

## 비글개에서 인체 재조합 적혈구 조혈인자, rHuEPO의 아만성 정맥독성에 관한 연구

조명행 · 성하정 · 김형식<sup>1</sup> · 곽승준<sup>1</sup> · 천선아<sup>1</sup> · 한하수<sup>1</sup> · 임소영<sup>1</sup> · 안미영<sup>1</sup>  
김원배<sup>2</sup> · 김병문<sup>2</sup> · 안병옥<sup>2</sup> · 흥성렬<sup>3</sup> · 이병무<sup>1\*</sup>

서울대학교 수의과대학, <sup>1</sup>성균관대학교 약학대학, <sup>2</sup>동아제약(주)연구소

### Subchronic Intravenous Toxicity of Recombinant Human Erythropoietin (rHuEPO) in Beagle Dogs

Myung Haing CHO, Ha Jung SEONG, Hyung Sik KIM<sup>1</sup>, Seung Jun KWACK<sup>1</sup>,  
Sun Ah CHUN<sup>1</sup>, Ha Su HAN<sup>1</sup>, So Young LIM<sup>1</sup>, Mi Young AHN<sup>1</sup>, Won Bae KIM<sup>2</sup>,  
Byoung Moon KIM<sup>2</sup>, Byoung Ok AHN<sup>2</sup>, Sung-Youl HONG<sup>3</sup> and Byung Mu LEE<sup>1\*</sup>

College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon, Korea

<sup>1</sup>Division of Toxicology, School of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Kyunggi-Do,  
Suwon 440-746, Korea

<sup>2</sup>Dong-A Pharm. Co., LTD., 47-5, Sanggal-Ri, Kiheung-Up, Yongin-Gun,  
Kyunggi-Do, 449-900, Korea

<sup>3</sup>Department of Genetic Engineering, School of Pharmacy, Sungkyunkwan University,  
Kyunggi-Do, Suwon 440-746, Korea

(Received June 5, 1998; accepted August 26, 1998)

**Abstract** – The subchronic toxicity study of rHuEPO, a newly developed recombinant erythropoietin, was investigated for 13 weeks in Beagle dogs intravenously treated with doses of 100, 500 and 2,500 IU/kg/day. There were no significant changes in body weight, food intake, physical and ophthalmic examination, urine analysis, etc. Any toxic response was not observed except for enlarged spleen and extramedullary hematopoiesis. These results indicate that the no-observed adverse effect level (NOAEL) of rHuEPO is 100 IU/kg in Beagle dogs.

**Keywords** □ recombinant human erythropoietin, Beagle dog, NOAEL

Erythropoietin은 신장에서 생성되는 단단백질 호르몬으로서 적혈구 클론형성세포와 적아구형성세포 등에 작용함으로써 적혈구 전구세포의 분열과 분화를 촉진하는 성장인자로 말기 신질환에서의 빈혈치료, 자가수혈, 약물치료나 방사선 치료에서의 회복 등 다방면의 임상 적용 가능성 때문에 많은 주목을 받고 있다(Erslev 등, 1980; Fisher, 1993). 인체 erythropoietin은 분자량이 30.4 KD으로 적혈구 원적세포인 erythroid burst-forming units(BFU-E)와 erythroid colony-forming units(CFU-E)의 분화와 증식을 촉진한다(Davis 등, 1987). 최근 일본, 미국 등의 선진국에서는 신부전뿐만 아니라 azidothymidine이나 HIV와 관련된 빈혈 등

의 임상적 치료에 recombinant human erythropoietin이 적용되고 있다(Winearls, 1988; Evans 등, 1990; Mino 등, 1990). 국내에서도 유전자 제조합 기술을 이용하여 erythropoietin을 대량생산할 수 있으며 이에 대한 독성시험도 보고되고 있다(Kim 등, 1994; Lim 등, 1994).

본 실험에서는 동아제약에서 제조한 recombinant human erythropoietin (rHuEPO)에 대하여 비글개에서 정맥내 13주간 연속투여 아만성 독성시험을 실시하였다.

#### 실험방법

#### 시험물질

시험물질인 rHuEPO(10,000 IU/ml) 및 rHuEPO 회색용완

\* To whom correspondence should be addressed.

총액은 무색, 무취의 액체로 동아제약(주)으로부터 공급받 은후 즉시 -20°C에서 보관하였다.

### 실험동물

6개월령의 비글개(Harlan Sprague-Dawley Laboratories, USA)를 해운무역(주)으로부터 암수 각각 12마리를 구입하여 1주간 순화 사육한 후 평균체중에 가까운 개체를 무작위법을 이용하여 군분리를 실시하였다. 실험기간중 사육실 환경 조건은 실내온도  $20\pm 3^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $50\pm 10\%$ , 환기회수 10~12회/hr으로 하였으며, timer를 이용하여 12시간 씩 명암을 주기적으로 교환하였고, 조도는 150~300 Lux로 하였다. 모든 동물은 철망케이지( $60\times 40\times 45\text{ cm}$ , 명진)에서 사육하면서 애완견용 고형사료(제로니, 제일제당)와 상수도를 자유급여하였다.

### 시험군의 구성, 투여농도 및 용량

시험군은 3개의 용량군과 용매대조군을 설정하였다. 시험물질은 rHuEPO 회석용 원총액으로 용시조제하여 사용하였다. 용량설정은 비글개에 대한 급성정맥투여 독성시험결과 25,000 IU/kg에서도 사망에 및 임상증상 등에서 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았으며 또한 30일간 연속 정맥투여 독성시험에서도 2,500 IU/kg 투여에 의해서 최중변화, 사료섭취량 및 일반증상 등에 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았다(Cho 등, 1996a; Cho 등, 1996b). 따라서 본 시험에서 고용량군을 2,500 IU/kg으로 설정하고 공비 5로 각각, 500 IU/kg 및 100 IU/kg을 중용량군과 저용량군으로 설정하였다. 시험물질은 임상투여경로와 동일한 정맥내로 하기위해 비글개의 요측피정맥을 통해 1일 1회 13주간 정맥내투여(투여속도는 10 ml/분)하였다. 대조군은 시험물질 투여군과 동일한 용량의 rHuEPO 회석용 원총액을 투여하였다.

### 관찰항목

#### 일반증상

투여개시전과 1회투여후 4시간까지는 연속하여, 그 이하는 2시간 간격으로 투여후 24시간까지 관찰하고, 2회 투여시부터 1일 1회, 13주간 관찰하였다. 임상증상으로 식욕부진, 유연, 설사, 구토, 다뇨, 무뇨 및 변상태의 이상 유무를 관찰하였다.

#### 사료섭취량 및 음수량 측정

사육상자별로 급식 및 급수 총량과 잔량을 시험개시 후 주 3회씩 측정하여 그 차를 사료섭취 및 음수량으로 하였다.

