

## 인체 재조합 적혈구 조혈인자, rHu-EPO의 유전독성 평가

김혁식 · 곽승준 · 천선아 · 임소영 · 안미영 · 김원배\* · 김병문\* · 안병옥\* · 서동상\*\* · 이병무<sup>1)</sup>

성균관대학교 약학대학 독성학교실, \*동아제약 중앙연구소

\*\*성균관대학교 생명자원과학대 유전공학과

(1996. 8. 1 접수)

### **Genotoxic evaluation of recombinant human erythropoietin (rHu-EPO) in short-term assays.**

**Hyung Sik Kim, Seung Jun Kwack, Sun Ah Chun, So Young Lim, Mi, Young Ahn, Won Bae Kim\*,  
Byoung Mun Kim\*, Byoung Ok Ahn\*, Dong Sang Suh\*\* and Byung Mu Lee**

*Division of Toxicology, School of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Kyunggi-Do, Suwon 440-746, Korea*

*\*Dong-A Pharm. Co., LTD., Kyunggi-Do, Suwon 449-900, Korea*

*\*\*Division of Genetic Engineering, Sung Kyun Kwan University, Kyunggi-Do, Suwon 440-746, Korea*

**ABSTRACT :** The mutagenic potential of rHu-EPO was evaluated using the short-term genotoxicity tests including Ames, chromosome aberration and micronuclei tests.

In *Salmonella typhimurium* assay, rHu-EPO did not show any mutagenic response in the absence or presence of S9 mix with TA98, TA100, TA1535, and TA1537. In chromosome aberration test, rHu-EPO did not show any significant effect on Chinese Hamster Ovary(CHO) cells compared with control.

In micronucleus test using male ICR mice, a dose-dependence increase in the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes(MNPCEs) was observed in bone marrow cells treated with rHu-EPO. However, it was related to the secondary effect of rHu-EPO and the number of MNPCEs was equal to spontaneous frequency. These results indicate that rHu-EPO does not show any positive response in short-term genotoxicity assays.

**Key Words :** rHu-EPO, genotoxicity tests, chromosome aberration, Ames test, micronucleus test

## 서 론

Erythropoietin(EPO)은 골수내 erythroid progenitor cell의 분화와 증식을 촉진하여 적혈구 생성을 유도하는 내분비성 호르몬인 glycoprotein으로서(Eschbach and Adamson, 1989) 주로 신장에서 생성된다(Koury *et al.*, 1988). 사람의 erythropoietin은 분자량이 약 30.4 kDa으로 과거에는 뇨에서 정제하였으나, 1985년 사람 EPO 유전자의 염기배열이 알려진 후(Jacobs *et al.*, 1985), 여러 가지 host cell들에서 발현되어 현재, 유전자 재조합 기법을 이용한 대량 생산이 가능하게 되었다. 이와같이 유전자 재조합기술에 의해 개발된 rHu-EPO은 만성 신질환

환자와 임상적으로 각종 빈혈 및 조혈장애의 치료에 사용되고 있다. 특히, 이들 제제는 장기간 치료가 요구되며 또한 조혈세포에 직접적인 영향을 미칠 수 있으므로 임상사용시 주의가 요구되나 그 효과가 우수하여 현재 널리 이용되고 있다.

따라서 본 연구에서는 (주)동아제약에서 유전자 재조합기술에 의해 개발된 rHu-EPO대한 전임상시험중 변이원성 여부를 평가하기 위해 실시하였다. rHu-EPO에 대한 유전독성평가 시험으로는 변이원성의 검색에 가장 널리 이용되는 *Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이 시험, 포유동물 배양세포를 이용한 염색체이상시험 및 마우스 골수세포에서의 소핵시험등을 수행하였다.

<sup>1)</sup>To whom all correspondences should be addressed.

