



게잡이 원숭이에 있어 rHuEPO의 4주간 투여 후 혈액학 및 조직병리학적 변화

김충용 · 윤석주 · 김용범 · 하창수 · 김달현¹ · 권명상² · 한상섭
한국화학연구원 부설 안전성평가연구소, ¹CJ 제약연구소, ²강원대학교 수의학과

Effects of Recombinant Human Erythropoietin Treatment in Male Cynomolgus Monkeys (*Macaca fascicularis*) (I): Hematological and Histopathological Changes

Choong-Yong Kim, Seok-Joo Yoon, Yong-Bum Kim, Chang-Su Ha,
Dal-Hyun Kim¹, Myung-Sang Kwon² and Sang-Seop Han

Non-human Primate Team, Toxicology Division, Korea Institute of Toxicology, KRICT, P.O. Box 123, Yuseong, Daejeon,
¹R&D Center of Pharmaceuticals, CJ Corp.,
²School of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Korea

Received August 8, 2005; Accepted September 12, 2005

ABSTRACT. We investigated effects of recombinant human erythropoietin (rHuEPO) on body weight, organ weight, hematology, serum biochemistry, and histopathology in 6 male cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). Six monkeys, composed of treatment and control groups, were intravenously administered 3 times per week at doses of 0 and 2730 IU/ 0.1 ml/kg with rHuEPO for 4 weeks. rHuEPO treatment did not show any change in body weights for 4 weeks and caused an increase of organ weight in spleen, salivary gland, kidney, and liver. rHuEPO treatment increased significantly mean corpuscular hemoglobin concentration, reticulocyte, and red cell distribution width from day 3 of the study and red blood cells, hemoglobin, and hematocrit levels were increased significantly from day 7 or 10 up to day 28. For an increase in red cell distribution width, it was found to a large extent on day 7, day 10, and day 14, while was found to a small extent on day 21 and day 28. It increased platelet distribution width on day 10, day 14, day 21, and day 28. Histopathological examination showed that rHuEPO treatment caused an extramedullary hemopoiesis in spleen and bone marrow hyperplasia in sternum and femur. The results indicated that rHuEPO treatment caused an increase in platelet- and RBC-related parameters, extramedullary hemopoiesis of spleen, and bone marrow hyperplasia of sternum and femur. The present study will be valuable in the proper interpretation and validation of general toxicology studies for biogeneric drugs including rHuEPO in cynomolgus monkeys.

Keywords: rHuEPO, Cynomolgus Monkeys, Hematology, Histopathology.

서 론

Erythropoietin(EPO)은 적혈구 전구세포의 분열과 분화를 촉진하는 당단백 호르몬으로서 태아 때에는 주로 간에서 생성되지만, 성숙동물에서는 80~90% 정도가 신장의 피질과 수질외측의 모세혈관을 둘러싸고 있는 내피세포에

서 형성되고 나머지는 간이나 기타 다른 조직에서 형성된다(Koury *et al.*, 1988; Fisher, 1993). 형성된 EPO는 혈류를 따라 이동하여 골수 내 erythroid progenitor cell (CFU-E)의 특이수용체와 작용하여 이들의 분화 및 증식을 촉진함으로써 적혈구 생산을 향진시킨다(Eschbach and Adamson, 1989). EPO는 유전자재조합기술의 발달로 인하여 EPO 유전자의 재조합과 대량생산이 가능하게 되어 임상적으로 만성빈혈, 신성빈혈, 말기 신장질환, 화학요법에 의한 빈혈, 자가수혈 등에 널리 사용되고 있다(Jacobs

Correspondence to: Sang-Seop Han, Korea Institute of Toxicology, KRICT, P.O. Box123, Yuseong, Daejeon, Korea.
E-mail: kimcy@kitox.re.kr

et al., 1985; Lin et al., 1985; Fisher, 1993; Vaziri et al., 1994; Gebbia et al., 1991).

