

토끼에서 EPO(erythropoietin)의 4주간 정맥 반복투여 독성시험에 관한 연구

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

Four-Week Intravenous Toxicity Studies of EPO(erythropoietin) in Rabbits

Jeong-Hwan Che, Jeong-Seok Nam, Jae-Man Yang, Suk-Man Lee, 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 Science,
College of Veterinary Medicine, Seoul National University

**Korea Green Cross Corporation

(Received February 10, 1997)

(Accepted March 25, 1997)

ABSTRACT : Four-week toxicity of EPO(erythropoietin) was investigated using New Zealand White rabbits according to the established regulations of Korean National Institute of Safety Research. Rabbits were administered intravenously seven days per week for 28 days with dosage of 0, 80, 400 and 2000IU/kg B.W./day. Animals administered with EPO showed no significant changes of body weight, water consumption and feed consumption, and no clinical signs and death. They were not significantly different from the control group in hematological and serum biochemical analysis, urinalysis, prothrombin time, and partial thromboplastin time. In this study, we concluded that EPO had no toxic effect in the New Zealand White rabbits when they were administered intravenously below 2000IU/kg B.W./day for 28 days.

Key Words : EPO(erythropoietin), New Zealand White Rabbits

I. INTRODUCTIONS

혈액이 생체에서 차지하는 물리적 부피 뿐만 아니라 그로부터 매개되는 여러 가지 작용들을 통해 보면 조혈기능의 중요성은 매우 크다고 할 수 있다. 조혈기능에 영향을 주는 여러요인들 중에서도 erythropoietin (EPO)는 말기 신질환에서의 빈혈치료, 자가수혈, 약물 치료나 방사선 치료에서의 회복 등 다방면의 임상적용 가능성으로 많은 주목을 받고 있다(James *et al.*, 1993). EPO는 특히, 신장이 손상되는 등의 hypoxemia 상태와 관련되어 혈중농도가 높아진다(Giglio *et al.*, 1994). 그리고, 생성장소가 renal peritubular cell 이라고 생각되는 sialylglycoprotein hormone으로, 193개의 아미노산 단백질로 생성되어 27개의 아미노산이 분할된 166개의 아미노산 산물이 된 후 다시 165개의 아미노산 단백질로 분할되고 glycosylation되면 생물학적 활성을 갖게 된다(James *et al.*, 1993).

이는 주로 후기적아구계 전구세포의 분화단계의 세

포에 작용, 그 분화증식을 촉진시켜, 적혈구의 생산을 조절하는 내인성 호르몬으로, 신장에서 생성된다고 생각되는 만큼 그 생산의 저하는 만성 신부전에 합병하는 빈혈의 주원인이라 생각되고 있으며 심각한 조혈장애를 유발한다(Kazuo *et al.*, 1990). 그래서, EPO의 임상적 적용에 대해 많은 관심이 모아져 왔는데, 최근에는 신부전 뿐만 아니라 azidothymidine이나 HIV와 관련된 빈혈 등의 임상적 치료에 recombinant human EPO의 적용이 다각도로 주목되고 있다(Kazuo *et al.*, 1990, Terumasa *et al.*, 1990).

한편, EPO이 적혈구에 대한 세망적혈구의 수를 증가시킨다는 소핵 다염성 적혈구를 유의성있게 증가시킨다는 유전 독성실험이나 소핵실험도 보고되어 있다(Yajima *et al.*, 1993a, 1993b, Buchbinder *et al.*, 1993).

따라서, 본 시험에서는 조혈장애의 치료제제로 주목 받고 있는 EPO의 안전성 평가 일환으로 (주)녹십자에서 분리 정제한 recombinant EPO에 대하여 토끼에서 4주간 정맥내 반복투여 독성시험을 실시하였다.

II. MATERIALS and METHODS

1. 시험물질

(주)녹십자에서 분리 정제한 EPO를 실험에 사용하였다.

2. 실험동물

실험동물로는 3개월령의 토끼(New Zealand White rabbit)를 암·수 각각 16마리씩 동물실에서 1주간 순화시키면서 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 12마리씩 선정하여 사용하였다. 실험기간중 사육실 환경조건은 실내온도 $24 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 10\%$, 환기회수 10~12회/hr으로 하였으며, 조명시간은 오전 7시부터 오후 7시까지, 조도는 150~200Lux로 하였다. 모든 동물은 토끼용 3단 사육상자대에 배열된 스테인레스 사육상자($45 \times 50 \times 31$ cm)에서 사육하면서 사료와 음수는 자유급여하였다.

3. 시험군의 구성, 투여농도 및 용량

임상용량 50IU/kg B.W.을 기준으로 80, 400, 2000IU/kg/day를 각각 저용량군(T1), 중간용량군(T2), 고용량군(T3)으로하여 시험물질을 투여시 마다 EPO 희석용 완충액(1.0 ml중 염화나트륨 5.84 mg, 구연산 나트륨 5.80 mg, 무수구연산 0.057 mg)으로 희석하여 만들었고, 음성대조군으로 EPO희석용 완충액만을 투여하였다. 임상에서의 투여경로와 동일한 정맥내로 투여하기 위해 토끼 귀정맥을 통해 1일 1회, 주 7회, 4주간 투여하였다.

