

## 새로운 인체 재조합 적혈구 조혈인자 LB00014의 생식독성연구: 랫드 초기형성시험

정문구\*, 양병철, 김종춘, 송시환, 이상구<sup>1</sup>

한국화학연구소 안전성연구부, <sup>1</sup>LG화학기술연구원 바이오텍연구소

### Reproductive Toxicity Study of LB00014, A New Recombinant Human Erythropoietin: Teratogenicity Study in Rats

Moon Koo CHUNG\*, Byung Chul YANG, Jong Choon KIM, Si Whan SONG and Sang Koo LEE<sup>1</sup>

*Korea Research Institute of Chemical Technology, Toxicology  
Research Center, P.O. Box 107, Yusung, Daejeon 305-606, Korea*

*<sup>1</sup>LG Chem Research Park, Biotech Research Institute, Yusung,  
Daejeon 305-380, Korea*

(Received September 18, 1997; accepted November 30, 1997)

**Abstract** – LB00014, a new recombinant human erythropoietin, was at dose levels of 0, 120, 600, and 3,000 IU/kg/day administered intravenously to pregnant Sprague-Dawley rats during the organogenetic period. All dams were subjected to caesarean section on day 20 of pregnancy. Effects of test substance on dams and embryonic development of F1 fetuses were examined. No treatment-related changes in clinical signs, body weight, and food consumption were observed at all doses tested. At necropsy spleen enlargement was found at 3,000 IU/kg. There was an increase in the spleen weight at 600 and 3,000 IU/kg. Developmental toxicity was evident as increased resorptions at 3,000 IU/kg. At 600 and 3,000 IU/kg, retarded ossification of fetuses occurred at an incidence of 31.3% and 64.7%, respectively. In addition, there was a delay in ossification of sternbrae and sacrocaudal vertebrae at 600 and 3,000 IU/kg. A decrease in the number of metacarpi and metatarsi was also seen at 3,000 IU/kg. The results show that the no observed adverse effect dose level (NOAEL) for maternal toxicity was over 3,000 IU/kg/day and the NOAEL for developmental toxicity was 120 IU/kg/day.

**Keywords** □ LB00014, recombinant human erythropoietin, teratogenicity study, rat

Erythropoietin(EPO)은 인체 및 동물에 있어서 신장의 renal peritubular cell에서 생성되어 적혈구 전구세포의 분열과 분화를 촉진하는 성장인자로서, 화학적 조성은 당단백질(glycoprotein)이다. EPO는 적아구 colony 형성세포와 적아구 burst 형성세포에 작용하여 적혈구 분화를 촉진한다고 한다(Fisher, 1993). 따라서 EPO는 의약품으로서 빈혈의 치료에 유용하게 사용될 수 있으나 그 공급이 제한되어 왔었다. 그러나 80년대에 EPO 유전자가 클로닝되어 그 유전자 서열이 밝혀지고 재조합 EPO가 만들어지면서 대량생산이 가능해졌다(Jacobs, 1985).

최근 미국, 일본 등의 선진국에서는 신장질환자의 빈혈 치료, 약물치료나 방사선치료시의 회복 등은 물론 azido-

thymidine이나 HIV(human immunodeficiency virus)와 관련된 빈혈 등의 치료에 인체 재조합 적혈구 조혈인자가 적용되고 있다(Mino 등, 1990).

한편 EPO는 랫드 초기형성연구에서 기형유발성이 인정되지 않았다고 한다(Hashimoto 등, 1990; Igarashi 등, 1990).

국내에서도 유전자 재조합 기술을 이용한 EPO의 대량생산이 가능하며 신규 인체 재조합 조혈인자에 대한 일반독성 평가 결과가 이미 보고된 바 있다(Kim 등, 1994; Lim 등, 1994). LB00014는 (주)LG화학 바이오텍연구소(대전광역시 유성구 문지동 104-1)에서 기존의 생산방법과는 다른 vector 및 promoter를 이용하여 Chinese hamster ovary(CHO) cell에서 expression하여 대량생산에 성공한 재조합 EPO이다.

