

Erythropoietin 檢查法에 關한 研究

서울大學校 醫科大學 內科學教室

趙京杉·盧興圭·李文鎬

=Abstract=

Studies on Erythropoietin Bioassay Method

Kyoung-Sam Cho, M.D., Heung Kyu Ro, M.D. and Munho Lee, M.D.

Department of Internal Medicine, College of Medicine Seoul National University

It is the purpose of this paper to design the most preferable method of erythropoietin bioassay in Korea.

Bioassay utilizing polycythemic mice are currently in general use for the indirect determination of erythropoietin. Assay animals are usually prepared either by transfusion or by exposure to reduced oxygen tension in specially constructed chamber.

We prepared the polycythemic mice by the specially constructed hypobaric chamber. We observed weights and hematocrits of the mice in the hypobaric chamber, then hematocrits and 72 hours ^{59}Fe red cell uptake ratio of the polycythemic mice induced by hypoxia after removal from the hypobaric chamber.

We designed the method of erythropoietin bioassay according to the results obtained by above experiments. Then we measured the 72 hours ^{59}Fe red cell uptake ratio of the polycythemic mice with normal saline, normal plasma and anemic plasma according to the method we designed.

The results are followed:

1. The hematocrits of the mice in hypobaric chamber increased to 74% in 14 days. It is preferable to maintain the pressure of the chamber to 400mmHg for first 4 days then 300mm Hg for last 10 days to reduce the death rate and time consuming in hypobaric chamber.
2. After removal from the hypobaric chamber, the 72-hours ^{59}Fe red cell uptake ratio decreased rapidly and maintained the lowest level from the fourth day to tenth day.
3. We design the method of erythropoietin bioassay according to the results of above experiment and to the half life of erythropoietin.
4. The Korean product ^{59}Fe is mixture of ^{59}Fe and ^{55}Fe . And the ^{59}Fe red cell uptake ratio in normal mice was far less with Korean product ^{59}Fe than with pure ^{59}Fe of foreign product. So it is desirable to use pure ^{59}Fe in this method of erythropoietin bioassay.
5. Considering the cost, the technique, the time consuming and the sensitivity it is the most preferable method of erythropoietin bioassay in Korea using hypobaric chamber to induce the polycythemia.

緒 論

Erythropoietin 은 骨髓에서 赤血球生成을 促進시키는 ฮอร์โมน으로 알려져 있다¹⁻⁴⁾. 이 ฮอร์โมน은 低酸素血症制戟等⁵⁻⁹⁾에 의해 腎臟의 絲球體傍細胞¹⁰⁻¹²⁾에서 만들어지는 것으로 推測되고 있을 뿐 아직 正確한 生成機轉과 生成場所는 알려져 있지 않다^{13,14)}. 뿐만 아니라, 많은 연구노력으로 상당히 純粹한 erythropoietin 을 推출해 내고 있지만¹⁵⁻¹⁷⁾ 正確한 分子量과 構造도 알고 있지 못하고 있다. Erythropoietin 의 測定에는 最近 放射免疫測定法이 試圖되고 있으나^{18,19)} 아직은 間接的 測定法인 生物檢査法이 주로 利用되고 있다.

이런 生物檢査法의 原理는 다음과 같다. 즉 動物自體의 erythropoietin 을 最下로 低下시킨 後, 患者의 血漿 또는 濃縮시킨 尿를 動物體內에 注入시켜 여기에 포함된 erythropoietin 의 作用에 의한 網狀赤血球 또는 ⁵⁹Fe 赤血球攝取率의 增加를 測定하는 것이다. 現在는 ⁵⁹Fe 赤血球攝取率이 훨씬 正確하며 誤差가 적기 때문에 주로 이 方法을 使用한다^{20,21)}. 純粹하게 만든 標準 erythropoietin 을 使用하여 標準曲線을 求한 後 이것을 利用해서 定量分析을 할 수 있다^{20,22-24)}. 現在 使用되는 erythropoietin 의 1unit 는 過去 ESB(erythropoietin standard B)로 불리우던 IRP(international reference preparation) 1.48mg 에 該當한다^{22,24)}. 動物自體의 erythropoietin 을 最下로 低下시키는 方法으로는 一般의 斷食^{25,26)}, 腦下垂體切除^{27,28)}, 輸血 또는 低酸素症으로 赤血球增多症을 誘發시키는 方法^{29,30)} 등이 있으나 이중 赤血球增多症을 만드는 方法이 좀더 正確한 結果를 얻을 수 있는 것으로 알려졌다^{27,35-37)}.