다국적 제약기업들은 포스트 지놈 시대를 맞이하여 제약 시장의 주력이 기존의 화학합성 의약품에서 바이오 의약품으로 빠르게 전환되고 있다. 특히 Glycomics 등 첨단 생명공학 기술을 도입하여 바이오 제네릭 제품의 당쇄를 변형시킴으로써 효능 및 안정성이 증가될 수 있는 차세대 의약품개발에 박차를 가하고 있다. Amgen사는 바이오 의약품 시장에서 최고의 블록버스터인 Epogen®(EPO)의 차세대 제품으로서 Aranesp®를 개발 상용화하고 있다 (Shriver et al., 2004). 한편 국내에서는 다양한 정부차원의 육성정책에 힘입어 1990년대에 들어 제약사들은 인터페론, 성장호르몬, EPO, 콜로니자극인자 등 유전자 재조합 의약품을 국내 자체기술로 개발하여 시판(정, 2004)하고 있으며 특히 구조의 리모델링을 통한 긴 반감기의 차세대 EPO 제품개발에 주력하고 있다.

EPO 제품 등 단백질약품의 안전성평가에 있어 시험동물로 사용되고 있는 설치류 및 개를 이용한 동물시험에서 사람에서는 예상되지 않는 항원성 및 항체형성이 보고되어 동물시험결과의 한계성이 제시되고 있다. 따라서 사람과 해부생리학적으로 유사성이 있는 원숭이를 이용한 안전성 평가의 필요성이 요구되고 있으나 국내에서는 원숭이의 정상적 생리학적 기초자료 및 원숭이를 이용한 안전성평가에 필요한 기초자료가 부족한 형편이다. 따라서, 본 연구는 EPO 제품에 대한 원숭이에서의 혈액 및 조직학적 독성 프로파일 등 기초자료를 확보하고자 실시하였다.

재료 및 방법

시험동물

한국화학연구원 부설 안전성평가연구소 영장류연구시험실에서 사육된 중국산 cynomolgus monkey(*Macaca fascicularis*)로서 수컷 6마리를 이용하였다. 공시동물의 연령은 4~5년생으로 체중은 평균 4796 g이었다.

사육환경

공시동물은 온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 10\%$, 환기 횟수 10~20회/hr., 조명시간 12 hr(07:00 점등~19:00 소등) 및 조도 150~300 Lux로 실내는 음압(3 mmAq 이상)으로 유지되는 조건에서 사육하였다. 동물실의 온·습도는 자동 온도습도측정기에 의하여 매시간 마다 측정되었으며, 조도 등의 환경조건은 정기적으로 측정되었고, 동물실의 환경측정 결과 시험에 영향을 미칠 것으로 사료되는 변동은 없었다.

사료 및 물

사료는 영장류 전용 고품사료(PS, 오리엔탈효모 주식회사 : 日本 東京都 板橋區 小豆泥 3-6-10)를 사육기간동안 1일 동물체중의 약 4%를 제한급여 하였다. 또한 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소 검역실에서 미생물검사와 사료공급처에서 오염물질을 확인한 바, 본 시험에 영향을 미칠만한 요인은 발견되지 않았다.

물은 상수도수를 미세여과기와 자외선유수살균기를 이용하여 소독시킨 후 자유섭취시켰다. 급여 전에 일반수질 검사를 실시하여 물 중의 오염물질 분석에 있어서 시험에 영향을 미칠만한 요인은 발견되지 않았다.

시험물질 EPO의 투여

시험군은 군당 3마리씩 부형제 대조군과 EPO 투여군을 두었다. 시험물질은 유전자재조합 사람 erythropoietin 제제(rHuEPO)로 골수 중의 적아구 전구세포에 작용하여 적혈구의 생성을 조절하는 조혈호르몬제제(에포카인, CJ 종합연구소)를 사용하였고, 투여용량은 2730 IU/0.1 ml/kg으로 주 3회 4주간 요측피정맥으로 투여하였다.

채혈 및 보정

채혈 및 보정 등 동물시험에 적용되는 모든 수술은 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소(AAALAC International 인증획득, 1998)의 동물관리 사용위원회(IACUC)에 의해 검토되어 실시되었다.

일반증상 및 체중측정

일반증상관찰은 투여전과 후에 1일 2회 실시하였고, 체중은 투여개시 전, 투여개시 후, 7, 14, 21 및 28일째 그리고 부검당일에 측정하였다.

