

토끼에서 EPO(Erythropoietin)의 안점막자극성 및 피부자극성시험

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

A Study on Ocular and Skin Irritation Test of EPO(Erythropoietin)

Byeong-Cheol Kang, Jeong-Seok Nam, Jeong-Hwan Che, Suk-Man Lee,
Jae-man Yang, Hak-Mo Lee, Jae-Hak Park*, Dong-Hoo 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 February 10, 1997)

(Accepted March 25, 1997)

ABSTRACT : This test was performed to evaluate the ocular and skin irritation of EPO (Erythropoietin). The results as follows :

1. Ocular irritation test

There were no observed clinical signs, body weight changes by EPO during experimental period. The acute ocular irritation index(A.O.I.), mean ocular irritation index(M.O.I.) and Day-7 individual ocular irritation index(I.O.I.) of EPO at dose of 1000U and 10,000U were 0, respectively. Therefore we evaluated that EPO was non-toxic to eyes.

2. Skin irritation test

There were no observed clinical signs, body weight changes and gross pathologic findings by EPO during experimental period. There were no observed erythema, eschar formation and edema formation on intact and abraded skin treated by EPO. The primary irritation index(P.I.I.) of EPO at dose of 1000U and 10,000U were 0, respectively and were evaluated none irritating product about skin irritation.

Key Words : Erythropoietin, Ocular irritation, Skin irritation

I. 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 등, 1988). 생체내에서 조혈기능의 중요성은 매우 크다 할 수 있는데, 조혈기능에 영향을 주는 여러 요인들 중에서도 erythropoietin(EPO)은 말기 신질환에서의 빈혈 치료, 자가수혈, 약물치료나 방사선 치료에서의 회복 등 다방면의 임상적용 가능성으로 많은 주목을 받고 있다(James W. Fisher 1993).

EPO는 여러원인에 기인해, 특히 신장이 손상되었을 때 등 hypoxemia 상태와 관련되어 혈중농도가 높아진다(Giglio MJ 등, 1994). 그 생성장소가 renal peritubular cell이라고 생각되는 sialoglycoprotein hormone으로, 193개의 아미노산 단백질로 생성되어 27개의 아미노산이 분할된 166개의 아미노산 산물이 된 후 다시 165개의 아미노산 단백질로 분할되고 glycosylation 되면 생물학적 활성을 갖게 된다(James et al., 1993).

이는 주로 후기적아구계 전구세포의 분화단계의 세포에 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. 그래서 EPO의 임상적 적용에 관해 많은 관심이 모아져 왔는데 최근에는 신부전 뿐만아니라

*To whom correspondence should be addressed.

azidothymidine이나 HIV와 관련된 빈혈 등의 임상적 치료에 recombinant human EPO의 적용이 다각도로 주목되고 있다(Kazuo O. 등, 1990). 한편 erythropoietin이 적혈구에 대한 세망적혈구의 수를 증가시킨다는가 소핵 다염성 적혈구를 현저히 증가시킨다는 유전 독성실험이나 소핵실험도 보고되고 있다(Yajima N. 등, 1993).

이렇듯 조혈장애의 치료제로 주목되고 있는 EPO의 안전성평가의 일환으로 (주)녹십자에서 분리 정제한 recombinant erythropoietin에 대하여 토끼에서 국소 자극 독성시험의 일환으로 안점막 자극성과 피부자극성 반응을 조사하기 위하여 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질

(주)녹십자에서 제공한 EPO(Erythropoietin)를 투여 직전에 다음과 같은 매체물질로 희석·혼합하여 조제하여 실험에 사용하였다(Table 1).