著者들은 低酸素狀態下에서 얻어진 赤血球增多症白鼠를 使用하여 erythropoietin 值를 測定하는 簡便 本實驗에서 使用한 國內製品⁵⁹Fe 의 純粹度を 보기 위해 正常白鼠에 國內製品 ⁵⁹Fe 와 英國製品⁵⁹Fe 를 注入하여 얻은 ⁵⁹Fe 赤血球攝取率을 比較觀察하여 몇가지 成績을 얻었기에 이에 報告하는 바이다.

實驗材料 및 方法

實驗動物로는 11gm 內외의 白鼠 숫놈을 使用하였다. 飼育통은 完全密閉시킬 수 있고, 上部는 透明板으로 만들어 內部를 들여다 볼 수 있게 하였고 氣壓計를 設置하여 恒時 內部의 氣壓을 알 수 있게 하였다. 低氣壓을 만들기 위해 1/12馬力の 眞空펌프를 使用하였다. 이 펌프로는 通內의 氣壓을 250mmHg 정도까지 低下시킬

수 있었다.

白鼠를 飼育하는 全期間은 14日이었으며 每日 23時間을 持續的으로 低氣壓을 維持시켰고 1時間동안은 飼料를 갈아주고 白鼠의 體重 및 赤血球容積을 測定하는데에 使用했다. 赤血球容積을 測定한 白鼠는 飼育통에서 除外하였다. 飼育期間中 처음 4日間은 飼育通內의 氣壓을 400mmHg 로 維持시켰고 이후 10日間은 300mmHg 로 維持시켰다. 白鼠의 體重은 매일 測定하여 平均値를 내었고 赤血球容積은 2~3日 間隔으로 3마리를 測定하여 平均値를 내었다.

赤血球增多症이 14日間의 飼育으로 誘發된 白鼠를 飼育통에서 正常氣壓下로 꺼낸 뒤에는 매일 3마리씩 赤血球容積과 72時間 ⁵⁹Fe 赤血球攝取率을 測定하였다. ⁵⁹Fe 赤血球攝取率은 0.2cc, 0.5μCi 의 ⁵⁹Fe 를 腹腔內로 注射한 後 72時間에 白鼠의 頸動脈을 切斷하여 0.2cc 의 血液을 採取하여 ⁵⁹Fe放射活性度를 測定하고 다음과 같은 式에 의해 計算하였다.

$$72時間\ ^{59}Fe\ 赤血球攝取率 = \frac{cpm\ of\ 1ml\ blood \times blood}{cpm\ of\ injected\ ^{59}Fe\ volume^*}$$

$$*blood\ volume = body\ weight\ of\ mouse \times 0.07$$

위의 式은 erythropoietin 測定時에도 같이 利用하였다.

本實驗의 結果에 의해 試圖된 erythropoietin 測定方法을 圖示하면 Fig. 1과 같다. 14日間 低氣壓飼育통에서 飼育하여 赤血球增多症이 된 白鼠를 正常氣壓下로 꺼낸 第4日과 5日에 각각 1回씩 血漿 또는 生理食鹽水 0.5cc 를 皮下로 注射하고 第6日에 0.2cc, 0.5μCi ⁵⁹Fe 를 腹腔內로 注射한다. 다음 72時間이 지난 第9日에 白鼠의 脛動脈을 切斷하여 血液을 採取하고 72時間 ⁵⁹Fe 赤血球攝取率과 赤血球容積을 測定하였다. 한 患者의 erythropoietin 을 測定하기 위해 4마리의 赤血球增多症白鼠를 使用하였으며 第9日까지 赤血球容積이 52%以上인 白鼠의 ⁵⁹Fe 赤血球結合率만을 測定結果로 使用하였다.

위의 實驗에는 國內製品(原子力研究所)인 ⁵⁹Fe를 使用하였다.

國內製品과 英國製品(Amersham)의 差異를 比較하기 위한 實驗에서도 위에서와 마찬가지로 0.2cc, 0.5μCi ⁵⁹Fe 를 腹腔內로 注射하였으며 이때는 24時間, 48時間 및 72時間의 ⁵⁹Fe 赤血球攝取率을 測定하였다. 同時에 ⁵⁹Fe 를 注射하기 前 2日間 매일 0.5cc 生理食鹽水を 皮下注射한 白鼠와 아무 것도 處置않은 白鼠에서도 같은 方法을 取하였다.