#### 체중측정

모든 동물에 대하여 투여개시일로부터 1개월까지는 매주 2회이상 그리고 이후 13주까지는 매주 1회씩 측정하였다.

#### 안과학적 검사

실험시작 전과 실험기간 중 매주 1회씩 transilluminator를 이용한 동공반사의 유무 및 간접검안경을 이용한 안저검사를 실시하였다. 안저검사에서는 망막 혈관의 출혈유무, 과립의 균질화 그리고 시신경 유두의 상태를 관찰하였다.

### 혈액학적 및 혈청생화학적 검사

일반 혈액학적검사는 실험 시작전과 최종 부검시에 적혈구수(RBC), 총백혈구수(WBC), 헤모글로빈(hemoglobin), 헤마토크리트(hematocrit), 평균적혈구 용적(MCV), 평균적 혈구색소량(MCH), 평균적혈구색소농도(MCHC), 혈소판(platelet) 등을 검사하였다. 혈청생화학적검사는 채취한 혈액의 일부를 실온에 30분간 방치하여 응고후 원심분리(3,000 rpm, 30 min)하여 얻은 혈청에 대해서 총단백(total protein), albumin, 혈액뇨소질소(BUN), creatinine, bilirubin, aspartate transaminase(AST), alanine transaminase(ALT), alkaline phosphatase(ALP), 콜레스테롤(cholesterol), potassium, chloride, phosphorus, calcium 및 A/G ratio, 혈당(blood glucose) 등을 각각 검사하였다.

### 혈액응고인자 기능검사

실험 시작전과 최종 부검시 sodium citrate로 항응고처리한 혈액으로 프로트롬빈 시간(prothrombin time)과 활성화부분 트롬보플라스틴 시간(activated partial thromboplastin time) 등을 검사하였다.

### 장기 줄량

전 시험동물에 대하여 간장, 심장, 비장, 췌장, 신장, 부신, 뇌, 뇌하수체, 갑상선, 악하선, 자궁, 전립선, 난소, 고환, 흉선, 폐장 등의 중량을 측정하여 체중에 대한 상대중량을 구하였다.

### 뇨검사

모든 동물에 대하여 투여개시시와 시험종료 전일에 채뇨한 후, 외관과 색을 관찰한 다음, 즉시 뇌검사지(Combur Test, Boehringer Manheim, Germany)를 사용하여 pH, leukocyte, 단백(protein), ketone, bilirubin, 비중, 포도당(glucose), 침혈(blood) 및 침사 등을 측정하였다.

### 병리조직검사

모든 시험동물에 대하여 간장, 심장, 비장, 췌장, 신장, 부신, 뇌, 뇌하수체, 갑상선, 악하선, 자궁, 전립선, 난소, 정소, 흉선, 폐장의 일부를 10% 완충포르말린에 충분히 고정시켰다. 그중 4개월 정맥내 연속투여독성시험결과 및 육안적 부검소견에 의해 이상이 있는 장기에 대하여 다음과 같은 통상적인 절차에 의하여 자동조직처리기로 조직을 처리한 후 파라핀에 포매하였다. 파라핀 포매조직을 5  $\mu\text{m}$ 의 두께로 절편한 다음 hematoxylin & eosin(H&E) 염색을 실시하여 광학 현미경 하에서 관찰하였다.

### 통계학적 방법

체중, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사 및 장기중량 검사치의 통계학적 분석은 통계처리 computer program인 SAS(statistical analysis system)을 이용하여, 모수 자료의 경우는 ANOVA 분산분석을 실시하여 유의한 F값이 판찰되는 항목에 대하여 Duncan test를 실시하였으며 비모수자료의 경우는 non-parametric one way Kruskal-Wallis test를 실

시하여 유의한 H값이 관찰되는 항목에 대하여 distribution-free multiple comparison을 실시하였다.

## 실험결과

rHu-EPO의 비글개에 대한 아급성독성시험은 국립보건 안전연구원 고시 제 94-3호 '의약품 등의 독성시험기준' (National Institute of Safety Research, 1994)에 따라 2,500 IU/kg을 고용량으로 하고 공비 5로 하여 중간용량을 500 IU/kg, 저용량을 100 IU/kg로 하여 1일 1회, 13주간 정맥내로 연속투여하였다. 그 결과는 다음과 같다.

### 입상증상 및 폐사율

시험기간중 사망에는 수컷의 중용량군에서 11주째에, 암컷의 고용량군에서 9주째에 각각 한 마리씩 발견되었다. 수컷 중용량군의 사망에는 사망 6주전에 좌후지의 부종증상을 보였고 그후 간헐적인 식욕부진이 있었다. 사망 3일 전부터 갑작스런 사지마비와 한쪽으로의 선회증상을 보였다. 암컷 고용량군의 사망에는 사망 1주전부터 식욕부진 증상을 보였다. 사망동물을 즉시 부검하여 내부장기의 육안

적 이상소견을 관찰하였다. 그 결과 시험물질에 의한 직접적인 사망원인으로 인정되지 않았다. 다만 투여부위의 피부에서 표피 각질화 및 염증반응을 유발한 것으로 볼 때 특별잘못에 의한 사망원인으로 판정되었다. 고용량군에서 숫컷 한 마리가 시험개시 9주와 10주째에 걸쳐 식욕부진과 우측 후지 부종증상을 보였으나 그 후 정상으로 회복되었다. 그외의 군에서는 사망예를 제외하고는 특이한 임상증상을 관찰할 수 없었다(Table I, II).

### 체중변화

시험물질 투여군과 용매대조군간에 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다(Fig. 1, 2).

### 사료섭취 및 음수량 변화

상기한 사망예 및 일부 고용량군에서 단발성의 간헐적인 사료섭취량의 저하가 관찰되었으나 타군에서는 특이한 변화가 관찰되지 않았다. 전반적인 사료섭취 및 음수량의 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 3, 4).

### 안과학적 검사소견

대조군과 투여군 모두에서 안저의 이상소견을 발견할 수 없었다.

**Table I.** Mortality of Beagle dogs intravenously treated with rHuEPO for 13 weeks

Sex	Dosage (IU/kg)	Weeks													Final Mortality	
		Start	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
Male	CON <sup>a</sup>	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	100	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	500	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/2	0/2	1/3
	2,500	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Female	CON	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	100	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	500	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	2,500	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/2	0/2	1/3

<sup>a</sup>CON : Treated with rHuEPO dilution buffer.

**Table II.** Clinical signs of Beagle dogs treated intravenously with rHuEPO for 13 weeks

Sex	Dosage (U/kg)	Animal numbers with clinical sign (Hours)													(Weeks)			
		2	4	8	16	24	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Male	CON <sup>a</sup>	0/3 <sup>b</sup>	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	100	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	500	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3 <sup>c</sup>	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	0/2	0/2	0/2	0/2
	2,500	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Female	CON	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	100	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	500	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	2,500	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3 <sup>c</sup>	0/2	0/2	0/2	0/2

<sup>a</sup>CON : Treated with rHuEPO dilution buffer. <sup>b</sup>0/3 : No clinical signs were observed in 3 animals treated with rHuEPO.