2. 실험동물

실험동물로는 5-6개월령의 수컷 토끼(New Zealand White Rabbit)를 삼육실험동물연구센터에서 구입하여 실험에 사용하였다. 모든 동물은 동물입수후 약 1주일간 동물실에서 순화시키면서 일반상태를 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 사용하였다. 시험개시 약 24시간전에 토끼의 좌우 안구의 각막, 결막, 홍채 등의 병변상태를 관찰하여 건강한 좌우 양안을 가진 토끼를 실험동물로 사용하였다. 본 시험의 환경조건을 온도 22±3°C, 상대 습도 55±5%, 환기회수 10-12회/hr, 조명시간(07:00-

19:00), 조도 150~200lux로 하였으며, 시험기간 및 시험기간 중에 토끼는 3단 사육상자 대에 배열된 스테인레스 스틸 사육케이(42×50×31 cm)에 1마리씩 수용하였다. 사료와 음수는 자유섭취시켰다.

3. 안점막자극시험

1) 시험군의 구성 및 투여방법

토끼를 각군당 9마리씩 2개군으로 나누어 제1군은 EPO 저용량(1,000 U/ml), 제2군은 EPO 고용량(10,000 U/ml)으로 분류하여 시험물질을 토끼 한쪽(오른쪽)눈에 점안하고, 다른쪽(왼쪽)눈에는 대조물질을 점안하였다. 각 군당 3마리는 20-30초후 양쪽눈에 미온 무균 생리식염수 20ml로 1분간 세안하였고, 나머지 6마리는 세안하지 않았다.

2) 관찰 및 평가

시험물질 투여후 일반증상, 사료 및 물섭취상태 등에 관하여 매일 관찰하였고, 시험물질 투여 직전, 투여 후 1일, 3일 및 7일째에 체중을 측정하였다. 시험물질 투여후 1, 2, 3, 4, 7일째에 안검사를 실시하여 안구병변의 등급평가 및 자극성의 판정은 식품의약품안전본부 고시에 준하여 평가하였으며, 안구병변의 등급표 및 안점막 자극판정표(Table 2)를 이용하여 자극성의 정도를 판정하였다.

4. 피부자극시험

1) 시험군의 구성 및 투여방법

토끼를 각군당 6마리씩 2개군으로 나누어 제 1군은 EPO 저용량(1,000 U/ml), 제 2군은 EPO 고용량(10,000 U/ml)으로 분류한 후 시험물질의 적용 24시간 전에 제 모를 실시하여 처치구획 및 대조구획으로 구분하였다(Fig. 1). 투여방법은 시험물질을 동물 1마리당 원액을 1 ml(0.5 ml/site)씩 투여부위에 1회 도포하였으며, 무처리 대조구획에는 대조물질을 같은 양 도포하였다. 도

Table 1. EPO 희석용 완충액 조성 (1.0 ml 중에)

| | |
|--------|----------|
| 염화나트륨 | 5.84 mg |
| 구연산나트륨 | 5.80 mg |
| 무수구연산 | 0.057 mg |

Table 2. Irritation index on rabbit eyes after treatment of EPO.

| Rating | A.O.I | Evaluation value M.O.I. | Day-7 I.O.I. |
|-------------------|--------|-------------------------|-------------------------|
| Non-irritant | 0~5 | 0(after 48 hrs) | |
| Minimal irritant | 6~15 | ≤5(after 48 hrs) | |
| Mild irritant | 16~30 | ≤5(after 48 hrs) | |
| Moderate irritant | 31~60 | ≤5(after 7 hrs) | ≤30(tested animals all) |
| Severe irritant | 61~80 | ≤20(after 7 hrs) | ≤30(tested animals all) |
| Extreme irritant | 81~110 | | |

M.O.I.(Mean ocular irritation index), total score/tested animal number in each observation time; A.O.I.(acute ocular irritation index), maximum among M.O.I.; Day-7 I.O.I.(Individual ocular irritation index), score of each animal on Day-7

포후 가제를 덮은 후 시험물질의 증발을 막기 위해 칩 투성이 없고 반응성이 없는 고휘 재질의 박지로 덮고

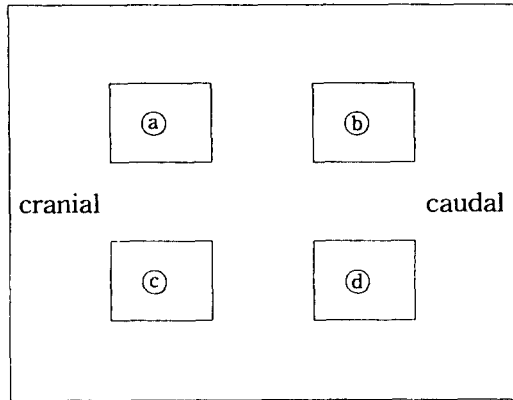


Fig. 1. Experimental region to rabbit back skin. (a) Test site, non-abraded. (b) Test site, non-abraded. (c) Control site, abraded. (d) Control site, non-abraded.

