromatid gap, ctb: Chromatid break, cte: Chromatid exchange, csg: Chromosome gap, csb: Chromosome break, cse: Chromosome exchange, pol: Polyploid, end: Endoreduplication.

**Table III.** Chromosomal aberration test of EPO on CHL cell with S9 mix

Test Compound	Dose (IU/ml)	Treatment time (hr)	No. of cells observed	No. of cells having aberrant chromosome(%)	Type of aberration <sup>d</sup>								
					ctg	csg	ctb	csb	cte	cse	pol	end	
Vehicle <sup>a</sup>	-	6	100	3	0	1	0	0	2	0	0	0	0
EPO	1000	6	100	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	500	6	100	4	2	0	1	0	1	0	0	0	0
	250	6	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B(a)P <sup>b</sup>	0.05 $\mu$ g/ml	6	100	30	6	9	3	2	11	16	0	0	0
B(a)P <sup>c</sup>	0.05 $\mu$ g/ml	6	100	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0

<sup>a</sup>Buffer, <sup>b</sup>Benzo[a]pyrene, <sup>c</sup>Benzo[a]pyrene without S9 mix, <sup>d</sup>ctg: Chromatid gap, ctb: Chromatid break, cte: Chromatid exchange, csg: Chromosome gap, csb: Chromosome break, cse: Chromosome exchange, pol: Polyploid, end: Endoreduplication.

**Table IV.** Results of micronucleus test with EPO in mice

Group	Compound	Dose(kg)	MNPCE/PCE <sup>b</sup>	PCE/NCE <sup>c</sup>
T1	Vehicle <sup>a</sup>	-	1.00 $\pm$ 0.63 (0-2)	0.86 $\pm$ 0.20 (0.57-1.09)
T2	EPO	6250 IU	0.67 $\pm$ 0.82 (0-2)	0.72 $\pm$ 0.16 (0.50-0.93)
T3		12500 IU	0.67 $\pm$ 0.52 (0-1)	0.81 $\pm$ 0.16 (0.70-1.11)
T4		25000 IU	1.33 $\pm$ 1.21 (0-3)	0.98 $\pm$ 0.26 (0.70-1.21)
T5	MMC	2 mg	17.33 $\pm$ 6.80* (9-26)	0.45 $\pm$ 0.05* (0.36-0.52)

<sup>a</sup>Buffer. <sup>b</sup>The number of polychromatic erythrocytes with micronuclei was calculated from 1000 polychromatic erythrocytes. Mean $\pm$ Standard deviation(Minimum-Maximum). <sup>c</sup>The ratio of polychromatic erythrocytes to normochromatic erythrocytes. Mean $\pm$ Standard deviation(Minimum-Maximum). \*Significantly different from the vehicle control(p<0.05).

## 고 찰

현재까지 알려진 rhEPO의 부작용으로는 고혈압과 고칼륨 혈증 및 편두통, 구토, 발열, 오한, 설사 등의 influenza 감염증과 유사한 증상의 발현 그리고 발작과 같은 신경증상의 발현 등이 보고되고 있으며, 그의 항체생성과 같은 면역관련 부작용은 rhEPO와 uhEPO의 생리학적 동등성 때문에 문제되지 않는 것으로 알려져 있다(Winearls 등, 1986; Jacquot 등, 1987; Michael과 Charles, 1989). 한편, EPO의 변이원성에 대하여는 epotin  $\alpha$ 와 epotin  $\beta$  등과 같은 rhEPO와 uhEPO는 Ames test와 염색체 이상시험에서는 변이원성을 나타내지 않으나 설치류를 이용한 소핵시험에서는 시험자에 따라 소핵유발능에 차이가 있는 것으로 알려져 있다(Nito 등, 1986; Sutou 등, 1988; Suzuki 등, 1989; Inoue 등, 1990; Yajima 등, 1993 a; Yajima 등, 1993 b; Physicians' desk reference, 1996; 日本醫藥情報センタ, 1996). 본 시험에서는 동아제약(주) 연구소에서 BHK 세포에서 생산한 rhEPO의 변이원성을 평가하기 위하여 세균을 이용한 Ames test와 CHL 세포를 이용한 염색체이상시험 및 설치류를 이용한 소핵시험을 실시하였다.