본 연구는 신약후보물질의 생식독성학적 스크리닝(reproductive-toxicological screening)의 일환으로서 적혈구 조

\* To whom correspondence should be addressed.

혈인자인 LB00014가 임신랫드의 배아 및 태자에 있어서 기형, 치사 및 발육지연을 유발하는지를 조사하기 위하여 실시하였다. 본 시험은 의약품 등의 독성시험기준(국립보건안전연구원, 1994)에 준하여 실시하였다.

## 실험방법

### 시험물질

본 시험에는 (주) LG화학 바이오텍연구소에서 합성한 LB00014(Lot No. EI007)가 사용되었다. LB00014는 적혈구 조혈인자로서 생물학적인 제제이고 무색투명한 액상제제이며 pH는 7.1, 단백질함량은 2.5 mg/vial 그리고 삼투압은 276 mOsm이었다. 용매로서는  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  7.72 g과  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1.545 g 및  $\text{NaCl}$  32.73 g을 증류수에 용해시켜 4 l가 되게 하고 Human Serum Albumin을 0.25%의 비율로 첨가하였다. 이 용매에 시험물질인 LB00014를 용량별로 용해시켜 사용하였다.

### 실험동물 및 사육환경

실험동물은 한국화학연구소 안전성연구부 실험동물육종실(대전광역시 유성구 장동 100)로부터 입수한 Sprague-Dawley 랫드(SPF)를 사용하였다. 9주령의 수컷 100마리와 암컷 200마리를 입수한 후 1주일간의 검역 및 순화를 거친 뒤 1:2로 교배시켜 질구의 정자를 확인한 날을 임신 0일로 정하였으며 교미확인된 암컷 100마리를 시험에 사용하였다.

본 시험은 온도  $23 \pm 3^\circ\text{C}$ , 상대습도  $50 \pm 10\%$ , 환기횟수 13~18회/hr., 조명시간 12시간(오전 9시~오후 9시), 조도 200~300 Lux로 설정된 동물실에서 실시되었다. 시험기간 중 사료는 실험동물용 고품사료(제일사료(주))를 방사선조사(2.0 Mrad)멸균하여, 그리고 물은 상수도수를 자외선 유수살균기로 소독시킨 후 자유섭취시켰다.

### 투여량의 설정과 시험군의 구성

100, 300, 1,000, 3,000 및 10,000 IU/kg의 5개 용량으로 예비시험을 실시한 결과, 3,000 및 10,000 IU/kg 투여군에서 태자체중의 감소가 관찰되었고, 그 밖의 투여군에서는 이상소견이 나타나지 않았다. 이를 기초로 3,000 IU/kg/day를 고용량으로 정하고 공비 5로 중용량 및 저용량을 600 및 120 IU/kg/day로 설정하였으며, 그 외에 매체대조군을 두었다. 시험군의 구성은 Table I과 같다.

### 투여방법 및 투여기간

25G 주사바늘과 주사기를 이용하여 시험물질을 동물의 미정맥내로 기관형성기(임신 6일부터 임신 16일까지)동안 1일 1회 오전중에 반복투여하였다. 투여액은 임신 6일, 9일 및 13일의 체중을 기준으로 산출하였다.

### 관찰 및 검사항목

#### 일반증상관찰

시험기간중 1일 1회 동물의 일반증상, 중독증상 및 사망

**Table I.** Experimental design for teratogenicity study of LB 00014 in rats

Group	Dose (IU/kg/day)	Volume (ml/kg)	No. of animals
Control	0	2	25
LB00014	120	2	25
	600	2	25
	3,000	2	25

유무에 관해서 관찰하였고 투여기간중에는 투여전후 1일 2회 관찰하였다.

### 체중 및 사료섭취량 측정

각 군의 전 어미동물에 대하여 임신 0, 6, 9, 13, 16 및 20 일째에 체중을 측정하였다. 사료섭취량은 모든 동물에 대하여 체중측정일에 사료를 급여한 후 익일 잔량을 측정하였다(단, 임신 20일째에는 제왕절개로 인하여 임신 19일째에 사료급여후 익일 잔량을 측정하였음).