Table 3. Irritation rating for Primary Dermal Reaction on rabbit skin after treatment of EPO.

| Ranging of P. I. I.* | Rating |
|----------------------|--------------------|
| P.I.I.<2 | Mild irritated |
| 2≤P.I.I.≤5 | Moderate irritated |
| 5<P.I.I. | Severe irritated |

*P. I. I., Primary Irritation Index.

Table 4. Ocular irritation reaction to Erythropoietin in New Zealand white Rabbits.

| Test group | Washing (Yes/No) | Observation time(day) | | | | | Acute ocular irritation index(A.O.I) |
|-----------------|------------------|-----------------------|---|---|---|---|--------------------------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 7 | |
| EPO (1,000U/ml) | Y | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | N | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| EPO (1,000U/ml) | Y | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | N | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Table 5. Results of primary skin irritation test(Draize's Method) in New Zealand white rabbits dressed dermally with Erythropoietin.

| Sites | Control site | | | | | | | | Low dose ^a | | | | | | | | High dose ^b | | | | | | | |
|---------------------|-------------------|----|---------|----|--------|----|---------|----|-----------------------|----|---------|----|--------|----|---------|----|------------------------|----|---------|----|--------|----|---------|----|
| | Erythema & eschar | | | | Edema | | | | Erythema & eschar | | | | Edema | | | | Erythema & eschar | | | | Edema | | | |
| | intact | | abraded | | intact | | abraded | | intact | | abraded | | intact | | abraded | | intact | | abraded | | intact | | abraded | |
| Change | 24 ^c | 72 | 24 | 72 | 24 | 72 | 24 | 72 | 24 | 72 | 24 | 72 | 24 | 72 | 24 | 72 | 24 | 72 | 24 | 72 | 24 | 72 | 24 | 72 |
| Ani.No. Sex | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 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 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 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 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Total score | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Mean score | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | |
| P.I.I. ^d | 0 | | | | 0 | | | | 0 | | | | 0 | | | | | | | | | | | |

^aanimals treated with Erythropoietin(low dose-1,000 U/ml). ^banimals treated with Erythropoietin(high dose-10,000 U/ml). ^cTime after topical application of EPO. ^dP.I.I.; Primary Irritation Index

테이프를 사용하여 고정하여 24시간 적용시켰다. 적용 시간 종료후에는 무균생리식염수를 이용해 도포부를 가볍게 세정해 주었다.

2) 관찰 및 평가

시험물질 투여 후 일주일간 매일 외관, 사료 및 음수 소비상태와 임상증상 등에 대하여 관찰하였고, 체중은 투여시 및 적용후 7일째(부검직전)에 각각 측정하였다. 피부반응의 평가 및 자극성의 판정은 "의약품등의 독성시험기준"을 이용하여 판정하였다. 또한 피부에 대한 자극성의 정도 판정은 일반적으로 많이 이용되는 Draize(1944)의 P. I. I.(Primary Irritation Index)의 산출 방법에 따랐다(Table 3).

III. 결 과

1. 안점막자극시험

1) 임상증상 및 체중변화

투여 1일부터 그 이후 7일까지 아무런 증상이 나타나지 않았고 대조의 한쪽 준에 비하여 시험물질에 의한다고 판단되는 아무런 이상을 관찰할 수 없었다. 또

한 모든 토끼에서 적용후 7일째의 체중은 도포개시일의 체중과 비교하여 시험물질과 관련된 체중의 증가 또는 감소와 같은 변화는 인정되지 않았다.

