

## YHB216의 토끼에서 국소독성시험 및 마우스에서 소핵시험

강민정\* · 김미영 · 박명규 · 김봉태 · 안경규 · 최연식 · 문병석 · 이종욱  
(주)유한양행 중앙연구소

### Study on Local Irritation in Rabbits and Micronucleus Test in Mice with YHB216

Min Joung Kang\*, Mi Young Kim, Myeong Kyu Park, Bong Tae Kim, Kyoung Kyu Ahn,  
Yeon Shik Choi, Byoung Seok Moon and Jong Wook Lee

Yuhan Research Institute, Yuhan Corporation, 27-3, Dangjeong-Dong, Gunpo-Si,  
Kyonggi-Do 435-715, Korea  
(Received February 7, 2002)  
(Accepted March 9, 2002)

**ABSTRACT** : YHB216 is one of new recombinant human erythropoietins (rHu-EPO) developed by Yuhan Research Institute. The rHu-EPO products are widely being used for the treatment of various types of anemia. As a series of safety studies on YHB216, we performed the local irritation test (dermal & ocular application) in male New Zealand White rabbits and micronucleus test in male ICR mice. In the skin irritation test, 0.5 ml of YHB216 10,000 IU/ml solution was applied to the back skin of rabbits for 24 hours and subsequent observation was performed. There was no induced response after the treatment and the primary irritation index (P.I.I.) was '0'. In the eye irritation test, 0.1 ml of YHB216 10,000 IU/ml solution was instilled into the conjunctiva of the eye. No treatment-related reaction was observed at the cornea, iris, and conjunctiva. In the micronucleus test, YHB216 was administered intravenously to male mice (6 mice per group) at dose levels of 0, 6,250, 12,500, and 25,000 IU/kg. Bone marrow cells were collected at 24 hours after the treatment. YHB216 treated groups showed no significant difference in the P/N (polychromatic erythrocyte/normochromatic erythrocyte) ratio and in the number of micronucleated polychromatic erythrocyte compared with the control. In conclusion, YHB216 was found to be a non-irritating material up to 10,000 IU/ml in the local irritation test and to be a non-mutagen up to 25,000 IU/kg in the micronucleus test.

**Key Words** : YHB216, rHu-EPO, Local irritation, Micronucleus test, Rabbits, Mice

#### I. 서 론

시험물질 YHB216은 (주)유한양행 중앙연구소에서 sialic acid 함량 증가 무단백 배양기술 및 유전자 재조합 기술을 이용하여 Chinese hamster ovary(CHO) 세포에서 생산한 새로운 유전자 재조합 인형 다당쇄 에리스로포이에틴(recombinant human erythropoietin, rHu-EPO) 제제이다.

에리스로포이에틴(erythropoietin, EPO)은 신장피질부의 관주위 간질세포(peritubular interstitial cell; Maxwell 등, 1990) 또는 관상세포(tubular cell; Koury 등, 1988)에서 생성되는 분자량 30,400 dalton의 165개 아미노산으로 구성된 내분비성 당단백질(glycoprotein)로 적혈구 전구세포에

작용하여 적혈구의 분화 및 증식을 촉진하는 역할을 담당한다(Eschbach와 Adamson, 1989; Ridley 등, 1994). EPO는 1977년 재생불량성 빈혈환자의 오줌으로부터 최초 순수 정제되었으나 원료수급의 어려움 때문에 널리 보급되지 못하다가 Jacobson 등(1957)과 Lin 등(1985)에 의해 유전자 클로닝이 성공함에 따라 유전자 재조합 EPO의 대량 생산이 가능하게 되었다.

그 후, 개발된 많은 rHu-EPO 제제들은 현재 만성 신부전과 관련된 빈혈, 혈우병 환자, HIV 환자에서 2차적으로 유발되는 빈혈 및 조산에 의한 빈혈 등에 효과가 있는 것으로 보고되었다(Vreundenhil 등, 1993; Fisher, 1993). 또한, 임상적으로 암환자에서 cisplatin 투여에 의해 유도된 만성 신질환성 빈혈과 같은 항암화학요법에 의한 빈혈, 만성 빈혈, 신성 빈혈, 말기 신장병(end stage renal disease),

\*To whom correspondence should be addressed

자가 수혈 및 재생불량성 빈혈 등에 널리 사용되고 있다 (Mino 등, 1990; Okumura 등, 1990).

