

비글개에서 인체 재조합 적혈구 조혈인자, rHu-EPO의 급성독성에 관한 연구

조명행 · 성하정 · 김형식* · 곽승준* · 천선아* · 임소영* · 김원배** · 김병문** · 안병옥** · 이병무*
서울대학교 수의과대학, *성균관대학교 약학대학, **동아제약(주)연구소

Acute Toxicity of Recombinant Human Erythropoietin (rHu-EPO) in Beagle Dogs

Myung Hang Cho, Ha Jung Seong, Hyung Sik Kim*, Seung Jun Kwack*,
Sun Ah Chun*, So Young Lim*, Won Bae Kim**, Byoung Moon Kim**,
Byoung Ok Ahn** and Byung Mu Lee*

College of Veterinary Medicine, Seoul National University.

*Division of Toxicology, School of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University.

**Dong-A Pharm. Co., LTD.

(Received August 14, 1996)

(Accepted September 5, 1996)

ABSTRACT : The acute toxicity of rHu-EPO, newly developed recombinant erythropoietin, was tested in beagle dogs. rHu-EPO, when administered intravenously at 25,000 IU/kg, did not cause any death. Also, rHu-EPO did not induce any change of body weight, food intake and clinical signs compared to controls. There were no significant changes in hematological, urine analysis and pathological examination. These results showed that rHu-EPO did not induce any remarkable toxic response and the LD₅₀ was greater than 25,000 IU/kg in beagle dogs.

Key Words : Recombinant human erythropoietin, Beagle dog, Acute toxicity

I. 서 론

Erythropoietin은 적혈구아세포의 발육을 촉진하는 glycoprotein으로 빈혈치료, 자가수혈, 약물치료나 방사선 치료에서의 회복 등 다방면의 임상적용 가능성 때문에 많은 주목을 받고 있다(Fisher, 1993).

신부전과 azidothymidine이나 HIV와 관련된 빈혈 등의 임상적 치료에 recombinant human erythropoietin이 적용되고 있으며(Terumasa 등, 1990), 다양한 유전자 재조합 기술을 이용하여 대량생산된 erythropoietin들에 대하여 실시한 안전성시험도 보고되고 있다(Kim 등., 1994; Lim 등., 1994).

따라서 본 실험에서는 동아제약에서 기존의 생산방법과는 다른 방법에 의해 대량생산에 성공한 recombinant human erythropoietin(rHu-EPO)에 대하여 비글개에서 일회 투여에 의한 급성독성시험을 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질

본 실험에 사용한 시험물질 rHu-EPO(DA3285)는 동아제약에서 제조한 인체 재조합 적혈구 조혈 인자로서 24,450 IU/ml의 농도로 되어있으며 사용시 의뢰자가 제공한 매체에 희석하여 사용하였다.

2. 실험동물

6개월령의 비글개(White Eagle Lab, 미국) 암수 각각 2마리씩을 1주간 기초사육한 후 시험에 사용하였다. 실험기간중 사육실 환경조건은 실내온도 20±3°C, 상대습도 50±10%, 환기회수 10~12회/hr으로 하였으며, timer를 이용하여 12시간씩 명암을 주기적으로 교환하였고, 조도는 150~300 Lux로 하였다. 모든 동물은 철망케이지(60×40×45 cm, 명진)에서 사육하면서 애완견용 고형사료(제로니, 제일제당)와 상수도를 자유급여하였다.

3. 시험군의 구성, 투여농도 및 용량

투여군에는 시험물질을 25,000 IU/ml로 희석하여 2 ml/kg의 용량으로 1회용 주사기를 이용하여 투여하였으며, 대조군에는 동량의 DA3285 희석용 완충액을 투여하였다. 투여경로는 임상에서의 투여경로와 동일한 정맥내로 투여하기 위해 비글개의 요측피정맥을 통해 투여하였다.

4. 일반증상 관찰

임상증상 및 폐사여부를 투여 당일은 투여후 4시간까지는 연속하여, 그 이하는 2시간 간격으로 투여후 8시간까지 관찰하고, 투여익일로부터는 1일 3회 이상, 7일간 관찰하였다. 임상증상의 종류(anorexia, salivation, diarrhea, vomiting, polyuria, anuria, fecal change) 등과 그 정도를 기록하였다(Zbiden and Flury-Roversy, .1981; Lorke, 1983; National Institute of Safety Research, 1994)

5. 사료섭취량 및 체중측정

사료섭취량은 투여전 5일로부터 투여후 7일까지 매일, 체중은 투여전 6, 3, 1일 및 투여후 2, 5, 7일에 측정하였다.

6. 혈액학적 검사

투여전일 및 부검전에 투여한 반대측의 요측피정맥으로부터 채혈하여 EDTA-3K로 항응고처리를 하고 적혈구수(RBC), 총백혈구수(WBC), 헤모글로빈량(hemoglobin), 헤마토크리트치(hematocrit), 평균적혈구용적(MCV), 평균적혈구혈색소량(MCH), 평균적혈구혈색소농도(MCHC), 혈소판(platelet) 등을 측정하였다.