4. 관찰 및 검사항목

1) 일반증상 관찰

시험기간중 1일 1회 실시하였고, 일반 임상증상 항목으로서 anorexia, salivation, diarrhea, vomiting, polyuria, anuria, fecal change 의 정도를 기록하였다.

2) 사료섭취량 및 음수량 측정

사육상자별로 급여 및 급수총량과 잔량을 시험개시 후 매주 2회 측정하여 그 차를 일일 사료섭취량 및 음수섭취량으로 하였다.

3) 체중측정

모든 동물에 대하여 시험개시일로부터 시험종료일

까지 매주 2회 측정하였다.

4) 뇨검사

모든 동물에 대하여 실험기간중 1회 채뇨한 후, 그 뇨에 대하여 외관과 뇨량 및 색을 관찰한 다음, 즉시 뇨 검사용 시험지(N-multistix, Ames)를 사용하여 pH, turbidity, leukocyte, nitrite, protein, ketone, urobilinogen, bilirubin, glucose 및 잠혈(blood)을 측정하였다.

5) 혈액학적 및 혈청생화학적 검사

일반 혈액학적 검사는 적혈구수, 총백혈구수, 헤모글로빈, hematocrit, MCV, MCHC, 혈소판, 호산구, 호중구, 림프구, 단핵구, reticulocyte 수를 측정하였다. 혈청생화학적 검사는 채취한 혈액의 일부를 실온에 30분간 방치하여 응고시킨 후 원심분리(3,000 rpm, 30 min)하여 얻은 혈청에 대하여 alanine transaminase(ALT), aspartate transaminase(AST), alkaline phosphatase(ALP), albumin, total bilirubin, BUN, cholesterol, chloride, creatinine kinase, glucose, lactic dehydrogenase, total protein, triglyceride를 측정하였다.

6) 장기중량 및 크기 측정

모든 시험동물에 대하여 간장, 신장(좌·우), 폐, 비장, 심장, 부신(좌·우), 뇌, 흉선, 난소(좌·우), 고환(좌·우) 등의 체중에 대한 상대장기 중량 및 크기를 측정하였다.

7) 병리조직검사

모든 시험동물에 대하여 ketamine(1mg/kg)으로 마취시킨 다음, 목동맥에 카테터를 삽입하여 충분한 방혈을 시키고, 장기 중량측정이 끝난 모든 장기를 10% 중성 포르말린액에 고정시켰다. 2주간 이상의 충분한 고정을 거친 모든 장기조직은 파라핀 포매기(Histomatic tissue processor, 166A, Fisher)에 포매하여 마이크로톰(AO rotary microtome)으로 $5 \mu\text{m}$ 절편을 만들어 hematoxylin & eosin염색을 하여 관찰하였다.

8) 통계학적 방법

본 실험에서 얻은 측정치의 통계학적 분석은 통계처리 computer program인 SAS(Statistical Analysis System)를 이용하여 등분산 검정후 one-way ANOVA에서 유의한 F값이 관찰되는 항목에 대하여 대조군과 각 용량군 사이에 유의수준 $p < 0.05$ 로 Dunnett's t-test를 이용하여 비교하였고, 비모수인 경우는 분산에 대하여 Kruskal-Wallis nonparametric analysis후 유의한 경우

Wilcoxon-Mann-Whitney rank-sum test, Nemenye-Kruskal-Wallis multiple comparisons을 실시하였다. 또한, 병리조직학적으로 관찰된 병변의 발생빈도는 χ^2 (Chi-square) 검정을 하였다.

III. RESULTS

1. 임상증상

저용량 80 IU/kg/day, 중간용량 400 IU/kg/day, 고용량 2000 IU/kg/day 및 대조군투여 전기간동안 시험물 질 투여 때문에 여겨지는 임상증상을 관찰하지 못하였다.

2. 폐사율

저용량 80 IU/kg/day, 중간용량 400 IU/kg/day, 고용량 2000 IU/kg/day에서 시험기간중 사망 동물을 관찰할 수 없었으며, 대조군에서도 사망 동물은 없었다.

3. 체중변화

대조군 및 투여군 모두에서 유의할 만한 체중 변화를 관찰할 수 없었다(Table 1).

4. 사료 및 음수섭취량 변화

대조군 및 투여군 모두에서 유의할 만한 사료 및 음수섭취량 변화를 관찰할 수 없었다.

5. 뇨검사 소견

대조군 및 투여군 모두에서 유의할 만한 이상을 나타내지 않았다(Table 2).

6. 혈액학적 및 혈청생화학적 검사소견

부검시의 혈액학적 검사소견으로는 대조군과 비교하여 수컷 고용량군에서 RBC, hemoglobin, hematocrit치가 유의성 있는 증가를 보였고, platelet는 유의성 있는 감소를 보였다. 그리고, 수컷 중간용량군에서는 platelet의 유의성 있는 감소와 basophil의 유의성 있는 증가를 보였다. 또한 수컷 저용량군에서는 platelet의 유

Table 1. Body weights of rabbits treated with EPO(erythropoietin).