2) 안구병변의 관찰

검체 투여후 1, 2, 3, 4, 7일에 각각 각막, 홍채, 결막에 대한 안구병변의 등급을 점수로 표시한 결과는 Table 4과 같다.

2. 피부자극시험

1) 임상증상, 폐사율 및 체중변화

시험 전기간을 통하여 토끼에서 폐사동물은 관찰되지 않았으며 어떠한 임상증상 및 시험물질과 관련된 체중의 증가 또는 감소와 같은 변화는 관찰되지 않았다.

2) 도포부위의 관찰

적용부위의 관찰은 전동물에서 시험물질 적용후 24, 72시간 각각 실시한 결과, 비찰과부위 및 찰과부위에서의 홍반, 부종 및 가피 형성은 거의 관찰되지 않았다(Table 5). 생리식염수를 투여한 무처리 대조구획에서의 피부반응의 결과는 전동물에서 특이적인 변화가 인정되지 않았다.

IV. 고 찰

EPO(Erythropoietin)의 안점막자극성 시험 및 피부자극시험을 식품의약품안전본부 고시 제 96-8호(1996. 4. 16). "의약품등의 독성시험기준"에 따라 실시하였다.

안점막자극성시험은 토끼를 각군당 9마리씩 2개군으로 나누어 시험한 결과 일반증상, 체중변화에서 EPO에 기인된 것으로 생각되는 특이병변은 관찰되지 않았다.

검체 투여 후 1, 2, 3, 4, 7일에 각각 각막, 홍채, 결막에 대한 안구병변의 등급을 점수로 표시하였고 안자극의 판정은 각군의 비세안 및 세안하는 경우의 자극 정도를 합산하였다(Table 4). 안점막 자극표에 따라 계산하면, 제 1군인 EPO 저용량(1,000 U/ml)에서 A.O.I.(acute ocular irritation index)는 투여후 1일째 0으로 나타났고, M.O.I.(mean ocular irritation index)는 2일째에 0, 투여후 3, 4, 7일째 0으로 나타났으며, Day-7 I.O.I.(individual ocular irritation index)는 0으로 판정되었다. 제 2군인 EPO 고용량(10,000 U/ml)에서 A.O.I.는 투여후 1일째 0으로 나타났고, M.O.I.는 2일째에 0, 투여후 3, 4, 7일째 0으로 나타났으며, Day-7 I.O.I.는 0으로 판정되었다. 따라서 EPO에서 저용량군(1,000 U/ml)과 고용량(10,000 U/ml)군은 토

끼의 안점막에 무자극물(non-irritant)로 사료된다.

다음으로 EPO(Erythropoietin)의 피부자극성시험에서는 각군당 토끼 6마리씩 2개군으로 나누어 1 ml/rabbit(0.5 ml/site)로 경피적용한 결과 일반증상, 체중변화에서 EPO에 기인된 것으로 생각되는 특이병변은 관찰되지 않았다.

저용량(1,000 U/ml)군과 고용량(10,000 U/ml)군에서의 비찰과부위와 찰과부위에서는 홍반, 가피, 부종 등의 피부자극 반응은 나타나지 않았다(Table 5). 이상과 같은 피부반응의 결과를 평가하기 위하여 피부 자극율(P. I. I.)을 산출한 결과, EPO의 저용량군과 고용량군에서 각각 0으로 나타나 토끼에서 EPO 저용량군과 고용량군에서 자극성이 없는 무자극물(non irritant)로 사료된다.

참고문헌

- Eschbach, J.W. and J.W. Adamson, (1989): Guidelines for recombinant human erythropoietin therapy, *Am. J. Kidney Dis.* **14**:2-8
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 Haruki H. (1990): General pharmacological studies of erythropoietin(TYB-5220). *藥理と治療*, **18**, 953-971.
- Buchbinder A, Adler H and Ballard H. (1993): An unusual and unreported toxicity to erythropoietin. *Am. J. Hematol.* **42**(4), 412-413.
- 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.
- Yajima N, Kurata Y, Sawai T and Takeshita Y. (1993): Induction of micronucleated erythrocytes by recombinant human erythropoietin. *Mutagenesis*, **8**(3), 221-229.