새로운 빈혈 치료제로 기대되는 YHB216은 임상에서 정맥내로 반복투여될 예정이므로 피부 또는 점막에 노출될 가능성이 있고 염색체이상을 유발할 수 있다. 따라서, YHB216의 국소자극성과 생체내 염색체이상 유발성을 평가하기 위하여 토끼를 이용한 국소독성시험(피부자극시험 및 안점막자극시험)과 마우스를 이용한 소핵시험을 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시험물질

(주)유한양행 중앙연구소에서 조제한 냉장 보관된 무색 투명한 액상의 시험물질 YHB216은 165개의 천연형 인간 EPO와 동일한 아미노산 서열로 이루어져 있고 약 40%의 당을 함유하고 있으며 에포틴 알파(epotin  $\alpha$ ) 형태이다. 시험물질조제액은 YHB216(Lot No. 9903)에 부형물질을 가하여 희석법으로 조제하였다. 부형물질로는 0.9 l의 멸균증류수에 1.164 g의 인산이수소나트륨(sodium phosphate, dibasic)과 2.225 g의 인산일수소나트륨(sodium phosphate, monobasic)을 넣어 제조한 sodium phosphate 완충용액에 등장화제로 5.84 g의 염화나트륨과 안정화제로 20% 농도의 인혈청알부민 (human serum albumin)을 12.5 ml 첨가한 다음 pH를 7.0으로 조정하고 최종부피가 1 l가 되도록 조성된 수용액을 사용하였다.

### 2. 토끼에서의 국소독성시험

#### 1) 시험계 및 사육환경

(주)삼육실험동물연구소로부터 약 3개월령의 수컷 New Zealand White(NZW) 토끼 25마리를 구입하여 1주일간 적응사육한 후, 육안관찰을 통해 건강한 시험계 21마리를 선발하여 본 시험에 사용하였다. 시험개시시 시험계의 체중은 2.3~2.8 kg 이었고, 선발된 시험계는 난수표를 이용하여 무작위로 균분리하였으며, 시험계는 사육상자당 1마리씩 배치하였다. 또한, 시험계마다 유성매직으로 귀의 안쪽에 번호를 표시하여 개체식별을 하였고, 군간의 혼동을 피하기 위하여 각 철망사육상자(45° $\phi$ 50 $\times$ 50 cm, 명진기기상사)마다 시험번호, 군, 성별 및 개체번호를 표기한 식별카드(label)를 부착하였다.

시험계를 수용하는 사육구역의 환경조건은 시험종료시까지 온도 23 $\pm$ 5°C, 상대습도 40~60%, 환기회수 10회 이상/시간, 암모니아농도 20 ppm 이하, 평균조도 150~300 lux, 소음 60 phone 이하 및 12시간 주기의 명암간격을 유

지하였으며, 모든 시험계에 대하여 (주)퓨리나사료에서 제조한 실험동물용 고행펠릿사료와 필터 및 유수살균기를 통하여 여과·살균된 수도물을 자동급수장치를 통하여 공급하였다.

#### 2) 투여량의 설정

도포 및 점안 용량은 YHB216의 임상사용 최대 예상용량인 10,000 IU/ml로 설정하였다. 또한, 도포 및 점안액량은 '의약품 등의 독성시험기준(식품의약품안전청, 1999)'에 따라 각각 0.5 및 0.1 ml로 설정하였다.

#### 3) 피부자극시험

시험계는 용매대조군 및 시험물질투여군 각각 6마리씩 총 12마리를 사용하였다. 시험물질 도포 24시간 전 및 시험물질 도포 직전에 시험계의 등부위 털을 제모기로 상치가 나지 않도록 완전히 제모한 후, 제모된 시험계의 등피부 좌우측에 2.5 $\times$ 2.5 cm 정도의 크기로 정상피부(비찰과 피부) 2개소와 슬라이드글라스로 각질층만 벗겨낸 손상피부(찰과피부) 2개소를 Fig. 1과 같이 표시하였다.

시험계의 좌측피부는 무처치대조군으로 사용하였고, 우측피부에는 부형물질 및 시험물질을 각각 1회 도포하였다. 도포 후에 가아제를 덮고 시험물질의 증발을 막기 위해 침습성과 반응성이 없는 고행재질의 비닐을 대고 반창고로 고정한다. 다음, 부착물의 이탈을 방지하기 위하여 보호대를 착용시켰다.