### 부검

각 군의 모든 임신동물들을 임신 20일째에 부검하여 체표, 체강, 흉강 및 복강의 전장기에 대하여 육안적 검사를 실시하였다. 이 때 간장, 신장, 비장, 췌장, 뇌, 부신 및 난소의 중량을 측정하였다.

### 제왕절개

각 군의 모든 암컷동물들을 임신 20일째에 제왕절개하여 임신황체수, 착상수, 생존태자수, 흡수배자(태자)수, 사망태자수, 생존태자의 성별 및 개체별 체중 등을 조사하였다.

### 태자의 외표검사

생존태자를 자궁에서 적출한 후 즉시 외표이상의 유무에 대하여 관찰하고 왼쪽 자궁각의 난소측에서 번호를 매겨 흡수번호는 골격검사에 그리고 짝수번호는 내장검사에 사용하였다.

### 골격검사

각 배당 생존태자를 5% 포르말린에 고정한 후 변형된 Dawson법(Dawson, 1926)에 따라 골격표본을 제작한 후 골격이상 유무 및 골화상태에 대하여 검사하였다.

### 내부장기검사

각 배당 생존태자를 Bouin액에 고정한 후, 두부 및 복부는 Wilson법(Wilson, 1965), 흉부는 Nishimura법(Nishimura, 1974)에 의하여 내부장기 이상유무를 검사하였다.

### 통계학적 분석

얻어진 시험자료에 대한 통계분석은 SAS 프로그램(SAS institute Inc., Ver. 6.04)을 이용하였으며, 체중, 사료섭취량 및 장기중량은 일원배치분산분석(ANOVA)과 Dunnett 다중비교검정을, 빈도수를 나타내는 시험자료는 Kruskal-Wallis (H) 검정과 Dunnett 다중비교검정법, 태자의 성비는  $\chi^2$  검정법으로 각각 대조군과 유의차검정을 실시하였다. 태자에

대한 시험자료는 성비를 제외하고 한배에서 나온 태자들의 평균체중, 빈도수(황체수, 흡수배자수, 사망태자수)를 이용하여 통계분석하였고, 출생자에 대한 시험자료는 모동물 단위로 정리하여 분석하였다. 전체적으로 검정의 유의수준은 1% 혹은 5%에서 검사하였다.

## 실험결과

### 모동물에 미치는 영향

#### 일반증상

모동물의 임신기간동안 매체대조군을 포함한 모든 투여군에서 이상증상이 관찰되지 않았다.

#### 체중

모동물의 임신기간동안의 체중에 있어서 각 투여군과 매체대조군간의 유의차는 인정되지 않았다.

#### 사료섭취량

모동물의 사료섭취량은 모든 투여군에서 매체대조군과 같이 정상적인 사료섭취가 관찰되었다.

#### 부검소견

모동물의 임신 20일째 부검시 매체대조군 및 120 IU/kg 투여군에서는 특이소견이 관찰되지 않았고, 600 IU/kg 투여군에서는 우측신장의 신우확장(pyelectasis)이 1례 발견되었다. 3,000 IU/kg 투여군에서는 비장종대(splenomegaly)가 13례, 좌측신장의 신우확장이 1례, 그리고 우측신장의 신우확장이 2례 관찰되었다.

상기소견들 중에서 600 및 3,000 IU/kg 투여군에서 소수례씩 나타난 신우확장은 SD 랫드에 있어서 자연발생적으로 나타나는 소견들로서 시험물질의 영향은 아니었고, 3,000 IU/kg 투여군에서 관찰된 비장종대는 시험물질에 의한 변화로 판단되었다.