<sup>c</sup>1/3 : Food consumption was reduced.

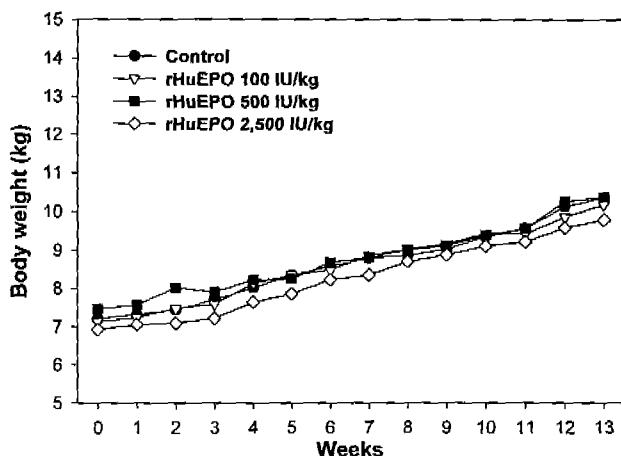


Fig. 1. Body weight changes of male Beagle dogs intravenously treated with rHuEPO for 13 weeks.

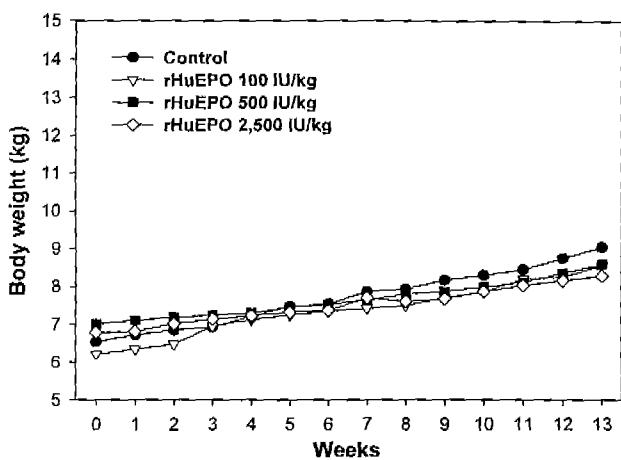


Fig. 2. Body weight changes of female Beagle dogs intravenously treated with rHuEPO for 13 weeks.

#### 혈액학적 검사소견

적혈구수는 수컷의 중용량군과 고용량군에서 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였으나 암컷은 저용량군과 중용량군에서 유의성 있게 증가하였다. 또한 암컷의 고용량군에서는 투여전과 비교하여 오히려 감소하였다. 혈소판과 lymphocytes는 수컷의 고용량군에서 투여전과 비교하여 각각 유의성 있게 증가하였다. 반면에 eosinophil은 암컷의 모든 시험군에서 투여전과 비교하여 투여후에 유의성 있게 증가하였으나 각군간의 유의성 있는 차이는 없었다. 혜마토크리트치와 혜모글로빈치는 암컷의 고용량군에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다. 또한 MCH는 암컷의 고용량군에서만 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(Table III, IV). 혈액응고인자의 기능검사인 PT와 PTT치는 대조군에 비하여 투여군에서 유의할만한 변화를 나타내지 않았다.

#### 혈청생화학 검사소견

간기능에 관계되는 AST, ALT, ALP, total bilirubin 및 al-

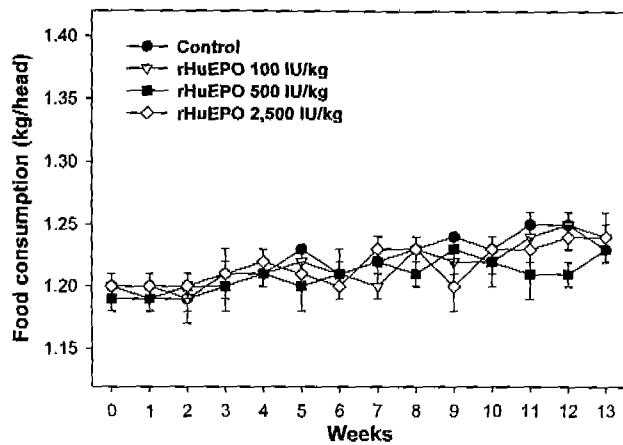


Fig. 3. Food consumption of male Beagle dogs intravenously treated with rHuEPO for 13 weeks.

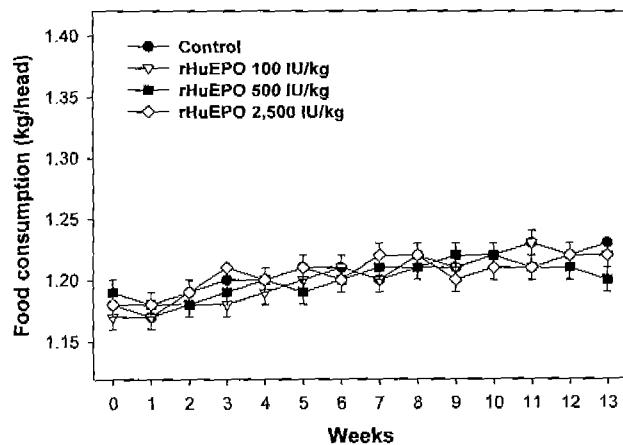


Fig. 4. Food consumption of female Beagle dogs intravenously treated with rHuEPO for 13 weeks.

bumin치는 시험물질투여군과 대조군사이에 모두 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다. 또한 신장기능에 관계되는 BUN과 creatinine치는 시험물질 투여전과 비교하여 증가하는 경향을 나타냈으나 유의성 있는 차이를 나타내지는 않았다(Table V, VI).