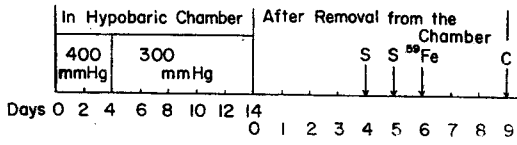


Fig. 1. Total schedule of erythropoietin bioassay.
 S : Sample inject. S.C. 0.5ml
⁵⁹Fe : ⁵⁹Fe inject. I.P. 0.5uCi (0.2ml)
 C : Counting for ⁵⁹Fe Uptake and Hematocrit

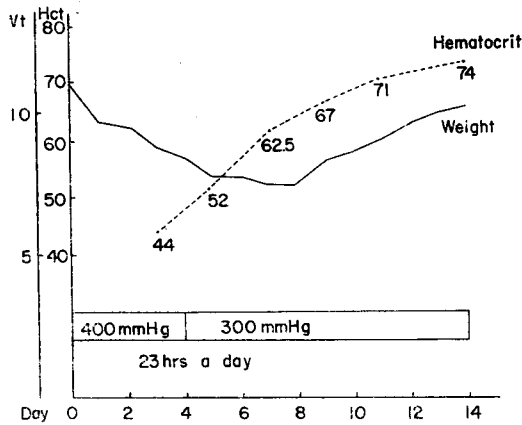


Fig. 2. Hematocrit and weight changes of mice in hypobaric chamber.

實驗成績

1. 低氣壓飼育통에서 14日間 飼育하는 동안의 體重 및 赤血球容積의 變化를 보면 Fig. 2에서 보는 바와같이, 體重은 初日 11gm 内外에서 減少하기 시작해서 第 6日~8日에는 8gm 内外로 약 1/4이 減少하였으나 이후부터는 점차 增加하기 시작하여 飼育통에서 나올 때 거의 元來의 體重에 到達하였다.

赤血球容積은 第 3日에는 44%였으나 以後부터 增加하기 시작하여 第 5日에는 52%, 第 7日에는 62.5%, 第 9日에는 67%, 第 11日에는 71%에 到達했고 飼育통에서 꺼내는 날에는 74%에 達했다. 飼育통 내에서 飼育도중 死亡하는 白鼠의 數는 平均 10% 内外였다.

2. 正常氣壓下로 돌아 온 후의 赤血球增多症白鼠의 赤血球容積과 72時間赤血球攝取率의 變化를 보면 Fig. 3에서 보는 바와같이 赤血球容積은 第 2日부터 減少하

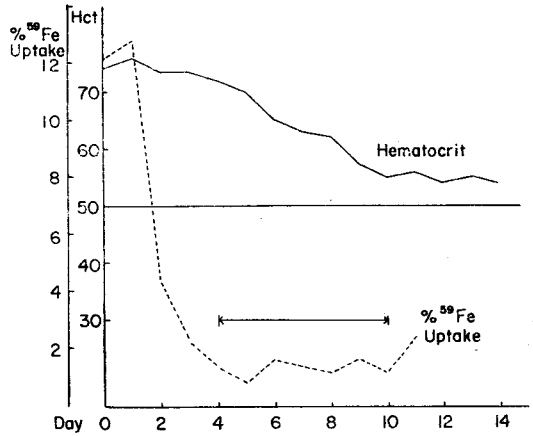


Fig. 3. Hematocrit and %⁵⁹Fe uptake of mice after removal from the hypobaric chamber.

기 시작하면 第10日에는 平均 54%까지 赤血球容積이 떨어졌으나 52%以下로 떨어지는 경우는 한마리도 없었다. 그러나 이후 14日까지는 平均値는 52%以上이었지만 이때는 50%以下로 떨어지는 白鼠도 있었다.

72時間 ⁵⁹Fe 赤血球攝取率은 飼育통에서 나온 날 및 第 1日에는 12%와 13%로 높은 값을 보였지만 急激히 減少하여 第 2日에는 4.3% 第 3日에는 2.0%까지 減少하였다. 第 4日부터 第 10日까지는 모두 2%未滿을 維持했으나 第 11日에는 약간 增加하여 2.3%를 보여주었다.

3. 上述한 實驗結果를 土台로한 erythropoietin 測定順序에 따라 (Fig. 1) 生理食鹽水, 正常人의 血漿 및 각종 貧血患者의 血漿內의 erythropoietin 을 測定한 結果를보면 Table 1과 같다.

生理食鹽水와 正常人血漿內의 erythropoietin 에 의한 72時間 ⁵⁹Fe 赤血球攝取率은 自體 erythropoietin 値가 最低로 떨어져 있는 赤血球增多症白鼠의 72時間 ⁵⁹Fe 赤血球攝取率과 有意한 差異를 보이지 않았다.