## 재료 및 방법

### 시약

rHu-EPO(Lot. No., ETS-002, 25,000IU/ml)는 (주)동아제약에서 입수하여 시험에 사용하였으며, 양성대조물질인 2-nitrofluorene(N1675-4), 2-aminofluorene(A5,550-0), 9-aminoacridine(A3,840-1) 등은 Aldrich Chem. Co.(Milwaukee, WI)에서 구입하였으며, L-histidine, biotine, benzo[a]pyrene, mitomycin C, sodium azide등은 (S 8032)는 Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO)에서 구입하였다. Bacto agar, Fetal bovine serum, Colcemid 및 Giemsa등은 Gibco-BRL (Gaithersburg, MD)에서 구입하였다.

### 시험물질의 조제 및 농도

시험물질인 rHu-EPO는 (주)동아제약에서 유전자 재조합 기술에 의해 생산된 당단백이다. 시험물질은 입수한 즉시 -20°C에서 보관하였으며 시험직전에 개봉하여 시험물질 희석용 완충액(Lot. No. ETB-003)에 혼탁하여 사용하였다. 변이원성 시험에 적용하기 위한 농도 설정은 1,000 unit/plate를 최고농도로 하여 공비 2로 5개 농도를 설정하였다. 포유동물 배양세포를 이용한 염색체이상시험에서는 1,000 unit/ml를 최고농도로 하고 공비 2로 3단계 농도를 설정하였다. 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험에서는 25,000 unit/kg을 최고농도로하고 공비 5로 하여 3개 농도를 설정하였다.

### Rat 간 S9 mix의 조제

Sprague-Dawley 계 수컷 랫드(체중 약 220~230 g, 7주령)에 약물대사효소계 유도체인 Aroclor 1254를 500 mg/kg으로 1회 복강내 투여하였다. 투여 5일째에 경추탈골에 의해 도살하여 간장을 적출하고 관류하여 혈액을 제거한 후 3배량의 150 mM KCl용액으로 균질화 하였다. 이것을 9,000×g에서 원심 분리하여 얻어진 상청액을 효소액(S9 fraction)으로 하여 사용할 때까지 -80 °C에서 동결보존 하였다. 동결보존하기 전 조제한 S9분획 0.1 ml을 Top agar와 함께 변이원성 검색용 배지에 도포하여 무균성을 확인하였다. S9 mix의 조제는 시험실 시직전에 용시조제 하여 0.22 μm로 여과하여 사용하였다.

### 복귀돌연변이시험

Maron and Ames(1983)의 방법에 따라 복귀돌연변이시험을

실시하였다. *Salmonella typhimurium* 균주(TA98, TA100, TA1535 및 TA1537)는 B.N. Ames 교수로부터 입수하여 사용하였다. 각 균주의 보존액 0.1 ml을 50 ml의 nutrient broth 배지에 가해 37°C에서 12시간 진탕배양하였다. 배양종료후 균배양액을 원심분리(2,200 rpm, 20분, 40°C)하여 배양액을 제거한 후 균 pellet을 0.1 M 인산완충액(pH 7.4)에 혼탁하였다(약 2×10<sup>8</sup>개/ml). 균현탁액 0.1 ml에 시험물질용액(0.1 ml) 및 인산완충액 또는 S9 mix(0.5 ml)를 가한 후 37°C에서 30분간 preincubation 하였다. 그후 바로 Top agar 2 ml을 첨가하여 혼합하고 glucose 한천평판배지에 접종하여 37°C에서 약 48시간이상 배양한후 복귀변이체 colony수를 수동식 칩락계수기로 계수하였다.

### 염색체이상시험

Chinese Hamster Ovary(CHO/K1) cells은 한국세포주재단으로부터 분양받아 사용하였다. rHu-EPO에 대한 예비독성시험에서 최고농도인 2,500 U/ml에서도 세포독성이 나타나지 않았다. 따라서 본 시험에서는 최고농도를 1,000 U/ml로 하고, 500 U/ml 및 250 U/ml의 3단계 용량과 용매대조군 및 기지의 양성 대조군을 설정하고, 대사활성의 부재 및 존재하에서 시험하였다.

