

## 기니픽, 마우스 그리고 랫드에서 EPO(Erythropoietin)의 항원성에 관한 고찰

이학모 · 남정석 · 제정환 · 이석만 · 양재만 · 강병철 · 박재학\* · 송동호\*\* · 유선희\*\* · 이영순<sup>1</sup>  
서울대학교 수의과대학 공중보건학교실, \*실험동물의학교실, \*\*(주)녹십자

### Antigenicity of EPO (Erythropoietin) in Guinea Pigs, Mice and Rats

Hak-Mo Lee, Jeong-Seok Nam, Jeong-Hwan Che, Suk-Man Lee, Jae-Man Yang,  
Byeong-Cheol Kang, Jae-Hak Park\*, Dong-Ho Song\*\*, Sun-Hee Lee\*\* 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 :** The antigenicity of EPO (erythropoietin) was investigated in guinea pig, mice and rats. Antigenicity tests-active systemic anaphylaxis (ASA), passive cutaneous anaphylaxis (PCA) of this materials were performed according to the established Regulation of Korean National Institute of Safety Research (1996, 4, 16).

The results were followed:

1. After sensitization with EPO emulsified with complete Freund's adjuvant (CFA), guinea pigs didn't show any anaphylactic shock symptom in the ASA test
2. After sensitization with antisera of EPO sensitized mice, blue spots were observed on the hypodermis of back of rats in the PCA test, but diameter of each spot was smaller than 5 mm.

From the results of this investigation, the antigenicity of EPO was negative under the present experimental condition.

**Key Words :** EPO, ASA, PCA, Guinea pig, Mouse, Rats

## I. 서 론

생체내에서 조혈기능에 영향을 미치는 여러 요인들 중에 EPO(erythropoietin)은 말기 신질환에서의 빈혈치료, 자가수혈, 약물치료나 방사선 치료에서의 회복 등 다방면의 임상적용 가능성으로 많은 주목을 받고 있다 (Buchbinder A. et al., 1993).

EPO는 여러 원인에 기인해 혈중농도가 증가하는데 (Giglio et al. 1994), 특히 신장이 손상되었을 때 hypoxemia 상태와 관련되어 높아지며, renal peritubular cell에서 생성되는 것으로 추정되는 asialyglycoprotein hormone으로, 193개의 아미노산 단백질로 생성되어 27개의 아미노산이 분할된 166개의 아미노산 산물이 된 후 다시 165개의 아미노산 단백질로 분할되고 glycosylation되면 생물학적 활성을 갖게 된다

(Buchbinder A. et al., 1993).

이는 주로 후기적아구계 전구세포의 분화단계의 세포에 작용, 그 분화와 증식을 촉진시켜, 적혈구의 생산을 조절하는 내인성 호르몬으로, 신장에서 생성된다고 생각되는 만큼 그 생산의 저하는 만성 신부전에 합병하는 빈혈의 주원인이라 생각되고 있으며, 심각한 조혈장애를 유발한다(Kazuo O. et al., 1990). 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 있다 (James et al., 1993; Kazuo O et al., 1990). 한편 EPO가 적혈구에 대한 세망적혈구의 수를 증가시킨다든가 소핵 다염성 적혈구를 현저히 증가시킨다는 유전 독성실험이나 소핵실험도 보고되고 있다 (Yaima N et al., 1993).

이렇듯 조혈장애의 치료제로 주목되고 있는 EPO의 안전성평가의 일환으로 (주)녹십자에서 분리 정제한

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed.

recombinant *erythropoietin*에 대하여 마우스, 기니픽, 랫드에서 면역독성실험의 일환으로 active systemic anaphylaxis(ASA)와 passive cutaneous anaphylaxis(PCA)를 조사하기 위하여 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시험물질

시험물질인 EPO(erythropoietin)는 무색투명한 물질로 희석액과 함께 (주)녹십자에서 공급받아 냉장보관하면서 희석하여 사용하였다.