貧血患者 血漿內의 erythropoietin 에 의한 72時間 赤血球攝取率은 뚜렷한 差를 보이지는 않았지만 正常人 血漿에 의한 것보다는 增加된 것을 볼 수 있었다.

4. 正常白鼠에서 國內製品과 英國製品 ⁵⁹Fe를 각각 使用하여 얻은 24時間, 48時間, 및 72時間의 ⁵⁹Fe 赤血球攝取率은 Fig. 4에서 보는바와 같이 ⁵⁹Fe 國內製品을 使用하여 얻은 24時間, 48時間 및 72時間의 ⁵⁹Fe 赤血球攝取率은 각각 8%, 10% 및 12%였으며 ⁵⁹Fe 英國製品을 使用한 경우에는 각각 20%, 30%, 및 40%로

Table 1. The Results of Erythropoietin Bioassay with Saline, Normal and Anemic Patients

Name		Hb(gm/dl)	Sample	% ⁵⁹ Fe Uptake
			Saline, 0.5ml ×2	1.5
			Saline, 0.5ml ×2	1.3
			Saline, 0.5ml ×2	1.8
K.S. CHO	Normal	13.0	Plasma, 0.5ml ×2	2.0
J.Y. KANG	Normal	13.5	Plasma, 0.5ml ×2	2.3
K.S. LEE	Iron Def. Anemia	6.3	Plasma, 0.5ml ×2	2.9
H.O. OH	Iron Def. Anemia	4.2	Plasma, 0.5ml ×2	3.3
W.J. LEE	Iron Def. Anemia	4.5	Plasma, 0.5ml ×2	4.4
K.A. LEE	CML	2.2	Plasma, 0.5ml ×2	3.8
K.W. KIM	SLE	6.5	Plasma, 0.5ml ×2	3.4
J.S. WON	ALL	5.6	Plasma, 0.5ml ×2	3.5
T.Y. SHIM	ALL	8.9	Plasma, 0.5ml ×2	6.6
W.K. KIM	M.M.	6.8	Plasma, 0.5ml ×2	3.3
D.C. KIM	HMR	6.3	Plasma, 0.5ml ×2	2.4
B.S. HAN	Nephrotic Syndrome	15.8	Plasma, 0.5ml ×2	1.2
Y.T. KIM	Nephritis	10.8	Plasma, 0.5ml ×2	2.4

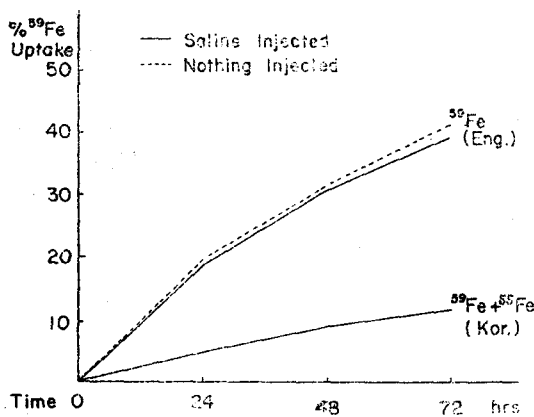


Fig. 4. % ⁵⁹Fe uptake in normal mice.

後者에서의攝取率在 현저하게 높았다.

生理食鹽水を ⁵⁹Fe 注射前에 注射한 白鼠와 對照白鼠에서는 ⁵⁹Fe 赤血球攝取率在 有意한 差를 보이지 않았다.

考 按

低酸素血症 및 여러가지 刺戟에 의해 腎臟에서 erythropoietin 의 分泌와 生産이 促進된다. 이때 增加된 erythropoietin 에 의해 赤血球의 生産이 促進되고 赤血球增多症이나 타날 수 있다^{2,4,39}. Gordon 들은 分離

시킨 動物의 腎臟에서 低酸素血症으로 erythropoietin 이 分泌되는 것을 觀察하였으며⁶⁻⁸ 絲球體傍細胞의 顆粒增加가 erythropoietin 分泌와 關聯이 있는 것을 證明하기도 했다¹⁰⁻¹². 보통 低酸素狀態를 만들기 위해서는 低氣壓을 利用하지만^{30,31} 半透膜인 silicon 膜을 使用한 사람도 있다^{33,34}.

