Korean J. Toxicol.
Vol. 13, No. 1, 2 pp. 127-130, 1997

랫드와 비글개에서 EPO(Erythropoietin)의 1회 정맥 투여 급성 독성 시험

남정석 · 제정환 · 이석만 · 양재만 · 강병철 · 이학모 · 박재학* · 송동호** · 유선희** · 이영순
서울대학교 수의과대학 공중보건학교실, *실험동물의학교실, **(주)녹십자

Acute Toxicity Test with EPO (Erythropoietin) in Rats and Beagle Dogs

Jeong-Seok Nam, Jeong-hwan Che, Suk-Man Lee, Jae-Man Yang, Byeong-Cheol Kang, Hak-Mo Lee, Jae Hak Park*, Dong-Ho Song**, Sun-Hee Yoo** and Yong-Soon Lee

*Department of Public Health and *Laboratory Animal Medicine*
College of Veterinary Medicine, Seoul National University
***Korea Green Cross Corporation*
(Received Faburary 10, 1997)
(Accepted March 25, 1997)

ABSTRACT : *Acute toxicity of EPO(Erythropoietin) was investigated using rats and beagle dogs according to Established Regulation of Korean National Institute of Safety Research (1994. 4. 14). Rats and beagle dogs were injected intravenously with dosages of 20000 IU/kg, 2000 IU/kg, 200 IU/kg, 20 IU/kg and 2 IU/kg. In animals injected with EPO, there were neither dead animals nor significant changes of body weights. In addition, no differences were found between control and treated groups in clinical signs and autopsy findings. Therefore LD_{50} of EPO was considered to be higher than 20000 IU/kg B. W. in rats and beagle dogs.*

Key Words : *EPO (Erythropoietin), Acute toxicity, Rats, Beagle dogs.*

I. 서 론

Erythropoietin(EPO)는 주로 후기적아구계 전구세포의 분화단계의 세포에 작용, 그 분화증식을 촉진시켜, 적혈구의 생산을 조절하는 내인성 호르몬으로, 신장에서 생산된다고 생각되는 만큼 그 생산의 저하는 만성신부전에 합병하는 빈혈의 주원인이라 생각되고 있으며 심각한 조혈장애를 유발한다. 그래서 EPO의 임상적 적용에 관해 많은 관심이 모아져 왔는데 최근에는 신부전 뿐만아니라 azidothymidine이나 HIV와 관련된 빈혈 등의 임상적 치료에 recombinant human EPO의 적용이 다각도로 주목되고 있으며(Fisher, 1993; Yajima 등 1993), 다양한 유전자 재조합 기술을 이용하여 대량생산된 recombinant erythropoietin에 대하여 실시한 안전성시험도 보고되고 있다(Kim 등, 1994; Lim 등, 1994).

따라서 본실험에서는 조혈장애의 치료제로 주목되고 있는 EPO의 안전성 평가의 일환으로 (주)녹십자에서 분리 정제한 recombinant EPO에 대하여 랫드와 비글개에서 1회 정맥투여 급성독성시험을 국립보건안전연구원 고시 제 94-3호 "의약품 등의 독성시험기준" (1994. 4. 14)에 따라 실시하였다(국립보건안전연구원, 1994).

II. 재료 및 방법

1. 시험물질

(주)녹십자에서 분리 · 정제한 erythropoietin(EPO)을 실험에 사용하였다.

2. 실험동물

4주령의 랫드(Sprague-Dawley)를 암 · 수 각각 40마리씩을 서울대학교 실험동물 사육장에서 구입하였고, 3개월령의 비글개(beagle dogs)를 암 · 수 각각 12마리씩을 (주)해은무역에서 구입하여 약 1주간 순화시킨 후 그 기간중 일반증상을 관찰하여 건강한 동물중 랫

드는 암 · 수 각각 30마리씩을 비글개는 암 · 수 각각 12마리씩을 실험에 사용하였다. 실험기간 중 사육실 환경조건은 온도 23±3°C, 상대습도 50±10%로 하였으며, 조명시간은 오전 7시부터 오후 7시까지, 조도는 150-200 Lux로 하였다. 랫드는 랫드용 polycarbonate 상자(26×42×18 cm, 명진기계제작)에서 사육하였고, 비글개는 철망 케이지(60×40×45 cm, 해은무역)에서 사육하면서 모든 동물에 공히 사료와 음수를 자유급여하였다.

