

유전자재조합법으로 생산한 human erythropoietin(DA-3285)의 국소자극성에 관한 연구

김옥진 · 김동환 · 안병옥 · 김원배* · 양중익
동아제약(주) 연구소

Local Irritation of DA-3285, Recombinant Human Erythropoietin

Ok Jin Kim, Dong Hwan Kim, Byoung Ok Ahn,
Won Bae Kim* and Junnick Yang

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

(Received May 16, 1996)

(Accepted May 23, 1996)

ABSTRACT : The local irritation studies of DA-3285, recombinant human erythropoietin(rHu-EPO), were carried out in rabbits after the following treatment ; single application into the conjunctival sac of the eye, single subcutaneous injection, 7-day repeated subcutaneous injection and 8-day repeated infusion into the ear vein. Also, the local irritancy of DA-3285 leaked around vein was studied in mice by single perivascular injection. The results obtained were as follows. In the result of ocular irritation test, DA-3285 could be considered as a non-irritating material. In single and 7-day repeated subcutaneous irritation test, the irritancy of DA-3285 was not so much different from that of saline. The vascular irritancy of DA-3285 by 8-day repeated infusion was negligible and similar to that of saline. And the irritancy of DA-3285 by perivascular injection was comparable to that of saline. These results indicate that DA-3285 has no irritating activity when injected through subcutaneous or intravenous route for clinical practice as 3.5% solution.

Key Words : DA-3285, Recombinant human erythropoietin, Toxicity, Local irritation

I. 서 론

DA-3285는 동아제약(주) 연구소에서 유전자 재조합법으로 생산한 human erythropoietin(rHu-EPO)으로서 만성신부전(chronic renal failure, CRF) 및 다른 원인에 의한 빈혈(anemia)의 치료제로서 개발예정인 물질이다.

적혈구생산(erythropoiesis)이 호르몬에 의하여 조절된다는 학설은 이미 1900년대 초에 제안되어졌으나 EPO의 분리와 아미노산배열의 확인은 근래에 Jacobs 등(1985)에 의하여 이루어졌다. EPO는 분자량이 약 30,000 dalton의 당단백(glycoprotein)으로서 사람의 신장 세뇨관 주변세포(peritubular cells), 내피세포 및 세뇨관 상피세포에서 주로 합성되고 간장에서도 일부 생성되는 것으로 알려져 있으며, 신장에서 혈중 산소농

도의 감소에 반응하여 증가된 혈중 EPO는 골수에서 적혈구전구세포의 분화, 증식 및 성장을 촉진한다(Ridley 등, 1994). 빈혈은 혈중 EPO의 감소, 실혈, 철분과 엽산의 결핍 및 성숙적혈구 수명의 감소 등에 의하여 유발되는 것으로 알려져 있다(Merrill, 1979). 만성신부전(CRF)환자의 빈혈은 뇨독소(uremic toxin)에 의한 적혈구전구세포 및 성숙적혈구의 직접적인 상해와 신장손상에 의한 EPO 생성저하로 유발되며, 정구성 정색소성 빈혈(normocytic normochromic anemia)인 점이 특징적이다(Eschbach 등, 1967). CRF환자의 경우 뇨독증의 예방을 위하여 투석요법이 자주 이용되나 투석과 정중에서 적혈구의 손상과 실혈이 유발되어 빈혈이 심화될 수 있으며, 이러한 빈혈의 교정을 위하여 과거에는 수혈(blood transfusion)요법이 자주 사용되었으나 반복적인 수혈시 감염의 위험성 증가와 혈액내 철분과부하 및 이종항원에 대한 면역반응의 유발 등이 문제시되고

*To whom correspondence should be addressed.

있다(Lindsay와 Burton, 1972). 이러한 CRF에 의한 빈혈은 최근에 유전자재조합법을 이용하여 EPO를 포유류세포에서 대량으로 발현하여 생산할 수 있게 되면서 치료의 새로운 지평을 열게 되었다. 1989년 미국의 FDA는 rHu-EPO를 CRF에 의한 빈혈의 치료제로 승인 하였으며, 최근에는 CRF 이외에 감염 및 갑상선호르몬결핍, 류마티스성 관절염과 같은 만성질환, 악성종양, 적혈구 미성숙(prematurity), 자가수혈, AIDS 또는 중양의 치료제로 쓰이는 세포독성물질 등에 의한 빈혈 및 겸상적혈구성빈혈(sickle cell anemia)과 같은 다른 원인들에 의한 빈혈의 치료효과도 보고되고 있다 (Vreugdenhil 등, 1993).

DA-3285는 rHu-EPO로서 임상사용시 정맥내 또는 피하주사로 장기간에 걸쳐 반복투여될 예정이므로 통증이나 주사부위의 국소적인 병변이 유발될 경우에 심각한 적용상의 문제가 발생할 것으로 예측되어졌으며, 임상적용시 발현 가능한 자극성을 보다 정확히 유추할 수 있도록 여러 시험계를 사용하여 국소자극성을 검토하는 것은 DA-3285의 안전성 평가를 위하여 중요한 항목으로 생각되었다. 본 시험은 새로운 빈혈 치료제로 기대되는 DA-3285의 국소자극성 평가를 위한 시험으로 토끼를 이용한 안점막자극시험 및 단회 및 7일 반복 피하투여에 의한 국소자극시험과 이개정맥내 투여에 의한 혈관장해시험을 실시하고 마우스에서 혈관주위누출(extravasation)에 의한 피부자극성시험을 실시하였다.

II. 실험방법

1. 시험물질

시험에 사용된 DA-3285(Lot No. ETS-004)는 동아제약(주)연구소 생물공학실에서 공급받아 사용하였으며 시료상태는 1 ml /vial로 무색투명한 액상이었고 pH는 7.1이었다. 순도는 역상HPLC에 의한 분석으로 99.0% 이었고 역기는 면역측정검사법으로 측정시 10,000 IU/ml 이었으며, 조성은 시험물질 1 ml 에 EPO 84.0 µg, human albumin 1.0 mg, D-mannitol 30 mg, sodium chloride 2.0 mg, sodium monobasic phosphate 1.5 mg으로서 임상사용제형중 최고농도인 3.5% 용액이었다. 시험물질은 냉장으로 보관하였으며 사용시 희석하지 않고 3.5% 용액을 바로 사용하였다. 대조물질에 사용된 acetic acid(Lot No. OC5024)는 純正化學株式會社로부터, saline(Lot No. AAX5DL)은 중외제약으로부터, 혈관장해성 시험에 사용된 sulfobromophthalein sodium

(bromsulphalein, BSP, Lot No. 93H0474)은 Sigma로부터 구입하여 사용하였다.