#### 각 장기의 중량 및 체중에 대한 상대중량

각 장기의 중량은 수컷의 저용량군과 고용량군에서 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었으며 고환무게는 중용량군에서만 유의성 있게 증가하였다. 암컷의 경우는 갑상선의 무게가 중용량군에서 유의성 있게 감소하였다. 각 장기의 체중에 대한 상대중량은 수컷에서 간장의 체중에 대한 상대중량은 중간용량군에서 암, 수 모두 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었다. 또한 고환은 중용량군과 고용량군에서 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다. 그외의 다른 장기에서는 투여군과 대조군사이에 유의성 있는 차이가

Table III. Hematological values of male Beagle dogs before and after intravenous treatment with rHuEPO for 13 weeks

Parameter\Group	CON <sup>a</sup>		100 IU/kg		500 IU/kg		2,500 IU/kg	
	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
WBC ( $10^3/\mu\text{l}$ )	21.73±5.05	16.77±2.34	16.80±2.26	17.10±4.00	17.50±3.47	17.50±1.98	17.20±1.61	17.33±0.76
Platelet ( $10^3/\mu\text{l}$ )	438.00±40.04	317.33±84.63	420.6±86.08	317.67±164.38	415.67±144.9	251.50±41.72	469.00±103.6	289.00*±118.82
Diff. count Segment (%)	51.33±2.89	37.00±15.39	55.33±16.29	54.33±14.98	56.33±7.51	52.00±2.83	55.33±7.23	31.33±3.21
Lymphocyte (%)	38.00±12.49	57.00±13.00	38.00±12.17	38.33±14.57	30.33±17.21	41.00±4.24	37.00±4.36	62.33*±6.35
Monocyte (%)	1.33±1.15	1.00±1.00	0.33±.58	1.33±2.31	1.67±2.08	2.50±0.71	1.33±1.15	1.00±1.73
Eosinophil (%)	5.67±6.35	5.00±3.61	3.00±3.61	4.33±3.51	9.67±8.02	3.50±0.71	3.67±0.58	5.00±1.00
Hemoglobin (g/dl)	15.80±0.26	17.97±1.07	16.10±0.89	15.10±8.85	15.40±0.72	15.50±7.92	15.17±0.64	15.97±6.21
Hematocrit (%)	44.07±1.47	53.50±3.57	44.97±3.25	44.47±23.45	43.00±2.14	45.25±21.28	42.33±1.97	47.30±16.66
RBC ( $10^6/\mu\text{l}$ )	6.82±0.23	7.78±0.45	6.84±0.54	7.11±3.69	6.36±0.37	8.30*±3.94	6.41±0.29	8.65*±3.18
MCV (fl)	64.60±0.10	68.67±2.12	65.73±0.81	62.33±2.54	67.60±1.15	66.50±2.40	66.43±1.36	68.20±4.26
MCH (pg)	23.20±0.53	23.13±0.32	23.57±0.93	20.90±1.59	24.23±0.38	18.45±0.78	23.67±0.59	18.33±1.79
MCHC (%)	35.87±0.83	33.67±0.49	35.83±0.95	33.57±2.74	35.83±0.15	33.80±1.70	35.83±0.15	33.30±1.92
Prothrombin Time (sec)	6.53±0.42	8.57±0.06	7.53±2.05	6.30±0.28	6.27±0.06	6.25±0.21	6.50±0.20	8.27±1.46
Activated PTT (sec)	9.53±1.27	14.70±2.12	12.83±5.61	9.35±0.64	11.97±0.87	11.15±0.21	11.87±0.71	14.51±5.09

<sup>a</sup>CON : Treated with rHuEPO dilution buffer. Value represents mean±SD. Statistically different from control (\*P<0.05).

Table IV. Hematological values of female Beagle dogs before and after intravenous treatment with rHuEPO for 13 weeks

Parameter\Group	CON <sup>a</sup>		100 IU/kg		500 IU/kg		2,500 IU/kg	
	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
WBC ( $10^3/\mu\text{l}$ )	18.13±6.19	12.20±0.28	19.00±1.40	14.93±1.63	15.30±1.65	13.33±0.76	18.07±4.49	18.80±1.13
Platelet ( $10^3/\mu\text{l}$ )	468.00±153.3	281.00±264.46	390.67±85.33	364.67±50.21	497.33±131.1	394.33±141.20	463.67±80.38	349.50±207.18
Diff. count Segment (%)	61.67±14.43	52.00±2.83	62.00±11.14	65.67±9.29	58.67±13.32	66.00±7.94	65.67±11.50	53.00±9.90
Lymphocyte (%)	30.67±11.72	41.00±1.41	33.33±11.02	26.33±10.26	36.33±14.15	28.67±6.66	28.33±9.07	38.50±10.61
Monocyte (%)	3.00±2.65	1.00±0.00	1.33±1.15	2.33±1.53	0.67±1.15	0.33±0.58	2.67±3.06	2.00±1.41
Eosinophil (%)	1.33±1.15	5.50*±0.71	1.33±2.31	5.00*±1.00	2.00±2.00	4.67*±1.15	2.33±1.53	6.50*±0.71
Basophil (%)	15.93±1.60	16.60±2.12	15.97±1.06	18.54±6.17	15.30±1.31	19.30±8.75	16.13±1.52	9.15±0.21
Hemoglobin (g/dl)	44.30±4.20	45.85±1.63	44.10±1.82	53.13±15.89	42.27±4.51	55.37±24.05	45.07±3.85	28.65±0.49
RBC ( $10^6/\mu\text{l}$ )	6.81±0.79	6.79±0.39	6.70±0.37	8.51±2.77	6.32±0.71	9.33±3.99	6.92±0.56	5.11±1.41
MCV (fl)	65.10±1.40	67.55±1.48	65.80±0.95	62.57±2.57	66.97±0.60	66.97±1.44	65.17±1.00	56.05±1.06
MCH (pg)	23.40±0.44	24.45±1.63	23.83±0.90	21.70±0.56	24.30±0.98	20.33±1.69	23.33±0.49	17.95±0.35
MCHC (%)	35.97±0.23	36.20±3.25	35.40±0.42	34.63±1.12	36.23±1.12	34.60±1.01	35.80±0.30	32.00±1.27
Prothrombin Time (sec)	6.57±0.67	6.40±0.36	6.27±0.12	6.40±0.00	6.33±0.38	8.20±2.55	6.73±0.29	6.50±0.28
Activated PTT (sec)	12.37±0.93	12.30±1.47	13.70±1.44	10.15±1.77	13.07±1.19	19.45±11.53	12.23±0.06	11.15±0.92

<sup>a</sup>CON : Treated with rHuEPO dilution buffer. Value represents mean±SD. Statistically different from control (\*P<0.05).