#### 장기중량

모동물의 임신 20일째 부검시 측정된 주요장기의 절대중량에 있어서 600 및 3,000 IU/kg 투여군의 비장은 통계학적으로 유의성있는 증가를, 그리고 모든 투여군의 심장은 통계학적으로 유의성있는 감소를 나타냈다. 한편 상대장기중량에 있어서는 3,000 IU/kg 투여군의 간장중량과 600 및 3,000 IU/kg 투여군의 비장중량의 통계학적 유의한 증가가 관찰되었다.

상기 소견들중에서 모든 투여군에서 관찰된 심장의 절대중량의 감소와 3,000 IU/kg 투여군에서 발견된 간장의 상대중량의 증가는 시험물질과는 무관한 우발적 소견으로 판단되었고, 600 및 3,000 IU/kg 투여군에서 관찰된 비장의 절대 및 상대중량의 증가는 시험물질의 약리작용에 의한 것으로 인정되었다(Table II).

### 태자에 미치는 영향

#### 제왕절개성적

제왕절개시 조사된 황체수, 착상수, 사망태자수와 암수태자의 성비 및 체중은 모든 투여군에서 매체대조군과 비교하여 통계학적인 유의성을 나타내지 않았다. 3,000 IU/kg 투여군에서 흡수배자수는 매체대조군에 비해 통계학적으로 유의성있는 증가를, 그리고 생존태자수는 유의성있는 감소를 나타냈는데, 이는 시험물질에 의한 변화로 판단되었다. 태자의 외표소견은 매체대조군에서 구순열(cleft lip), 복벽파열(gastroschisis), 혈종(hematoma) 및 흔적미(vestigial tail)가 각각 1례씩 관찰되었고, 600 IU/kg 투여군에서는 흔적미가 1례 나타났다. 또한 3,000 IU/kg 투여군에서는 곡미(kinky tail)가 2례, 그리고 꼬리기시부의 함몰(depression at the base of the tail)이 1례 관찰되었다. 상기 소견들은 발현율이 낮고 용량상관성이 결핍되어 시험물질에 의한 영향으로 인정되지 않았다(Table III).

#### 내부장기검사

임신 20일째에 적출한 태자의 내부장기검사시 매체대조군에서는 구개열(cleft palate)[기형]이 1례(0.6%) 그리고 흉선경부잔류(thymic remnant in the neck), 신우확장(dilatation of the renal pelvis) 및 요관확장(dilatation of the ureter)[변이]이 9례(5.3%) 관찰되었다. 120 IU/kg 투여군에서는 소악증(micrognathia) 및 외측뇌실확장(dilatation of the lateral ventricle)[기형]이 2례(1.3%) 그리고 흉선경부잔류, 신우확장 및 요관확장[변이]이 9례(6.0%) 나타났다. 600 IU/kg 투여군에서는 외측뇌실확장[기형]이 2례(1.3%) 그리고 신우확장 및 요관확장[변이]이 6례(3.9%) 관찰되었다. 또한 3,000 IU/kg 투여군에서는 외측뇌실확장[기형]이 2례(1.5%) 그리고 신우확장 및 요관확장[변이]이 5례(3.8%) 발견되었다.

상기소견중 모든 투여군에서 소수례씩 관찰된 기형소견들은 발현율이 낮고 용량상관성이 결핍되어 시험물질의 영향으로 판단되지 않았다. 또한 매체대조군을 포함한 모든

**Table II.** Spleen weights of dams treated with LB00014

DOSE: (IU/kg)	0	120	600	3,000
No. of animals	25	23	23	22
Body weight (g)	373.8±30.14	369.7±19.13	371.5±30.57	363.4±25.27
Spleen (g)	0.665±0.089	0.664±0.077	0.762±0.152*	1.165±0.170**
per B.W. (g%)	0.178±0.020	0.180±0.023	0.205±0.040*	0.321±0.046**

Values are mean±S.D. \* and \*\* indicate significant difference at P<0.05 and P<0.01 levels when compared with the control group.