혈액학적 및 혈액생화학적 검사

게잡이 원숭이는 분석을 위하여 대퇴정맥 또는 요측피정맥에서 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액의 일부는 EDTA-2K 함유 채혈병(CBC bottle, 세원메디칼)을 사용하여 응고를 방지하였고, 나머지는 혈액생화학적 검사를 위해 혈청분리관에 옮겨 담았다. 혈액학적 검사는 투여개시 후, 0, 3, 7, 10, 14, 21 및 28일째 채혈하여 20분 이내에 혈구자동계측장치(ADVIA 120, Bayer, USA)를 이용하여 측정하였다. 혈액생화학적 검사는 투여개시 후, 7, 10, 14, 21 및 28일째 채혈하여 채혈후 30분 이내에 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 분리된 혈청을 -80°C 에 보관하여 3개월 이내에 자동분석장치(Shimadzu CL-7200, Shimadzu Co., Japan)를 이용하여 측정하였으며, chloride(Cl), sodium(Na) 및 potassium(K)은 전해질자동분석장치(644, Na/K/Cl analyzer

Table 1. Abbreviations, unit and analysis methods of the items

Items	Unit	Methods
RBC (Red blood cell)	$\times 10^6/\text{mm}^3$	Laser optical (Flow cytometry)
HGB (Hemoglobin concentration) : Hb	g/dl	Cyanmethemoglobin Spectrophotometry
HCT (Hematocrit) : Ht	%	Calculation from MCV
MCV (Mean corpuscular volume)	fl	Laser optical (Flow cytometry)
MCH (Mean corpuscular hemoglobin)	pg	(HGB/RBC) \times 10
MCHC (Mean corpuscular hemoglobin concentration)	g/dl	(HGB/(RBC \times MCV)) \times 1000
RET (Reticulocyte count)	%	Laser optical with cytochemical reaction
RDW (Red cell distribution width)	%	Laser optical flow cytometry
WBC (White blood cell)	$\times 10^3/\text{mm}^3$	Laser optical with cytochemical reaction
Differential leukocyte count	%	Perox optical with chemical reaction
NEU% (Neutrophils)	%	Laser optical with cytochemical reaction
LYM% (Lymphocytes)	%	Laser optical with cytochemical reaction
MON% (Monocytes)	%	Laser optical with cytochemical reaction
EOS% (Eosinophils)	%	Laser optical with cytochemical reaction
BAS% (Basophils)	%	Laser optical with cytochemical reaction
LUC% (Large unstained cells)	%	Laser optical with cytochemical reaction
Platelet	$\times 10^3/\text{mm}^3$	Laser optical (Flow cytometry)
MPV (Mean platelet volume)	fl	Laser optical (Flow cytometry)
PDW (Platelet distribution width)	%	Laser optical (Flow cytometry)
PCT (Plateletcrit)	%	Laser optical (Flow cytometry)
AST (Aspartate aminotransferase)	IU/l	UV-Rate
ALT (Alanine aminotransferase)	IU/l	UV-Rate
ALP (Alkaline phosphatase)	IU/l	P-NPP
BUN (Blood urea nitrogen)	mg/dl	UV rate
CREA (Creatinine)	mg/dl	Jaffe
GLU (Glucose)	mg/dl	Hexokinase
T-CHO (Total cholesterol)	mg/dl	Enzyme
A/G (Albumin globulin ratio)	ratio	ALB/(TP-ALB)
TP (Total protein)	g/dl	Biuret
ALB (Albumin)	g/dl	BCG
CPK (Creatine phosphokinase)	IU/l	UV-Rate
TG (Triglyceride)	mg/dl	Enzyme
T-BIL (Total bilirubin)	mg/dl	Enzyme
PL (Phospholipid)	mg/dl	Enzyme
IP (Inorganic phosphorous)	mg/dl	UV
Ca (Calcium)	mg/dl	OCPC
Cl (Chloride)	mmol/l	Electrode
Na (Sodium)	mmol/l	Electrode
K (Potassium)	mmol/l	Electrode

Ciba-corning USA)를 이용하여 측정하였다. 혈액 및 혈액생화학적 검사의 방법과 단위는 Table 1과 같다.

장기중량 측정

모든 동물은 부검 후 심장, 간, 비장, 신장, 부신, 폐, 고환, 뇌, 뇌하수체, 타액선, 갑상선, 부고환 및 흉선에 대해서 중량을 측정하였고 부검전 체중에 대해서 상대중량을 산출하였다.