시험물질 도포 후 24시간째에 반창고, 비닐 및 가아제를 제거하고 도포부위를 증류수로 세척한 다음 홍반과 가피의 형성여부 및 부종형성여부를 관찰하였고, 72시간째에도 같은 방법으로 적용부위의 피부반응을 관찰하였다. 피부반응의 결과는 '의약품 등의 독성시험기준(식품의약품안전청, 1999)'에서 정한 피부반응의 평가표에 따라 판정하였다. 24시간과 72시간째의 홍반과 가피의 형성 점수와

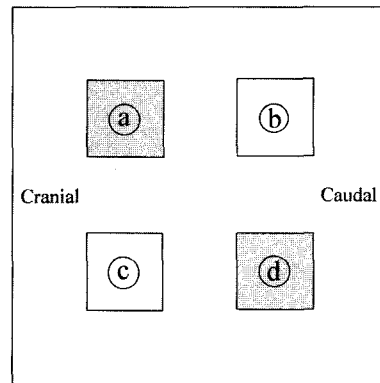


Fig. 1. Experimental region to rabbit back skin. ①: test site (abraded), ②: test site (non-abraded), ③: non-test site (non-abraded), ④: non-test site (abraded).

**Table 1.** Evaluation of primary skin irritation in rabbits

Classification	Primary irritation index (P.I.I.)
Non-irritant	0~0.5
Slightly irritant	0.6~2.0
Moderately irritant	2.1~5.0
Severely irritant	> 5.1

부종의 형성 점수들에 대한 평균을 구하고, 이들 8개 평균의 합을 4로 나눈 값을 '1차 피부자극지수(Primary irritation index, P.I.I.)'로 하여 Table 1에 따라 그 정도를 구분하였다(Draize 등, 1994; Patrick과 Maibach, 1994).

#### 4) 안점막자극시험

시험계는 세척군 3마리 및 비세척군 6마리로 총 9마리를 사용하였다. 시험물질 점안 24시간 전에 육안 및 검안경(ophthalmoscope)을 이용한 안과학적 검사를 실시하여 시험계 안구의 각막, 홍채 및 결막이 정상임을 확인하였다. 9마리의 시험계 우측 안점막에 시험물질조제액을 각각 1회 직접 점안한 다음, 그 중 3마리는 20~30초 후 양쪽 눈에 미온 무균생리식염수 20 ml로 1분간 세안하고, 나머지 6마리는 세안하지 않았다.

시험계의 우측 안점막에 시험물질을 점안한 후 1, 2, 3, 4 및 7일에 시험물질을 점안하지 않은 좌측 안점막(무처리 대조군)을 대조로 하여 각막의 혼탁 및 혼탁된 각막의 범위, 홍채의 반응, 결막의 발적, 부종 및 배출물 유무의 변화를 육안 및 검안경을 이용하여 관찰하였다.

결과는 '의약품 등의 독성시험기준(식품의약품안전청, 1999)'에서 정한 '안구병변의 등급표'에 따라 안구의 각막 반응에 최대 80점, 홍채 반응에 최대 10점, 결막 반응에 최대 20점을 주어 총점이 최대 110점으로 안점막 자극 반

**Table 2.** Scale for interpretation of ocular irritation evaluations

Classification	Values of indices		
	I.A.O.I.	M.I.O.I.	Day-7 I.I.O.I.
Non-irritant	0~5	0 after 48 hrs	
Slightly irritant	5~15	≤ 5 after 48 hrs	
Irritant	15~30	≤ 5 after 48 hrs	
Moderately irritant	30~60	≤ 20 after 7 days	≤ 30 in all 6 rabbits ≤ 10 in at least 4/6
Severely irritant	60~80	≤ 40 after 7 days	≤ 60 in all 6 rabbits ≤ 30 in at least 4/6
Extremely irritant	80~110		

응을 평가하였다. 관찰결과의 판정은 각각의 판정일 각 마리 총점(The individual index of ocular irritation, I.I.O.I.)의 합을 마리수로 나눈 평균 값인 평균안구자극지수(Mean index of ocular irritation, M.I.O.I.), 관찰기간 중 M.I.O.I.의 최대값인 급성안구자극지수(The index of acute ocular irritation, I.A.O.I.) 및 점안한 후 7일째의 I.I.O.I.의 값으로 시험물질의 안점막 자극 정도를 Table 2의 '안점막자극표'에 의해 구분하여 평가하였다(Ballantyne, 1993; Draize 등, 1994).