7. 혈청생화학적 검사

채취한 혈액의 일부를 실온에 30분간 방치하여 응고 후 원심분리(3,000 rpm, 30 min)하여 얻은 혈청에 대해서 alanine transaminase(ALT), aspartate transminase(AST), alkaline phosphatase(ALP), 총콜레스테롤(total cholesterol), 혈당(blood glucose), albumin, globulin, bilirubin, 총단백(total protein), 혈액뇨소질소(BUN), creatinine, lactic dehydrogenase(LDH), γ -glutamyl transferase(GGT), creatine phosphokinase(CPK), Ca^{++} , Na^{+} , 및 K^{+} 등을 각각 검사하였다.

8. 장기 중량 및 크기 측정

전 실험동물에 대하여 관찰기간종료후에 pentobarbital 마취하에서 방혈 거사하여 부검하고 전신의 주요 장기를 육안으로 관찰하였다. 뇌하수체, 악하선, 갑상선, 흉선, 폐, 심장, 간장, 췌장, 비장, 신장, 부신, 정소, 전립선, 난소, 자궁에 대하여 중량을 측정하고 병리해부시의 체중에 대한 상대중량 및 크기를 산출하였다.

9. 병리조직검사

각 실질장기의 일부를 10% 완충 포르말린에 충분히 고정시킨 다음 통상적인 절차에 의하여 자동조직처리기로 조직을 처리한 후 파라핀에 포매하였다. 파라핀 포매 조직을 5 μm 의 두께로 절편한 다음 hematoxylin & eosin 염색을 실시하여 광학 현미경하에서 관찰하였다. 또 신장에 대해서는 Periodic acid-Schiff(PAS)염색을 하였다.

10. 통계학적 방법

본 실험에서 얻은 측정치의 통계학적 분석은 동일 시점에 대한 대조군과 투여군과의 차이를 Student's *t*-test를 사용하여 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

비글개에서 동아제약이 개발한 recombinant human erythropoietin(rHu-EPO)의 투여에 대한 급성독성을 조사하기 위해 임상용-량(50 IU/kg)의 500배와 5배인 25,000 IU/kg와 250 IU/kg의 2단계 용량으로 암, 수 각 1마리씩 설정하여 1회 정맥투여하고 1주간 관찰하는 예비실험을 실시하였다. 이 경우에서 폐사예가 없어서 25,000 IU/kg를 급성독성시험 용량으로 하였다.

1. 임상증상 및 폐사율

투여군 및 대조군 모두 전기간 동안 시험물질 투여때문으로 여겨지는 임상증상이 관찰되지 않았고, 투여군과 대조군 모두에서 시험기간중 폐사동물을 없었다.

2. 체중변화

대조군에 비하여 투여군에서 유의할 만한 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 1).

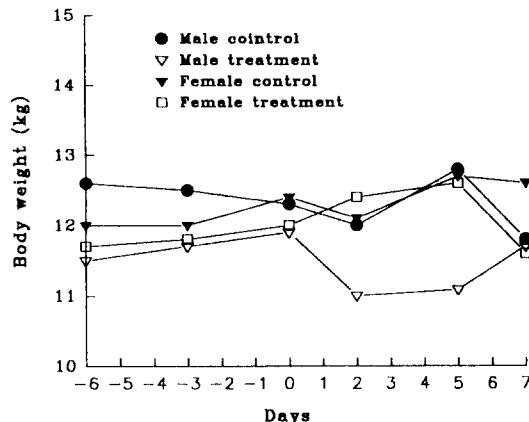


Fig. 1. Body weights change in male and female beagle dogs treated intravenously with rHu-EPO.

3. 혈액학적 및 혈청생화학적 검사소견

대조군에 비하여 투여군에서 유의할만한 이상을 나타내지 않았다(Table 1, 2).

4. 각 장기의 체중에 대한 상대중량비

대조군에 비하여 투여군에서 유의할만한 이상을 나타내지 않았다(Table 3).

5. 병리조직검사 소견

대조군에 비하여 투여군에서 별다른 이상을 나타내지 않았다. 이미 보고된 원숭이에서의 erythropoietin의

Table 1. Hematological values of beagle dogs intravenously treated with rHu-EPO

Parameters\Group	Male				Female			
	Control (n=2)		25,000 IU/kg (n=2)		Control (n=2)		25,000 IU/kg (n=2)	
	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
WBC(10^3 mm 3)	15.5	17.7	14.6	13.1	14.4	8.3	19.6	11.8
RBC(10^6 /mm 3)	6.4	6.4	6.4	7.5	5.2	5.8	5.5	6.6
Hb(g/dL)	13.8	9.3	12.9	15.4	11.0	12.6	11.6	14.6
Ht(%)	43.5	41.7	43.8	49.4	33.9	37.0	39.4	48.1
MCV(μ 3)	68.1	64.4	69.5	66.9	65.8	63.9	72.1	72.9
MCH(pg)	21.5	21.9	20.3	20.6	21.4	21.7	21.3	22.3
MCHC(g/dL)	31.6	34.1	29.5	30.9	32.6	34.0	30.0	30.5
PLT(10^3 /mm 3)	211.0	361.5	138.5	260.0	136.0	258.0	228.0	225.0

Each value represents mean of 2 dogs.