### 2. 실험동물

3주령의 수컷 마우스(C57BL/6)와 10주령의 수컷 랫드(Sprague Dawley)는 서울대학교 실험동물사육장에서, 3개월령의 기니픽(Hartley)은 해운무역에서 구입하여 실험에 사용하였다. 모든 동물은 약 1주간 순환시키면서 건강한 동물만을 선택하여 실험에 사용하였다. 실험기간중 사육실 환경조건은 온도  $23 \pm 3^\circ\text{C}$ , 상대습도  $50 \pm 10\%$ , 환기 회수 10~12회/hr, 조명시간(오전 7시~오후 7시), 조도 150~200 Lux로 설정된 서울대학교 수의과대학 동물사육장 동물실험실 5호실에서 실시하였다. 모든 동물에서 사료와 음수는 자유급여하였으며, 기니픽은 음수에 0.01% vitamin C(삼육실험동물센타)을 녹여 공급하였다.

### 3. 시험군의 구성, 투여농도 및 용량

#### 1) ASA(active systemic anaphylaxis test(Table 1))

투여액의 조제는 EPO 고용량(제 1군), 저용량(제 2군), BSA(제 3군)의 각 시험물질을 각각 의뢰자측에

서 제공한 희석액에 희석하여 투여시마다 조제하였고, 실험 제 0, 4, 7일에 각 시험물질과 complete Freund's adjuvant와 같은 양 섞어 피하로 감각투여하였고, 제 14일과 제 24일에 정맥내 주사로 유발투여하여 anaphylactic shock를 관찰하였다.

#### 2) PCA(passive cutaneous anaphylaxis) test(Tables 2 and 3)

이 실험은 IgE 항체의 생산능력을 관찰하기 위한 실험으로 C57BL/6 마우스를 항원감작시켜 얻은 항혈청을 의뢰자측에서 제공한 희석액으로 단계희석하여 피내로 주사하였고 24시간 후에 각 항원과 Evan's blue 혼합액(1:1)을 각각 꼬리정맥내로 주사한 다음 30분경과 후에 피부를 박리하여 주사부위에 생성된 청색반점을 확인하였다. 항원감작은 C57BL/6 마우스를 각군당 6마리씩 4개군으로 나누어 제 1군은 EPO 고용량( $5 \times 10^3$  U/1 ml)을, 제 2군은 EPO 저용량( $5 \times 10^2$  U/1 ml)을, 제 3군은 BSA를 각각 희석액에 용해하여 complete Freund's adjuvant(CFA)와 같은 양을 섞어 조제한 후 피하로 감각시켰으며, 제 4군은 용매와 CFA를 동량 혼합하여 피하감작시켰다. 투여회수는 2주간격으로 3회 투여하였고, 조제빈도는 매 투여시마다 조제하였다. 최종감작 투여후 10일후에 부검하여 배대정맥에서

**Table 2.** Experimental Design in Producing Antisera with Mice

Group	Sex	No.	Serial No.	Dose
1	M	6	E1~6	EPO(H)+CFA, sc
2	M	6	E7~12	EPO(L)+CFA, sc
3	M	6	E13~18	BSA+CFA, sc
4	M	6	E19~24	Vehicle+CFA, sc

H, EPO high dose ( $5 \times 10^3$  U/1 ml); L, EPO low dose ( $5 \times 10^2$  U/1 ml); BSA, Bovine Serum Albumin (120 mg/1 ml); Vehicle, Buffer of EPO; CFA, Complete Freund's Adjuvant; sc, subcutaneous injection.

**Table 1.** Experimental Design in ASA Test with Guinea pigs

Test	Group	Sex	No	Serial No.	Sensitization	Challenge
ASA	1	M	5	ASAE 1~5	EPO(H)+CFA (sc)	EPO(H) (iv)
	2	M	5	ASAE 6~10	EPO(L)+CFA (sc)	EPO(L) (iv)
	3	M	5	ASAE 11~15	BSA+CFA (sc)	BSA (iv)
	4	M	5	ASAE 16~20	Vehicle+CFA (sc)	Vehicle (iv)

H, EPO high dose ( $5 \times 10^3$  U/1 ml); L, EPO low dose ( $5 \times 10^2$  U/1 ml); BSA, Bovine Serum Albumin (120 mg/1 ml); Vehicle, Buffer of EPO; CFA, Complete Freund's Adjuvant; sc, subcutaneous injection; iv, intravenous injection.