本實驗에서는 低氣壓으로 低酸素狀態를 維持시킨 飼育통에서 赤血球增多症白鼠를 만들었다. 飼育통내의 氣壓을 繼續 400mmHg 로 維持시켜 白鼠를 飼育했을 때는 赤血球容積을 70%以上으로 增加시키기 위해 20日 正度의 期間이 必要했고 白鼠의 死亡率은 10%未滿이었다. 300mmHg 로 氣壓을 繼續 維持시켰을 때에는 赤血球容積의 增加가 빨라져서 10日~12日이면 70%以上으로 增加시킬 수 있었다. 그러면 이때는 初期의 白鼠死亡率이 急激히 增加하여 20%까지 到達했다. 本實驗에서는 처음 4日間은 氣壓을 400mmHg 로 하고 以後 10日間은 300mmHg 維持시키면 이때의 白鼠死亡率은 10%內外였고 14日에 74%로 赤血球容積이 增加하였다. 飼育通 內에서의 赤血球容積의 變化는 第3日 以後부터 나타났으나 第6~8日까지는 體重의 減少가 同件되고 있다. 이와같은 變化는 처음의 赤血球容積增加에 赤血球生産增加 및 體重減少의 두 要因이 作用하는 것으로 생각된다. 그러나 以後에는 白鼠의 體重이 다시 增加하므로 第14日에 얻어진 赤血球增多症에는 體重減少의 作用을 無視할 수 있다.

腦下垂體를 切除하거나 斷食으로 基礎代謝量이 減少

할 경우^{26,28,40)} 또 低酸素에 의해 二次的 赤血球增多症이 誘發된 경우에는 正常 酸素分壓下에서 erythropoietin의 分泌가 減少하고 赤血球生産이 低下된다^{31,33,39)}. 本實驗에서 觀察한 正常氣壓下의 赤血球增多症白鼠의 72時間 ⁵⁹Fe 赤血球攝取率은 急激히 減少하여 第 4 日부터 10 日까지는 最低狀態로 維持하는 것을 알 수 있다. 여러사람들에 의해 測定된 erythropoietin의 半減期는 대략 24時間정도로 알려져 있다^{41,42)}. 즉 일단 形成된 erythropoietin은 3~4日間 作用할 수 있고 이 事實은 本實驗에서 얻은 結果와 一致한다^{3,37)}. 飼育桶內에서 分泌되었던 erythropoietin이 第 3 日까지 作用하고 第 4 日부터 10 日사이에는 白鼠自體의 erythropoietin은 作用을 하지 않고 있다. 本實驗에서 赤血球容積의 減少는 第 2 日부터 나타났다. 赤血球容積이 減少하는 정도는 赤血球壽命에 比較해서 상당히 急激한 것을 볼 수 있다. 이것은 赤血球壽命이 減少하거나 赤血球消失이 나타난 때문이 아니고 正常氣壓下에서 白鼠가 體重增加를 일으켜 全血量이 增加하기 때문이다. 完全히 成熟한 白鼠를 使用하면 體重增加의 要因을 除去하여 赤血球容積의 減少를 緩化시킬 수 있을 것이다 그러나 本實驗에서는 赤血球容積이 第 10 日까지 54% 이상을 維持하므로 이 變化가 erythropoietin의 測定에 影響을 미치지 않는다.

本實驗에서 企圖한 erythropoietin의 測定方法은 위에서 얻은 結果를 基礎로 하였다. 즉 白鼠自體의 erythropoietin이 最低로 되기 시작한 第 4 日과 5 日에 被檢者의 血漿을 皮下로 注射하고 第 6 日에 ⁵⁹Fe를 腹腔內로 注射하였다. 赤血球攝取率을 測定하는 時間은 注射한 血漿의 erythropoietin이 作用할 수 있는 最大期間과 生物檢査에 使用하는 白鼠의 赤血球容積이 增加되어 있는 期間等を 考慮하여 72時間으로 했고 따라서 第 9 日에 白鼠의 血液을 採取하였다.

一般的으로 血漿의 erythropoietin을 生物檢査法으로 測定하면 正常人에서는 測定이 되지 않고 血色素가 8 gm%以下로 떨어진 경우에만 增加된 것을 觀察할 수 있다^{43,44)}. 本實驗에서도 生理食鹽水와 正常人의 血漿으로 測定한 72時間 ⁵⁹Fe 赤血球攝取率은 有意한 差를 보이지 않는 것을 볼 수 있다. 貧血患者血漿에 의한 72時間 ⁵⁹Fe 赤血球攝取率은 正常人보다는 增加되었으나 그 差異는 뚜렷하지 않았다. 이런 結果를 얻게된 가장 큰 要因은 著者들이 使用한 ⁵⁹Fe가 國內製品으로 外國製品과 같이 純粹하지 못해서 赤血球攝取率이 떨어지기 때문이 아닌가 생각된다. 卽 이 製品上의 差異는 상당히 심해서 Fig. 4에서 보이는 바와 같이 72時間에는 대