조직병리학적 검사

모든 동물에 대해서 뇌, 폐(기관지 포함), 기관, 심장, 흉선, 간, 담낭, 신장, 췌장, 비장, 부신, 고환, 방광, 위, 십이지장, 공장, 회장, 맹장, 결장, 직장, 대퇴골, 골격근, 장림프절, 하악림프절, 좌골신경, 피부(개체식별 포함), 투여 부위 및 흉골을 적출하여 10% 중성포르말린 용액에 고정

시켰고, 고환 및 부고환은 Bouin액에, 안구는 Davidson액에 고정시켰다. 고정된 장기 및 조직은 조직처리과정에 따라 처리한 후, 포매, 박절 및 Hematoxyline & Eosin 염색하여 광학현미경으로 검경하였다.

통계학적 방법

측정된 자료는 SAS/STAT(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 통계처리용 프로그램으로 계산하였고 각 항목에 대하여 *t*-test를 실시하였다.

결 과

본 연구는 cynomolgus monkey에 주 3회 4주간 rHuEPO를 투여하여 일반증상관찰, 체중측정, 장기중량

Table 2. Body weight in cynomolgus monkeys treated with/without EPO for 4 weeks

Days	Control (g)	EPO (g)
Day 0	5566 ± 1426	4027 ± 397
Day 7	5173 ± 1137	3778 ± 313
Day 14	5240 ± 1194	3834 ± 303
Day 21	5204 ± 1114	3836 ± 296
Change (%) = (Day 21 - Day 0)/Day 0 × 100	-6.48%	-4.74%

Each value represents as mean ± SD (n = 3).

Table 3. Relative organ weights in cynomolgus monkeys treated with/without EPO for 4 weeks

Organs (% Body weight)	Control	EPO
Salivary gl.	0.082 ± 0.007	0.161 ± 0.004***
Spleen	0.097 ± 0.038	0.171 ± 0.009*
Thyroid gl.	0.009 ± 0.004	0.007 ± 0.004
Testis	0.311 ± 0.153	0.421 ± 0.171
Epididymis	0.066 ± 0.025	0.074 ± 0.014
Liver	1.313 ± 0.140	1.701 ± 0.012*
Lung.	0.441 ± 0.056	0.479 ± 0.050
Brain	1.409 ± 0.255	1.727 ± 0.166
Pituitary gl.	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.000
Thymus	0.053 ± 0.032	0.074 ± 0.025
Heart	0.371 ± 0.037	0.388 ± 0.026
Kidneys	0.304 ± 0.008	0.379 ± 0.021*
Adrenal gl.	0.010 ± 0.003	0.011 ± 0.004

Each value represents as mean ± SD (n = 3).

Significant difference from each VC group (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

측정, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사 및 조직병리학적 검사를 실시하였다.

일반증상, 체중 및 장기중량 측정

시험기간 중 시험물질 투여와 관련된 일반증상은 관찰되지 않았다. 체중 측정 결과는 Table 2와 같이 부형제 대조군과 EPO 투여군이 모두 투여 21일째 체중이 6.48% 및 4.74%가 각각 감소하였다. 장기중량 측정결과, Table 3과 같이 EPO 투여군에서 비장, 간, 티액선 및 신장의 상대중량이 부형제 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다.

혈액학적 검사

적혈구 관련지표의 변화를 Fig. 1에 나타내었다. 평균적혈구혈색소농도(mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC), 망상적혈구수(reticulocyte count, RET) 및 적혈구입자분포폭(red cell distribution width, RDW)은 각각 투여개시 후 3일째부터 유의성 있게 증가하여 28일째까지 지속되었고, 적혈구수(red blood cell, RBC), 혈색소량(hemoglobin, HGB), 헤마토크리트치(hematocrit, HCT)는 각각 투여개시 후, 7일 혹은 10일째부터 증가하

여 28일째까지 지속적으로 증가하였다. 망상적혈구수는 투여개시 후, 7, 10 및 14일째 현저한 증가폭을 보였으나 21일 및 28일째에 증가폭이 감소되는 경향을 나타내었다.