*Sal. typhimurium* TA100, 1535, 98 및 1537 네 균주를 이용하여 rhEPO의 base pair mutation과 frameshift-type mutation 유발여부를 검토한 결과, EPO는 1000 IU/plate 이하 전 용량군에서 대사활성계의 유무에 관계없이 모든 균주에 대

후 24시간에 도말표본을 작성하여 검사한 결과, 소핵을 가진 다염성적혈구의 수는 EPO를 투여한 모든 시험군에서 유의성 있는 증가를 나타내지 않았다. 반면, 양성대조군인 MMC 2 mg/kg 투여군에서는 MNPCE가 9~26개로 유의성 있는 증가를 보였다. 다염성적혈구와 정염성적혈구의 비율도 EPO를 투여한 모든 시험군에서 용매대조군과 비교할때 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다.

하여 His<sup>-</sup> → His<sup>+</sup>로의 복귀변이원성을 나타내지 않았으며, 시험균주에 대한 독성도 관찰되지 않아 변이원성이 없었으므로 나타났다. 이와같은 시험결과는 Sutou 등(1988)과 Inoue 등(1990)의 시험결과와 유사한 것으로 이들은 유전자 재조합 기술을 이용하여 CHL 세포에서 발현시킨 EPO를 이용하여 Ames test를 실시한 결과, 각각 5000 IU/plate 및 126.5 µg/plate 이하 모든 농도에서 복귀변이를 유발하지 않았다는 시험결과를 보고하였다. 또한 본 연구소에서 CHO 세포에서 생산한 rhEPO의 유전독성시험에서도 rhEPO는 1000 IU/plate 이하 모든 용량군에서 복귀돌연변이가 유발되지 않았다고 하여(김 등, 1996) 본 시험결과와 유사하였다.

염색체 이상시험은 CHL 세포를 이용하여 24시간 직접법과 대사활성화법으로 실시하였다. 시험결과, rhEPO를 처리한 1000 IU/ml 이하 모든 용량군에서 대사활성계의 적용에 관계없이 염색체 이상을 보인 세포의 출현빈도가 유의성 있게 증가하거나 용량의존성 있는 증가는 관찰되지 않았다. 이와 같은 시험결과도 동계열의 의약품인 epotin α (KRN5702)와 epotin β(EPOCH) 및 본 연구소에서 CHO 세포에서 생산한 rhEPO 등의 염색체이상시험에서 음성으로 나타난 결과와 유사한 것이었다(Sutou 등, 1988; Inoue 등, 1990; 김 등, 1996).

일반적으로 복귀돌연변이 시험에서 채택되는 시험물질의 최고농도는 5-10 mg/plate 이며, 염색체이상시험에서는 10 mM/plate인데, 본 시험에서 실시한 rhEPO의 경우에 최고농도는 단백질량을 기준으로 할때 0.0075 mg(=1000 IU/ml)으로서 상당히 낮은 농도이다. 그러나 EPO의 예정 임상제형이 2000, 4000 및 10000 IU/ml로 되어있기 때문에 이 시험물질 용액으로 시험가능한 최고농도는 약 0.0075 mg(=1000 IU)/ml이다. 또한 EPO의 정상혈중 농도는 13-21 mU/ml인 점으로 미루어 볼때(Garcia 등, 1982), 본 시험의 최고농도인 1000 IU/ml는 정상인 혈중농도의 약 47000배 이상의 충분히 높은 농도가 되어 시험결과의 해석에는 무리가 없을 것으로 사료된다. 또한 시험물질인 rhEPO는 일반 화학물질이 아닌 생물학적제제(단백질)이며, 단백질의 aggregation 등의 이유 때문에 원액제조시 농축에 한계가 있는점 등을 고려하면 절대량 보다는 생물학적 활성을 지표로 하여 농도를 설정하는 것이 타당할 것으로 사료된다.