략 4倍정도의 差異가 난다. 國內製品 ⁵⁹Fe의 赤血球攝取率이 떨어지는 것은 國產의 ⁵⁹Fe은 純粹한 ⁵⁹Fe만이 아니라 ⁵⁵Fe와 ⁵⁹Fe의 混合放射能인 것이 큰 原因이 아닌가본다. 이 외에, 注射하는 血漿의 量을 增加시키거나 患者의 血漿대신 濃縮시킨 尿를 使用하면 ⁵⁹Fe 赤血球結合率의 差異를 增加시킬 수 있다고 한다^{16,26,44)}.

本實驗에서는 한 患者의 erythropoietin을 測定하기 위해 4마리의 赤血球增多症白鼠를 使用하였다. 얻어진 結果中 第 9 日까지 赤血球容積이 52%以上인 것만을 使用하였으며 보통 4마리中 3마리가 52%以上の 赤血球容積을 維持하였다.

Erythropoietin의 生物檢査法에 여러가지 方法이 있다는 것은 上述한 바와 같으며 本實驗과 같이 低氣壓飼育桶을 使用하던 患者 10名의 erythropoietin測定에 대략 50마리의 白鼠가 必要하며 測定에 必要한 全期間은 23일 정도가 된다. 輸血을 하여 赤血球增多症을 일으키면 全測定期間이 11일 정도로 짧아지는 利點이 있으나 이때는 輸血等の 技術的인 어려움이 있고 10名의 患者에 對해 250마리의 白鼠가 必要하다^{21,32)}. 斷食을 利用하는 方法은 本實驗보다 期間도 짧고 使用하는 白鼠의 數도 같지만 얻어지는 結果가 本實驗에서 使用한 方法보다 正確하지 않다고 보고 되었다^{25,35)}. 腦下垂體切除術을 使用하는 方法은 正確度도 떨어질 뿐 아니라 技術的으로 대단히 어렵다.

經濟的, 時間的 및 技術的인 問題와 正確性 등을 考慮하여 볼 때 우리나라의 現實로는 erythropoietin의 測定에는 本實驗과 같이 低氣壓飼育桶을 使用하는 多血症法이 제일 좋을 것 같다. 그러나 좀 더 正確한 結果를 얻기 위해서는 우선 ⁵⁹Fe의 純粹度를 높여 赤血球攝取率을 增加시키고 以外에 注射하는 血漿의 量을 늘리거나 血漿대신에 濃縮시킨 患者의 尿를 使用하는 方法等を 考慮하여야겠다. 또한 現在 만들어지고 있는 標準 erythropoietin을 使用하여 標準曲線을 求하면 erythropoietin의 定量測定도 可能하다.

結 論

著者들은 低氣壓下에 飼育하여 二次性赤血球增多症을 誘發시킨 白鼠에 生理食鹽水, 正常人의 血漿 및 貧血患者의 血漿을 注射하고 72時間 ⁵⁹Fe 赤血球攝取率을 測定하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 低氣壓飼育桶에서 14日間을 飼育하여 赤血球容積을 74%까지 增加시킬 수 있었다. 白鼠의 死亡率을 最

少로 줄이고 赤血球增多症의 誘發에 必要한 時間을 短縮시키기 위해서는 처음 4日間은 飼育통의 氣壓을 400 mmHg 로, 다음 10日間은 300mmHg 로 維持시키는 것이 좋다.

2. 正常氣壓下에서 赤血球增多症白鼠自體 erythropoietin의 影響은 第4日부터 10日 사이에 最低로 低下하므로 이 時期에 患者血漿의 erythropoietin을 測定하는 것이 가장 適當함을 알 수 있었다.

3. 正常人血漿을 注射한 後의 72時間 ^{59}Fe 赤血球攝取率은 生理食鹽水를 注射했을 때와 같았다.

4. 本實驗에서 使用한 ^{59}Fe 國內製品은 ^{59}Fe 와 ^{56}Fe 의 複合體이고, 赤血球攝取率이 떨어지므로 erythropoietin 測定에는 보다 純粹한 ^{59}Fe 를 使用하거나 外國製品 ^{59}Fe 를 使用해야 한다.