**Table III.** Caesarean section data of dams treated with LB00014

DOSE: (IU/kg)	0	120	600	3,000
No. of pregnant animals	25	23	23	22
Corpora lutea (mean±S.D.)	16.1±2.04	16.0±2.33	15.7±1.60	16.1±1.97
Implantations (mean±S.D.)	14.5±2.87	14.5±3.30	14.4±3.20	14.1±3.01
% of corpora lutea (mean±S.D.)	89.4±10.86	90.5±15.86	91.0±17.27	87.6±15.52
Prenatal deaths (resorptions+dead fetuses)	12	24	16	39**
Resorptions				
Total	12	24	16	38**
Early	11	24	16	37
Late	1	0	0	1
Dead fetuses	0	0	0	1
Live fetuses				
Male/Female	180/171	144/166	158/157	147/124
Litter size (mean±S.D.)	14.0±2.82	13.5±3.15	13.7±3.60	12.3±3.18
% of implantation (mean±S.D.)	98.9±11.81	92.8±7.28	93.8±10.24	86.8±9.38**
Sex ratio (male/female)	1.05	0.87	1.01	1.19
Body weight of live fetuses (g)				
Male (mean±S.D.)	3.3±0.24	3.3±0.82	3.2±0.19	3.0±0.43
Female(mean±S.D.)	3.2±0.17	3.2±0.83	3.0±0.20	3.0±0.50
No. of fetuses with external anomalies (%)	4(1.1)	0	1(0.3)	3(1.1)
Cleft lip	1	0	0	0
Gastroschisis	1	0	0	0
Hematoma	1	0	0	0
Vestigial tail	1	0	1	0
Kinky tail	0	0	0	2
Depression at the base of the tail	0	0	0	1

\*\*indicates significant difference at P<0.01 level when compared with the control group.

**Table IV.** Visceral findings in fetuses from dams treated with LB00014

DOSE: (IU/kg)	0	120	600	3,000
No. of fetuses examined	170	149	152	132
No. of fetuses with malformations (%)	1(0.6)	2(1.3)	2(1.3)	2(1.5)
Cleft palate	1	0	0	0
Micrognathia	0	1	0	0
Dilatation of the lateral ventricle	0	1	2	2
No. of fetuses with variations (%)	9(6.3)	9(6.0)	6(3.9)	5(3.8)
Thymic remnant in the neck	1	1	0	0
Dilatation of the renal pelvis	4	2	3	1
Dilatation of the ureter	4	6	3	4

투여군에서 나타난 변이소견들은 자연발생적인 소견들로서(Morita 등, 1987) 시험물질에 의한 변화는 아니었다(Table IV).

#### 골격검사

랫드태자의 골격소견은 신체의 기능장애 유발여부, 골화 정도 등에 따라서 기형(malformation), 변이(variation) 및 골

화지연(retardation)으로 구분된다. 임신 20일째에 적출한 태자의 골격검사시 매체대조군에서는 요늑(lumbar rib)[변이]이 2례(1.1%) 그리고 이분흉추추체(bicentric thoracic vertebral body) 및 아령형흉추추체(dumbbell-shaped thoracic vertebral body)[골화지연]이 9례(5.0%) 관찰되었다. 120 IU/kg 투여군에서는 말늑골단소(shortened 13th rib)[기형]가

1례(0.6%), 파상형늑골(wavy ribs) 및 요늑[변이] 4례(2.5%) 그리고 이분흉추추체, 아령형흉추추체 및 이분흉골분절(cleaved sternbrae)[골화지연]이 24례(14.9%) 나타났다. 600 IU/kg 투여군에서는 파상형늑골 및 요늑[변이]이 2례(1.2%) 그리고 이분흉추추체, 아령형흉추추체, 이분흉골분절, 좌골 및 치골의 무골화(ischium and pubis not ossified), 치골의 무골화, 후두상골의 골화지연(delayed ossification of os supraoccipitale)[골화지연]이 51례(31.3%) 관찰되었다. 또한 3,000 IU/kg 투여군에서는 말늑골결손(absence of 13th rib) 및 말늑골단소[기형]가 2례(1.4%), 요늑[변이]이 2례(1.4%) 그리고 흉추추체결손(absence of thoracic vertebral body), 요추추체결손, 6번 요추의 무골화(6th lumbar vertebrae not ossified), 흉추추체의 무골화(thoracic vertebral bodies not ossified), 요추추체의 무골화, 이분흉추추체, 아령형흉추추체, 이분흉골분절, 좌골 및 치골의 무골화, 치골의 무골화, 후두상골의 골화지연, 천문확장(enlarged fontanelle) 및 두정간골의 무골화(os interparietale not ossified)[골화지연]가 90례(64.7%) 발견되었다.