대사활성 부재하의 시험은 CHO 세포를 60 mm의 petri dish에 1×10<sup>5</sup>/ml 되도록 퍼종하여 2 일간 배양한 후, 각각 시험 물질과 양성 대조 물질 등을 함유하는 배양액으로 교환하여 22시간동안 배양하였다. 그 후 각 petri dish에 colcemid를 0.2 μg/ml 되도록 처리한 후 2시간동안 더 배양하여 총 검체 처리 시간이 24시간이 되도록 하였다. 세포의 arrest정도를 현미경 하에서 관찰한 후 0.25% trypsin-1 mM EDTA로 15 ml-원심분리관에 세포를 모은후 37°C의 저장액(0.075 M KCl) 4 ml에 잘 혼탁 시킨후 37°C 수조에 20분간 방치하고, 고정액(methanol:acetic acid=3:1)으로 3회 고정시킨후 공기 건조법으로 slide를 제작하여, 5% Giemsa 염색액으로 30분간 염색하여 현미경으로 관찰하였다(Ishidate, 1978; Evans et al., 1964).

대사활성 존재하의 시험은 CHO 세포를 60 mm의 petri dish에 1×10<sup>5</sup>/ml 되도록 퍼종하여 2 일간 배양한 후, 각각 S9 mix(배양액의 20% 비율)와 시험물질 또는 양성 대조물질이 포함된 배양액으로 6시간 배양한후, 보통의 배양액으로 교환하여 18시간동안 더 배양하여 세포 수거 2시간전에 colcemid를 처리한후 세포를 수거, 표본제작을 하였다. 양성대조군으로는 각 변이원 물질의 특성에 따라 대사활성 부재하에서는 mitomycin C 0.2 μg/ml을, 대사활성 존재하에서는 benz[a]pyrene 0.02 mg/ml을 사용하였다.

## 소핵시험

7주령 ICR 계 마우스를 B&K(U.S.A.)사로부터 공급받아 온도  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , 습도  $55 \pm 5\%$ , 배기 10-18회/hr, 형광등 명암 12 hr cycle, 조도 300-500 Lux의 사육환경에서 폴리카보네이트 사육상자( $70\text{W} \times 240\text{L} \times 120\text{H mm}$ )케이지에 6마리씩 넣어 사육하였다. 1주일간의 순화사육기간동안 관찰하여 정상적인 동물만 시험에 사용하였다. 사료는 제일사료주식회사의 실험동물사료를 구입하여 고압증기멸균기에서  $121^\circ\text{C}$ , 15분간 멸균한다음 실험동물에 자유로이 공급하였으며, 음용수는 수도수를 자유공급하였다. 순화기간을 거친 모든 동물의 체중을 측정, 소정의 범위에 속하는 동물을 선별하여 무작위로 각 군에 6마리씩 배분하였다. 개체의 식별은 색소에 의한 부위별 피모염색법과 사육상자별 tag 표시법을 이용하였다.

시험물질 투여량은 25,000 U/kg을 최고농도로 하고 공비 5로 3단계의 농도를 설정하였다. 용매대조물질로는 시험물질의 조제에 사용한 희석용완충액을 사용하였으며, 양성대조물질은 mitomycin C (MMC)를 주사용중류수에 용해시켜 사용하였다. 각 시험물질용액은 1 ml용량의 일회용주사기를 사용하여 10 ml/kg의 용량으로 단계 희석하여 1회 복강내투여 하였으며, 양성대조물질도 10 ml/kg의 용량으로 조제하여 1회 복강내투여 하였다.

시험물질 투여후 24시간에서 경추탈구에 의해 도살한 동물의 양쪽대퇴골로부터 골수를 0.5 ml의 Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco)을 주입한 1 ml용 1회용주사기(23 gauge 주사침

사용)를 삽입하여 채취한후 골수세포 부유액을 1,500 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 제거한후 침전된 골수를 pasteur pipette으로 소량의 혈청에 고르게 혼탁시켜 청결한 슬라이드에 떨어뜨려 도말하고 공기중에서 충분히 건조시킨다음 메탄올에 5분간 고정시켰다. 건조가 끝난 표본을 4% Giemsa액(1/150 M phosphate buffer, pH 6.8)에 30분간 염색하고, 염색후 동일 완충액에 1회 세척한 후 0.004%의 구연산수용액에 다시 수초간 세척한 다음, 중류수에 수회 세척하고 공기중에서 건조시켰다(Schmid, 1975).