(unit : g)

Day	\Sex \Group \Dose(IU/kg/day) \No. of animal	Male			
		Control 0 3	Low 80 3	Middle 400 3	High 2000 3
0		2200.0±173.2 ^a	2200.0±173.2	2383.3±189.3	2183.3±500.8
4		2250.0±180.3	2233.3±189.3	2400.0±217.9	2200.0±477.0
7		2300.0±150.0	2433.3±202.1	2500.0±229.1	2333.3±500.8
11		2416.7±115.5	2533.3±25.5	2616.7±160.7	2383.3±500.8
14		2533.3±152.8	2616.7±175.6	2700.0±180.3	2500.0±409.3
18		2650.0±180.3	2550.0±132.3	2816.7±175.6	2550.0±350.0
21		2783.3±144.3	2683.3±144.3	2916.7±160.7	2616.7±340.3
25		2900.0±173.2	2866.7±160.7	3016.7±115.5	2733.3±368.6
28		3033.3±104.1	3000.0±200.0	3083.3±115.5	2766.7±354.7
Day	\Sex \Group \Dose(IU/kg/day) \No. of animal	Female			
		Control 0 3	Low 80 3	Middle 400 3	High 2000 3
0		2300.0±100.0 ^a	2300.0±100.0	2316.7±293.0	2266.7±375.3
4		2383.3±76.4	2316.7±125.8	2333.3±275.4	2300.0±400.0
7		2583.3±28.9	2483.3±125.8	2483.3±275.4	2550.0±377.5
11		2666.7±76.4	2566.7±152.8	2483.3±305.5	2600.0±409.3
14		2766.7±57.7	2666.7±104.1	2616.7±332.9	2750.0±427.2
18		2850.0±50.0	2733.3±152.8	2666.7±321.5	2766.7±485.6
21		2900.0±100.0	2900.0±250.0	2816.7±368.6	2916.7±503.3
25		3000.0±150.0	3083.3±301.4	2916.7±368.6	3033.3±611.0
28		3116.7±76.4	3216.7±375.3	3166.7±368.6	3100.0±655.7

^aValues were expressed as mean±S.D.

의성 있는 감소를 보였다. 한편, 암컷 고용량군에서는 RBC, hemoglobin, hematocrit치가 유의성 있는 증가와

WBC의 유의성 있는 감소를 보였고, 암컷 중간용량군에서는 basophil, WBC의 유의성 있는 감소를 보였고,

Table 2. Urinalysis in rabbits intravenously treated with EPO(*erythropoietin*).

Parameter	\Sex \Group \Dose(IU/kg/day) \No. of animal	Male				Female			
		Control	Low	Middle	High	Control	Low	Middle	High
		0	80	400	2000	0	80	400	2000
		3	3	3	3	3	3	3	3
Leukocyte	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrite	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urobilinogen (Ehrlich unit/dl)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	
Protein(mg/dl)	+(30)	+(30)	++(100)	±	+(30)	+(30)	+++ (30)	±	
pH	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	
Blood Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	
Gravity	1.000	1.000	1.000	1.005	1.000	1.000	1.000	1.010	
Keton body(mg/dl)	-	-	-	-	-	-	-	-	
Bilirubin	-	-	-	-	-	-	-	-	
Glucose(g/dl)	-	-	-	-	-	-	-	-	

Table 3. Hematological values of rabbits intravenously treated with EPO(*erythropoietin*).

Parameter	\Sex \Group \Dose (IU/kg/day) \No. of animal	Male			
		Control	Low	Middle	High
		0	80	400	2000
		3	3	3	3
Neutrophil($\times 10^3/\mu l$)	5/13 \pm 3.16 ^a	6.24 \pm 2.25	4.70 \pm 0.85	3.33 \pm 0.66	
Lymphocyte($\times 10^3/\mu l$)	4.08 \pm 2.97	3.03 \pm 1.89	8.33 \pm 6.54	3.58 \pm 1.46	
Monocyte($\times 10^3/\mu l$)	0.12 \pm 0.09	0.10 \pm 0.06	0.43 \pm 0.62	0.23 \pm 0.16	
Eosinophil($\times 10^3/\mu l$)	0.27 \pm 0.15	0.15 \pm 0.05	0.13 \pm 0.04	0.12 \pm 0.07	
Basophil($\times 10^3/\mu l$)	0.22 \pm 0.13	0.30 \pm 0.10	0.52 \pm 0.15*	0.33 \pm 0.14	
Leukocyte($\times 10^3/\mu l$)	0.41 \pm 0.26	0.49 \pm 0.29	0.67 \pm 0.53	0.17 \pm 0.06	
WBC($\times 10^3/\mu l$)	10.08 \pm 1.31	9.81 \pm 3.98	14.26 \pm 7.24	7.42 \pm 1.30	
RBC($\times 10^3/\mu l$)	6.28 \pm 0.23	7.19 \pm 1.06	7.38 \pm 1.89	9.01 \pm 0.25*	
HGB(g/l)	13.17 \pm 0.38	15.13 \pm 2.59	15.53 \pm 3.84	19.70 \pm 1.21*	
HCT(%)	38.53 \pm 1.37	46.70 \pm 9.46	47.47 \pm 13.84	62.27 \pm 5.80*	
MCV(fL)	61.33 \pm 0.25	64.67 \pm 3.69	63.90 \pm 2.76	69.13 \pm 6.36	
MCH(pg)	20.93 \pm 0.25	21.03 \pm 1.00	21.13 \pm 0.35	21.90 \pm 1.64	
MCHC(g/l)	34.13 \pm 0.31	32.53 \pm 1.29	33.10 \pm 1.73	31.73 \pm 1.46	
PLT($\times 10^3/\mu l$)	548.33 \pm 85.56	344.33 \pm 55.15*	344.33 \pm 70.01*	225.33 \pm 44.56*	

Table 3. Continued.