2. 시험동물

안점막자극시험과 피하투여에 의한 국소자극시험 및 혈관장해성시험에 사용된 토끼는 연암축산으로 부터 2.5-3.0 kg의 웅성 New Zealand White계 토끼 50마리를 공급받아 1주일간의 순화사육을 거친뒤 건강한 동물 42마리를 사용하였다. 사육환경은 온도 22±3°C, 습도 55±10%, 조명시간 12시간(05:00-17:00)의 통상 조건을 유지하였으며, 토끼용 스테인레스 케이지에 2마리씩 수용하였고 사료(토끼용사료, Purina)와 물(수도수)은 자유섭취시켰다.

혈관주위모델에 의한 국소자극시험에 사용된 마우스는 Charles River(Japan)로 부터 4주령의 SPF 웅성 ICR계 마우스 60마리를 공급받아 1주일간의 순화사육을 거친뒤 건강한 동물 50마리를 사용하였으며, 검역 순화사육기간 및 시험기간중 온도 23±2°C, 습도 55±15%, 환기횟수 15-20회/시간, 조도 150-300 Lux, 조명시간 12시간(07:00-19:00)의 조건을 유지하였다. 동물의 수용은 마우스용 PC 케이지에 10마리씩 분리하여 수용하였다. 사료는 마우스·랫드용 고품사료(2.0 M rad 방사선멸균품, 제일사료)를, 음수는 자외선멸균 수도수를 자유섭취시켰다.

3. 안점막자극시험

본 시험은 국립보건안전연구원 “의약품 등의 독성시험기준”(1994년)에 준하여 실시하였다. 1주일간의 순화사육기간을 거쳐 선별된 건강한 토끼를 시험개시 24시간전 각각의 안구에 브롬화수소호마트로핀액(삼일제약, Lot No. SK9364)을 2방울씩 떨어뜨리고 육안 및 검안경(Mini miroflex2, Heine)을 이용하여 안구, 각막손상의 이상유무를 확인한 후 양안이 정상인 토끼 9마리를 선택하여 시험에 사용하였다. 시험에 사용된 DA-3285는 예정된 임상사용제형 중 최고농도인 3.5% (10,000 IU/ml)액으로서, 각각의 왼쪽 안구에 0.1 ml 씩 점안하고 1군의 3마리는 20-30초 후 생리식염수를 사용하여 1분간 세척하고 오른쪽 눈을 비쳐치 대조군으로 사용하였다. 2군의 6마리는 DA-3285를 왼쪽 안구에 적용 후 세척하지 않고 관찰하며 오른쪽 눈을 비쳐치 대조군으로 사용하였다. 적용 후 3시간, 1, 2, 3, 4 및 7일에 관찰하고 평가는 국립보건안전연구원 “의약품 등의 독성시험기준”(1994년)의 안구병변의 등급표

에 준하여 실시하였으며 이에 따른 평점을 산출 후 그 결과에 대한 자극성의 정도판정은 국립보건안전연구원 "독성시험 표준작업지침서"(1993)의 안점막자극표에 의해 물질의 자극도를 구분하였다.

4. 피하투여에 의한 국소자극시험

1) 단회투여시험

본 시험은 일본 후생성 "주사제의 국소자극성에 관한 시험법안"(厚生省資料, 1979)을 응용하여 실시하였다. 순화사육을 거쳐 선별된 건강한 토끼 12마리의 후지외측대퇴부를 투여 1일 전 제모하고 유성펜을 이용하여 주사할 부위를 표시하였다. 군구성은 Table 1과 같으며, 투여는 1회용 주사기(28G, ½ inch)를 사용하였다. 1군에는 우측후지에 DA-3285 3.5%(10,000 IU/ml)액을, 좌측후지에는 생리식염수를 각각 1 ml 씩 피하로 단회투여하였다. 2군에는 양성대조를 위하여 6.0%의 acetic acid를 우측후지에, 0.75% acetic acid를 좌측후지에 각각 1 ml 씩 피하로 단회투여하였다. 결과의 판정은 시험종료시까지 연일 임상증상을 관찰하였다. 약물의 투여후 2일 및 7일에 각 군의 3마리씩을 각각 부검하여 주사부위의 피하에 형성된 병변을 관찰하고 digital caliper(Digimatic, Mitutoyo)를 사용하여 병변의 장경과 단경을 측정하여 이들의 곱으로 병변의 면적을 산출하였다. 주사부위의 피하 및 근육을 10% 중성포르말린용액에 24시간이상 고정하고 병리표본작성을 위한 통상과정을 거쳐 병리조직학적 검사를 실시하였다. 이상의 결과를 종합하여 saline과 0.75% acetic acid 및 6.0% acetic acid에 의하여 형성된 병변의 크기 및 색조, 병리조직학적 검사결과와 비교하여 주사후 2일 및 7일의 판정결과가 생리식염수에 의한 국소자극도와 동등하거나 보다 약한 경우는 Grade 1, 0.75% acetic acid에 의한 국소자극도와 동등하거나 보다 약하고 생리식염수에 의한 국소자극도 보다 강한 경우는 Grade 2, 6.0% acetic acid에 의한 국소자극도와 동등하거나 보다 약하고 0.75% acetic acid에 의한 국소자극

도 보다 강한 경우는 Grade 3, 6.0% acetic acid에 의한 국소자극도 보다 강한 경우는 Grade 4로 등급을 분류하였다.

2) 7일연속투여시험

순화사육을 거쳐 선별된 건강한 토끼 12마리의 후지외측대퇴부를 투여 1일 전 제모하고 유성펜을 이용하여 주사할 부위를 표시한 후 1회용주사기(28G, ½ inch)를 사용하여 투여하였다. 군구성은 Table 2와 같으며, 각 군에는 각각 6마리의 토끼를 사용하였다. 1군에는 우측후지에 DA-3285 3.5%(10,000 IU/ml)액을, 좌측후지에는 생리식염수를 각각 0.5 ml씩 피하로 7일간 반복투여하였다. 2군에는 양성대조를 위하여 0.2%의 acetic acid를 우측후지에, 1.6%의 acetic acid를 좌측후지에 피하로 0.5 ml 씩 동일기간 주사하였다. 결과의 판정은 약물의 투여종료후 2일 및 7일에 각 군의 3마리씩을 각각 부검하여 saline과 0.2% acetic acid 및 1.6% acetic acid에 의하여 형성된 병변의 크기 및 색조, 병리조직학적 검사결과와 비교하여 자극도를 평가하였다.