마우스를 이용한 소핵시험에서, EPO는 임상사용량(50 IU/kg)의 약 500배에 해당하는 25000 IU/kg 및 그 이하 모든 용량군에서 소핵을 가진 다염성적혈구의 유의성 있는 증가는 관찰되지 않았다. 현재까지 알려진 바로 rhEPO는 소핵시험에서 MNPCE의 발생빈도를 증가시킨다는 시험결과가 보고되어 있으며(Tanaka 등, 1990; Yajima 등, 1993 a), Yajima 등은 epotin α, epotin β, SNB-5001 등의 rhEPO와 사람의 뇨에서 분리한 천연형 uhEPO의 소핵유발능을 비교한 시험에서 모든 EPO는 유사한 정도의 소핵유발능을

나타낸다고 발표하였다(Yajima 등, 1993 b). 반면, Iuoue 등과 Sutou 등은 각각 Epotin α와 Epotin β가 소핵시험에서 MNPCE를 유발하지 않았다는 시험결과를 발표하였으며(Sutou 등, 1988; Inoue 등, 1990), 이와같은 시험결과는 Epotin α(Epogen<sup>®</sup>)나 Epotin β에 관한 기존의 보고들과 일치하는 것이었다(Physicians' desk reference, 1996; 日本醫藥情報センタ, 1996). 이상과 같은 기존의 시험결과에 미루어 보건데 rhEPO의 소핵유발능은 시험물질과 시험자에 따라서 다른것으로 판단되는데, 본 연구소에서 BHK 세포를 이용하여 생산한 rhEPO는 본 시험결과 소핵다염성 적혈구의 증가를 나타내지 않았다.

한편, 다염성적혈구와 정염성적혈구의 비율에 있어서 rhEPO를 투여한 모든 용량군에서 음성대조군과 비교하여 유의성 있는 변화를 나타내지는 않았으나, rhEPO의 투여 용량에 상관없이 PCE/NCE의 비율이 감소하는 경향을 나타내었다. 일반적으로 소핵시험에서 PCE/NCE의 비율은 0.97±0.22 정도인데(Hart와 Engberg-Pedersen, 1983), Venitt와 parry(Venitt와 Parry, 1984)는 소핵시험에서 NCE의 증가를 세포독성작용으로, PCE의 증가를 세포증식작용으로 판단하였다. 이와 같은 점에 미루어 보면 본 시험에서 나타난 PCE/NCE ratio의 감소를 EPO의 세포독성작용으로 추측할 수 있다. 그러나, 이와 같은 시험결과는 동일계 약물인 EPOCH와 KRN 5702의 소핵시험 및 본 연구소의 CHO 세포 유래 rhEPO인 DA-3285의 시험에서도 관찰된 결과로서(Sutou 등, 1988; Inoue 등, 1990; 김 등, 1996) 그 이유는 rhEPO의 악리작용에 의하여 골수내에서 적아구세포의 분화증식이 활성화되므로 성숙한 골수세포내의 PCE는 빠르게 혈중으로 방출되어 골수내 PCE 수가 감소하고, 보상성으로 말초혈액이 골수내로 이동하여 골수내에는 NCE와 같은 성숙적혈구 수가 증가하여 결과적으로는 PCE/NCE의 비율이 감소하는 것으로 알려져 있다(Suzuki 등, 1989; Inoue 등, 1990). 따라서 이와같은 점에 미루어 보면, 본 시험결과에서 관찰된 PCE/NCE ratio의 감소도 세포독성작용이라기 보다는 rhEPO의 악리작용에 의한 것으로 판단되어 rhEPO는 골수 적아구의 증식을 억제하거나 염색체 또는 분열장치에 이상을 유발하지 않는 물질인 것으로 사료된다.