Parameter	\Sex \Group \Dose (IU/kg/day) \No. of animal	Female			
		Control	Low	Middle	High
		0	80	400	2000
		3	3	3	3
Neutrophil($\times 10^3/\mu\text{l}$)		5.43 \pm 4.28 ^a	1.73 \pm 0.76	3.93 \pm 0.86	5.38 \pm 1.22
Lymphocyte($\times 10^3/\mu\text{l}$)		6.28 \pm 3.19	4.87 \pm 0.30	2.31 \pm 0.54	3.31 \pm 1.63
Monocyte($\times 10^3/\mu\text{l}$)		0.05 \pm 0.04	0.10 \pm 0.01	0.04 \pm 0.02	0.08 \pm 0.02
Eosinophil($\times 10^3/\mu\text{l}$)		0.10 \pm 0.08	0.06 \pm 0.00	0.12 \pm 0.12	0.17 \pm 0.13
Basophil($\times 10^3/\mu\text{l}$)		0.46 \pm 0.18	0.22 \pm 0.11*	0.21 \pm 0.07*	0.33 \pm 0.03
Leukocyte($\times 10^3/\mu\text{l}$)		0.70 \pm 0.11	0.34 \pm 0.33	0.45 \pm 0.34	0.76 \pm 0.47
WBC($\times 10^3/\mu\text{l}$)		12.66 \pm 1.45	7.16 \pm 0.71*	6.87 \pm 1.56*	9.70 \pm 1.11*
RBC($\times 10^3/\mu\text{l}$)		6.10 \pm 0.61	7.38 \pm 0.00	6.66 \pm 0.75	8.54 \pm 0.65*
HGB(g/l)		12.47 \pm 1.07	15.65 \pm 0.50	14.80 \pm 2.25	18.00 \pm 1.99*
HCT(%)		38.07 \pm 3.99	47.25 \pm 1.48	45.43 \pm 8.28	58.10 \pm 8.10*
MCV(fL)		62.40 \pm 0.26	64.00 \pm 1.98	67.87 \pm 4.80	67.66 \pm 5.16
MCH(pg)		20.43 \pm 0.49	21.20 \pm 0.71	22.20 \pm 1.04	21.07 \pm 0.91
MCHC(g/l)		32.73 \pm 0.93	33.10 \pm 0.14	32.70 \pm 1.04	31.10 \pm 1.05
PLT($\times 10^3/\mu\text{l}$)		501.33 \pm 85.41	148.00 \pm 149.91*	331.67 \pm 97.03	281.00 \pm 113.50

^aValues were expressed as mean \pm S.D., *significantly different from control group ($p < 0.05$).

WBC, white blood cell ; RBC, red blood cell ; HGB, hemoglobin ; HCT, hematocrit ; MCV, mean corpuscular volume ; MCH, mean corpuscular hemoglobin ; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration ; PLT, platelet.

저용량군에서는 basophil, WBC, platelet의 유의성 있는 감소를 보였다(Table 3).

부검시의 혈청 생화학적 검사소견으로는 대조군과 비교하여 수컷 고용량군에서 creatinine의 유의성 있는 증가를 보였으며 수컷 중간용량군에서 albumin의 유의성 있는 감소를 보였다. 한편 암컷 고용량군에서는 glucose, K(potassium)이 유의성 있는 감소가 인정되었다(Table 4).

Prothrombin time 검사 소견에서 암컷 고용량군(17.33 \pm 2.53 sec)이 암컷 대조군(12.67 \pm 0.58 sec)보다 유의성 있는 증가를 보였다(Table 5).

7. 체중에 대한 각 장기의 상대 및 절대증량비

Lung의 절대장기무게에 대하여 암컷 고용량군(17.59 \pm 1.11 g)이 대조군(13.88 \pm 1.78 g)보다 유의성 있는 증가가 인정되었고, 또한 Brain의 절대장기무게에 대해서도 암컷 고용량군(8.72 \pm 0.43 g)이 암컷 대조군(9.78 \pm 0.62 g)보다 유의성 있는 감소를 보였다(Table 6 and 7).

8. 병리조직검사 소견

수컷의 경우, 고용량군에서 spleen에 megakaryocytes, progranulocytes, erythroblast가 현저하게 증가하였고, liver에서도 megakaryocytes의 증가와 Glisson's sheath에 lymphocyte proliferation이 관찰되었다. 또한 bone marrow에서는 megakaryocytes, progranulocytes

증가가 관찰되었다. 수컷 중간·저용량군에서는 spleen과 bone marrow에서 megakaryocytes의 증가 이외에는 수컷 대조군과 비교하여 기초병변이외에는 특이한 병변은 관찰되지 않았다.

암컷의 경우, 고용량군에서 spleen에서 granulocyte migration이 관찰되고, bone marrow에서 megakaryocytes가 증가하였다. 암컷 중간·저용량군에서는 spleen과 bone marrow에서 megakaryocytes의 증가이외에는 수컷 대조군과 비교하여 기초병변이외에는 특이한 병변은 관찰되지 않았다.

IV. DISCUSSION

다양한 원인에 의한 조혈장애 치료의 일환으로 시도되고 있고, 특히, 말기 신질환에서의 빈혈치료, 자가수혈, 약물치료나 방사선 치료에서의 회복 등 다방면의 임상적용 가능성으로 많은 주목을 받고 있다.