5. 혈관장해성시험

혈관장해성시험은 府川 등(1975)의 방법으로 실시하였다. 투여 3일전 순화사육을 거쳐 선별된 건강한 토끼의 좌우 외측이개를 electric clipper(A5, Oster)로 제모하고 각 군에 3마리씩 나누어 군분리하였다. 1군은 생리식염수를, 2군에는 DA-3285를, 3군에는 5% BSP를 이개정맥에 0.4 ml/min 유속으로 1 ml 을 투여하는 방법으로 1회용 인슐린주사기를 사용하여 투여하였다. 동일요령으로 8일간 반복투여하며 연일 육안검사로 이개정맥내 혈전의 형성과 그 길이를 측정하여 0 mm, 1-4 mm, 5-14 mm 및 15 mm 이상을 각각 -, +, ++ 및 +++로 분류하고 이개정맥주위 염증상태를 관찰하여 무병변, 경도, 중등도 및 강도병변을 각각 -, +, ++ 및 +++로 나누어 평가하고 기록하였다. 최종 투여일에 관

Table 1. Experimental design for local irritation test by single subcutaneous injection with DA-3285

Group	Substance	Site of inject.	Route of inject.	No. of animal
1	Saline	left	s.c.	6
	DA-3285	right		
2	0.75% Acetic acid	left	s.c.	6
	6.0% Acetic acid	right		

Table 2. Experimental design for local irritation test by repeated subcutaneous injection of DA-3285 for 7 days

Group	Substance	Site of inject.	Route of inject.	No. of animal
1	Saline	left	s.c.	6
	DA-3285	right		
2	1.6% Acetic acid	left	s.c.	6
	0.2% Acetic acid	right		

찰 종료 후 부검하여 접종부위의 병리조직학적 검사를 실시하고 육안검사결과와 종합하여 saline과 5% BSP 투여군과의 비교를 통하여 DA-3285의 혈관장해성을 판단하였다.

6. 혈관주위누출에 의한 피부자극성시험

혈관주위누출에 의한 피부자극성시험은 Balsari 등 (1989)의 방법으로 실시하였다. 순화사육을 거쳐 선발된 건강한 마우스를 10마리씩 5개군으로 군분리하고, 시험 제 0일에 1군에는 생리식염수를, 2군에는 매체대조물질을, 3군에는 DA-3285 3.5%액을, 4군에는 0.75% acetic acid를, 5군에는 6.0% acetic acid를 마우스의 미정맥주위(perivascular)에 단회투여하였다. 투여시 액량은 0.05 ml로 insulin 주사기를 사용하여 투약하였고 투여후 3시간, 1일, 3일, 5일 및 7일에 모든 동물의 주사부위 병변을 육안으로 관찰하여 아래와 같은 기준에 따라 점수화한 후 각군의 평균값을 구하였고, 투여 후 7일에 대조군을 포함한 모든 군을 도살하여 주사부위의 병리조직학적 검사를 실시하였다.

0 : no gross lesion

1 : erythematous, swelling, induration, but no necrotic change

2 : erythematous, swelling, and/or severe induration, mild necrosis

3 : obvious necrosis, but no deformity of tail

4 : severe necrosis and eschar formation and/or deformity of tail

7. 통계학적 검사

피부병변측정치를 rank transformation한 후 Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA를 실시하고 유의차가 인정되었을 경우에 변환된 rank를 이용하여 Distribution free multiple comparison을 실시하여 군간 유의차를 검정하였다(Gad와 Weil, 1989). 피부병변측정치의 각 군간 유의성 검정은 분산 분석과 t-test로 실시하였다.

III. 결 과

1. 안점막자극시험

1) 일반증상

관찰기간중 세척군과 비세척군을 포함하여 DA-

3285를 투약한 모든 동물에서 유의한 임상증상이 관찰되지 않았다.

2) 투여부위 관찰

DA-3285의 임상사용농도 3.5%(W/V)액을 결막낭내 투약한 후 3시간, 1일, 2일, 3일, 4일 및 7일에 각막손상, 홍채의 충혈이나 빛에 대한 반응과 안검접막, 안구결막 등의 혈관상태, 결막의 부종 및 배출물의 유무 등을 관찰한 결과, 세척군과 비세척군 모두에서 시험기간동안 유의한 변화가 관찰되지 않았다(Table 3, 4). 이상의 관찰에 의하여 3.5%의 DA-3285 용액은 세척 및 비세척시 모두 A.O.I(acute ocular irritation index)와 48시간이후의 M.O.I(mean ocular irritation index)가 0으로 무자극(non-irritating)물질에 해당되었다.

2. 단회피하투여에 의한 국소자극성

1) 임상증상

시험기간동안 약물과 관련한 임상증상이나 폐사에는 관찰할 수 없었으며, 생리식염수 피하주사시 1마리의 개체에서 주사직후 가벼운 출혈이 있었다. 그 외에 시험기간중 약물의 영향으로 보이는 변화는 관찰되지 않았다.

Table 3. Eye irritation scores of irrigation group treated with DA-3285

Time ^{a)}	Animal No.	Score			Total score	M.O.I. ^{b)}	A.O.I. ^{c)}
		Cornea	Iris	Con-junctiva			
3 hrs	1	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0		
Day 1	1	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0		
Day 2	1	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0		
Day 3	1	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0		
Day 4	1	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0		
Day 7	1	0	0	0	0 ^{d)}	0	
	2	0	0	0	0 ^{d)}		
	3	0	0	0	0 ^{d)}		

^{a)}Time after topical application.

^{b)}Mean ocular irritation index: Total score in each observation time/tested animals.

^{c)}Acute ocular irritation index: Maximum among M.O.I.

^{d)}Day 7 I.O.I. (individual ocular index).

2) 육안소견

DA-3285의 단회피하투여에 의한 육안소견은 Table 5와 같다. 생리식염수의 피하주사에 의하여 투여 2일째 한 개체에서 적색반점이 관찰되었으나 그외의 생리식염수투여 동물들과 DA-3285투여군의 다른 개체에서는 투여 후 2일 및 7일에 유의한 변화가 인정되지 않았다. 양성대조를 위하여 0.75% acetic acid를 투여한 개체는 투여 후 2일째 피하직에서 암적색 테두리의 유백색 반점을 관찰할 수 있었으며, 그 크기는 평균 866.0 mm²이었다. 투여 후 7일째 또한 2일째와 유사한 피하직의 병변이 관찰되었으며 그 크기는 평균 409.7 mm²로 감소되었다. 6.0% acetic acid투여에 의하여는 투여 후 2일째 피하직에서 암적색 테두리의 황백색 반점을 관

찰할 수 있었으며 크기는 평균 3488.7 mm²이었고, 피하직에 담갈색의 젤리양 물질이 형성되어 있는 점이 0.75% acetic acid에 의한 병변과 다른점이었다. 투여 후 7일째 병변 또한 2일째와 유사하였으며 반점의 크기는 평균 818.3 mm²로 감소되었다. 피하주사시 0.75% 및 6.0% acetic acid투여에 의한 병변의 크기는 생리식염수에 의한 것과 비교하여 통계학적으로 유의성이 인정되었다.