### 3. 마우스에서의 소핵시험

#### 1) 시험계 및 사육환경

(주)유한양행 중앙연구소에서 번식 사육한 약 6주령의 수컷 Crj:CD-1(ICR) 마우스 50마리를 1주일간 적응사육한 후, 육안관찰을 통해 건강한 시험계만을 선발하여 군당 6마리씩 총 30마리를 시험에 사용하였다. 시험계마다 꼬리 색소도포법으로 표식하여 개체식별을 하였으며, 군간의 혼동을 피하기 위하여 시험군별로 폴리카보네이트 사육상자

**Table 3.** Skin irritation in New Zealand White rabbits treated with YHB216

Test compound	Vehicle								YHB216 (10,000 IU/ml)								
	Erythema & Eschar				Edema				Erythema & Eschar				Edema				
	Intact		Abraded		Intact		Abraded		Intact		Abraded		Intact		Abraded		
Hours	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	
Animal No. 1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
2	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
3	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
4	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
5	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
6	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Total	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Mean	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P.I.I. <sup>a</sup>	0								0								

Each values are grades of skin irritation, marked as the left(non-treatment)/right(treatment).

<sup>a</sup>Primary irritation index: the sum of means in erythema & eschar and edema/4.

(42×26×18 cm, 명진기기상사)마다 시험번호, 군, 성별 및 개체번호를 표기한 라벨을 부착하였고, 시험계는 사육 상자당 6마리씩 수용하였다.

시험계를 수용하는 사육구역의 환경조건은 시험종료시 까지 온도 23±2°C, 상대습도 40~60%, 환기회수 10회 이상/시간, 암모니아농도 20 ppm 이하, 평균조도 150~300 lux, 소음 60 phone 이하 및 12시간 주기의 명암간격을 유지하였으며, 모든 시험계에 대하여 (주)삼양유지사료에서 제조한 실험동물용 고품펠렛사료와 필터 및 자외선유수살균기를 거쳐 여과·살균된 수도물을 멸균된 물병에 담아 수동공급하였다.

## 2) 시험방법

YHB216의 설치류 및 비설치류에서 정맥내 단회투여 독성시험 결과에 따라 사람의 1일 임상추정량(50~100 IU/kg/day)의 약 250~500배인 25,000 IU/kg을 최고용량으로 설정하고, 이 용량에서 표본제작시기를 결정하기 위한 예비시험을 실시하였다. 예비시험결과 각 시간대별(투여 후 24, 48 및 72시간) 소핵의 계수결과에서 차이가 없었으므로, 본 시험에서는 투여 후 24시간째를 골수세포의 수거시간으로 설정하였으며, 투여용량은 0, 6,250, 12,500 및 25,000 IU/kg으로 설정하였다.

YHB216은 임상에서 정맥내 투여가 예상되는 약물임

**Table 4.** Eye irritation in New Zealand White rabbits treated with YHB216

Group	Animal number	Tissue	Left (non-treatment) time after application (day)					Right (treatment) time after application (day)						
			1	2	3	4	7	1	2	3	4	7		
YHB216 10,000 IU/ml (irrigation)	1	Cornea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Iris	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2	Cornea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Iris	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	3	Cornea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Iris	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Total		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	M.I.O.I. <sup>a</sup>		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	I.A.O.I. <sup>b</sup>		0					0						
	YHB216 10,000 IU/ml (non-irrigation)	4	Cornea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			Iris	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5		Cornea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Iris	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
6		Cornea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Iris	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
7		Cornea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Iris	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
8		Cornea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Iris	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
9	Cornea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Iris	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Total		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
M.I.O.I. <sup>a</sup>		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
I.A.O.I. <sup>b</sup>		0					0							

<sup>a</sup>Mean index of ocular irritation : Total score in each observation time/no. of animal.

<sup>b</sup>The index of acute ocular irritation : The maximum value of M.I.O.I. during the observation time.