**Table V.** Serum biochemical values of male Beagle dogs before and after intravenous treatment with rHuEPO for 13 weeks

Parameter/Group	CON <sup>a</sup>		100 IU/kg		500 IU/kg		2,500 IU/kg	
	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
Total Protein (g/dl)	5.17±0.12	5.87±0.31	4.97±0.45	5.20±0.40	5.47±0.12	5.45±0.49	5.37±0.15	6.17±0.85
Albumin (g/dl)	3.20±0.20	3.70±0.30	3.00±0.26	3.13±0.06	3.23±0.06	3.25±0.35	3.17±0.25	3.73±0.67
BUN (mg/dl)	21.67±1.53	30.00±6.08	20.67±3.51	26.33±4.93	16.33±3.06	22.50±3.54	18.67±0.58	22.00±5.00
Creatinine (mg/dl)	0.67±0.06	1.03±0.15	0.73±0.06	0.90±0.10	0.73±0.15	0.85±0.07	0.63±0.12	0.90±0.10
Total Bilirubin (mg/dl)	0.33±0.06	0.47±0.12	0.30±0.00	0.20±0.10	0.20±0.00	0.70±0.85	0.23±0.06	1.50±1.25
AST (IU/l)	40.00±9.00	32.67±11.85	35.67±5.51	22.33±3.51	31.33±6.03	22.00±5.66	30.67±0.58	36.00±2.65
ALT (IU/l)	23.00±2.65	32.00±8.72	22.33±8.02	29.33±3.06	28.00±2.65	33.00±1.41	27.33±4.93	32.33±9.29
ALP (IU/l)	233.00±44.98	172.67±17.56	216.00±56.03	168.00±14.11	193.67±36.36	149.00±28.28	209.67±56.01	131.00±18.33
Cholesterol (IU/l)	247.67±55.77	178.00±49.49	203.67±7.37	144.67±30.66	246.67±4.93	161.00±35.36	233.67±25.72	160.00±19.08
Potassium (mEq/l)	5.27±0.29	5.20±0.66	5.20±0.36	4.97±0.29	4.83±0.31	4.95±0.07	4.83±0.12	4.93±0.12
Chloride (mEq/l)	105.00±1.00	111.00±3.00	107.00±1.00	110.33±2.52	106.33±1.53	110.50±2.12	105.67±1.15	108.67±0.58
Phosphorus (mg/dl)	6.53±0.93	7.73±1.75	6.37±0.38	7.00±0.75	6.70±0.46	7.25±0.35	6.97±0.60	7.93±1.79
Calcium (mg/dl)	10.83±0.21	11.47±0.29	10.57±0.45	10.33±0.15	10.80±0.26	10.35±0.64	10.53±0.06	10.67±0.12
A/G ratio	1.63±0.21	1.70±0.17	1.53±0.06	1.53±0.31	1.47±0.06	1.45±0.07	1.47±0.15	1.53±0.15
Glucose (mg/dl)	63.22±8.15	78.55±9.18	72.13±8.82	62.13±6.67	79.31±5.47	55.47±9.24	84.15±15.39	63.25±13.68

<sup>a</sup>CON : Treated with rHuEPO dilution buffer. Value represents mean±S.D.

**Table VI.** Serum biochemical values of female Beagle dogs before and after intravenous treatment with rHuEPO for 13 weeks

Parameter/Group	CON <sup>a</sup>		100 IU/kg		500 IU/kg		2,500 IU/kg	
	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
Total Protein (g/dl)	5.53±0.15	5.77±0.12	5.20±0.52	5.70±0.44	5.43±0.15	5.77±1.50	5.33±0.21	5.25±0.35
Albumin (g/dl)	3.40±0.17	3.47±0.25	3.13±0.31	3.57±0.38	3.23±0.12	3.60±0.87	3.27±0.12	3.20±0.14
BUN (mg/dl)	18.90±3.00	26.00±0.00	15.67±1.15	21.33±4.04	16.00±2.65	28.67±5.51	15.00±1.00	23.50±0.71
Creatinine (mg/dl)	0.73±0.06	0.77±0.15	0.70±0.10	0.83±0.15	0.67±0.12	0.90±0.00	0.77±0.21	0.95±0.21
Total Bilirubin (mg/dl)	0.20±0.10	0.30±0.10	0.17±0.06	0.27±0.90	0.30±0.26	0.23±1.71	0.20±0.17	0.30±0.00
AST (IU/l)	31.33±4.51	20.67±4.16	31.00±10.15	30.67±8.50	33.67±4.62	39.33±28.36	34.00±11.27	33.50±12.02
ALT (IU/l)	32.00±3.61	26.00±5.29	40.00±21.28	42.67±19.01	26.33±10.50	26.67±4.16	24.33±3.51	29.50±0.71
ALP (IU/l)	163.33±18.58	117.67±19.04	213.00±86.63	196.00±82.02	205.33±10.26	145.33±15.63	180.00±13.00	132.50±16.26
Cholesterol (IU/l)	228.67±17.16	174.33±28.15	181.33±62.07	135.00±26.06	231.67±13.61	164.33±70.44	223.33±58.01	139.50±27.58
Potassium (mEq/l)	4.93±0.32	4.93±0.25	4.87±0.25	5.37±0.57	4.97±0.74	5.27±0.15	5.67±2.08	4.90±0.28
Chloride (mEq/l)	108.67±0.58	111.33±2.08	105.33±2.08	109.33±0.58	111.00±1.73	105.00±2.00	111.50±2.12	111.50±2.83
Phosphorus (mg/dl)	6.43±0.45	7.57±2.50	6.60±0.10	8.20±2.57	7.13±0.23	8.60±1.04	6.10±0.89	7.40±2.83

<sup>a</sup>CON : Treated with rHuEPO dilution buffer. Value represents mean±S.D.

**Table VII.** Absolute organ weights of male Beagle dogs intravenously treated with rHuEPO for 13 weeks Unit (g)

Parameter\Group	CON <sup>a</sup>	100 IU/kg	500 IU/kg	2,500 IU/kg
Heart	70.20±3.55	79.39±7.27	89.57±24.14	74.63±15.91
Liver	230.51±9.99	271.57±23.15	294.20±12.45	266.33±42.34
Spleen	28.74±1.50	15.07±12.80	27.70±7.80	27.82±11.88
Adrenal gland	1.17±0.13	1.92±0.32	1.36±0.22	1.30±0.27
Prostate	1.64±0.22	2.48±0.91*	3.92±3.29*	2.91±1.50
Testis	16.85±2.29	14.35±6.54	21.68±5.94*	20.97±5.71
Brain	74.50±3.86	80.72±8.67	90.49±5.41	74.17±4.74
Pituitary gland	0.04±0.01	0.04±0.01	0.05±0.01	0.05±0.02
Lung	84.22±5.99	103.38±31.45	85.79±6.24	122.15±29.70
Salivary gland	10.97±1.65	10.53±2.04	9.82±2.00	11.39±1.83
Thymus	15.34±2.40	17.15±1.94	17.33±4.89	17.99±4.77
Thyroid gland	0.93±0.09	0.92±0.18	0.69±0.04	0.96±0.31
Kidney	44.71±5.44	44.76±6.53	54.55±4.77	55.91±6.07
Pancreas	29.83±3.35	29.32±5.00	36.56±1.12	37.41±4.46

<sup>a</sup>CON : Treated with rHuEPO dilution buffer. Value represents mean±S.D. Statistically different from control (\*P<0.05).