## 결 론

동아제약(주) 연구소에서 유전자 재조합 기술을 이용하여 BHK 세포에서 생산한 인 적혈구 조혈인자(rhEPO)의 안전성 평가의 일환으로 변이원성시험을 실시하였다. 시험결과, rhEPO는 세균을 이용한 복귀돌연변이 시험에서 대사활성계의 유무에 관계없이 모든 균주에 대하여 His<sup>-</sup> → His<sup>+</sup>로의 복귀변이원성을 나타내지 않았으며, CHL 세포를 이용한 염색체이상시험에서도 대사활성계의 적용에 관계없

이 염색체 이상을 유발하지 않았다. 또한 설치류를 이용하는 소핵시험에서도 소핵유발작용이 없는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 부터 rhEPO는 세균에서 유전자돌연변이나 포유류 배양세포 및 설치류에서 염색체 돌연변이를 유발하지 않는 물질로 판단되었다.

### 참고문헌

- Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Res.* **31**, 347-364.
- Anagnostou, A. (1985). Erythropoietin: a hematopoietic hormone produced by the kidney. *Semin. Nephrol.* **5**, 104-114.
- Davis, J. M., Arakawa, T., Strickland, T. W. and Yphantis, D. A. (1987). Characterization of recombinant human erythropoietin produced in chinese hamster ovary cell. *Biochemistry.* **26**, 2633-2638.
- Egrie, J., Strickland, T. W. and Lane, J. (1986). Characterization and biological effects of recombinant human erythropoietin. *Immunobiology.* **172**, 213-224.
- Garcia, J. F., Ebbe, S. N. and Hollander, L. (1982). Radioimmunoassay of erythropoietin: Circulation levels in normal and polycythemic human beings. *J. Lab. Clin. Med.* **99**, 624-635.
- Goto, M., Akai, K., Murakami, A., Hashimoto, C., Tsuda, E., Ueda, M., Kawanishi, G., Takahashi, N., Ishimoto, A., Chiba, H. and Sasaki, R. (1988). Production of recombinant human erythropoietin in mammalian cells: host-cell dependency of the biological activity of the cloned glycoprotein. *Bio/Technology.* **6**, 67-71.
- Hart, J. W. and Engberg-Pedersen, H. (1983). Statistics of the mouse bone-marrow micronucleus test: counting, distribution and evaluation of results. *Mutation Res.* **111**, 195-207.
- Inoue, M., Horiuchi, K., Fukuda, T., Fukuda, A., Yano, M., Matsuoka, Y., Koizumi, T., Kojima, Y. and Satoh, T. (1990). Mutagenicity test on EPOCH. *Rinshou-iyaku.* **6** (Suppl. 2), 489-497.
- Jacobs, K., Shoemaker, C. and Rudersdorf, R. (1985). Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature.* **313**, 806-810.
- Jacquot, C., Ferragu-Haguet, M., Lefebvre, A., Berthelot, J. M., Peterlonga, P. and Castaigne, J. P. (1987). Recombinant erythropoietin and blood pressure. *Lancet.* **ii**, 1083.
- Joseph, W. E. and John, W. A. (1989). Guideline for recombinant human erythropoietin therapy. *Am. J. Kidney Dis.* **2**, 2-8.
- Kastenbaum, M. A. and Bowman, K. O. (1970). Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutation Res.* **9**, 527-549.
- Lin, F. K., Suggs, S., Lin, C. H., Browne, J. K., Smalling, R., Egrie, J. C., Chen, K. K., Fox, G. M., Martin, F., Stabinsky, Z., Badrawi, S. M., Lai, P. H. and Goldwasser, E. (1985). Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Soc. USA.* **82**, 7580-7584.
- Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983). Revised methods for Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res.* **113**, 173-215.