Table 4는 백혈구 관련지표인 백혈구수(white blood cell, WBC), 림프구(lymphocyte), 호중구(neutrophils), 호산구(eosinophils), 호염기구(basophils) 및 단핵구(monocyte)의 변화를 나타내었고 또한 혈소판 관련지표인 혈소판 수(platelet count), 혈소판입자분포폭(platelet distribution width, PDW), 혈소판크리트(plateletcrit, PCT)의 변화를 나타내었다(Table 4). 백혈구 수는 투여개시 후, 10, 14 및 28일째 유의성 있게 감소가 관찰되었고 혈소판 수는 투여개시 후, 21일째 유의성있는 증가가 관찰되었고 대체로 증가경향이 관찰되었다. 혈소판입자분포폭은 투여개시 후 10일째부터 증가하여 28일째까지 지속적으로 유의성 있게 증가하였다.

혈액생화학적 검사

혈액생화학적 검사결과를 Table 5에 나타내었다. 크레아티닌(creatinine, CREA)은 투여개시 후 7일 및 14일째에 유의성 있는 감소, 글루코오스(GLU)은 투여개시 후 21일째에 감소, 알부민/글로브린 비율(albumin/globulin ratio, A/G)은 투여개시 후 14일 및 28일째에 감소, 총단백(total protein)은 투여개시 후 7일 및 14일째에 증가, 총 빌리루빈(total bilirubin)은 투여개시 28일째에 증가, 소듐(Na)은 투여개시 후 21일째에 증가를 보였다.

조직병리학적 검사

조직병리학적 검사결과를 Table 6에 나타내었다. 시험물질 투여와 관련하여 EPO 투여군에서 비장의 골수외조혈(extramedullary hemopoiesis)이 3례, 흉골 및 대퇴골의 골수 과형성(bone marrow hyperplasia)이 각각 3례와 2례가 관찰되었다. 그 외 소견들은 우발적인 병변으로 판단된다.

고 찰

rHuEPO는 분자유전공학을 통하여 생산된 적혈구조혈인자로 정의되는 일반적 용어로 사용되고 있으며, 1989년 미국식품의약품안전청(Food and Drug Administration)에 의해 처음 만성신부전증(chronic renal failure) 환자에게 사용이 승인되었으며, 현재는 epoetin alfa, epoetin beta 및 darbepoetin alfa 등이 치료제로서 사용되고 있다(Cazzola, 2003; Ng *et al.*, 2003). 또한 EPO에 있어 혈액도핑(blood doping)은 혈중 최대 산소분압의 증가 및 지치지 않고 달릴 수 있는 시간이 각각 9% 및 23%가 증가(Ekblom *et al.*, 1972) 될 수 있으며, 특히 운동선