**Table VIII.** Absolute organ weights of female Beagle dogs intravenously treated with rHuEPO for 13 weeks Unit : (g)

Parameter\Group	CON <sup>a</sup>	100 IU/kg	500 IU/kg	2,500 IU/kg
Heart	71.33±5.62	68.99±4.05	65.19±8.48	76.95±3.03
Liver	259.48±9.32	217.33±21.94	263.37±90.74	226.67±20.23
Spleen	31.63±5.08	28.24±2.10	29.21±7.45	32.05±3.38
Adrenal gland	1.04±0.10	1.17±0.30	1.17±0.36	1.05±0.13
Ovary	0.68±0.02	0.72±0.09	0.76±0.48	0.78±0.13
Brain	69.81±2.33	80.17±16.21	69.72±3.74	75.72±2.55
Pituitary gland	0.03±0.01	0.04±0.01	0.05±0.01	0.05±0.02
Lung	78.22±7.31	69.28±7.10	82.04±14.83	72.59±4.32
Salivary gland	8.38±1.65	10.05±0.92	9.65±1.42	9.95±0.05
Thymus	14.15±1.12	17.28±3.84	16.37±6.46	15.86±0.61
Thyroid gland	0.94±0.09	0.74±0.16	0.57±0.28*	0.78±0.07
Uterus	1.63±0.15	1.44±0.22	1.52±0.58	1.64±0.32
Kidney	42.11±4.60	39.86±4.51	49.66±4.76	42.72±8.07

<sup>a</sup>CON : Treated with rHuEPO dilution buffer. Value represents mean±S.D. Statistically different from control (\*P<0.05).

**Table IX.** Relative organ weights of male Beagle dogs intravenously treated with rHuEPO for 13 weeks

Parameter\Group	CON <sup>a</sup>	100 IU/kg	500 IU/kg	2,500 IU/kg
Body Weight (kg)	11.47±0.49	10.83±1.80	10.80±1.27	10.46±0.85
Heart (g%)	0.641±0.034	0.739±0.066	0.822±0.127	0.711±0.132
Liver (g%)	2.120±0.021	2.530±0.289	2.750±0.439*	2.540±0.076
Spleen (g%)	0.272±0.016	0.211±0.039	0.254±0.042	0.261±0.001
Adrenal gland (g%)	0.009±0.000	0.012±0.002	0.012±0.000	0.012±0.001
Prostate (g%)	0.014±0.001	0.022±0.008	0.034±0.026	0.026±0.011
Testis (g%)	0.124±0.001	0.129±0.043	0.199±0.031*	0.199±0.033*
Brain (g%)	0.675±0.012	0.750±0.043	0.847±0.150	0.722±0.139
Pituitary gland (mg%)	0.430±0.070	0.360±0.060	0.420±0.110	0.440±0.130
Lung (g%)	0.753±0.014	0.983±0.401	0.796±0.036	0.790±0.338
Salivary gland (g%)	0.108±0.007	0.096±0.002	0.090±0.007	0.112±0.033
Thymus (g%)	0.137±0.005	0.160±0.002	0.159±0.026	0.170±0.143*
Thyroid gland (g%)	0.008±0.000	0.008±0.001	0.006±0.001	0.009±0.001
Kidney (g%)	0.396±0.014	0.414±0.012	0.406±0.015	0.442±0.106
Pancreas (g%)	0.306±0.021	0.277±0.078	0.341±0.050	0.359±0.032

<sup>a</sup>CON : Treated with rHuEPO dilution buffer. Value represents mean±S.D. Statistically different from control (\*P<0.05).

없었다(Table VIII-X).

### 뇨검사 소견

대조군과 투여군 모두에서 이상을 발견할 수 없었다  
(Table XI).

**Table X.** Relative organ weights of female Beagle dogs intravenously treated with rHuEPO for 13 weeks

Parameter\Group	CON <sup>a</sup>	100 IU/kg	500 IU/kg	2,500 IU/kg
Body Weight (kg)	9.36±0.133	10.03±1.96	8.26±1.09	10.00±15.55
Heart (g%)	0.714±0.059	0.692±0.068	0.789±0.015	0.761±0.105
Liver (g%)	2.700±0.111	2.180±0.303	3.160±0.861*	2.180±0.324
Spleen (g%)	0.201±0.035	0.184±0.035	0.296±0.091	0.203±0.016
Adrenal gland (g%)	0.010±0.008	0.011±0.002	0.014±0.005	0.010±0.003
Ovary (g%)	0.007±0.000	0.007±0.001	0.008±0.005	0.007±0.001
Brain (g%)	0.730±0.076	0.797±0.108	0.851±0.086	0.762±0.082
Pituitary gland (mg%)	0.370±0.001	0.370±0.001	0.560±0.110	0.048±0.020
Lung (g%)	0.789±0.065	0.693±0.057	0.797±0.158	0.722±0.159
Salivary gland (g%)	0.075±0.010	0.101±0.009	0.120±0.034	0.100±0.015
Thymus (g%)	0.142±0.008	0.175±0.050	0.120±0.067	0.128±0.019
Thyroid gland (g%)	0.008±0.000	0.007±0.001	0.006±0.002	0.070±0.000
Uterus (g%)	0.019±0.001	0.014±0.002	0.017±0.007	0.018±0.006
Kidney (g%)	0.395±0.007	0.397±0.009	0.376±0.096	0.390±0.009
Pancreas (g%)	0.311±0.025	0.354±0.053	0.346±0.021	0.327±0.084

\*CON : Treated with rHuEPO dilution buffer. Value represents mean±S.D. Statistically different from control (\*P<0.05).

**Table XI.** Urinalysis of Beagle dogs intravenously treated with rHuEPO for 13 weeks

Parameter	Groups	Male			Female				
		CON <sup>a</sup>	100 IU/kg	500 IU/kg	2,500 IU/kg	CON <sup>a</sup>	100 IU/kg	500 IU/kg	2,500 IU/kg
Leukocyte	-	-	-	#	-	-	-	-	-
pH	6.5	6.5	6.5	5.9	6.5	6.5	6.2	6.5	
	6	6	#	8	7	6	6	6.5	
	6	6	6.5	6	7	6	6	6.5	
Protein	2+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	#	3+	+	-	+	+	+
	2+	3+	+	+	+	+	+	+	-
Glucose (mg/dl)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	#	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ketone body	-	-	#	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Bilirubin	-	-	#	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Erythrocyte	-	-	#	-	-	-	-	-	-
	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Gravity	1.020	1.025	1.050	1.050	1.025	1.025	1.020	#	
	1.020	1.035	#	1.020	1.020	1.030	1.020	1.030	
	1.035	1.030	1.040	1.025	1.030	1.030	1.035	1.030	
Precipitation	-	-	#	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\*CON : Treated with rHuEPO dilution buffer. +: Slight, -: no detection. #: Dead.