- Merrill, R. H. (1979). Iron metabolism in end stage renal disease. *Dialysis and transplantat.* **8**, 898-904.
- Michael, H. S. and Charles, E. H. (1989). Recombinant human erythropoietin. *DIAP.* **23**, 528-536.
- Miyake, T., Kung, C. K. H. and Goldwasser, E. (1977). Purification of human erythropoietin. *J. Biol. Chem.* **252**, 5558-5564.
- Nito, S., Kondo, Y., Ono, T. and Ariyuki, F. (1986). In vitro micronucleus method with erythropoietin-differentiated erythrocytes. *Mutat. Res.* **175**, 243-247.
- Physicians' desk reference. (1996). Epogen®, pp.489-495. Medical Economics Company, Montvale.
- Recny, M. A., Scoble, H. A. and Kim, Y. (1987). Structural characterization of natural human urinary and recombinant DNA-derived erythropoietin(identification of des-Arginine 166 erythropoietin). *J. Biol. Chem.* **262**, 17156-17163.
- Ridley, D. M., Dawkins, F. and perlin, E. (1994). Erythropoietin: A review. *J. Natl. Med. Assoc.* **86**, 129-135.
- Salmone, M., Heddle, J., Stuart, E. and Katz, M. (1980) Towards an improved micronucleus test: Studies on 3 model agents, mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene. *Mutation Res.* **74**, 347-356.
- Sutou, S., Sato, S., Ushihusa, Y., Yamachi, T., Tomii, S., Hitachi, T., Izumi, H. and Amano, K. (1988). Mutagenicity study of KRN5702. *Koso to Rinshou.* **22**, 333-348.
- Suzuki, Y., Nagae, Y., Li, J., Sakaba, H., Mozawa, K., Takahashi, A. and Shimizu, H. (1989). The micronucleus test and erythropoiesis. Effects of erythropoietin and a mutagen on the ratio of polychromatic to normochromatic erythrocytes(P/N ratio). *Mutagenesis.* **4**, 420-424.
- Tanaka, N., Yamakage, K., Sasaki, K. and Haneda, A. (1990). In vitro chromosome test TYB-5220 in chinese hamster cells, *Jpn. Pharmacol. Ther.* **18**(Suppl. 8), 115-120.
- Venitt, S. and Parry, J. M. (1984). Mutagenicity testing. A practical approach. pp. 298-306. IRL press, England.
- Vreugdenhil, G., Frenken, L. A. M. and Keone, R. A. P. (1993). Erythropoietin: Mechanisms of action and indications for treatment. *Neth. J. Med.* **42**, 187-202.
- Winearls, C. G., Oliver, D. O., Pippard, M. J., Reid, C., Downing, M. R. and Cotes, P. M. (1986). Effect of human erythropoietin from recombinant DNA on the anemia of patients maintained by chronic hemodialysis. *Lancet.* **ii**, 1175-1178.
- Yajima, N., Kurata, Y., Sawai, T. and Takeshita, Y. (1993 a). Induction of micronucleated erythrocyte by recombinant human erythropoietin. *Mutagenesis.* **8**, 227-233.
- Yajima, N., Kurata, Y., Sawai, T. and Takeshita, Y. (1993 b). Comparative studies in induction of micronuclei by three genetically recombinant and urinary human erythropoietins. *Mutagenesis.* **8**(3), 237-241.
- 김형식, 광승준, 천선아, 임소영, 안미영, 김원배, 김병문, 안병욱, 서동상, 이병무. (1996). Genotoxic evaluation of recombinant human erythropoietin(rHu-EPO) in short-term assay. *Environmental Mutagen Carcinogen.* **162**(2), 103-108.
- 日本醫藥情報センター. (1996). 日本醫藥品集, pp. 279-284. 藥業時報社, 日本.