3) 병리조직학적 소견

병리조직학적 검사결과는 Table 6과 같다. 피하주사에 의한 국소자극성시험결과 투여후 2일째 육안소견으로 적색반점이 관찰된 생리식염수투여군의 한 개체에서 피하직에 미약한 혈구의 유출이 관찰되었으나 그 외에 생리식염수나 DA-3285의 투여에 의하여 특기할 만한 변화가 관찰되지 않았으며 투여 7일 후에는 모든 개체에서 유의한 변화가 인정되지 않았다. 반면 0.75% acetic acid투여군은 투여 2일 및 7일째 피하직(subcutaneous layer)에 수종성변화와 염증세포의 침윤 및 대식구에 의한 탐식상의 소견과 국소적으로 출혈을 동반한 괴사소견을 관찰할 수 있었으며 인근조직에서는 신생혈관을 포함한 육아조직의 형성(granulation) 등이 관찰되었다. 또한 피하직에 인접한 근육층의 일부 근육조직에서는 섬유화(fibrosis)에 의한 막(membrane) 형성이 관찰되었다. 6.0% acetic acid투여군은 0.75%에 의한 것과 유사하였으나 그 정도가 보다 심하였다. 0.75% 및 6.0% acetic acid 투여 후 2일째와 7일째의 병변의 차이점으로 7일째에 섬유화가 보다 심하게 관찰되는 점이였다.

Table 4. Eye irritation scores of non-irrigation group treated with DA-3285

Time ^{a)}	Animal No.	Score			Total score	M.O.I. ^{b)}	A.O.I. ^{c)}
		Cornea	Iris	Conjunctiva			
3 hrs	4	0	0	0	0	0	
	5	0	0	0	0		
	6	0	0	0	0		
	7	0	0	0	0		
	8	0	0	0	0		
Day 1	4	0	0	0	0	0	
	5	0	0	0	0		
	6	0	0	0	0		
	7	0	0	0	0		
	8	0	0	0	0		
Day 2	4	0	0	0	0	0	
	5	0	0	0	0		
	6	0	0	0	0		
	7	0	0	0	0		
	8	0	0	0	0		
Day 3	4	0	0	0	0	0	
	5	0	0	0	0		
	6	0	0	0	0		
	7	0	0	0	0		
	8	0	0	0	0		
Day 4	4	0	0	0	0	0	
	5	0	0	0	0		
	6	0	0	0	0		
	7	0	0	0	0		
	8	0	0	0	0		
Day 5	4	0	0	0	0	0	
	5	0	0	0	0		
	6	0	0	0	0		
	7	0	0	0	0		
	8	0	0	0	0		

^{a)}Time after topical application.

^{b)}Mean ocular irritation index: Total score in each observation time/ tested animals.

^{c)}Acute ocular irritation index: Maximum among M.O.I..

^{d)}Day 7 I.O.I. (individual ocular index).

3. 7일반복피하투여에 의한 국소자극성

1) 임상증상

약물투여 6일 및 7일째에 생리식염수와 DA-3285 피하 투여시 각각 1마리씩의 개체에서 주사직후 가벼운 출혈이 있었다. 그 외에 시험기간중 약물의 영향으로 보이는 변화는 관찰되지 않았다.

2) 육안소견

DA-3285의 7일연속피하투여에 의한 육안소견은 Table 7과 같다. 생리식염수와 DA-3285투여군의 동물들은 투여종료 후 2일째 각각 한 개체에서 적색의 출혈반점이 관찰되었으나 그외 다른 동물들에서는 유의한 변화가 인정되지 않았으며 7일째에는 이들 두군의 모든 동물에서 병변이 관찰되지 않았다. 양성대조로

Table 5. Macroscopic findings of the injection sites at 2 and 7 days after single subcutaneous administration of DA-3285 and various substances

Substance	Animal No.	Day 2		Day 7	
		Size (mm ²)	Color	Size (mm ²)	Color
Saline	1, 4-l ^{a)}	25	Red	0	-
	2, 5-l	0	-	0	-
	3, 6-l	0	-	0	-
	Mean ± SD	8.3 ± 14.4		0 ± 0	
DA-3285	1, 4-r	0	-	0	-
	2, 5-r	0	-	0	-
	3, 6-r	0	-	0	-
	Mean ± SD	0 ± 0		0 ± 0	
0.75% A.A.	7, 10-l	630	Red focus around milky white spot	50	Red focus around milky white spot
	8, 11-l	1428	Red focus around milky white spot	125	Red focus around milky white spot
	9, 12-l	540	Red focus around milky white spot	1054	Red focus around milky white spot
	Mean ± SD	866.0 ± 488.8*		409.7 ± 559.3*	
6.0% A.A.	7, 10-r	4875	Red focus around yellow-white spot	231	Red focus around yellow-white spot
	8, 11-r	3591	Red focus around yellow-white spot	1008	Red focus around yellow-white spot
	9, 12-r	2000	Red focus around yellow-white spot	1216	Red focus around yellow-white spot
	Mean ± SD	3488.7 ± 1440.2*		818.3 ± 519.2*	

*Significantly different from saline control ($p < 0.05$).

^{a)}The former number is that of the rabbit at day 2 and the later number is that of the rabbit at day 7 (l: left side, r: right side).