Table XII. Histopathological findings in Beagle dogs intravenously treated with rHuEPO for 13 weeks

Sex	Male				Female			
	Dosage (IU/kg)	CON <sup>a</sup>	100	500	2,500	CON	100	500
<b>Kidney</b>								
Chronic nephritis	0	0	0	0	0	0	0	0
Pyelonephritis	0	0	0	0	0	0	0	0
Calcification in renal tubuli	0	0	1 <sup>b</sup>	1	0	0	0	1
Pyelitis	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Liver</b>								
Vasculitis	0	0	0	0	0	0	0	0
Necrosis	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Lung</b>								
Pneumonia	0	0	0	0	0	1	0	0
Foamy cells	0	0	0	1	0	0	0	1
<b>Spleen</b>								
Hemosiderosis	0	1	1	3	0	1	3	2
Extramedullary hematopoiesis	0	2	2	3	0	2	3	2
<b>Testis</b>								
Stomach	0	0	0	0	0	0	0	0
Pancreas	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Thymus</b>								
Agonal hemorrhage	0	0	0	0	0	0	0	0
Lymphocytic necrosis	0	0	0	0	0	0	0	0

<sup>a</sup>CON : Treated with rHuEPO dilution buffer. <sup>b</sup>No. of animals.

### 병리조직검사 소견

특징적인 병리조직학적 변화는 비장에서만 관찰되었으며, 기타 다른 장기에서는 용매대조군과 비교해볼 때 약물 투여와 직접 관련된 변화는 관찰할 수 없었다. 비장은 대조군에 비해 저용량, 중용량군 및 고용량군에 있어서 적수 (red pulp)에 미만성의 거핵구(megakaryocyte)와 적아구 (erythroblast)가 현저하게 증가된 것을 관찰할 수 있었다. 특히 중용량군에서의 거핵구 및 적아구의 수가 고용량군보다 증가된 경향을 보였다. 또한 모든 투여군의 비장에서 거핵구와 적아구가 중심이 되어 골수외 조혈이 현저하게 나타남을 알 수 있었다. 그러나 고용량군이 중용량군보다 거핵구 및 적아구의 수가 줄어드는 경향을 보였다. 같은 용량으로 4주간 실시한 아급성 독성시험에서 중용량군과 고용량군에서는 거핵구와 적아구가 현저하게 증가된 것이 관찰되었으나 저용량군은 대조군과 유사하였다. 그러나 본 실험에서는 중용량군이 고용량군보다 골수외 조혈이 항진된 것을 관찰할 수 있었다(Table XII).

### 고 졸

Erythropoietin은 조혈기능에 영향을 주는 여러 요인들 중 하나로 말기 신질환자의 빈혈치료 및 자기수혈, 약물치료나 방사선 치료에서의 회복 등 다방면에서 조혈장애의 치

료제로 주목되고 있다. Erythropoietin은 주로 후기 적아구계 전구세포의 분화단계의 세포에 작용, 분화와 증식을 촉진시켜, 적혈구 생산을 조절하는 내인성 호르몬으로 신장의 renal peritubular cell에서 생산된다. 따라서, erythropoietin의 생산 저하는 만성 신부전증에 수반되는 빈혈의 주원인이라 생각되고 있으며 심각한 조혈장애를 유발한다. 또한 erythropoietin의 임상적 적용에 관해 많은 관심이 모아지고 있으며 최근에는 신부전 뿐 아니라 다른 질환과 관련된 빈혈 등의 임상적 치료에 recombinant erythropoietin의 적용이 다각도로 주목되고 있다(Sevitt, 1973; Okumura 등, 1990; Holley 등, 1992; Kokot 등, 1994; Cascinu 등, 1995).

시험기간중 사망예는 수컷의 중용량군에서 11주째에, 암컷의 고용량군에서 9주째에 각각 한 마리씩 발견되었다. 수컷 중용량군의 사망예는 사망 6주전에 좌후지의 부종곤란 증상을 보였고 그후 간헐적인 식욕부진이 있었다. 사망 3일 전부터 갑작스런 사지마비와 한쪽으로의 선화증상을 보였다. 암컷 고용량군의 사망예는 사망 1주전부터 식욕부진 증상을 보였다. 이를 동물은 사망후 즉시 부검하여 내부장기 및 기타 이상소견을 관찰한 결과 약물에 의한 직접적인 영향으로는 판정되지 않았다.

적혈구수는 저용량군과 중용량군에서 성별에 관계없이 투여전에 비해 증가하는 경향을 보였다. 그러나 고용량군

의 수컷에서는 증가하는 경향을 보였으나 암컷에서는 오히려 저하되었다. 헤마토크리트치와 혈모글로빈치도 역시 암컷의 고용량군에서 대조군보다 모두 감소하는 경향을 보였다. 총백혈구수와 감별계산 및 혈소판수는 투여전후의 차 이를 발견할 수 없었다. 이와 같은 결과는 30일간 개에 rHuEPO를 투여한 Cho 등(1996)의 결과와 일치하였다.

각 장기의 체중에 대한 절대증량은 변화가 없었으나 간장의 체중에 대한 상대증량은 중간용량군에서 암, 수 모두 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었다. 그외의 다른 장기에서는 투여군과 대조군사이에 유의성 있는 차이가 없었다. 특징적인 병리조직학적 변화는 비장에서만 관찰되었으며, 기타 다른 장기에서는 용매대조군과 비교해 볼 때 약물투여와 직접 관련된 변화는 관찰할 수 없었다. 비장은 대조군에 비해 저용량, 중용량군 및 고용량군에 있어서 적수(red pulp)에 미만성의 거핵구(megakaryocyte)와 적아구(erythroblast)가 현저하게 증가된 것을 관찰할 수 있었다. 특히 중용량군에서의 거핵구 및 적아구의 수가 고용량군보다 증가된 경향을 보였다. 또한 모든 투여군의 비장에서 거핵구와 적아구가 중심이 되어 골수외 조혈이 현저하게 나타남을 알 수 있었다. 그러나 고용량군이 중용량군보다 거핵구 및 적아구의 수가 줄어드는 경향을 보였다. 같은 용량으로 4주간 실시한 아급성 독성시험에서 중용량군과 고용량군에서는 거핵구와 적아구가 현저하게 증가된 것이 관찰되었으나 저용량군은 대조군과 유사하였다. 그러나 본 실험에서는 중용량군이 고용량군보다 골수외 조혈이 항진된 것을 관찰할 수 있었다.