**Table 3.** Experimental Design in PCA Test with Rats

Group	Sex	No	Serial No.	Sensitization	Challenge
1	M	5	E1~6	Mouse Anti-EPO(H) (0.1 ml, id)	EPO (H)+EB (1 ml, iv)
2	M	5	E7~12	Mouse Anti-EPO(L) (0.1 ml, id)	EPO (L)+EB (1 ml, iv)
3	M	5	E13~18	Mouse Anti-BSA (0.1 ml, id)	BSA+EB (1 ml, iv)
4	M	5	E19~24	Mouse Anti-Vehicle (0.1 ml, id)	Vehicle+EB (1 ml, iv)

H, EPO high dose ( $5 \times 10^3$  U/1 ml); L, EPO low dose ( $5 \times 10^2$  U/1 ml); BSA, Bovine Serum Albumin (120 mg/ml); Vehicle, Buffer of EPO (1 ml/animal); EB, Evan's blue (10 mg/ml); id, intradermal injection; iv, intravenous injection.

채혈하여 실온에서 3시간 응고시킨 후 원심분리하여 혈청을 얻었으며, 분리한 혈청은 -20°C에서 보관하여 두었다가 PCA test시에 사용하였다.

4. 관찰자료의 해석 및 평가

1) Active systemic anaphylaxis(ASA):

Anaphylaxis의 유무를 불안, 기모, 진전, 코를 문지르거나 핏몸, 재채기, 기침, 호흡촉진, 배뇨, 배변, 유루, 호흡곤란, 짹짹거리는 소리, 청색증, 보행불안, 도약, 헛떡거리고 몸부림침, 경련, 황와, Cheyne-Stokes 호흡, 사망 등을 관찰하여 종합적으로 shock 정도에 따라 음성(-)은 아무런 임상증상이 관찰되지 않을 때, 경중(±)은 불안, 기모, 진전, 코비비기 등이 나타날때, 중등도(+)는 재채기, 기침, 호흡촉진, 배뇨, 배변, 유루 등이 관찰될 때, 중증(++)은 호흡곤란, 짹짹거리는 소리, 청색증, 보행불안, 도약, 헛떡거리고 몸부림침, 경련, 황와, Cheyne-Stokes 호흡 등이 관찰될때와, 사망시(+++)의 4단계로 판정하였다.

2) Passive cutaneous anaphylaxis(PCA)

주사부위에 관찰되는 청색반점의 생성여부를 관찰하여 청색반점의 직경((장경+단경)/2)이 5 mm 이상의 크기일 때 Anaphylaxis와 관련이 있는 IgE가 생성되어진 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1) Active Systemic Anaphylaxis(Table 4, 5)

Anaphylaxis의 유무를 평가하기 위해 각군의 기니픽을 0, 4, 7일에 3회 감작시키고 최종투여후 14일, 24일 2회에 걸쳐 귀정맥(ear vein)으로 주사하여 유발투여하였다. BSA 투여군에서는 투여후 14일에 정맥 주사시 불안, 기모, 진전, 코를 문지르거나 핏몸, 재채기, 기침, 짹짹거리는 소리, 보행불안, 경련, 황와, Cheyne-Stokes 호흡 등 보통의 anaphylatic shock를 보이다가 3마리가 폐사하였으며, 두번째 정맥주사시에는 불안, 기모, 진전, 코를 문지르거나 핏몸, 재채기, 기침, 짹짹거리는 소리 등의 anaphylatic shock를 보였지만 폐사하지는 않았다. EPO 투여군에서는 14일째의 첫번째 투여시와

Table 4. Active systemic anaphylaxis symptoms of each groups of male guinea pigs after first challenge with EPO