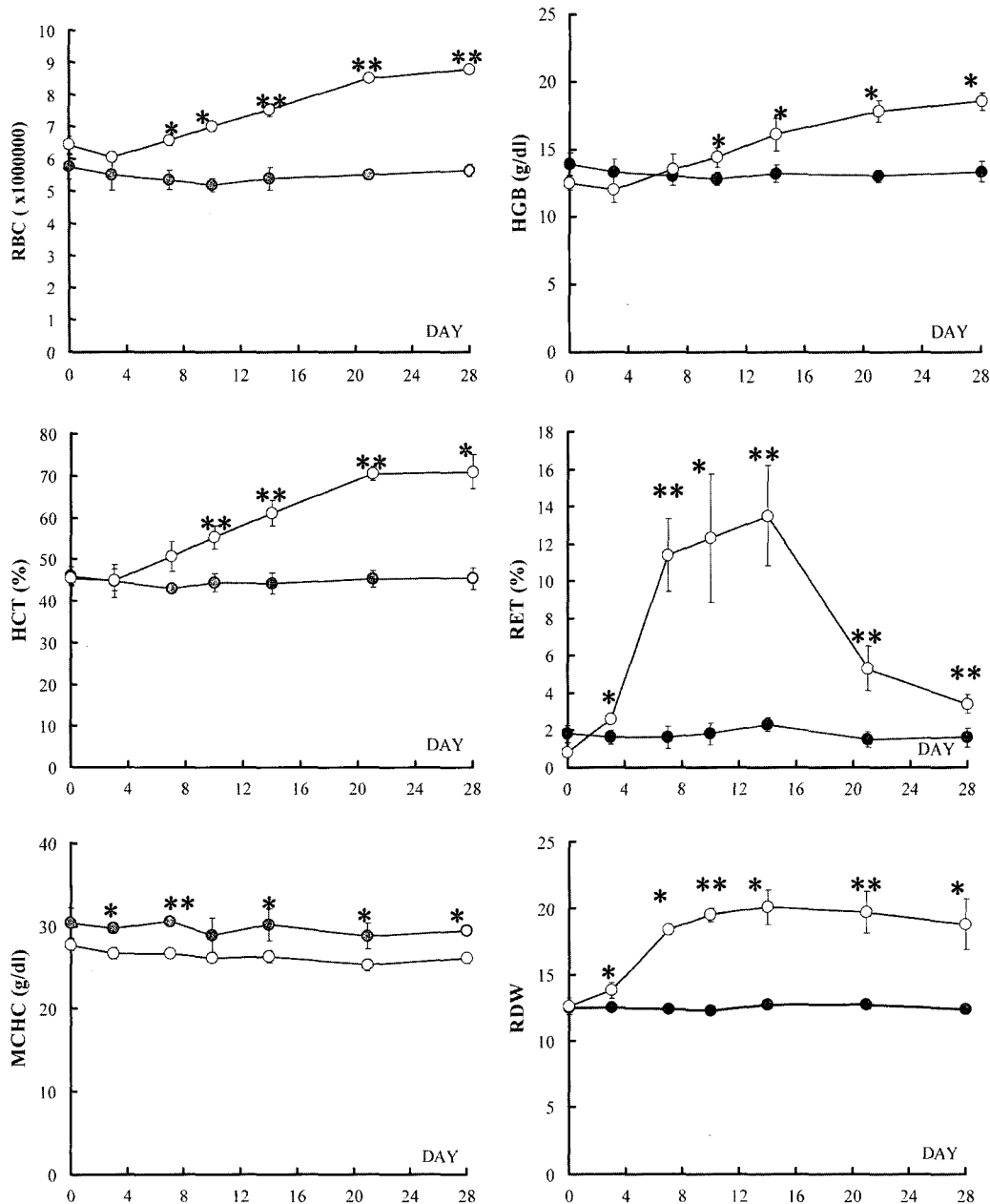


Fig. 1. Changes in RBC-related parameters in cynomolgus monkeys treated with/without EPO for 4 weeks. Mean and SD are shown. Closed circle represented for control group (n = 3) and open circle for EPO (n = 3). The statistical difference between the EPO group and control group was analyzed by Student's t-test (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.00).

수에 대한 재조합 EPO 투여는 항 빈혈 및 기능증진의 효과는 있으나 과도한 적혈구 생산으로 인한 혈액점도의 증가 및 혈전형성(thrombogenicity)의 부작용이 보고되고 있다(Jelkmann 2000).

체중측정 결과, 부형제 대조군 및 EPO 투여군의 체중이 투여 21일째 각각 6.48% 및 4.74%가 감소하였다. EPO 투여군에서 체중감소는 부형제 대조군과 비슷한 정도를 나타내고 있어 시험물질 투여와 관련이 없는 것으로

판단된다. Cynomolgus monkey에서 체중감소는 수술 스트레스, 물리적 보정 및 심리적 스트레스와의 관련성이 보고되었다(Kim *et al.*, 2004). 본 시험에서 부형제 대조군 및 EPO 투여군의 체중감소는 투여, 채혈 및 체중측정과 같은 시험수행 중에 발생하는 물질적 보정의 스트레스와 관련이 있는 것으로 생각된다.

장기중량 측정 결과, 간과 비장의 중량증가는 EPO를 4주간 정맥투여한 랫드시험과 비슷한 결과로, EPO가 후기

Table 4. Changes in WBC-related and platelet-related parameters in cynomolgus monkeys treated with/without EPO for 4 weeks