Erythropoietin 투여와 관련하여 나타난 독성학적 현상 중의 하나로 혈전의 발생을 보고하였다(Sevitt, 1973; Kim 등, 1994). Sevitt(1973)는 중용량과 고용량(>400 IU/kg) 투여시에 과다한 적혈구 생성에 의하여 혈액의 점도가 상승하고 그에 따라 정맥혈류 속도가 지연되어 혈전이 심장과 신장의 미세혈관에서 생성된다고 하였다. 그러나 본 시험에서는 투여종료 후 병리조직학적 소견에서 주요 장기의 미세혈관내 혈전형성이 관찰할 수 없었다. 암컷 고용량군의 사망예에서 사망전의 임상증상으로 사지의 부전마비 및 선회증상을 보였으며, 일부 다른 군에서도 간헐적인 식욕부진 및 후지 부종곤란 증상이 관찰되었다. 선회 및 부종곤란의 임상증상으로 보아 뇌내의 혈전이 의심되나 폐를 비롯한 각 장기의 육안 및 병리조직학적 검사시 혈전은 관찰할 수 없었다. 본 시험기간 동안 사망한 동물은 적혈구수의 증가에 따라 혈류의 흐름이 지연되고 그로 인하여 혈액응고인자가 다행 생성됨으로 파종성 혈관내응집(DIC)이 일어난 것으로 추측되었으나 부검시 혈액응고가 지연된 것 외는 특이한 변화를 관찰할 수 없었다. 따라서 이들 동물은 시험물질 투여에 의한 직접적인 사망원인으로 인정되지 않았다. Yajima(1993a, 1993b) 등은 erythropoietin<sup>o</sup> 세망적혈구

와 소핵다염성적혈구를 증가시켜 유전독성을 유발할 수 있다고 하였다. 그러나 본 시험의 아만성독성 시험에서 적혈구수의 증가는 있었으나 평균 적혈구 용적의 변화는 관찰할 수 없었다.

rHu-EPO의 비글개에서의 정맥내 투여에 대한 아만성독성시험을 실시한 결과, 최고 2,500 IU/kg/day까지 13주간 연속투여하였을 때, 100 IU/kg/day 투여군과 500 IU/kg/day 투여군에서는 시험기간중 체중변화, 식욕 등을 비롯한 특이한 임상증상을 나타내지 않았으며 혈액학 및 혈청생화학 검사결과 rHuEPO 투여군에서 간 및 신장기능의 이상 변화는 없었다. 또한 혈액응고인자 기능검사, 뇨검사 등에서도 대조군에 비하여 유의적인 변화를 관찰할 수 없었다. 비장의 병리조직학적 검사에서 거핵구의 증가 등이 관찰되었으며, 특히 500 IU/kg/day에서 현저한 증가를 관찰할 수 있었다. 다른 주요장기에서는 병리조직학적 변화를 관찰할 수 없었다. 다만 시험기간중 수컷의 중용량군과 암컷의 고용량군에서 각각 한 마리가 사망한 것이 발견되었다. 사후 즉시 부검한 후 관찰한 병리조직소견에서는 약물에 의한 직접적인 사망 원인으로 추정되는 소견은 보이지 않았다.

이상의 결과로 보아 비글개에서 rHuEPO의 13주간 정맥내 연속투여는 500 IU/kg/day까지 뚜렷한 독성을 나타내지 않으면서 골수외 조혈기능을 항진시키는 것으로 사료된다.

## 참고문헌

- Cascinu, S., Del Ferro, E., Fedeli, A., Ligi, M., Alessandroni, P. and Catalano, G. (1995). Recombinant human erythropoietin treatment in elderly cancer patients with cisplatin-associated anemia. *Oncology* **52**, 422-426.
- Cho, M. H., Seong, H. J., Kim, H. S., Kwack, S. J., Lim, S. Y., Chun, S. A., Kim, W. B., Kim, B. M., Ahn, B. O. and Lee, B. M. (1996a). Subacute toxicity of recombinant human erythropoietin (rHuEPO) in Beagle dogs. *J. Appl. Pharmacol.* **4**, 322-329.
- Cho, M. H., Seong, H. J., Kim, H. S., Kwack, S. J., Chun, S. A., Lim, S. Y., Kim, W. B., Kim, B. M., Ahn, B. O. and Lee, B. M. (1996b). Acute toxicity of recombinant human erythropoietin (rHuEPO) in Beagle dogs. *Korean J. Toxicol.* **12**, 305-308.
- Davis, J. M., Arakawa, R., Strickland, T. W. and Yphatis, D. A. (1987). Characterization of recombinant human erythropoietin production in Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry* **26**, 2633-2638.
- Evans, R. W., Rader, B., Manninen, D. L. and the Cooperative Multicenter EPO Clinical Trial Group. (1990). The quality of life of hemodialysis recipients treated with recombinant human erythropoietin. *JAMA* **263**, 825-830.
- Erslev, A. J., Caro, J., Kansu, E. and Silver, R. (1980). Renal and extrarenal erythropoietin production in anemic rats. *Br. J. Haematol.* **45**, 65-72.
- 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.
- Holley, J. L., Nolan, T. A. and Piraino, B. (1992). Recombinant human erythropoietin in a patient with multiple myeloma and end-stage renal disease. *Clin. Nephrol.* **37**, 145-147.
- Kim, 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.
- Kim, H. S., Kwack, S. J., Chun, S. A., Lim, S. Y., Park, H. S., Hong, C. Y., Kim, W. B., Kim, B. M., Ahn, B. O. and Lee, B. M. (1996). Subacute intravenous study of recombinant human erythropoietin (rHuEPO) in rats. *Korean J. Toxicol.* **12**, 309-318.
- Kokot, F., Nieszpolak, T., Wiecek, A., Marcinkowski, W., Rudka, R. and Trembecki, J. (1994). Influence of long-term erythropoietin treatment on insulin, glucagon, pancreatic polypeptide, and gastrin secretion in haemodialysed patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* **9**, 35-39.
- 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.
- Mino, T., Ohmura, T., Hiraoka, Y., Sugino, T. and Hayashi, H. (1990). General Pharmacological studies of erythropoietin (TYB-5220). 藥理と治療 **18**, 953-971.
- National Institute of Safety Research. (1994). Toxicity test guideline for safety evaluation of drugs for human use, No. 94-3 Korea.
- Okumura, K., Aoki, S., Sugino, T., Ono, T., Nagano, N. and Iba, Y. (1990). Metabolic fate of erythropoietin (TYB-5220). 藥理と治療 **18**, 2009-2019.
- Sevitt, S. (1973). Vascularization of deep-vein thrombi. *J. Path.* **111**, 1-11.
- Winearls, C. G. (1988). Treatment of the anaemia of chronic renal failure with recombinant human erythropoietin. *Drugs* **38**, 342-345.
- Yajima, N., Kurata, Y., Imai, E., Sawai, T. and Takeshita, Y. (1993a). Genotoxicity of genetic recombinant human erythropoietin in a novel test system. *Mutagenesis* **8**, 231-236.
- Yajima, N., Kurata, Y., Sawai, T. and Takeshita, Y. (1993b). Induction of micronucleated erythrocytes by recombinant human erythropoietin. *Mutagenesis* **8**, 221-229.