5. 經濟的, 時間的 및 技術的 問題와 erythropoietin 測定の 銳敏性を 考慮할때 우리의 現實로는 本實驗方法과 같은 低氣壓飼育통을 使用하는 것이 가장 좋을 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Fried, W., Plzak, L.F., Jacobson, L.O. and Goldwasser, E.: *Studies on erythropoiesis. III. Factors controlling erythropoietin production.* P.S.E.B.M. 94:237, 1957.
- 2) Schooley, J.C.: *Responsiveness of hematopoietic tissue to erythropoietin in relation to the time of administration and duration of action of the hormone.* Blood 25:795, 1965.
- 3) Kretchmar, A.L.: *Erythropoietin: Hypothesis of action tested by analogue computer.* Science 152:367, 1966.
- 4) Lajtha, L.G.: *Recent studies in erythroid differentiation and proliferation.* Medicine 43: 625, 1964.
- 5) Kuratowska, Z., Lewartowski, B. and Michalski, E.: *Studies on the production of erythropoietin by isolated perfused organ.* Blood 18:5-27, 1961.
- 6) Pavlovic-Kentera, V., Hall, D.P., Brogassa, C. and Lange, R.D.: *Unilateral renal hypoxia and production of erythropoietin.* J. Lab. Clin. Med. 65:577, 1965.
- 7) Zangheri, E.O., Campana, H., Ponce, F., Silva, J.C., Fernandez, F.O. and Suarez, F.R.E.: *Production of erythropoietin by anoxic perfusion of the isolated kidney of a dog.* Nature 199: 572, 1963.
- 8) Fisher, J.W. and Birdwell, B.J.: *The production of an erythropoietic factor by the in situ perfused kidney.* Acta. Haemat. 26:224, 1961.
- 9) Fisher, J.W., Schofield, R. and Porteous, D.D.: *Effect of renal hypoxia on erythropoietin production.* Brit. J. Haemat. 11:382, 1965.
- 10) Hirashima, K. and Takaku, F.: *Experimental studies on erythropoietin. II. The relationship between juxtglomerular cells and erythropoietin.* Blood 20:1, 1962.
- 11) Oliver, W.J. and Brody, G.L.: *Effect of prolonged hypoxia upon granularity of renal juxtglomerular cells.* Circulation Res 16:83, 1965.
- 12) Goldfarb, B. and Tobian, L.: *The interrelationship of hypoxia, erythropoietin and the renal juxtglomerular cell.* P.S.E.B.M. 111:510, 1962.
- 13) Takaku, F., Hirashima, K. and Nakao, K.: *Studies on the mechanism of erythropoietin production. I.: Effect of unilateral constriction of the renal artery.* J. Lab. Clin. Med. 59:815, 1962.
- 14) Katz, R., Cooper, G.W., Gordon, A.S. and Zanjani, E.D.: *Studies on the site of production of erythropoietin.* Ann. N.Y. Acad. Sci. 149:120, 1968.
- 15) Goldwasser, E. and Kung, C.K.H.: *Progress in the purification of erythropoietin.* Ann. N.Y. Acad. Sci. 149:49, 1968.
- 16) Lowy, P.H. and Keighley, G.: *The fractionation of erythropoietin from anemic and normal human urine.* Ann. N.Y. Acad. Sci. 149:54, 1968.
- 17) Painter, R.H., Bruce, W.R. and Goldwasser, E.: *The commercial production of erythropoietin from anemic sheep plasma.* Ann. N.Y. Acad. Sci. 149:71, 1968.
- 18) Schooley, J.C., Garcia, J.F., Cantor, L.N. and Haveus, V.W.: *A summary of some studies on*