마우스 1개체당 1,000개의 적혈구에서 다염성적혈구(poly-chromatic erythrocyte, PCE)와 정염성적혈구(normochromatic erythrocyte, NCE)의 비를 구하고 다시 1,000개의 다염성적혈구중에서 소핵을 가진 다염성적혈구의 출현빈도를 구하였다. 계수시 소핵의 크기는 세포직경의 1/2로부터 식별가능한 범위까지로 하였으며, 주변 유핵세포의 핵과 염색상이 동일한 것을 선택하였다.

## 결 과

### 미생물을 이용한 복귀돌연변이시험

시험물질인 rHu-EPO의 복귀돌연변이 시험결과 직접법의 경우 시험물질의 모든 용량단계에서 시험군주인 TA98, TA100, TA1535 및 TA1537에 대한 복귀변이 집락 수는 음성대조군과 거의 유사하거나 그 이하로 나타났다. 또한 대사활성

**Table 1.** Reverse mutation test of rHu-EPO in *Salmonella typhimurium*

Compound	Dose (U/plate)	S9 mix	No. of His <sup>r</sup> revertants/plate			
			TA 98	TA 100	TA 1535	TA 1537
Control rHu-EPO	0	-	25.1 ± 3.2	156.4 ± 5.2	9.5 ± 1.2	9.6 ± 1.2
	1,000	-	15.4 ± 1.5	121.5 ± 6.8	5.8 ± 0.5	8.4 ± 2.5
	500	-	26.7 ± 3.4	116.9 ± 7.6	11.6 ± 2.4	7.6 ± 0.9
	250	-	24.2 ± 1.8	132.4 ± 9.5	15.4 ± 1.9	13.7 ± 1.5
	125	-	31.4 ± 4.6	128.6 ± 7.5	13.8 ± 1.2	12.6 ± 1.4
	63	-	21.8 ± 1.9	130.2 ± 4.1	15.4 ± 2.1	9.5 ± 1.0
2-NF	1 µg/plate	-	325.6 ± 25.1			
SAZ	1 µg/plate	-		625.3 ± 26.1	521.6 ± 39.4	
9-AA	50 µg/plate	-				1214.5 ± 56.8
Control rHu-EPO	+	35.4 ± 4.2	124.5 ± 8.9	15.8 ± 1.2	12.4 ± 2.6	
	1,000	+	28.6 ± 2.7	92.5 ± 2.6	16.4 ± 2.2	5.8 ± 1.1
	500	+	36.1 ± 4.9	141.3 ± 12.9	9.8 ± 1.4	6.3 ± 0.8
	250	+	22.3 ± 1.1	118.6 ± 9.2	8.7 ± 2.6	8.9 ± 1.1
	125	+	34.7 ± 3.1	129.3 ± 7.2	13.5 ± 2.7	10.5 ± 0.9
	63	+	32.6 ± 2.8	143.2 ± 12.9	14.6 ± 3.8	9.6 ± 2.4
2-AF	2 µg/plate	+	1453.5 ± 42.8	648.2 ± 38.9		

Abbreviations: 2NF, 2-nitrofluorene; SAZ, sodium azide; AF, 2-aminofluorene; 9-AA, 9-aminoacridine · hydrochloride

화법의 경우에 있어서도 대체적으로 직접법의 경우와 유사한 결과를 나타내었으나 TA98 및 TA100균주에 있어서는 직접법의 경우보다 약간 증가하는 경향을 나타내었다(Table 1). 본 실험에서 사용한 양성대조물질의 복귀변이 빈도는 직접법 및 간접법에서 모두 복귀변이 집락수가 대조군보다 유의성 있는 증가를 나타냈다. 이상의 결과 본 시험조건에서는 rHu-EPO가 돌연변이 유발성이 없는 것으로 판단되었으며 또한 돌연변이 유발성 물질이 포함되지 않는 것으로 평가되었다.