Table 2. Biochemical serum values of beagle dogs intravenously treated with rHu-EPO

Parameters\Group	Male				Female			
	Control (n=2)		25,000 IU/kg (n=2)		Control (n=2)		25,000 IU/kg (n=2)	
	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
Total Protein(g/dl)	6.2	6.0	5.4	6.2	5.6	5.4	6.6	5.4
Albumin(g/dl)	3.5	3.6	3.4	4.8	3.2	3.2	3.4	3.4
Globulin(g/dl)	2.7	2.4	2.0	3.2	2.3	2.1	2.1	2.0
Glucose(mg/dl)	42.5	105.5	58.5	48.8	54.5	97.5	55.5	40.5
Chol.(mg/dl)	120.0	124.0	139.5	185.0	220.5	203.5	169.5	190.0
AST(IU/l)	50.0	33.5	46.0	63.0	32.0	25.0	55.0	40.5
ALT(IU/l)	23.0	34.5	25.0	21.0	24.5	30.0	31.0	22.5
GGT(IU/l)	3.5	3.0	5.0	3.0	2.5	3.0	1.0	4.0
ALP(IU/l)	310.0	314.5	261.5	262.0	187.0	221.5	253.5	249.5
LDH(IU/l)	541.0	169.0	711.5	1000.5	422.5	152.0	962.5	523.5
BUN(mg/dl)	17.7	10.3	14.8	14.6	40.3	60.5	12.8	8.2
Creatinine(mg/dl)	0.9	0.8	0.7	0.8	2.3	2.7	0.7	0.7
CPK(IU/l)	317.0	361.0	437.0	607.5	262.0	161.0	386.5	345.5
Na(mEq/l)	147.5	146.0	134.0	134.5	136.5	144.5	127.0	126.0
K(mEq/l)	5.9	5.6	16.7	19.2	16.4	11.7	28.2	26.1
Ca(mg/dl)	8.8	9.9	6.4	14.4	9.8	10.0	10.4	10.3

Each value represents mean of 2 dogs.

Chol., Total cholesterol; AST, Aspartate transaminase; ALT, Alanine transaminase; GGT, Gamma glutamyl tranferase; ALP, Alkaline phosphatase; LDH, Lactic dehydrogenase

Table 3. Relative organ weights of beagle dogs intravenously treated with rHu-EPO

(Unit : g%)

Parameter \ Group	Male		Female	
	Control (n=2)	Treatment (n=2)	Control (n=2)	Treatment (n=2)
Weight(kg)	11.20	11.80	11.35	12.22
Liver	2.96	2.96	3.21	3.01
Spleen	0.23	0.25	0.25	0.25
Pancreas	0.33	0.36	0.35	0.37
Kidney	0.45	0.45	0.49	0.44
Adrenal gland(mg%)	9.53	8.23		
Testis	0.12		19.91	16.17
Ovary		0.15		
Prostate gland	0.09		0.10	0.10
Uterus		0.10	0.19	0.18
Lung	0.57	0.60	0.65	0.68
Heart	0.84	0.82	0.94	0.77
Thymus	0.11	0.14	0.22	0.11
Thyroid gland(mg%)	9.45	8.45	7.23	10.19
Submandibular	0.16	0.12	0.17	0.10
Pituitary gland(mg%)	0.34	0.47	0.48	0.45

Each value represents mean \pm S.D.

급성독성결과(Spicer and Wisler, 1990)와 랙드와 개를 가지고 실시한 human recombinant erythropoietin(rHu-EPO)의 급성독성시험에서 LD₅₀은 20,000 IU/kg ♂]상(Lim 등., 1994)이라고 하였으며, 본 실험에서도 25,000 IU/kg 투여결과 임상증상, 혈액학적 및 혈청생화학적 검사소견, 뇨검사등에서 대조군과 투여군 모두에서 유의적인 변화가 나타나지 않았다.

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 293-331.
 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.

Lorke, D. (1983): A new approach to practical toxicity testing. Arch. Toxicol., **54**, 275-287.

National Institute of Safety Research (1994): Toxicity test guideline for safety evaluation of drugs for human use, No. 94-3 Korea.

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

Terumasa Mino, Tsuyoshi Ohmura, Yasuko Hiraoka, Takako Sugino and Haruki Hayashi(1990) : General Pharmacological studies of erythropoietin (TYB-5220). 藥理と治療, **18** : 953~971.

Zbinden, G. and Flury-Roversi, M. (1981) Significance of the LD₅₀ test for toxicological evaluation of chemical substance. Arch. Toxicol., **47**, 77-99.