Table 6. Histopathological findings of the injection sites at 2 and 7 days after single subcutaneous administration of DA-3285 and various substances

Days after injection	Day 2						Day 7									
	Saline		DA-3285		0.75% A.A.		6.0% A.A.		Saline		DA-3285		0.75% A.A.		6.0% A.A.	
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
Grade	- ±	- ±	± + ++	+ ++ +++	- ±	- ±	± + ++	+ ++ +++	- ±	- ±	± + ++	+ ++ +++	+ ++ +++	+ ++ +++	+ ++ +++	
Cutaneous layer																
Edema	2 1	2 1	0 3 0	0 3 0	1 2 0	3 0 0	2 1 0	2 1 0	3 0 0	2 1 0	2 1 0	2 1 0	2 1 0	2 1 0	2 1 0	
Cellular infiltration	3 0	3 0	0 2 1	0 3 0	3 0 0	3 0 0	0 3 0	3 0 0	3 0 0	0 3 0	0 3 0	3 0 0	3 0 0	3 0 0	3 0 0	
Activated phagocytosis	3 0	3 0	1 2 0	1 2 0	3 0 0	3 0 0	2 1 0	3 0 0	3 0 0	2 1 0	3 0 0	3 0 0	3 0 0	3 0 0	3 0 0	
Focal hemorrhage	3 0	3 0	1 2 0	1 2 0	3 0 0	3 0 0	2 1 0	3 0 0	3 0 0	2 1 0	3 0 0	3 0 0	3 0 0	3 0 0	3 0 0	
Focal necrosis	3 0	3 0	3 0 0	0 2 1	3 0 0	3 0 0	2 1 0	3 0 0	3 0 0	2 1 0	3 0 0	3 0 0	3 0 0	3 0 0	3 0 0	
Granulation	3 0	3 0	2 1 0	0 2 1	3 0 0	3 0 0	0 1 2	0 2 1	3 0 0	0 1 2	0 2 1	0 2 1	0 2 1	0 2 1	0 2 1	
Fibrosis	3 0	3 0	2 1 0	1 2 0	3 0 0	3 0 0	0 2 1	3 0 0	3 0 0	0 2 1	3 0 0	0 3 0	0 3 0	0 3 0	0 3 0	
Subcutaneous layer																
Edema	2 1	3 0	0 2 1	0 2 1	2 1 0	3 0 0	1 2 0	3 0 0	2 1 0	3 0 0	1 2 0	3 0 0	3 0 0	3 0 0	3 0 0	
Cellular infiltration	3 0	3 0	0 1 2	0 2 1	3 0 0	3 0 0	0 2 1	3 0 0	3 0 0	0 2 1	3 0 0	3 0 0	3 0 0	3 0 0	3 0 0	
Activated phagocytosis	3 0	3 0	0 3 0	0 3 0	3 0 0	3 0 0	2 1 0	3 0 0	3 0 0	2 1 0	3 0 0	3 0 0	3 0 0	3 0 0	3 0 0	
Necrosis	3 0	3 0	0 2 1	0 3 0	3 0 0	3 0 0	0 3 0	3 0 0	3 0 0	0 3 0	3 0 0	3 0 0	3 0 0	3 0 0	3 0 0	
Hemorrhage	2 1	3 0	0 2 1	0 3 0	3 0 0	3 0 0	1 2 0	3 0 0	3 0 0	1 2 0	3 0 0	3 0 0	3 0 0	3 0 0	3 0 0	
Granulation	3 0	3 0	0 2 1	1 2 0	3 0 0	3 0 0	0 3 0	3 0 0	3 0 0	0 3 0	3 0 0	2 1 0	2 1 0	2 1 0	2 1 0	
Fibrosis	3 0	3 0	3 0 0	2 1 0	3 0 0	3 0 0	0 0 3	3 0 0	3 0 0	0 0 3	3 0 0	0 0 3	0 0 3	0 0 3	0 0 3	

Grade: -, no changes; ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe.

0.2% acetic acid를 투여한 동물들은 투여종료 후 2일째 피하직에서 암적색 테두리의 유백색 반점을 관찰할 수 있었으며, 그 크기는 평균 637.3 mm²이었다. 투여종료 후 7일째 또한 2일째와 유사한 병변이 관찰되었으며 그 크기는 평균 601.3 mm²으로 감소되었다. 1.6% acetic acid투여군에서는 투여 후 2일째 피하직에서 암

적색 테두리의 황백색 반점을 관찰할 수 있었으며 크기는 평균 955.3 mm²이었고, 피하직에 담갈색의 젤리양 물질이 형성되어 있는 점과 근막에 황백색의 막성 물질(membranous materials)이 부착되어 있는 점이 0.2% acetic acid에 의한 병변과 다른 점이었다. 투여종료 후 7일째 병변 또한 2일째와 유사하였으나 크기는

Table 7. Macroscopic findings of the injection sites at 2 and 7 days after 7-day repeated subcutaneous administration of DA-3285 and various substances

Substance	Animal No.	Day 2			Day 7		
		Size (mm ²)	Color		Size (mm ²)	Color	
Saline	1, 4- <i>l</i> ^{a)}	50	Red		0	-	
	2, 5- <i>l</i>	0	-		0	-	
	3, 6- <i>l</i>	0	-		0	-	
	Mean ± SD	16.7 ± 28.9			0 ± 0		
DA-3285	1, 4- <i>r</i>	0	-		0	-	
	2, 5- <i>r</i>	0	-		0	-	
	3, 6- <i>r</i>	48	Red		0	-	
	Mean ± SD	16.0 ± 27.7			0 ± 0		
0.2% A.A.	7, 10- <i>r</i>	525	Red focus around milky white spot		600	Red focus around milky white spot	
	8, 11- <i>r</i>	667	Red focus around milky white spot		700	Red focus around milky white spot	
	9, 12- <i>r</i>	720	Red focus around milky white spot		504	Red focus around milky white spot	
	Mean ± SD	637.0 ± 100.8*			601.3 ± 98.0*		
1.6% A.A.	7, 10- <i>l</i>	690	Red focus around yellow-white spot		1102	Red focus around yellow-white spot	
	8, 11- <i>l</i>	1406	Red focus around yellow-white spot		850	Red focus around yellow-white spot	
	9, 12- <i>l</i>	770	Red focus around yellow-white spot		828	Red focus around yellow-white spot	
	Mean ± SD	955.3 ± 392.3*			926.7 ± 152.0*		

*Significantly different from saline control ($p < 0.05$).

^{a)}The former number is that of the rabbit at day 2 and the later number is that of the rabbit at day 7 (*l*: left side, *r*: right side).

Table 8. Histopathological findings of the injection sites at 2 and 7 days after 7-day repeated subcutaneous administration of DA-3285 and various substances

Days after injection	Day 2								Day 7											
	Saline		DA-3285		0.2% A.A.		6.0% A.A.		Saline		DA-3285		0.2% A.A.		1.6% A.A.					
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3				
Grade	-	±	-	±	±	+	++	+	++	+++	-	±	-	±	±	+	++	+	++	+++
Cutaneous layer																				
Edema	3	0	3	0	0	3	0	2	1	3	0	3	0	1	2	0	2	1	0	
Cellular infiltration	3	0	3	0	0	2	1	0	3	0	3	0	3	0	0	3	0	3	0	0
Focal hemorrhage	3	0	3	0	1	2	0	2	1	0	3	0	3	0	1	2	0	2	1	0
Focal necrosis	3	0	3	0	1	2	0	0	3	0	3	0	3	0	1	2	0	2	1	0
Granulation	3	0	3	0	0	1	2	0	2	1	3	0	3	0	0	2	1	1	2	0
Fibrosis	3	0	3	0	1	2	0	0	3	0	3	0	3	0	0	2	1	0	3	0
Subcutaneous layer																				
Edema	3	0	3	0	0	3	0	0	2	1	3	0	3	0	0	2	1	2	1	0
Cellular infiltration	3	0	3	0	0	2	1	0	3	0	3	0	3	0	0	3	0	1	2	0
Necrosis	3	0	3	0	0	3	0	0	2	1	3	0	3	0	0	3	0	0	3	0
Hemorrhage	2	1	2	1	1	2	0	2	1	0	3	0	3	0	0	3	0	3	0	0
Granulation	3	0	3	0	0	3	0	0	3	0	3	0	3	0	0	3	0	2	1	0
Fibrosis	3	0	3	0	2	1	0	1	2	0	3	0	3	0	0	2	1	0	0	3

Grade: -, no changes; ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe.