#### 염색체이상시험

본 제제의 세포독성에 대한 예비시험에서는 최고용량인 2,500 U/ml에서 세포독성을 나타내지 않았다. 본 시험에서는 양성대조물질로서 대사활성화제의 유무에 따라 B[a]P과 MMC를 각각 시험한 결과, MMC의 경우 34%이상이, B[a]P의 경우는 28%이상의 염색체이상을 가진 세포가 출현하였다. 반면에 본 시험물질인 rHu-EPO를 처리한 모든 시험농도에서 대사활

성화제의 유무에 따라 시험한 결과 모두 3% 이하의 염색체이상을 가진 세포가 출현하였다. 또한 본 시험물질에 의한 염색체이상의 형태는 chromosome에서 보다는 chromatid 내에서의 breakage 및 interchange가 있었으나 모두 5% 이하로 염색체이상시험에서는 음성으로 평가되었다(Table 2).

#### 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험

시험물질 및 양성대조물질을 복강투여한후 최종 시간까지 비특이적이라고 평가되는 임상소견은 없었다. 시험물질 투여에 의해 다염성적혈구에서 소핵의 출현율은 1,000 U/kg 투여군에서 0.08%, 5,000 U/kg 투여군에서 0.12% 및 25,000 U/kg 투여군에서는 0.15%로 용량의존적으로 약간 증가하였으나 음성대조군과 비교하여 통계학적인 유의성은 없었다. 반면에 양성대조인 MMC투여에 의한 소핵출현빈도는 4% 이상으로 높은 소핵 출현율을 나타내었다(Table 3). 또한 시험물질 투여에 의해 normochromatic erythrocytes(NCEs)가 대조군에 비해 증

**Table 2.** Chromosome aberration test of rHu-EPO in chinese hamster ovary cells

compound	Dose (U/ml)	S-9 mix	Treatment time(hrs)	Frequencies of aberrant cells							No. of cells scored	
				ctg	ctb	cte	csg	csb	cse	frg		
Saline	-	-	24	1							1	100
rHu-EPO	1,000	-	24	1	1	1					3	100
	500	-	24				2				2	100
	250	-	24		1	1					2	100
MMC	0.2 µg/ml	-	24	6	5	15		1	7		34	100
DMSO	+	-	6								0	100
rHu-EPO	1,000	+	6		1	1				1	3	100
	500	+	6		1	1					2	100
	250	+	6	1		1		4			2	100
B[a]P	0.02 mg/ml	+	6	6	6	12			4		28	100

Abbreviations: DMSO, dimethyl sulfoxide; ctg, chromatid and isochromatid gap; ctb, chromatid breakage; cte, chromatid exchange; csg, chromosome gap; csb, chromosome breakage; cse, chromosome exchange; frg, fragment; MMC, mitomycin C; B[a]P, Benz[a]pyrene.

**Table 3.** Micronucleus test in male ICR mice treated with rHu-EPO

Test Compound	Dose (U/kg)	Route	No. of mice tested	Exposure time(hr)	MNPCE% <sup>1</sup> (Mean ± SD)	PCE/PCE+NCE <sup>2</sup> (Mean ± SD)
Control <sup>3</sup>	0	i.p.	6	24	0.05 ± 0.08	0.53 ± 0.07
r-Hu-EPO	25,000	i.p.	6	24	0.15 ± 0.10	0.36 ± 0.04
	5,000	i.p.	6	24	0.12 ± 0.08	0.42 ± 0.05
	1,000	i.p.	6	24	0.08 ± 0.07	0.45 ± 0.06
MMC <sup>4</sup>	2 mg/kg	i.p.	6	24	4.25 ± 1.16	0.34 ± 0.03

<sup>1</sup>MNPCE: micronucleated polychromatic erythrocytes/1,000 polychromatic erythrocytes.

<sup>2</sup>PCE/PCE+NCE: polychromatic erythrocytes/1,000 erythrocytes.