이러한 시점에서 녹십자에서 개발한 EPO의 토끼에서 4주간 반복투여에 대한 독성을 조사한 결과, 최고 2000IU/kg/day까지 4주간 연속투여하였을 때 시험기간 중 사망 동물은 없었으며 체중변화, 음수 및 사료섭취량 변화를 비롯한 특이한 임상증상을 나타내지 않았고, 뇨검사, 안검사 결과도 EPO 투여군에서 특이할 만한 변화는 없었다. 부검시의 Prothrombin time의 검사 소견에서는 암컷 고용량군(17.33 \pm 2.53 sec)이 암컷 대조군(12.67 \pm 0.58 sec)보다 통계적으로 유의성 있는 증가를 보였으나, 실험 시작전의 측정시의 개체에 따른

Table 4. Serum biochemical values of rabbits intravenously treated with EPO(*erythropoietin*)

Parameter	\Sex \Group \Dose (IU/kg/day) \No. of animal	Male			
		Control	Low	Middle	High
		0	80	400	2000
		3	3	3	3
Alt(μ /l)		34.33 \pm 14.50 ^a	37.67 \pm 16.86	22.00 \pm 5.00	23.33 \pm 4.16
AST(μ /l)		33.00 \pm 0.00	41.67 \pm 10.60	37.00 \pm 15.56	38.33 \pm 6.66
CHOL(mg/dl)		57.00 \pm 24.06	57.67 \pm 13.87	51.67 \pm 2.89	89.00 \pm 31.32
GLU(mg/dl)		75.67 \pm 17.04	49.00 \pm 41.04	34.33 \pm 35.44	58.67 \pm 48.81
P(meq/dl)		8.47 \pm 0.81	8.13 \pm 1.70	7.63 \pm 0.98	8.37 \pm 1.50
TB(meq/dl)		0.37 \pm 0.12	0.37 \pm 0.06	0.27 \pm 0.25	0.33 \pm 0.12
TP(meq/dl)		6.73 \pm 0.21	7.03 \pm 0.31	6.73 \pm 0.32	7.03 \pm 0.31
TG(meq/dl)		161.33 \pm 90.01	158.67 \pm 94.32	92.43 \pm 76.21	119.67 \pm 19.09
ALP(μ /l)		155.33 \pm 35.73	157.67 \pm 25.54	154.33 \pm 19.66	175.33 \pm 61.83
Ca ⁺⁺ (mg/dl)		12.63 \pm 0.80	13.33 \pm 0.31	12.30 \pm 0.40	11.97 \pm 1.97
Cl(meq/dl)		103.67 \pm 1.53	105.33 \pm 6.81	106.00 \pm 2.65	99.00 \pm 7.21
CREAT(meq/dl)		1.17 \pm 0.06	1.27 \pm 0.06	1.30 \pm 0.10	1.33 \pm 0.06*
BUN(meq/dl)		15.33 \pm 5.03	17.33 \pm 1.536	14.67 \pm 0.58	18.33 \pm 3.06
K(meq/dl)		20.47 \pm 5.00	17.35 \pm 7.00	16.30 \pm 0.52	19.00 \pm 5.19
Albumin(g/dl)		4.93 \pm 0.55	4.90 \pm 0.30	3.57 \pm 0.40*	4.47 \pm 0.76
Parameter	\Sex \Group \Dose (IU/kg/day) \No. of animal	Female			
		Control	Low	Middle	High
		0	80	400	2000
		3	3	3	3
Alt(μ /l)		30.33 \pm 5.29 ^a	31.67 \pm 18.45	26.33 \pm 4.51	32.33 \pm 11.02
AST(μ /l)		30.67 \pm 8.08	44.33 \pm 26.73	4.00 \pm 2.83	52.33 \pm 29.74
CHOL(mg/dl)		89.67 \pm 29.77	82.00 \pm 28.58	78.33 \pm 16.44	126.00 \pm 31.18
GLU(mg/dl)		96.00 \pm 23.39	64.67 \pm 8.62	49.33 \pm 39.55	31.67 \pm 38.00*
P(meq/dl)		9.83 \pm 1.76	7.73 \pm 0.06	8.40 \pm 1.08	8.27 \pm 1.03
TB(meq/dl)		0.37 \pm 0.06	0.23 \pm 0.12	0.33 \pm 0.06	0.33 \pm 0.03
TP(meq/dl)		7.07 \pm 0.31	6.67 \pm 0.29	6.60 \pm 0.36	7.03 \pm 1.08
TG(meq/dl)		110.67 \pm 79.86	108.67 \pm 7.09	136.00 \pm 35.16	141.33 \pm 54.99
ALP(μ /l)		214.33 \pm 69.57	126.33 \pm 29.40	154.67 \pm 54.15	170.67 \pm 41.31
Ca ⁺⁺ (mg/dl)		12.17 \pm 2.40	10.67 \pm 0.21	11.30 \pm 1.47	11.47 \pm 0.75
Cl(meq/dl)		107.67 \pm 1.53	103.67 \pm 2.31	99.00 \pm 8.89	100.67 \pm 3.21
CREAT(meq/dl)		1.37 \pm 0.06	1.27 \pm 0.06	1.30 \pm 0.17	1.27 \pm 0.06
BUN(meq/dl)		18.00 \pm 1.00	17.67 \pm 4.04	16.67 \pm 5.69	16.00 \pm 2.00
K(meq/dl)		22.10 \pm 5.13	18.97 \pm 1.82	16.43 \pm 3.23	14.43 \pm 3.58
Albumin(g/dl)		5.00 \pm 0.72	4.70 \pm 0.066	4.60 \pm 0.10	4.67 \pm 0.35

^aValues were expressed as mean \pm S.D., *Significantly different from control group(p<0.05).