Days	WBC-related parameters						
	WBC count ($\times 1000/\mu\text{l}$)	LYM (%)	NEU (%)	EOS (%)	BAS (%)	MON (%)	
Control	D 0	13.89 \pm 1.91	49.1 \pm 19.5	44.8 \pm 19.5	1.0 \pm 0.3	1.0 \pm 0.3	2.7 \pm 0.4
	D 3	12.54 \pm 1.78	42.0 \pm 17.0	53.8 \pm 17.9	0.5 \pm 0.3	1.1 \pm 0.6	2.2 \pm 0.3
	D 7	11.37 \pm 3.37	52.3 \pm 15.6	43.2 \pm 15.2	0.9 \pm 0.4	0.6 \pm 0.5	2.4 \pm 0.6
	D 10	14.03 \pm 0.90	47.6 \pm 7.6	46.8 \pm 6.2	0.8 \pm 0.2	1.6 \pm 0.9	2.6 \pm 0.9
	D 14	12.54 \pm 3.44	51.2 \pm 12.9	44.6 \pm 12.9	0.8 \pm 0.2	0.5 \pm 0.3	2.4 \pm 0.8
	D 21	10.81 \pm 4.39	30.2 \pm 6.2	64.6 \pm 8.7	0.4 \pm 0.2	1.9 \pm 2.3	2.3 \pm 0.5
	D 28	8.84 \pm 0.54	60.7 \pm 16.9	33.7 \pm 17.1	1.1 \pm 0.5	1.0 \pm 0.5	2.8 \pm 0.7
EPO	D 0	11.96 \pm 1.11	65.0 \pm 3.6	27.6 \pm 5.5	2.5 \pm 2.3	1.7 \pm 2.3	2.4 \pm 0.6
	D 3	11.91 \pm 1.47	51.5 \pm 9.9	43.1 \pm 10.1	1.1 \pm 0.6	1.2 \pm 0.8	2.3 \pm 0.5
	D 7	7.82 \pm 1.23	56.7 \pm 7.9	34.2 \pm 7.9	2.5 \pm 2.4	1.4 \pm 1.1	3.8 \pm 0.5
	D 10	9.55 \pm 1.64*	59.1 \pm 4.6	34.6 \pm 3.6	1.4 \pm 1.5	4.2 \pm 1.9	3.3 \pm 0.2
	D 14	5.93 \pm 0.46*	53.6 \pm 5.8	37.6 \pm 6.6	1.4 \pm 1.9	2.1 \pm 1.4	4.1 \pm 0.3
	D 21	5.23 \pm 0.76	36.1 \pm 5.6	56.5 \pm 3.8	0.9 \pm 1.1	5.2 \pm 2.1	4.2 \pm 0.9
	D 28	4.71 \pm 0.76*	64.5 \pm 9.0	27.4 \pm 5.6	1.4 \pm 1.7	2.8 \pm 1.6	4.1 \pm 0.7
Days	Platelet-related parameters						
	Platelet count ($\times 1000/\mu\text{l}$)	MPV	PDW	PCT			
Control	D 0	332 \pm 55	9.9 \pm 0.7	61.8 \pm 2.0	0.3 \pm 0.0		
	D 3	314 \pm 42	9.8 \pm 1.0	61.0 \pm 3.6	0.3 \pm 0.0		
	D 7	311 \pm 30	10.0 \pm 0.8	61.2 \pm 5.1	0.3 \pm 0.0		
	D 10	315 \pm 44	10.4 \pm 0.6	63.7 \pm 1.4	0.3 \pm 0.1		
	D 14	291 \pm 32	10.2 \pm 0.3	66.5 \pm 3.7	0.3 \pm 0.0		
	D 21	321 \pm 28	10.0 \pm 0.6	64.7 \pm 4.3	0.3 \pm 0.0		
	D 28	208 \pm 169	11.2 \pm 1.5	66.6 \pm 3.0	0.2 \pm 0.2		
EPO	D 0	380 \pm 104	9.6 \pm 1.3	70.4 \pm 4.9	0.4 \pm 0.1		
	D 3	451 \pm 102	9.7 \pm 1.2	75.7 \pm 10.9	0.5 \pm 0.1*		
	D 7	452 \pm 105	10.9 \pm 2.4	86.8 \pm 16.2	0.5 \pm 0.1		
	D 10	489 \pm 112	11.5 \pm 3.1	89.9 \pm 11.6*	0.6 \pm 0.2		
	D 14	421 \pm 103	12.9 \pm 4.5	93.8 \pm 5.3*	0.6 \pm 0.3		
	D 21	534 \pm 123*	12.5 \pm 5.1	91.9 \pm 3.1*	0.7 \pm 0.4		
	D 28	437 \pm 71	13.9 \pm 3.1	96.5 \pm 5.0*	0.6 \pm 0.2		

Each value represents as mean \pm SD (n = 3). Significant difference from each control group (* p < 0.05, ** p < 0.01).

WBC, white blood cell; LYM, lymphocyte; NEU, neutrophil; EOS, eosinophil; BAS, basophil; MON, monocyte; MPV, mean platelet volume; PDW, platelet distribution width; PCT, plateletcrit.