평균 926.7 mm²으로 감소되었다. 7일 연속 피하주사시 0.2% 및 1.6% acetic acid 투여에 의한 병변의 크기는 생리식염수에 의한 것과 비교하여 통계학적으로 유의성이 인정되었다.

3) 병리조직학적 소견

병리조직학적 검사결과는 Table 8과 같다. 피하주사

에 의한 국소 자극성 시험결과 투여 종료 후 2일째 생리 식염수와 DA-3285 투여군에서 각각 한 개체에서 피하 조직에 미약한 혈구의 유출이 관찰되었으나 그 외에 특기할만한 변화가 관찰되지 않았으며 투여 7일 후에는 모든 개체에서 유의한 변화가 인정되지 않았다. 반면 acetic acid 투여군은 단회투여 시험에서와 유사한 소견을 관찰할 수 있었으며 단회투여 시험에 비하여 피하 조직

의 섬유화가 두드러진 것이 특징이었고 1.6% acetic acid 투여군은 0.2%에 의한 것과 병변은 유사하였으나 그 정도가 보다 심하였다.

4. 혈관장해성시험

1) 육안소견

시험물질을 정주법으로 8일간 혈관내 반복투여하였을 때 혈관자극성의 육안소견은 Table 9와 같다. 투약 개시 후 7일 및 8일에 생리식염수를 투여한 개체중 한 마리에서 미약한 염증소견이 나타난 것을 제외하고 생리식염수와 DA-3285투여군에서는 혈전형성과 염증이 유발되지 않았다. 5.0% BSP투여군에서는 투여 개시 후 4일째 전례에서 심한 혈전형성과 염증소견이 관찰되었으며 혈전에 의한 혈관의 폐색으로 약물의 투여가 어려워 투약을 중단하고 부검은 다른 군과 동일하게 투여종료 후 1일에 실시하였다.

2) 병리조직학적 소견

주사부위에 대한 병리조직학적 검사결과는 Table 10과 같으며, 생리식염수 투여군의 한 개체에서 주사부위의 경미한 출혈소견과 염증세포의 침윤이 관찰되었으나 그 외의 동물과 DA-3285 투여군의 모든 개체는 주사부위의 조직에서 유의한 변화가 인정되지 않았다(Fig. 1). 5.0% BSP용액의 투여군에서는 3예 모두 혈관내피세포의 탈락 및 혈관벽괴사, 혈전형성, 혈관주위 조직의 부종, 출혈 및 염증세포침윤, 국소적 괴사, 육아조직형성 및 섬유화 등의 병변이 관찰되었다(Fig 2).

5. 혈관주위누출에 의한 국소자극성시험

1) 육안소견

시험기간 중 관찰된 주사부위의 국소병변 평점은 Table 11과 같이 도식화될 수 있다. 투여후 3시간에 생리식염수, 매체대조물질 및 DA-3285를 투여한 개체들

Table 9. Macroscopic changes of the auricles of rabbits infused with DA-3285 and various controls for 8 days

Substance	Animal No.	Thrombogenesis (days)								Inflammation (days)							
		1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
Saline	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DA-3285 (3.5%)	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BSP ^{a)} (5.0%)	7	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+	+	++	+++	+++	+++	+++
	8	-	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	+	+	+++	+++	+++	+++
	9	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+	+	++	+++	+++	+++	+++

^{a)}Bromsulphalein (sulphobromophthalein).

Table 10. Microscopic findings around the ear vein of rabbits treated with DA-3285 and various controls for 8 days

Substance	Saline	DA-3285		BSP ^{a)}		
n	3	3		3		
Grade	- ± +	- ± +	+ ++ +++			
Venous wall						
Desquamation of endothelium	3	0	0	3	0	0
Necrosis	3	0	0	3	0	0
Lumen						
Thrombus	3	0	0	3	0	0
Perivascular area						
Edema	2	1	0	2	1	0
Cellular infiltration	2	1	0	3	0	0
Hemorrhage	2	1	0	3	0	0
Necrosis	3	0	0	3	0	0
Granulation	3	0	0	3	0	0

^{a)}5.0% bromsulphalein (sulphobromophthalein).

Grade: -, No change; ±, Very slight; +, Slight; ++, moderate; +++, Severe.

의 각각 1마리에서 주사부위의 경도 종창이 인정되었으나 투여 후 1일에는 모두 정상으로 회복되어 이후 유의한 변화를 관찰할 수 없었다. 양성대조물질인 acetic acid 0.75%액을 투여한 개체들은 주사 후 국소병변이 진행되어 7일후에는 발적, 종창과 개체에 따라 경도 또는 중등도의 국소적 괴사소견이 관찰되었다. Acetic acid 6.0%액을 투여한 개체들은 주사 후 국소병

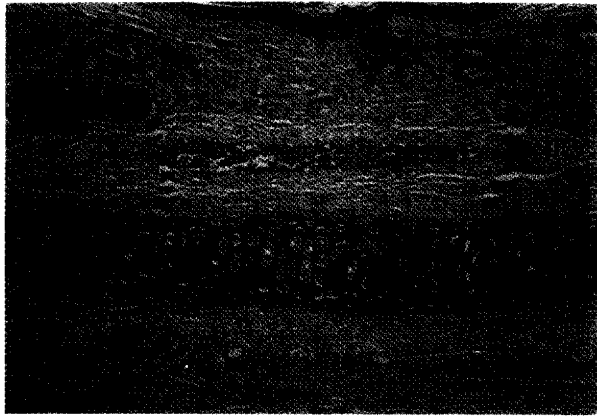


Fig. 1. The vein retroauricularis of a rabbit after 8-day repeated intravenous infusion of DA-3285. No abnormal change noted (HE stain, $\times 100$).