이중 120 IU/kg 투여군에서 관찰된 골화지연은 매체대조군에서도 나타난 소견들로서 발현율은 정상범위내에 속하였고 600 및 3,000 IU/kg 투여군의 골화지연 발현율은 매체대조군에 비해 현저히 높아서 시험물질에 의한 영향으로

인정되었다. 그리고 흉골, 중수골, 중족골, 전후지의 지골 및 천미추의 골화진행도에 있어서 600 및 3,000 IU/kg 투여군의 흉골분절 및 천미추의 수와 3,000 IU/kg 투여군의 중수골 및 중족골의 수가 매체대조군과 비교할 때 통계학적으로 유의성 있는 감소를 나타냈는데 이는 시험물질에 의한 변화로 판단되었다(Table V).

## 고 찰

LB00014는 (주) LG 화학 바이오텍연구소에서 개발중인 적혈구 조혈제이다. 이러한 LB00014를 0, 120, 600 및 3,000 IU/kg의 용량으로 Sprague-Dawley 계통의 랫드에 임신 6일부터 16일까지 정맥투여하여 모동물과 태자에 미치는 영향을 조사하였다.

모동물의 일반증상, 체중 및 사료섭취량은 모든 투여군에서 매체대조군의 결과와 차이를 나타내지 않아 본 시험물질이 모동물의 일반상태에 영향을 주지않는 것으로 사료되었다.

모동물의 부검시 3,000 IU/kg 투여군에서 관찰된 비장중대와 600 및 3,000 IU/kg 투여군에서 발견된 비장중량의 증가는 LB00014의 랫드 만성독성시험(송, 1997)에서 관찰되었으며, 유사물질인 EPOCH의 랫드 최기형성시험(Igarashi 등, 1990)

**Table V.** Skeletal findings in fetuses from dams treated with LB00014

DOSE: (IU/kg)	0	120	600	3,000
No. of fetuses examined	181	161	163	139
No. of fetuses with malformations (%)	0	1(0.6) <sup>c</sup>	0	2(1.4) <sup>b</sup>
No. of fetuses with variations (%)	2(1.1) <sup>c</sup>	4(2.5) <sup>d</sup>	2(1.2) <sup>e</sup>	2(1.4) <sup>f</sup>
No. of fetuses with retardations (%)	9(5.0) <sup>e</sup>	24(14.9) <sup>***h</sup>	51(31.3) <sup>**i</sup>	90(64.7) <sup>**j</sup>
No. of ossification centers				
Sternebrae	4.2±0.46	4.0±0.78	2.8±1.17**	1.5±1.34**
Metacarpals in both forelimbs	6.4±0.50	6.2±0.75	5.7±0.69	4.8±1.69**
First & 2nd phalanges in both forelimbs	0.03±0.14	0.4±1.67	0	0.2±0.65
Third phalanges in both forelimbs	0	0.3±1.67	0	0.6±1.93
Metatarsals in both hindlimbs	7.9±0.40	7.8±0.82	7.5±0.51	6.2±1.79**
First & 2nd phalanges in both hindlimbs	0	0.4±2.1	0	0
Third phalanges in both hindlimbs	0	0.4±2.1	0	0.9±2.41
Sacral and caudal vertebrae	7.3±0.44	7.1±1.62	6.2±0.76*	4.2±2.21**