\Group \No. of animal \Symptoms	1 (Low) 5		2 (High) 5		3 (BSA) 5		4 (Vehicle) 5	
	±	±	±	±	±	±	±	±
Restlessness	0	0	0	0	0	5	0	0
Piloerection	0	0	0	0	0	5	0	0
Tremor	0	0	0	0	0	5	0	0
Rubbing or licking nose	0	0	0	0	2	3	0	0
Sneezing	0	0	0	0	0	0	0	0
Coughing	0	0	0	0	0	3	0	0
Hyperpnea	0	0	0	0	0	3	0	0
Urination	0	0	0	0	0	0	0	0
Evacuation	0	0	0	0	0	0	0	0
Lacrimation	0	0	0	0	0	0	0	0
Dyspnea	0	0	0	0	0	3	0	0
Rhonchus	0	0	0	0	0	0	0	0
Cyanosis	0	0	0	0	0	0	0	0
Staggering gait	0	0	0	0	0	3	0	0
Jumping	0	0	0	0	0	0	0	0
Gasping and writhing	0	0	0	0	0	3	0	0
Convulsion	0	0	0	0	0	0	0	0
Side position	0	0	0	0	0	3	0	0
Cheyne-Stokes respiration	0	0	0	0	0	3	0	0
Death	0	0	0	0	0	0	0	0
Evaluation of the intensity	0	0	0	0	+++	0	0	0

High, EPO high dose (5×10<sup>3</sup>/ml); Low, EPO low dose (5×10<sup>2</sup>/ml); BSA, Bovine Serum Albumin (120 mg/1 ml); sc, subcutaneous injection; iv, intravenous injection. 0, normal; ±, mild; +, moderate; ++, severe; +++, death.

Table 5. Active systemic anaphylaxis symptoms of each groups of male guinea pigs after second challenge with EPO

\Group \No. of animal \Symptoms	1 (Low) 5		2 (High) 5		3 (BSA) 5		4 (Saline) 5	
	±	±	±	±	±	±	±	±
Restlessness	0	0	0	0	0	2	0	0
Piloerection	0	0	0	0	0	2	0	0
Tremor	0	0	0	0	0	2	0	0
Rubbing or licking nose	0	0	0	0	0	2	0	0
Sneezing	0	0	0	0	0	2	0	0
Coughing	0	0	0	0	0	2	0	0
Hyperpnea	0	0	0	0	0	2	0	0
Urination	0	0	0	0	0	0	0	0
Evacuation	0	0	0	0	0	0	0	0
Lacrimation	0	0	0	0	0	0	0	0
Dyspnea	0	0	0	0	0	0	0	0
Rhonchus	0	0	0	0	0	0	0	0
Cyanosis	0	0	0	0	0	0	0	0
Staggering gait	0	0	0	0	0	0	0	0
Jumping	0	0	0	0	0	0	0	0
Gasping and writhing	0	0	0	0	0	0	0	0
Convulsion	0	0	0	0	0	0	0	0
Side position	0	0	0	0	0	0	0	0
Cheyne-Stokes respiration	0	0	0	0	0	0	0	0
Death	0	0	0	0	0	0	0	0
Evaluation of the intensity	0	0	0	0	+++	0	0	0

High, EPO high dose (5×10<sup>3</sup>/ml); Low, EPO low dose (5×10<sup>2</sup>/ml); BSA, Bovine Serum Albumin (120 mg/ml); Vehicle, Buffer of EPO; sc, subcutaneous injection; iv, intravenous injection. 0, normal; ±, mild; +, moderate; ++, severe; +++, death.