**Table 5.** The results of micronucleus test in mice administered intravenously once with YHB216

Test compound	Dose (IU/kg)	Exposure time (hr)	No. of animals	MNPCE <sup>a</sup> (%)	PCE/(PCE + NCE) <sup>b</sup> (%)	PCE/NCE
Vehicle <sup>c</sup>	-	24	6	1.25±0.52	47.37±3.92	0.91±0.15
YHB216	6,250	24	6	0.67±0.61	39.67±4.39	0.67±0.13
	12,500	24	6	1.00±0.84	42.40±4.42	0.74±0.13
	25,000	24	6	0.92±0.80	42.73±6.29	0.76±0.18
Mitomycin C	2 mg/kg	24	6	52.75±7.20*	40.40±7.18	0.70±0.20

<sup>a</sup>The permillage of micronucleated polychromatic erythrocyte (PCE) was calculated from 2,000 PCEs per animal.

<sup>b</sup>The percentage of PCE was calculated from 500 erythrocytes per animal.

<sup>c</sup>Formulated buffer.

\* $p < 0.001$ : Significantly different from vehicle control, Chi-square ( $\chi^2$ ) test.

로 각각의 시험물질조제액 및 부형물질은 1회 정맥내 투여하였으며, 양성대조물질인 mitomycin C는 2 mg/kg 투여용량으로 1회 복강내 투여하였다. 모든 시험군의 투여액은 10 ml/kg으로 설정하였다. 투여 후 24시간째에 시험계를 경추탈구법으로 안락사시키고, 좌우대퇴골을 적출하여 거즈로 근육질을 깨끗이 제거한 후, 그 양끝단을 가위로 절단하여 소 태자 혈청(fetal bovine serum)이 1 ml씩 충전된 주사기를 이용하여 골수세포를 원심분리용 튜브에 씻어 냈다. 원심분리(1,000 rpm×10 min) 후에 상층액을 버리고, 그 침전물을 잘 현탁시켜 슬라이드 글라스에 도말 건조하고 메탄올에 5분간 고정한 후, 10% Giemsa액(인산염 완충액, pH 6.8)에서 30분간 염색하여, 커버 글라스로 봉입하였다.

계수는 광학현미경(Microphot Fx, Nikon, Japan, ×1,000 배)을 이용하여 실시하였다. 세포직경의 1/5~1/20 크기로 주변 유헤세포의 염색상과 동일한 것을 소핵으로 간주하였으며, 각 개체당 2,000개의 다염성적혈구(polychromatic erythrocyte, PCE) 중 소핵다염성적혈구(micronucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE) 수와 골수세포의 증식억제지표로서 500개의 총 적혈구[PCE와 정염성적혈구(normochromatic erythrocyte, NCE)의 합] 중 PCE 수를 각각 계수하였다.

소핵시험결과는 Hayashi 등(1994)의 3단계법을 적용하여 분석하였고, PCE/(PCE + NCE) 비율에 대한 용매대조군과 시험물질투여군간의 유의성은 Students t-test법으로 검정하였다. 결과의 판정은 MNPCE수가 통계학적으로 유의하게 용량의존적으로 증가하거나 하나 이상의 용량단계에서 재현성 있게 양성반응을 나타낼 경우를 양성으로 하고, PCE/(PCE + NCE) 비율이 30% 이하로 억제되었을 때를 조혈기능억제 등의 세포독성이 있다고 판정하였다.

### III. 결 과

#### 1. 토끼에서 국소독성시험

적용부위의 피부반응 관찰결과, 시험물질 및 부형물질

도포 후 24 및 72시간이 경과한 시점에서 피부반응은 전혀 없었으며(Table 3), 적용부위의 안점막반응 관찰결과에서도 점안 후 1, 2, 3, 4 및 7일에 시험물질 점안에 의한 각막, 홍채 및 결막의 반응은 전혀 관찰되지 않았다(Table 4).

#### 2. 마우스에서 소핵시험

모든 YHB216 투여군에서 MNPCE의 출현빈도 및 PCE/(PCE + NCE) 비율은 용매대조군과 유사하였다. 그러나, 양성대조군에서는 MNPCE의 출현빈도가 용매대조군에 비해 유의하게 증가하였다.