<sup>3</sup>Control: rHu-EPO dilution buffer

<sup>4</sup>MMC: mitomycin C

가하였다. 또한 양성대조인 MMC투여에 의해서도 이와 유사한 경향을 나타내었다.

## 고 칠

유전자 재조합기술에 의해 개발된 rHu-EPO에 대한 전임상 시험중 유전독성평가의 일환으로 변이원성시험에 가장 널리 이용되는 *Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이 시험, 포유동물 배양세포를 이용한 염색체이상시험 및 마우스 골수세포에서의 소핵시험등을 실시하여 변이원성 유,무를 평가하였다. 시험물질인 rHu-EPO에 대한 미생물을 이용한 복귀돌연변이시험에서는 시험군주인 TA98, TA100, TA1535 및 TA1537를 이용하였다. 본 실험에서는 대사활성화법의 경우에 있어서 TA98 및 TA100군주는 직접법의 경우보다 약간 증가하는 경향을 나타내었다. 본 실험에서 사용한 양성대조물질의 복귀변이 빈도는 직접법 및 간접법에서 모두 복귀변이 집락수가 대조군보다 유의성 있는 증가를 나타냈다. 따라서, 본 시험 조건에서는 rHu-EPO가 돌연변이 유발성이 없는 것으로 판단되었으며, 또한 돌연변이 유발성 물질이 포함되지 않는 것으로 평가되었다. 포유동물 배양세포를 이용한 염색체이상시험에서는 본 시험물질인 rHu-EPO를 처리한 모든 시험농도에서 대사 활성화제의 유무에 따라 시험한 결과 모두 3% 이하의 염색체 이상을 가진 세포가 출현하였다. 또한 본 시험물질에 의한 염색체이상의 형태는 chromosome에서 보다는 chromatid 내에서의 breakage 및 interchange가 있었으나 모두 3% 이하로 염색체 이상시험에서는 음성으로 평가되었다. 염색체이상시험은 Ames test와 함께 현재 가장 많이 이용되고 있는 유전독성시험 중 하나로서 시험절차의 간편함과 재현성 있는 결과로 인해 여러분야에서 화학물질의 유전자에 대한 영향평가에 이용되고 있다. 시험대상으로 Chinese Hamster 유래의 여러가지 배양세포(CHO, CHL, V79등)가 많이 이용되고 있으며(Koyama et al., 1970), 본시험에서도 포유동물 세포인 CHO 세포를 이용하였다. 예비독성시험 및 본시험에서 시험물질의 처리시간은 직접법에서 24시간, 대사활성화법에서는 6시간으로 하였다.

마우스 골수세포를 이용한 소핵시험에서는 시험물질 투여에 의해 다염성적혈구에서 소핵의 출현율이 용량의존적으로 약간 증가하는 경향을 나타냈으며, 또한 normochromatic erythrocytes(NCEs)가 대조군에 비해 증가하였다. 또한 양성대조인 MMC투여에 의해서도 이와 유사한 경향을 나타내었다. 일반적으로 erythropoietin투여에 의해 erythroblast의 증가를 일으켜 세망적혈구수와 소핵을 수반하는 다염성적혈구의 증가를 일으킬수 있다는 보고가 있으나(Yajima et al., 1993a; 1993b), 본 실험에서는 대조군과 유의한 차이를 나타내지는

않았다. 또한 Beak 등 (1995)은 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험에서  $5 \times 10^5$  U/kg의 EPO를 정맥으로 투여할 때 소핵출현율이 음성대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다고 보고한 바 있다. Tanaka 등 (1990)도 EPO투여에 의해 양성의 결과를 나타냈다고 보고한바 있다. 이의 결과는 EPO 자체가 DNA에 직접작용하여 나타난 결과라기보다는 적혈구 전구세포의 분화 및 증식촉진에 의한 2차적인 요인으로 평가되었다. 본 시험에서는 임상 사용량의 500배인 rHu-EPO 25,000 U/kg을 복강투여할 때 소핵의 출현율은 용량의존적으로 증가하는 경향을 나타냈으나 모두 자연발생적인 소핵출현율보다 낮았다.