3. 시험군의 구성, 투여농도 및 용량

투여액의 조제는 20000 IU/kg을 최고용량으로하고 그 용량의 일정한 공비(x1/10)로 5단계를 설정하고, 매체를 대조물질로하여 투여하는 매체대조군을 두고, 시험물질을 1회 정맥으로 투여하며, 투여경로는 랫드는 꼬리정맥 비글개는 전완두정맥으로 투여하였다.

4. 시험항목 및 통계학적 방법

국립보건안전연구원고시 제 94-3호 '의약품 등의 독성시험기준'(1994. 4. 14)에 따라 모든 시험동물에 대하여 임상증상(anorexia, salivation, diarrhea, vomiting, polyuria, anuria, fecal change 등)은 매일 관찰하였고, 투여 개시일, 투여 후 4일 그리고 부검시에 체중을 측정하였으며, 시험중 폐사동물은 그때마다 부검을 실시하였고, 시험종료시 생존동물은 에테르마취로 치사시켜 육안적으로 모든 장기를 검사한 후, 육안적으로 이상 장기의 조직은 10% 중성 포르말린액에 고정하였다.

본 실험에서 얻은 측정치의 통계학적 분석은 LD_{50}치의 산출에는 Litchfield-Wilcoxon법을 이용하였다. 체중에 대한 유의성 검정법으로 one-way ANOVA에서 유의차가 인정되는 F값이 관찰될때 대조군과 각 용량군과 비교하기 위하여 Dunnett's t-test를 하였으며, 발생병변의 빈도는 χ^2(chi-square) 검정을 하였다.

III. 결 과

1. 폐사율(Tables 1 and 2)

시험 전기간을 통하여 모든군에서 폐사동물이 관찰되지 않았다.

2. 임상증상

시험 전기간을 통하여 모든 동물에서 본 시험물질에 의한다고 생각되는 어떠한 임상증상(anorexia, salivation, diarrhea, vomiting, polyuria, anuria, fecal change 등)도 관찰되지 않았다.

3. 체중변화(Tables 3 and 4)

랫드와 비글개의 암수 각각 5개 용량으로 투여한 군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다. 또한, 투여용량군 사이의 체중변화는 용량의존성을 나타내지 않았다.

4. 부검소견(Tables 5 and 6)

모든 동물에서 본 시험물질의 투여에 기인한다고 사료되는 어떠한 유의할 만한 병변을 관찰하지 못하였다.

Table 1. Mortality of male and female Sprague Dawley rats intravenously injected with EPO (Erythropoietin)

Sex	Dose (IU/kg B.W.)	Hours after treatment						Days after treatment							Final mortality
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	
Male	20000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5(0%)
	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5(0%)
	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5(0%)
	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5(0%)
	2	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	0/5(0%)
Female	20000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5(0%)
	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5(0%)
	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5(0%)
	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5(0%)
	2	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	0/5(0%)

Table 2. Mortality of male and female Beagle dogs intravenously injected with EPO (Erythropoietin)

Sex	Dose (IU/kg B.W.)	Hours after treatment						Days after treatment							Final mortality
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	
Male	20000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/2(0%)
	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/2(0%)
	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/2(0%)
	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/2(0%)
	2	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	0/2(0%)
Female	20000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/2(0%)
	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/2(0%)
	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/2(0%)
	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/2(0%)
	2	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	0/2(0%)

Table 3. Body weight change of male and female Sprague Dawley rats intravenously injected with EPO (Erythropoietin) (unit : g)

Sex	Days after treatment	Dose (IU/kg B.W.)					
		0	2	20	200	2000	20000
Male	0	168.40[a]±19.28(5)[b]	173.84± 9.53(5)	169.14±12.15(5)	178.46±18.70(5)	163.24±12.53(5)	167.42±10.03(5)
	4	183.58±17.00(5)	189.30±10.82(5)	180.06± 6.34(5)	187.44±12.24(5)	177.18±12.91(5)	184.92± 6.42(5)
	7	200.26±19.64(5)	205.82± 7.42(5)	195.82±10.11(5)	202.98± 9.22(5)	190.24±10.51(5)	202.84±10.92(5)
Female	0	141.54±18.79(5)	146.18± 9.73(5)	146.42±15.27(5)	139.78±29.62(5)	142.94±11.54(5)	135.32± 6.23(5)
	4	159.90±21.59(5)	172.80± 9.08(5)	170.44±16.25(5)	169.94±12.80(5)	164.62±16.32(5)	171.32± 6.12(5)
	7	188.16± 8.04(5)	184.16± 6.45(5)	180.90±11.57(5)	182.46±11.67(5)	183.30± 7.96(5)	181.36± 4.59(5)

[a] Data were presented as mean±S.D.; [b] Number of animals examined.