### IV. 고찰 및 결론

시험물질 YHB216은 (주)유한양행 중앙연구소에서 sialic acid 함량 증가 무단백 배양기술을 이용하여 CHO 세포에서 제조한 rHu-EPO 제제이다. YHB216은 항후 임상에서 만성 신부전증, 자가 수혈, 재생불량성 빈혈 및 항암화학요법에 의한 빈혈 등과 같은 다양한 빈혈의 치료제로써 그 사용이 기대된다. 따라서, 본 시험에서는 이에 대한 안전성 평가의 일환으로 토끼에서 국소독성시험 및 마우스에서 소핵시험을 실시하였다.

시험물질 YHB216을 10,000 IU/ml의 농도로 각각 NZW 수컷 토끼의 피부에 1회 도포 및 안점막에 1회 점안하여 국소독성시험을 실시하였다. 피부반응 관찰결과, 토끼의 피부에 시험물질 및 부형물질을 도포한 후 24시간 및 72시간이 경과하였을 때, 정상 및 손상피부 모두에서 피부반응은 전혀 관찰되지 않았으며, P.I.I.의 산출결과는 '0'이었다. 안점막에 시험물질을 점안한 후 1, 2, 3, 4 및 7일에 안과학적 검사를 실시한 결과, 모든 개체의 각막, 홍채 및 결막에서 병변이 전혀 나타나지 않았으며, 따라서 M.I.O.I. 및 I.A.O.I.는 모두 '0'이었다. 이러한 결과는 Kim 등(1996)이 CHO 세포를 이용하여 생산한 DA-3285와 Cho 등(1998)이 baby hamster kidney(BHK) 세포를 이용하여 생산한 DA-3585의 국소독성시험에서 각각의 시험물질이 10,000 IU/ml 농도에서 특이한 국소자극성을 나타나지 않

았다는 보고와 일치하였다. 또한, Kawasaki 등(1988)이 실시한 KRN5702의 국소독성시험에서 특이한 이상이 발견되지 않았다는 결과와도 일치하였다.

Crij:CD-1(ICR) 암·수 마우스에 시험물질 YHB216을 0, 6,250, 12,500 및 25,000 IU/kg의 용량으로 1회 정맥내 투여하고, 양성대조물질 mitomycin C는 2 mg/kg의 용량으로 1회 복강내 투여하여 소핵시험을 실시하였다. 시험결과, YHB216 투여군의 MNPCE 출현빈도는 용매대조군의 출현빈도와 유사하였고, 또한 Hart와 Engberg-Pederson (1983)이 제시한 소핵생성의 일반적인 정상범위(1.67±1.11%)에 포함되었다. 이러한 결과는 epotin  $\alpha$ 와 epotin  $\beta$ 가 소핵시험에서 MNPCE를 유발하지 않았다고 발표한 시험결과와 일치하였다(Inoue 등, 1990; Sutou 등, 1988). PCE/(PCE + NCE) 비율의 경우, YHB216 투여군에서 용매대조군에 비해 다소 감소하였으나 통계학적 유의성은 없었으며, 30% 이상의 비율을 나타내는 것으로 보아 YHB216에 의한 세포독성 가능성은 없는 것으로 판단되었다. 한편, 양성대조군에서는 MNPCE의 출현빈도가 용매대조군에 비해 현저히 증가하였다(MacGregor 등, 1990). 모든 YHB216 투여군의 PCE/NCE 비율은 용매대조군의 결과와 일반적인 PCE/NCE 비율(0.97±0.22)을 고려할 때(Hart와 Engberg-Pedersen, 1983), 통계학적 유의성은 없었으나 다소 감소되었다. 이와 같은 시험결과는 동일계열 약물인 KRN5702 및 EPOCH의 소핵시험결과와(Inoue 등, 1990; Sutou 등, 1988) 일치하며, 이러한 이유는 rHu-EPO 투여시 골수내에서 적아구계 세포의 분화 및 증식이 활성화되어 성숙한 골수세포내의 PCE가 빠르게 혈중으로 방출되어 골수내 PCE 수는 감소되는 반면 말초혈액은 보상성으로 골수내로 이동하여 골수내에는 NCE 수가 증가됨으로써 결과적으로는 PCE/NCE 비율이 감소되는 것으로 알려져 있다(Inoue 등, 1990; Suzuki 등, 1989). 따라서, 본 시험결과에서 관찰된 PCE/NCE 비율의 감소도 세포독성 작용이라기보다는 rHu-EPO의 약리작용에 의한 것으로 판단된다.