**Table 6.** Passive cutaneous anaphylaxis test in rats with sera of sensitized mic

Sensitized Antigen (0.1 ml, id)	Challenged Antigen (1 ml, iv)	No. of animal		Dilution of antisera in sensitized mice								
		Mouse	Rat	x2 <sup>0</sup>	x2 <sup>1</sup>	x2 <sup>2</sup>	x2 <sup>3</sup>	x2 <sup>4</sup>	x2 <sup>5</sup>	x2 <sup>6</sup>	x2 <sup>7</sup>	vehicle
Mouse Anti EPO (H)	EPO (H) + Evan's blue	1	1	±	-	±	±	±	-	-	±	-
		2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mouse Anti EPO (L)	EPO (L) + Evan's blue	4	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		6	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mouse Anti BSA	BSA + Evan's blue	7	7	+	+	-	-	-	-	-	-	-
		8	8	+	+	-	-	-	-	±	±	-
		9	9	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Mouse Anti Vehicle	Vehicle + Evan's blue	10	10	±	±	-	-	-	±	-	±	-
		11	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		12	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[ - ]: less than 5 mm of PCA titer. [ ± ]: approximately equal 5 mm of PCA titer. [ + ]: more 5 mm of PCA titer. H, EPO high dose ( $5 \times 10^3$ /1 ml). L, EPO low dose ( $5 \times 10^2$ /ml). BSA, Bovine Serum Albumin (120 mg/ml). EB, Evan's blue (10 mg/ml). id, intradermal injection; iv, intravenous injection.

24일째의 두번째 투여시 anaphylaxis shock로 보여지는 어떠한 증상도 나타내지 않았다.

#### 2) Passive Cutaneous Anaphylaxis (Table 6)

Anaphylaxis와 관련있는 IgE가 생성되는지를 판정하기 위해 PCA 시험을 하였다. 각 항혈청을 희석하여 피내주사하고 항원과 Evan's Blue 혼합용액을 정맥주사한 결과는 Table 3과 같다. BSA 투여군(12 mg/0.1 ml/animal)의 경우 2<sup>7</sup>배 희석배율까지 청색반점을 나타내었으나 5 mm 이상크기의 청색반점은 2배 희석배율까지만 나타내었고, EPO 고용량( $5 \times 10^3$  U/1 ml) 및 저용량( $5 \times 10^2$  U/1 ml)투여군 모두에서는 24배 희석배율까지 청색반점이 나타났으나 청색반점의 크기는 용량의 존적인 양상을 보이지 않았으며, 그 크기도 5 mm에 미치지 못했다.

### IV. 고 찰

무색투명한 성상을 띠는 액상제제인 EPO를 식품의약품안전본부 고시 제 96-8호 "의약품 등의 독성시험 기준(1996. 4. 16)"에 따라 기니픽을 이용한 Active Systemic Anaphylaxis(ASA), 마우스와 랫드를 이용한 Passive Cutaneous Anaphylaxis(PCA) 등의 시험을 통하여 안전성 평가의 일환인 면역독성시험을 실시하였다.

ASA 실험에서 EPO 고용량 투여군( $5 \times 10^3$  U/1 ml/animal)과 저용량 투여군( $5 \times 10^2$  U/1 ml/animal)에 있어서 14일과, 24일 두번의 야기실험 결과 모든개체에서 anaphylaxis와 관련된 특이적인 임상증상을 나타내지

않았으며, 마우스, 랫드를 이용한 PCA 실험에서, 고용량과 저용량으로 감작시켜 얻은 항혈청을 단계희석하여 각각 피내감작한 후 항원과 Evan's blue 혼합용액을 주입시, EPO 고용량 투여군과 저용량 투여군에서 유의한 청색반점을 관찰할 수 없었다.

이상의 결과를 종합해볼 때 EPO는 면역독성시험에서 보여지는 것처럼 특이한 IgE를 형성하지 않고 Anaphylactic shock를 유발하지 않는 것으로 사료된다.

### 참고문헌

- Buchbinder A., Adler H. and Ballard H. (1993): An unusual and unpredicted toxicity to erythropoietin. *Am. J. Hematol.* **42**: 412-413.
- Giglio M.J., Frid A., Arrizurrieta E., Barcat J., Gonzalez E. and Bozzini C.E. (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. p. 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.
- Yajima N., Kurata Y., Sawai T. and Takeshita Y. (1993): Induction of micronucleated erythrocytes by recombinant human erythropoietin. *Mutagenesis*, **8**(3): 221-229.