<sup>a</sup>Shortened 13th rib, <sup>b</sup>Absence of 13th rib and shortened 13th rib, <sup>c</sup>Lumbar rib, <sup>d</sup>Wavy ribs and lumbar rib, <sup>e</sup>Wavy ribs and lumbar rib, <sup>f</sup>Lumbar rib, <sup>g</sup>Bicentric thoracic vertebral body and dumbbell-shaped thoracic vertebral body, <sup>h</sup>Bicentric thoracic vertebral body, dumbbell-shaped thoracic vertebral body and cleaved sternbrae, <sup>i</sup>Bicentric thoracic vertebral body, dumbbell-shaped thoracic vertebral body, cleaved sternbrae, ischium and pubis not ossified, pubis not ossified and delayed ossification of os supraoccipitale, <sup>j</sup>Absence of thoracic vertebral body, absence of lumbar vertebral body, 6th lumbar vertebrae not ossified, thoracic vertebral bodies not ossified, lumbar vertebral bodies not ossified, bicentric thoracic vertebral body, dumbbell-shaped thoracic vertebral body, cleaved sternbrae, ischium and pubis not ossified, pubis not ossified, delayed ossification of os supraoccipitale, enlarged fontanelle and os interparietale not ossified, \* and \*\* indicate significant difference at P<0.05 and P<0.01 levels when compared with the control group.

과 TYB-5220의 랫드 최기형성시험(Hashimoto 등, 1990)에서도 나타난 소견으로서 시험물질의 약리학적 작용에 의해 야기된 적색비수(red pulp)의 증가의 결과이며, 본 시험물질에 의한 특이적인 독성증상으로는 사료되지 않았다.

한편 LB00014의 랫드 6개월 정맥투여 만성독성시험(송, 1997)에서 부검시 측정된 적혈구용적(hematocrit)은 암컷동물의 경우 0, 15, 60, 240 및 960 mg/kg 투여군의 순으로 각각 39.5, 43.7, 56.5, 71.8 및 79.6%로 용량상관성있게 높게 나타났으며 비장중량의 증가를 동반하였다. 본 시험에서도 비장중량이 증가한 것으로 미루어 보아 시험물질의 투여에 따른 약리작용의 결과로 적혈구의 생성이 급격히 증가한 것으로 판단된다.

모동물의 제왕절개시 3,000 IU/kg 투여군에서 관찰된 흡수배자수의 증가와 그에 따른 생존태자수의 감소는 시험물질의 직접적인 영향 때문이 아니라 적혈구의 증가에 따른 혈액점도의 증가가 태반의 혈액순환장애, 즉 태반을 통한 혈액공급의 감소를 일으켜서 배자의 사망을 유도한 것으로 추정된다.

태자의 골격점사시 관찰되는 골화지연은 태자의 체중감소와 마찬가지로 시험물질에 기인한 태자의 자궁내 발육지연 효과로서 평가된다. 그 동안 정상태자에 있어서의 태자체중과 골화점수의 상관성에 관한 일련의 보고(Ariyuki 등, 1982; Chung 등, 1993)와 기형유발물질에 의한 태자체중의 감소 및 골화지연이 다수 보고된 바 있는데(Knight와 Roe, 1978; Kim 등, 1994), 본 시험에서는 특이하게도 600 및 3,000 IU/kg 투여군에서 태자체중의 감소없이 몇몇 골격부위에서 골화점수의 감소가 발견되었으며, 특히 좌골 및 치골의 무골화, 후두상골의 골화지연, 흉골분절 및 천미추수의 감소 등과 같은 골화지연이 높은 빈도로 관찰되었다. 그런데 이같은 시험결과를 현재 상품화되어 있는 유사물질의 시험에서도 관찰되었는데, EPOCH의 랫드 최기형성시험(Igarashi 등, 1990)에서는 태자체중의 감소(1, 10 및 100 µg/kg 투여군)와 함께 흉골분절 및 천미추수의 감소, 두정간골의 골화지연과 같은 골화지연(10 및 100 µg/kg 투여군)이 관찰되었고 TYB-5220의 랫드 최기형성시험(Hashimoto 등, 1990)에서는 태자체중의 감소 및 천미추수의 감소(1.3 및 13 µg/kg 투여군)가 발견되었다. 그런데 상기한 태자의 골화지연은 배자의 사망과 마찬가지로 시험물질에 의한 혈액점도의 증가가 직접적인 원인으로 추정된다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 본 시험조건하에서 LB00014는 랫드에 있어서 기형을 유발하지 않았으며 무해용량(no observed adverse effect level)은 모동물에 있어서 3,000 IU/kg 이상 그리고 F1 태자에 있어서 120 IU/kg 이라고 사료된다.