ALT, alanine transaminase ; AST, aspartate transaminase ; CHOL, cholesterol ; GLU, glucose ; P, Inorganic Phosphorous ; TB, total bilirubin ; TP, total protein ; TG, triglyceride ; ALP, alkaline phosphatase ; Ca, calcium ; CL, chloride ; CREAT, creatinine ; BUN, blood urea nitrogen ; K, potassium ; ALB, albumin.

Table 5. Prothrombin time and thromboplastin time of rabbits intravenously treated with EPO(*erythropoietin*).

(unit : second)

Sex	\Group \Dose(IU/kg/day) \No. of animal	Control	Low	Middle	High
		0	80	400	2000
		3	3	3	3
Male	PT	14.33 \pm 0.58	14.67 \pm 2.08	15.67 \pm 2.51	20.00 \pm 7.00
	PTT	20.00 \pm 2.65	20.67 \pm 1.15	23.67 \pm 3.21	22.67 \pm 3.79
Femal	PT	12.67 \pm 0.58	14.00 \pm 1.00	15.33 \pm 1.15	17.33 \pm 2.52*
	PTT	21.33 \pm 1.53	23.33 \pm 1.53	19.67 \pm 2.52	22.00 \pm 3.61

*Significantly different from control group(p<0.05).

variation이 컸고, 변화량의 차가 작으므로 측정시의 실험적 오차로 사료된다.

부검시의 혈청 생화학적 검사소견으로는 대조군과 비교하여 수컷 고용량군에서 creatinine의 유의성 있는

Table 6. Relative organ weights of rabbits intravenously with EPO(*erythropoietin*) (unit : %)

Parameter	\Sex	Male			
	\Group	Control	Low	Middle	High
	\Dose (IU/kg/day)	0	80	400	2000
	\No. of animal	3	3	3	3
Liver		1.89 ± 1.21 ^a	2.75 ± 0.23	2.39 ± 0.23	2.41 ± 0.38
Spleen		0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.08 ± 0.04	0.06 ± 0.01
Kindey left		0.31 ± 0.05	0.31 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.29 ± 0.29
Kidney right		0.31 ± 0.05	0.030 ± 0.03	0.30 ± 0.03	0.28 ± 0.04
Adrenal gland(left)		0.004 ± 0.0009	0.004 ± 0.0007	0.004 ± 0.001	0.005 ± 0.001
Adrenal gland(right)		0.004 ± 0.0004	0.004 ± 0.0007	0.004 ± 0.001	0.005 ± 0.002
Heart		0.23 ± 0.01	0.29 ± 0.05	0.26 ± 0.09	0.34 ± 0.06
Lung		0.48 ± 0.08	0.46 ± 0.07	0.44 ± 0.07	0.46 ± 0.07
Salivary gland		0.04 ± 0.004	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.002	0.46 ± 0.01
Testis left		0.06 ± 0.03	0.05 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01
Testis right		0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.05 ± 0.005	0.06 ± 0.01
Brain		0.31 ± 0.02	0.31 ± 0.02	0.30 ± 0.01	0.34 ± 0.03

Parameter	\Sex	Female			
	\Group	Control	Low	Middle	High
	\Dose (IU/kg/day)	0	80	400	2000
	\No. of animal	3	3	3	3
Liver		2.31 ± 0.13 ^a	2.22 ± 1.48	2.29 ± 0.19	2.50 ± 0.40
Spleen		0.10 ± 0.06	0.06 ± 0.03	0.09 ± 0.04	0.07 ± 0.01
Kindey left		0.40 ± 0.15	0.26 ± 0.01	0.28 ± 0.03	0.33 ± 0.10
Kidney right		0.40 ± 0.15	0.26 ± 0.02	0.28 ± 0.03	0.31 ± 0.10
Adrenal gland(left)		0.004 ± 0.0007	0.033 ± 0.001	0.004 ± 0.0002	0.004 ± 0.001
Adrenal gland(right)		0.004 ± 0.0006	0.004 ± 0.001	0.004 ± 0.0002	0.004 ± 0.001
Heart		0.27 ± 0.04	0.27 ± 0.05	0.25 ± 0.10	0.28 ± 0.04
Lung		0.46 ± 0.07	0.42 ± 0.05	0.48 ± 0.05	0.57 ± 0.14
Salivary gland		0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.001	0.04 ± 0.004	0.04 ± 0.01
Testis left		0.01 ± 0.002	0.01 ± 0.004	0.005 ± 0.001	0.004 ± 0.002
Testis right		0.001 ± 0.003	0.01 ± 0.003	0.05 ± 0.0004	0.004 ± 0.002
Brain		0.32 ± 0.01	0.31 ± 0.03	0.31 ± 0.05	0.28 ± 0.07

^aValues were expressed as mean ± S.D., *Significantly different from control group(p<0.05).