변이 진행되어 7일 후에는 이러한 병변이 더욱 진행되어 보다 심한 괴사 및 궤양병소가 관찰되었다.

2) 병리조직학적 소견

주사 후 7일에 실시한 병리조직학적 검사결과는 Table 12와 같으며, 생리식염수와 용매 및 DA-3285를 투여한 제 1, 2, 3시험군에서는 특기할만한 변화가 인

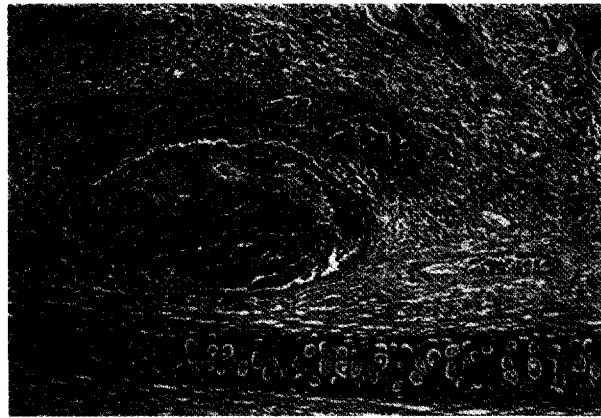


Fig. 2. Tissue around vein retroauricularis of a rabbit after 4 day repeated intravenous infusion of 5% BSP. There were moderate thrombosis, edematous changes and cellular infiltration (HE stain, $\times 100$).

Table 11. The results of macroscopic observation for 7 days after perivascular injection with DA-3285 and various compounds (Mean \pm STD)

Substance	Time of experiment				
	3 hrs	1 day	3 days	5 days	7 days
Saline	0.2 \pm 0.4	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Vehicle	0.1 \pm 0.3	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
DA-3285	0.2 \pm 0.4	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
0.75% A. A.	1.0 \pm 0*	1.2 \pm 0.4*	1.9 \pm 0.3*	2.6 \pm 0.5*	2.8 \pm 0.4*
6.0% A. A.	1.0 \pm 0*	1.7 \pm 0.5*	3.4 \pm 0.5*	3.6 \pm 0.5*	3.9 \pm 0.3*

*Significantly different from saline control ($p < 0.05$).

Table 12. Microscopic findings around the caudal vein of mice 10 days after perivascular injection with DA-3285 and various compounds

Substance	Saline		Vehicle		DA-3285		0.75% A.A.				6.0% A.A.			
	n	10	n	10	n	10	-	\pm	+	++	\pm	+	++	+++
Cutaneous layer														
Necrosis and ulcer		10 0		10 0		10 0	0	0	8	2	0	0	4	6
Proliferation of prickle cells		10 0		10 0		10 0	0	0	8	2	0	6	4	0
Subcutaneous layer														
Edematous change		10 0		10 0		10 0	0	4	6	0	0	10	0	0
Cellular infiltration		10 0		10 0		10 0	0	0	2	8	0	3	7	0
Granulation		10 0		10 0		10 0	0	0	6	4	0	0	5	5
Fibrosis		10 0		10 0		10 0	0	3	7	0	0	3	5	2
Muscular degeneration		10 0		10 0		10 0	0	4	6	0	0	0	10	0
Degeneration of bone		10 0		10 0		10 0	10	0	0	0	2	8	0	0

Grade: -, No change; \pm , Very slight; +, Slight; ++, moderate; +++, severe.

정되지 않았다. Acetic acid 0.75%액을 투여한 개체들에서는 외피의 유극세포(prickle cells) 증식에 의한 비후와 일부에서는 괴사에 의한 궤양의 형성 및 호중구의 침윤에 의한 화농소형성 등이 관찰되었다. 피하 결제조직은 수종성 변화와 신생육아조직의 형성 및 일부 섬유화소견이 인정되었고, 근섬유는 국소적으로 위축과 변성소견을 나타내었다. Acetic acid 6.0%액을 투여한 개체들은 보다 심한 변화를 나타내었는데 외피층의 상당부분이 괴사되었고 화농소가 넓게 분포하며 피하 결제조직에는 대식구(macrophage) 위주의 염증세포침윤 및 육아조직형성이 관찰되었다. 일부 동물에서는 섬유화소견이 관찰되었으며 근섬유는 보다 심한 변성 및 괴사로 형태의 소실도 관찰되었다.

IV. 고 찰

유전자재조합 human erythropoietin(rHu-EPO)은 면역학적 및 생물학적 활성이 사람 유래의 EPO와 동등하여 임상사용시 항체생성이나 면역관련 부작용은 문제되지 않는 것으로 알려져 있으며, 고혈압과 고칼륨혈증(Jacquot 등, 1987) 및 편두통, 구토, 발열, 오한, 설사 등의 influenza감염증과 유사한 증상의 발현(Winearls 등, 1986) 및 발작(seizure)과 같은 신경증상의 발현 등이 보고되고 있으나 rHu-EPO와 이들 보고된 부작용과의 직접적인 관련성은 불확실하다(Samtleben 등, 1991). 또한 rHu-EPO를 장기투여하는 환자에서 기능성 철분결핍증이 유발될 수 있으므로 투여기간중에 혈중철분량을 측정하여 적정하게 유지할 수 있도록 보충해줄 것이 권장되고 있다(McDougall 등, 1991). 이러한 부작용 발현의 위험성에도 불구하고 rHu-EPO는 반복적인 수혈을 필요로 하는 CRF환자의 혈액장애를 효과적으로 개선하여 삶의 질(Quality of life, Q.O.L.)을 향상시켜주는 긍정적인 측면이 강하게 부각되고 있으며 약품의 risk/benefit 비교에서 우수한 제제로 받아들여지고 있다(Casati 등, 1987).