- erythropoiesis using anti-erythropoietin immune serum. Ann. N.Y. Acad. Sci. 149:266, 1968.*
- 19) Frenkel, E.B., Suki, W. and Baum, J.: *Investigations on an Immunoassay of erythropoietin. Ann. N.Y. Acad. Sci. 149:294, 1968.*
 - 20) Bangham, D.R.: *Biological assay and a standard for erythropoietin. In Erythropoiesis. p. 23, N.Y.*
 - 21) Gordon, A.S. and Weintraub, A.H.: *Assay of the erythropoietic stimulating factor (ESF). In Erythropoiesis. p. 1, N.Y.*
 - 22) Cotes, P.M. and Bangham, D.R.: *An International Reference Preparation for bioassay of erythropoietin. Bull. W.H.O. 35:751, 1966.*
 - 23) Cotes, P.M.: *Quantitative estimation of erythropoietin Ann. N.Y. Acad. Sci. 149:12, 1968.*
 - 24) Keighley, G.: *Further experiences with assays, units and standards of erythropoietin. Ann. N.Y. Acad. Sci. 149:18, 1968.*
 - 25) Gallagher, N.J., Hagan, D.Q., McCarthy, J.M. and Lange, R.D.: *Response of starved rats and polycythemic rats to graded doses of erythropoietin. P.S.E.B.M. 106:127, 1961.*
 - 26) Hodgson, G., Perreta, M., Yudilevich, D. and Eskuche, I.: *Assay of "hemopoietin" in starved animals; properties of urinary hemopoietin. P.S.E.B.M. 103:43, 1960.*
 - 27) Gurney, W.G. and Pan, C.: *Studies on erythropoiesis. XIII. A comparison of methods of bioassay of erythropoietin in human plasma. J. Lab. Clin. Med. 55:67, 1960.*
 - 28) Jacobson, L.O., Goldwasser, E., Plzak, L.F. and Fried, W.: *Studies on erythropoiesis. Part IV. Reticulocyte response of hypophysectomized and polycythemic rodents to erythropoietin. P.S.E.B.M. 94:243, 1957.*
 - 29) Cotes, P.M. and Bangham, D.R.: *Bioassay of erythropoietin in mice made polycythemic by exposure to air at a reduced pressure. Nature 1961:1065, 1961.*
 - 30) DeGowin, R.L., Hofstra, D. and Gurney, C.W.: *The mouse with hypoxia induced erythremia, an erythropoietin bioassay animal. J. Lab. Clin. Med. 60:846, 1962.*
 - 31) Weintraub, A.H., Gordon, A.S. and Camiscoli, J.F.: *Use of the hypoxia-induced polycythemic mouse in the assay and standardization of erythropoietin. J. Lab. Clin. Med. 62:743, 1963.*
 - 32) Monette, F.C., LoBue, J., Gordon, A.S. and Chau, P.: *Erythropoiesis in transfusion-induced polycythemic rats studied with ³H-thymidine autoradiography. P.S.E.B.M. 119:445, 1965.*
 - 33) Lange, R.D., Simmons, M.L. and Dibelius, N. R.: *Polycythemic mice produced by hypoxia in silicone rubber membrane enclosures: a new technique. P.S.E.B.M. 122:761, 1966.*
 - 34) Lange, R.D., Simmons, M.L. and McDonald, T.P.: *Use of silicone rubber membrane enclosure for preparation of erythropoietin assay. Ann. N.Y. Acad. Sci. 149:34, 1968.*
 - 35) DeGowin, R.L., Hofstra, D. and Gurney, C. W.: *A comparison of erythropoietin bioassay. P.S.E.B.M. 110:48, 1962.*
 - 36) Gurney, C.W., Wackman, N. and Filmanowicz, E.: *Studies on erythropoiesis. XVII. Some quantitative aspects of the erythropoietic response to erythropoietin. Blood 17:531, 1961.*
 - 37) Fimanowicz, E. and Gurney, C.W.: *Studies on erythropoiesis XVI. Response to a single dose of erythropoietin in polycythemic mouse. J. Lab. Clin. Med. 57:65, 1961.*
 - 38) Seip, M., Halvorsen, S., Andersen, P. and Kameda, B.R.: *Effects of hypothalamic stimulation on erythropoiesis in rabbit. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 13:553, 1961.*
 - 39) Reynafarje, C., Ramos, J., Faura, J. and Villavicencio, D.: *Humoral control of erythropoietic activity in man during and after altitude exposure. P.S.E.B.M. 116:649, 1964.*
 - 40) Crafts, R.C. and Meineke, H.A.: *The anemia of hypophysectomized animals. Ann. N.Y. Acad. Sci. 77:501, 1959.*
 - 41) Fogh, J.: *The increased doses response of ESF after ESF stimulation. Ann. N.Y. Acad. Sci. 149:217, 1968.*
 - 42) Hodgson, G.: *Effects of plasma erythropoiesis*

- stimulating factor (ESF) at different time interval: after single injection. P.S.E.B.M. 106:766, 1961.*
- 43) Camiscoli, J.E., Weintraub, A.H. and Gordon, A.S.: *Comparative assay of erythropoietin standards. Ann. N.Y. Acad. Sci.* 149:40, 1968.
- 44) Adamson, J.W., Alexanian, R., Martinez, C. and Finch, C.A.: *Erythropoietin excretion in normal man. Blood* 28:354, 1966.
- 45) Hammond, D., Shore, N. and Movassaghi, N.: *Production, utilization and excretion of erythropoietin: I. chronic anemia, II. aplastic crisis, III. erythropoietic effects of normal plasma. Ann. N.Y. Acad. Sci.* 149:516, 1968.
-