## 결 론

유전자 재조합기술에 의해 개발된 rHu-EPO에 대한 유전독성 평가 시험으로는 변이원성의 검색에 가장 널리 이용되는 Ames test, 염색체이상시험 및 소핵시험등을 수행하였다. 시험물질 r-Hu-EPO의 *Salmonella typhimurium* 복귀돌연변이시험에서 시험용군주인 TA98, TA100, TA1535, TA1537등 4개의 군주에 대하여 전용량단계에서 음성대조와 같은 정도의 복귀변이 집락수를 나타내었다. 따라서 본 시험조건에서 r-Hu-EPO는 돌연변이 유발성이 없는 것으로 평가되었다. 또한 염색체이상시험에서도 시험물질인 rHu-EPO 처리에 의해서는 염색체 이상을 가진 세포의 출현빈도는 3% 이하였다. 따라서 rHu-EPO는 CHO세포에 대하여 염색체이상유발성이 없는 것으로 판단된다. 마우스의 골수세포를 이용한 소핵시험에서도 본 시험조건에서는 rHu-EPO가 마우스 골수세포에 대하여 소핵유발성이 없는 것으로 나타났다.

## 참고문헌

- Ames, B.N., J. McCann, and E. Yamasaki, (1975): Methods for detecting carcinogen & mutagens with the *Salmonella/Mammalian-microsome mutagenicity test*, *Mutat. Res.* **31**: 347-364.
- Baek, N.J., D.H. Kim, S.J. Kim, K.H. Park, and H.S. Kim, (1995): Mutagenicity tests on erythropoietin(EPO) produced by recombinant DNA technique, *Environ. Mutagens & Carcinogens* **15**: 47-50.
- Eschbach, J.W. and J.W. Adamson, (1989): Guidelines for recombinant human erythropoietin therapy, *Am. J. Kidney Dis.* **14**: 2-8.
- Evans, E.P., G. Breckon, and E. Ford, (1964): An air-drying method for meiotic preparations from mammalian tests, *Cytogenetics* **3**: 289-294.
- Hayashi, M., I. Yoshimura, T. Sofuni, and M.Jr. Ishidate, (1989): A procedure for data analysis of the rodent

- micronucleus test involving a historical control, *Environ. Mol. Mutagen* **13**: 347-356.
- Ishidate, M., (1978): Data Book of Chromosomal Aberration Test in vitro. Revised Ed. L.I.C., Tokyo, Japan.
- Jacobs, K., C. Shoemaker, R. Rudersdorf, S.D. Neill, R.J. Kaufman, A. Mufson, J. Seehra, S.S. Jones, R. Hewick, E. F. Fritsch, M. Kawakita, T. Shimizu, and T. Miyake, (1985): Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin, *Nature* **313**: 806-810.
- Koury, S.T., M.C. Bondurant, and M.J. Koury, (1988): Localization of erythropoietin of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization, *Blood* **71**: 524-527.
- Koyama, H. et al., (1970): A new cell line derived from newborn Chinese hamster lung tissue, *Gann* **61**: 161-167.
- Maron, D.M. and B.N. Ames, (1983): Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutat. Res.* **113**: 173-215.
- Schmid, W., (1975): The micronucleus test, *Mutat. Res.* **31**: 9-15.
- Tanaka, N., K. Yamakage, K. Sasaki, and A. Haneda, (1990): In vitro chromosome test TYB-5220 in Chinese Hamster cells, 藥理と治療 **18**: 115-220.
- Yajima, N., Y. Kurata, E. Imai, T. Sawai, and Y. Takeshita, (1993a): Gonotoxicity of genetic recombinant human erythropoietin in a novel test system, *Mutagenesis* **8**: 231~236.
- Yajima, N., Y. Kurata, T. Sawai, and Y. Takeshita, (1993b): Induction of micronucleated erythrocytes by recombinant human erythropoietin, *Mutagenesis* **8**: 221~229.