임상사용시 rHu-EPO는 75-450 IU/kg용량을 정맥내 투여(i.v.) 또는 피하주사(s.c.)로 주 3회 분할하여 투약하며 혈중 적혈구수가 정상화될 때까지 장기간 반복 투약하기 때문에 다른 제제에 비교하여 투약시 주사부위의 국소자극성이 문제될 가능성이 높다. 또한, 비록 약물 자체에 의한 것이 아니고 용매에 의한 부작용으로 밝혀졌으나 피하주사로 투약받은 환자에서 주사부위의 미약한 작열통(burning pain)이 보고되었으며 rHu-EPO 제제의 안전성평가시 국소자극성에 대한 세심한 검토가 요구된다(Frenken 등, 1991). 본 시험에서

는 rHu-EPO인 DA-3285의 국소자극성을 평가하기 위하여 안점막시험을 실시하였고 DA-3285가 피하 및 정맥내투여용 주사제이기 때문에 다른 제형의 자극성 평가에 많이 이용되는 피부도포법대신 실제 임상에 가까운 시험계를 이용하고자 단회 및 7일반복 피하투여에 의한 국소자극시험, 혈관장해시험 및 혈관주위모델을 이용한 피부자극시험을 실시하였다. 약물의 임상사용시 우발적인 접촉에 의한 점막자극성을 평가하고자 실시된 안점막자극시험결과 예정임상제형중 최고농도인 3.5% 용액(10,000IU/ml)은 세척 및 비세척시 모두 무자극물질로 분류되었다. 임상에서 rHu-EPO는 정맥내투여법이 많이 이용되고 있으나 최근에는 피하투여에 의한 방법이 혈중 EPO농도가 오래 유지되며 보다 낮은 용량으로도 유효농도를 얻을 수 있어 치료비용 및 부작용을 경감시킬 수 있고 주사가 용이하여 환자에게 편리하게 이용될 수 있어 향후 rHu-EPO의 투여법으로 많이 이용될 것으로 예상된다(Egrie 등, 1988; Steinhauer 등, 1991). 따라서 DA-3285의 국소자극성 평가를 위한 여러 시험계에서 피하주사시 자극성을 평가하는 것은 중요한 항목으로 판단되었다. 본 시험에서 피하주사에 의한 자극성평가 시험을 실시한 결과 DA-3285의 단회투여 및 장기간의 반복투여에 의하여 발현 가능한 자극성은 생리식염수와 동등한 정도인 것으로 생각되었다. 또한 정맥내투여용 주사제는 혈전증, 정맥염 및 정맥주위염 등을 유발할 수 있으며 실제 임상에서 자주 접하게 되는 문제라고 할 수 있다(赤石英 등, 1974). 따라서 정맥내투여용 주사제에 대한 혈관장해성과 혈관외누출(extravasation)에 의한 혈관주위조직에의 자극도에 대한 평가는 전임상개발과정중에 필히 검토되어야 할 항목으로 고려되고 있다. 본 연구에서 DA-3285의 혈관장해성을 검토한 결과 혈전형성 및 혈관주위염증과 같은 약물의 영향으로 보이는 국소병변을 야기시키지 않았다. 또한 혈관주위주사에 의한 자극성시험결과에서도 육안 및 조직학적으로 유의한 변화를 보이지 않았으며 DA-3285의 임상사용시 우발적인 혈관주위누출에 의한 자극성은 생리식염수와 동등한 정도인 것으로 생각되었다.

이상의 결과에 의하면 새로운 rHu-EPO인 DA-3285는 예정임상최고농도인 3.5% 용액(10,000 IU/ml)으로 사용할 경우 국소자극성이 생리식염수와 동등한 정도로 임상사용시 문제되지 않을 것으로 판단되었다.

참고문헌

Balsari, A., Lombardo, N. and Ghione, M. (1989): Skin

- and perivascular toxicity induced experimentally by doxorubicin, *J. Chemother.*, **1**, 324.
- Casati, S., Passerini, P., Campise, M.R., Graziani, G., Cesana, B., Persic, M. and Ponticelli, C. (1987): Benefits and risks of protracted treatment with human recombinant erythropoietin in patients having hemodialysis, *Br. Med. J.*, **295**, 1017-1020.
- Egrie, J.C., Eschbach, J.W., McGuire, I. and Adamson, J.W. (1988): Pharmacokinetics of recombinant human erythropoietin(r-HuEPO) administered to hemodialysis(HD) patients, *Kidney Int.*, **32**, 262.
- Eschbach, J.W., Frunk, D., Adamson, J., Kuhn, I., Scribner, B.H. and Finch, C.A. (1967): Erythropoiesis in patients with renal failure undergoing chronic dialysis, *N. Engl. J. Med.*, **276**, 653-658.
- Frenken, L.A. M., Van Lier, H.J., Gerlag, P.G., Den Hartog, M. and Koene, R.A.P. (1991): Assessment of pain after subcutaneous injection of erythropoietin in patients receiving haemodialysis, *Br. Med. J.*, **303**, 288.
- Gad, S.C and Weil, C.S. (1989): Statistics for toxicologists in Principles and Methods of Toxicology (Hayes, A. W. Ed), (Raven press, New York), pp. 453-454.
- 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- Haguët, M., Lefebvre, A., Berthelot, J.M., Peterlongo, P. and Castaigne, J. P. (1987): Recombinant erythropoietin and blood pressure, *Lancet*, **ii**, 1083.
- Lindsay, R.M. and Burton, J.A. (1972): Blood loss from cannulation sites during hemodialysis, *Scott. Med. J.*, **17**, 266-269.
- McDougall, I.C., Hutton, R.D., Coles, G.A. and Williams, J.D. (1991): The use of erythropoietin in renal failure, *Postgrad. Med. J.*, **67**, 9-15.
- Merrill, R.H. (1979): Iron metabolism in end stage renal disease, *Dialysis and transplantation*, **8**, 898-904.
- Ridley, D.M., Dawkins, F. and Perlin, E. (1994): Erythropoietin: A review, *J. Natl. Med. Assoc.*, **86**: 129-135.
- Samtleben, W., Ehmer, B., Lutz-Knochenhauer, I., Hagman, C., Seigalla, P. and Gurland, H.J. (1991): Side effects during recombinant human erythropoietin therapy in 2000 ESRD patients, *Contib. Nephrol.*, **88**, 107-116.
- Steinhauer, H.B., Lubrick-Birkner, I., Dreyling, K.W. and Schollmeyer, P. (1991): Effect of human recombinant erythropoietin on anemia and dialysis efficacy in patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis, *Eur. J. Clin. Invest.*, **21**, 47-52.
- Vreugdenhil, G. Frenken, L.A.M. and Koene, 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.
- 府川和永, 伊藤義彦, 三崎則幸, 野村聰子 (1975): 静脈注射による血全性静脈炎に於ける實驗的研究, *日藥理紙*, **71**, 307-315.
- 赤石英, 押田茂美, 高橋由美子 (1974): 藥劑に關する醫療事故について, *月刊藥事*, **16**(6), 901.
- 厚生省資料 (1979): 注射劑の局所障害性に關す試驗法(案), *醫藥ジャーナル*, **15**, 447-449.
- 국립보건안전연구원 (1993): 안점막자극시험결과의 관찰 방법 및 판정기록 및 성적평가, 독성시험 표준작업지침서, pp. 496-499.
- 국립보건안전연구원 (1994): 의약품등의 독성시험기준, 국립보건안전연구원 고시 제94-3호.