Table 7. Absolute organ weights of rabbits intravenously with EPO(*erythropoietin*) (unit : %)

Parameter	\Sex	Male			
	\Group	Control	Low	Middle	High
	\Dose (IU/kg/day)	0	80	400	2000
	\No. of animal	3	3	3	3
Body Weight(kg)		3033.33 ± 104.08 ^a	3016.67 ± 175.59	3050.000 ± 200.00	± 2766.67 ± 332.92
Liver		56.60 ± 35.28	82.89 ± 6.34	73.31 ± 11.34	66.49 ± 10.05
Spleen		1.27 ± 0.37	1.65 ± 0.74	2.50 ± 1.31	1.76 ± 0.35
Kindey left		9.35 ± 1.83	9.34 ± 0.71	9.60 ± 0.91	7.84 ± 0.55
Kidney right		9.44 ± 1.77	9.20 ± 1.06	9.18 ± 1.21	7.70 ± 0.23
Adrenal gland(left)		0.13 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.12 ± 0.03	0.14 ± 0.03
Adrenal gland(right)		0.13 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.04	0.13 ± 0.05
Heart		7.04 ± 0.65	8.63 ± 1.25	7.95 ± 3.31	9.8 ± 2.93
Lung		14.64 ± 2.30	13.98 ± 2.96	13.20 ± 1.19	12.50 ± 1.43
Salivary gland		1.22 ± 0.13	1.49 ± 0.26	1.35 ± 0.09	1.26 ± 0.16
Testis left		1.75 ± 0.72	1.59 ± 0.63	1.80 ± 0.34	1.68 ± 0.37
Testis right		1.78 ± 0.65	1.72 ± 0.68	1.56 ± 0.25	1.79 ± 0.30
Brain		9.30 ± 0.19	9.72 ± 0.44	8.98 ± 0.15	9.51 ± 1.22

Parameter	\Sex	Female			
	\Group	Control	Low	Middle	High
	\Dose (IU/kg/day)	0	80	400	2000
	\No. of animal	3	3	3	3
Body weight(kg)		3016.67 ± 125.83 ^a	3150.00 ± 300.00	3116.67 ± 368.56	3183.33

Table 7. Continued.

Parameter	\Sex \Group \Dose (IU/kg/day) \No. of animal	Female			
		Control	Low	Middle	High
		0 3	80 3	400 3	2000 3
Liver		69.66±1.51	71.05±51.52	71.36±10.31	77.72±4.04
Spleen		2.90±1.64	1.85±1.02	2.88±1.12	2.06±0.54
Kidney left		12.14±4.59	8.19±0.66	8.76±0.64	10.08±2.14
Kidney right		11.72±4.33	8.32±0.62	8.71±0.77	9.64±1.87
Adrenal gland(left)		0.12±0.03	0.10±0.02	0.12±0.02	0.12±0.04
Adrenal gland(right)		0.11±0.02	0.11±0.03	0.11±0.02	0.12±0.03
Heart		8.00±0.77	8.53±1.62	7.78±0.74	9.00±3.32
Lung		13.88±1.78	13.01±1.45	14.96±0.47	17.59±1.11*
Salivary gland		1.52±0.17	1.27±0.08	1.34±0.26	1.22±0.19
Testis left		0.20±0.07	0.22±0.13	0.15±0.04	0.15±0.09
Testis right		0.21±0.10	0.22±0.10	0.15±0.01	0.14±0.09
Brain		9.78±0.62	9.78±0.08	8.98±0.25	8.72±0.43*

*Values were expressed as mean ± S.D., *Significantly different from control group(p<0.05).

증가를 보였다. 한편 암컷 고용량군에서는 glucose, K (potassium)이 유의성 있는 감소가 인정되었으나, 토끼의 일반적인 생리치 범위를 넘어서는 변화라고는 인정할 수 없었다.

부검시의 혈액 생화학적 검사결과는 대조군과 비교하여 혈소판은 암컷저용량군과 수컷 고·중·저용량 투여군에서 통계적으로 유의성있는 감소가 인정되었으나, 토끼의 일반적인 생리치 범위를 넘어서는 변화라고는 인정할 수 없었다. 그러나, 수컷 고용량군과 암컷 고용량군에서 RBC, hemoglobin, hematocrit치가 유의성 있는 증가를 보인 것은 Kazau 등(1990)이 주장한 EPO가 후기적아구계 전구세포의 분화단계의 세포에 작용, 그 분화증식을 촉진시켜 조혈작용을 유발한다는 결과와 일치함으로 시험물질인 EPO의 약리작용으로 사료된다.

절대 장기 무게와 체중에 대한 각 장기의 상대중량비는 산발적으로 유의성 있는 변화를 보이는 항목이 있으나, 변화량의 차가 크지 않고 용량의존성도 나타내지 않으므로 무게측정시의 실험적 오차로 사료된다.