## 감사의 말씀

시험물질 LB00014를 제공해주신 (주)LG화학과 본시험을 수행하는데 기술적인 도움을 주신 최규갑, 이상준 씨 그리고 통계처리 및 자료정리를 맡아주신 황선구 씨께 감사드립니다.

## 참고문헌

- Ariyuki, F., Ishihara, H., Higaki, K. and Yasuda, M. (1982). A study of fetal growth retardation in teratological tests: Relationship between body weight and ossification of the skeleton in rat fetuses. *Teratology* **26**, 263-267.
- Chung, M. K., Kim, J. R., Han, S. S. and Roh, J. K. (1993). Relationship between fetal weight and ossification of Ktc: ICR mice and Ktc:SD rats. *Korean J. Lab. Ani. Sci.* **9**(1), 57-64.
- Dawson, A. B. (1926). A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with Alizarin red S. *Stain. Technol.* **1**, 123-124.
- Fisher, J. W. (1993). Recent advances in erythropoietin research. *Prog. Drug Res.* **41**, 293-311.
- Hashimoto, Y., Kaneko, Y., Ishizuka, Y. and Mizutani, M. (1990). Reproduction and developmental toxicity study of TYB-5220(2)-teratogenicity study of TYB-5220 by intravenous injection in rats. *藥理と治療* **18**(Suppl. 5), 247-263.
- Igarashi, S., Watanabe, K., Sugiyama, O., Watanabe, S., Ebihara, Y. and Usami, M. (1990). Teratological study of EPOCH in rats. *臨床醫藥* **6**(Suppl. 2), 429-449.
- Jacobs, K. (1985). Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* **313**, 806-810.
- 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.
- Kim, J. C., Chung, M. K., Jun, M. H. and Han, S. S. (1994). Embryotoxic effects of ochratoxin A and amelioration by phenylalanine in rats. *Korean J. Toxicol.* **10**(2), 193-206.
- Knight, E. and Roe, D. (1978). Effect of salicylamide and protein restriction on the skeletal development of the rat fetus. *Teratology* **18**, 17-22.
- 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 in rats. *Korean J. Toxicol.* **10**, 237-241.
- Mino, T., Sugino, T., Hiraoka, Y. and Hayashi, H. (1990). Erythropoietic effect of TYB-5220 in normal and renal anemic rats. *藥理と治療* **18**(Suppl. 5), 939-952.
- Morita, H., Ariyuki, F., Inomata, N., Nishimura, K., Kagegawa, Y., Miyamoto, M. and Watanabe, T. (1987). Spontaneous malformations in laboratory animals: Frequency of external, internal and skeletal malformations in rats, rabbit

- and mice. *Cong. Anom.* **27**, 147-206.
- Nishimura, K. (1974). A microdissection method for detecting thoracic visceral malformations in mouse and rat fetuses. *Cong. Anom.* **14**(1), 23-40.
- Palmer, A. K. (1972). Sporadic malformation in laboratory animals. *Adv. Exp. Med. Biol.* **27**, 48.
- Wilson, J. G. (1965). Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals In *Teratology; Principles and Techniques* (Wilson J. G. and Warkany J., eds), p. 262-277. The university of Chicago press, Chicago and London.
- 국립보건안전연구원 (1994). 의약품등의 독성시험기준, 국립보건안전연구원 예규 제 94-3호.
- 송시환 (1997): LB00014의 팻트에 있어서 26주간 반복 정맥내투여 만성독성시험 (S-615), 한국화학연구소 안전성연구센터 pp. 1-435.