이상의 시험결과를 종합해 볼 때, 시험물질 YHB216은 임상사용 최대 예상용량인 10,000 IU/ml 농도에서 피부 및 안점막에 대한 자극이 없는 비자극성(non-irritant) 물질이며, 마우스 소핵시험에서 유전독성이 없는 것으로 판단된다.

## 참고문헌

- Ballantyne, B. (1993): Ophthalmic toxicology in General & Applied Toxicology (Ballantyne, B. ed), M. Stockton Press, New York, pp. 567-593.
- Cho, H., Kim, D.H., Kang, K.K., Park, J.H., Lee, S.H. and Kim, W.B. (1998): Studies on local irritation of DA-3585, a recombinant human erythropoietin, in rabbits. *J. Toxicol. Pub. Health*, **14**, 393-400.
- Draize, J.H., Woodward, G. and Calvery, H.O. (1994): Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **82**, 377-390.
- Eschbach, J.W. and Adamson, J.W. (1989): Guidelines for recombinant human erythropoietin therapy. *Am. J. Kidney Dis.*, **14**, 2-8.
- Fisher, J.W. (1993): Recent advances in erythropoietin research. pp. 293-311. in: Progeress in Drug Research. Vol. 41. eds. Ernst Jucker, Birkhauser Verlag Basel, Switzerland. pp. 293-331.
- Hart, J.W. and Engberg-Pedersen, H. (1983): Statistics of mouse bone-marrow micronucleus test: counting, distribution and evaluation of results. *Mutation Research*, **111**, 195-207.
- Hayashi, M., et al. (1994): Statistical analysis of data in mutagenicity assays; rodent micronucleus assay. *Environ Health Perspect.*, **102**, 49-52.
- Inoue, M., Horiuchi, K., Fukuda, T., Fukuda, A., Yano, M., Matsuoka, Y., Koizumi, T., Kojima, Y. and Satoh, T. (1990): Mutagenicity test on EPOCH. *臨床醫藥*, **6**, 489-497.
- Jacobson, L.O., Goldwasser, E., Fied, W. and Plzak, L. (1957): Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature*, **179**, 633-634.
- Kawasaki, H., et al. (1988): Primary eye irritation study of KRN5702 in rabbits. *The Clinical Report*<sup>®</sup>, **22**, 349-355.
- Kim, H.S., Kwack, S.J., Chun, S.A., Lim, S.Y., Ahn, M.Y., Kim, W.B., Kim, B.M., Ahn, B.O., Suh, D.S. and Lee, B.M. (1996): Genotoxic evaluation of recombinant human erythropoietin (rHu-EPO) in short-term assays. *Environmental mutagens & Carcinogens*, **16**, 103-108.
- Koury, S.T., Bondurant, M.C. and Koury, M.J. (1998): Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization. *Blood*, **71**, 524-527.
- Lin, F.K., Suggs, S., Lin, C.H., Browne, J.K., Smalling, R., Egrie, J.C., Cjen, K.K., Fox, G.M., Martin, F., Stabinsky, Z., Bdrawi, S., Lin, P.H. and Goldwasser, E. (1985): Cloning and expression of human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **49**, 807-815.
- MacGregor, J.T., et al. (1990): The *in vivo* erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **14**, 513-522.
- Maxwell, A.P., Lappin, T.R. J., Johnston, C.F., Bridges, J.M. and McGeown, M.G. (1990): Erythropoietin production in kidney tubular cells. *Brit. J. Hematol.*, **74**,

- 535-539.
- 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.
- 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.
- Patrick, E. and Maibach, H. (1994): Dermatotoxicology in Principles and Methods of Toxicology (Hayes, A.W. ed.), Raven Press, London, pp. 767-803.
- Ridley, D.M., Dawkins, F. and Perlin, E. (1994). Erythropoietin : A riew. *J. Natl. Med. Assoc.*, **86**, 129-135.
- Sutou, S., et al. (1988): Mutagenicity study of KRN5702. *The Clinical Report*<sup>®</sup>, **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.
- Vreundenhil, G., Frenken, L.A.M. and Koene, R.A.P. (1993): Erythropoietin; mechanisms of action and indications for treatment. *Netherlands J. Med.*, **42**, 187-202.
- 식품의약품안전청(1999): 의약품 등의 독성시험기준, 식품의약품안전청 고시 제 1999-61호.
- 식품의약품안전청(2000): 비임상시험관리기준, 식품의약품안전청 고시 제 2000-63호.