Table 4. Body weight change of male and female Beagle dogs intravenously injected with EPO (Erythropoietin) (unit : kg)

Sex	Days after treatment	Dose (IU/kg B.W.)					
		0	2	20	200	2000	20000
Male	0	9.60[a]±0.57(2)[b]	9.55±0.49(2)	9.45±0.35(2)	9.75±0.35(2)	9.35±0.21(2)	9.50±0.71(2)
	4	9.75±0.64(2)	9.60±0.42(2)	9.70±0.28(2)	9.85±0.49(2)	9.40±0.28(2)	9.65±0.64(2)
	7	9.95±0.78(2)	9.85±0.49(2)	9.85±0.21(2)	10.10±0.42(2)	9.60±0.28(2)	9.90±0.71(2)
Female	0	8.35±0.21(2)	8.60±0.14(2)	8.50±0.00(2)	8.50±0.14(2)	8.35±0.07(2)	8.55±0.07(2)
	4	8.50±0.00(2)	8.65±0.21(2)	8.60±0.00(2)	8.70±0.00(2)	8.50±0.00(2)	8.65±0.07(2)
	7	8.65±0.07(2)	8.80±0.14(2)	8.75±0.07(2)	8.80±0.00(2)	8.70±0.14(2)	8.85±0.07(2)

[a] Data were presented as mean±S.D.; [b] Number of animals examined.

Table 5. Autopsy findings of male and female Sprague Dawley rats intravenously injected with EPO (Erythropoietin).

		Dose (IU/kg B.W.)											
		0		2		20		200		2000		20000	
Fate		tk	fd	tk	fd	tk	fd	tk	fd	tk	fd	tk	fd
No. of animals	Male	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0
	Female	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0
Male	NAD	5		5		5		5		5		5	
Female	NAD	5		5		5		5		5		5	

tk : Terminal kill, fd : Found dead, NAD : No abnormality detected

IV. 고 찰

EPO(Erythropoietin)에 대한 급성독성시험을 국립보건안전연구원 고시 제94-3호(1994. 4. 14.) "의약품 등의 독성시험기준"에 준하여 랫드와 비글개에서 정맥내로 최고용량(20000 IU/kg B.W.)까지 투여한 결과, 모

Table 6. Autopsy findings of male and female Beagle dogs intravenously injected with EPO (Erythropoietin)

		Dose (IU/kg B.W.)											
		0		2		20		200		2000		20000	
Fate		tk	fd	tk	fd	tk	fd	tk	fd	tk	fd	tk	fd
No. of animals	Male	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0
	Female	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0
Male	NAD	2		2		2		2		2		2	
Female	NAD	2		2		2		2		2		2	

tk : Terminal kill, fd : Found dead, NAD : No abnormality detected

든 동물에서는 폐사 및 일반증상과 모든 생존동물에 대한 해부병리 소견에서 시험물질의 투여에 기인한다고 사료되는 변화는 관찰되지는 않았다. 일본에서도 human recombinant erythropoietin에 대하여 랫드, 원숭이 등을 가지고 급성독성시험결과 LD_{50}은 20000 IU/kg B.W. 이상이라고 보고하였다(Spicer 등 1990).

따라서 랫드와 비글개에서 이 시험물질의 LD_{50}는 정맥투여 최고용량인 20000 IU/kg B.W. 이상일 것으로 사료된다.

참고문헌

Fisher, J.W. (1993): Recent advances in erythropoietin research. pp. 293~311 in; Progress in Drug Research, Vol. 41. eds. Ernst Jucker, Birkhauser Verlag Basel, Switzerland pp. 293~311.

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.

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. *Korean J. Toxicol.* **10**, 237~241.

Spicer, E.J.F and Wisler, J.A(1990): Acute subcutaneous and intravenous toxicity studies in rat monkey with TYB-5220. 薬理と治療 **18**(suppl. 5), 973-1034.

Yajima, N, Kurata, Y, Imai, E, Sawai, T and Takeshita, Y(1993): Genotoxicity of genetic recombinant human erythropoietin in a novel test system. *Mutagenesis* **8**(3), 231~236.

국립보건안전연구원 (1994): 의약품 등의 독성시험 기준(국립보건안전연구원 고시 제94-3호).