병리조직학적 검사 결과 수컷 고용량군에서 spleen에 megakaryocytes, progranulocytes, erythroblast의 증가가 중심이 되어 현저한 골수의 조혈이 나타났고, liver에서도 megakaryocytes의 증가와 Glisson's sheath에 lymphocyte proliferation이 나타났고 또한 bone marrow에서는 megakaryocytes, progranulocytes 증가 하였으며, 암컷 고용량군에서도 spleen에서 granulocyte migration이 나타났고, bone marrow에서 megakaryocytes가 증가하였다. 이상의 결과는 James (1993)가 주장한 EPO이 신부전환자나 빈혈환자에서 조혈기능을 향상시킨다는 결과와 일치함으로 시험물질인 EPO의 약리

작용인 것으로 추정된다. 그밖에 중간용량군, 저용량군에서는 spleen과 bone marrow에서 약간의 megakaryocytes의 증가이외에는 대조군과 비교하여 기초병변이외에는 특이한 병변은 관찰되지 않았다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 고용량(2000 IU/kg B.W.)에서 혈액학적으로 RBC, hemoglobin, hematocrit치가 증가하고 조직학적으로는 특히, spleen과 bone marrow에서 megakaryocytes와 erythroblast가 중심이 되어 현저한 조혈의 증가는 James(1993), Kazau (1990)등이 주장한 EPO의 조혈기능을 증진시키는 약리작용의 결과에 기인한 것으로 사료된다.

그러므로 토끼에서 4주간 EPO 정맥내 연속투여는 최고 2000 IU/kg/day까지 독성을 나타내지 않는 것으로 사료된다.

V. CONCLUSION

녹십자에서 개발한 EPO의 토끼에서 4주간 반복투여에 대한 독성시험을 실시한 결과, 시험기간중 사망 동물은 없었으며 체중변화, 음수 및 사료섭취량 변화, 뇨 검사, 안검사 결과 EPO투여군에서 특이할 만한 변화는 없었다. 부검시의 Prothrombin time의 검사소견에서는 암컷 고용량군(17.33±2.53 sec)이 암컷 대조군(12.67±0.58 sec)보다 통계적으로 유의성 있는 증가를 보였으며, 부검시의 혈청 생화학적 검사소견으로는 대조군과 비교하여 수컷 고용량군에서 creatinine의 유의성 있는 증가를 보였다. 한편 암컷 고용량군에서는 glucose, K(potassium)이 유의성 있는 감소가 인정되었다. 부검시의 혈액 생화학적 검사결과는 대조군과 비교하

여 혈소판은 암컷저용량군과 수컷 고·중·저용량 투여군에서 통계적으로 유의성있는 감소가 인정되었다. 그러나, 수컷 고용량군과 암컷 고용량군에서 RBC, hemoglobin, hematocrit치가 유의성 있는 증가를 보인 것은 시험물질인 EPO의 약리작용으로 사료된다. 절대 장기 무게와 체중에 대한 각 장기의 상대중량비는 산발적으로 유의성 있는 변화를 보였다. 병리조직학적 검사 결과 수컷 고용량군에서 spleen에 megakaryocytes, progranulocytes, erythroblast의 증가가 중심이 되어 현저한 골수의 조혈이 나타났고, liver에서도 megakaryocytes의 증가와 Glisson's sheath에 lymphocyte proliferation이 나타났고 또한 bone marrow에서는 megakaryocytes, progranulocytes 증가 하였으며, 암컷 고용량군에서도 spleen에서 granulocyte migration이 나타났고, bone marrow에서 megakaryocytes가 증가하였다. 이것은 시험물질인 EPO의 약리작용인 것으로 추정된다. 그밖에 중간용량군·저용량군에서는 spleen과 bone marrow에서 약간의 megakaryocytes의 증가이외에는 대조군과 비교하여 기초병변이외에는 특이한 병변은 관찰되지 않았다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 고용량(2000 IU/kg B.W.)에서는 혈액학적으로 RBC, hemoglobin, hematocrit치가 증가하고 조직학적으로는 특히, spleen과 bone marrow에서 megakaryocytes와 erythroblast가 중심이 되어 현저한 조혈의 증가는 James(1993), Kazau(1990)등이 주장한 EPO의 조혈기능을 증진시키는 약리작용의 결과에 기인한 것으로 사료된다.

따라서, 토끼에서 4주간 EPO의 정맥내 연속투여는 최고 2000 IU/kg/day까지 독성을 나타내지 않는 것으로

사료된다.

REFERENCES

- Buchbinder A, Adler H and Ballard H. (1993): An unusual and unreported toxicity to erythropoietin. *Am. J. Hematol.* **42**(4), 412-413.
- Giglio MJ, Frid A, Arrizurrieta E, Barcat J, Gonzalez E and Bozzini CE. (1994): Erythropoietin production in hypoxemic rats with selective necrotic damage of the different resions of the proximal tubules.
- James W. and 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.
- Kazuo O, Shoichi A, Takako S, Tomako O, Naoki N and Yoshiko I. (1990): Metabolic fate of erythropoietin(TYB-5220). *藥理と治療*, **18**, 2009-2019.
- Terumasa M, Tsuyoshi O, Yasuko H, Takako S and Hamki H. (1990): General pharmacological studies of erythropoietin(TYB-5220). *藥理と治療*, **18**, 953-971.
- Yajima N, Kurata Y, Inai E, Sawai T and Takeshita Y. (1993a): Genotoxicity of genetic recombinant human erythropoietin in a nivel test system.. *Mutagenesis*, **8**(3), 231-236.
- Yajima N, Kurata Y, Sawai T and Takeshita Y. (1993b): Induction of micronucleated erythrocytes by recombinant human erythropoietin. *Mutagenesis*, **8**(3), 221-229.