적아구계 전구세포의 분화와 증식을 촉진시킴으로써 조혈 관련 세포의 증식에 따른 영향으로 여겨진다(남 등, 1997). 그러나 EPO를 13주간 정맥투여한 붉은털 원숭이(rhesus monkey) 시험(Furuno *et al.*, 1990)에서 이들 장기의 중량증가가 관찰되지 않아 계통간의 차이를 보이는 것으로 사료되었다.

혈액학 검사결과, 적혈구 관련지표에 있어 투여개시 후 3일째부터 MCHC, RET 및 RDW의 증가, 투여개시 후 7일 혹은 10일째부터 RBC, HGB, HCT의 증가가 28일째까지 지속적으로 관찰되었다(Fig. 1). rHuEPO투여에 따른 적혈구계 지표의 증가는 랫드, 토끼, 개 및 원숭이(김 등, 1994; 남 등, 1997; 제 등, 1997; 조 등, 1998; Furano *et al.*, 1990)를 이용한 동물시험에서 관찰된 바 있어 본 시험결과와 일치하는 결과이었다. 따라서 본 시험물질은

골수 내 erythroid progenitor cell(CFU-E)의 특이수용체와 작용하여 이들의 분화 및 증식을 촉진함으로써 적혈구 및 관련인자의 생성을 항진시킨 것으로 생각된다. 또한 RET의 증가양상에 있어 투여개시 후, 7, 10 및 14일째 11~13%에 달하는 현저한 증가폭을 보이다가 21일 및 28일째 증가폭이 감소됨(Fig. 1)을 보였으며, HCT는 투여개시 후, 14일째 61%이었으나 21일째 및 28일째에 각각 70.5% 및 70.9%으로 더 이상 증가하지 않고 그대로 지속됨으로써 현저한 적혈구계의 생산에 있어 체내의 보상적인 네가티브 피드백 효과가 관련되어 더 이상 증가되지 않은 것으로 사료된다. PDW는 혈소판 크기에 대한 평균로서 특히 혈소판의 대소부동증(anisocytosis)일 때 증가하며 PDW와 RDW가 동반하는 것으로 알려져 있다(Wiwanitkit, 2004). 13주간 EPO를 정맥투여한 붉은털원

Table 5. Changes in serum biochemical values in cynomolgus monkeys treated with/without EPO for 4 weeks

	Day 7		Day 14		Day 21		Day 28	
	Control	EPO	Control	EPO	Control	EPO	Control	EPO
AST (IU/l)	37.3 ± 9.8	36.4 ± 11.3	38.9 ± 10.3	40.5 ± 23.5	45.8 ± 16.1	53.4 ± 18.9	40.8 ± 14.3	56.8 ± 12.2
ALT (IU/l)	41.7 ± 14.9	36.8 ± 9.4	43.5 ± 14.1	43.9 ± 9.7	45.9 ± 27.9	48.1 ± 10.6	52.4 ± 35.7	48.1 ± 15.6
ALP (IU/l)	1256.0 ± 410.5	1573.0 ± 470.6	1292.0 ± 433	1578.0 ± 333.6	1220.0 ± 327.5	1643.0 ± 329.1	1163.0 ± 390.6	1465.0 ± 349.1
BUN (mg/dl)	18.5 ± 2.0	19.1 ± 1.0	20.2 ± 2.0	17.5 ± 1.4	19.4 ± 2.8	17.0 ± 1.4	19.3 ± 2.2	16.6 ± 0.5
CREA (mg/dl)	1.1 ± 0.1	0.8 ± 0.0**	1.1 ± 0.0	0.8 ± 0.2*	1.0 ± 0.1	0.8 ± 0.0	1.0 ± 0.2	0.8 ± 0.0
GLU (mg/dl)	64.8 ± 5.8	49.5 ± 5.7	67.4 ± 5.5	52.7 ± 8.9	60.2 ± 7.6	22.7 ± 10.5**	66.1 ± 9.4	29.1 ± 10.3
T-CHO (mg/dl)	104.4 ± 25.8	110.7 ± 5.8	112.0 ± 24.0	119.0 ± 16.3	109.6 ± 12.9	123 ± 5.6	109.2 ± 17.9	121.0 ± 10.8
A/G (ratio)	1.75 ± 0.19	1.47 ± 0.10	1.69 ± 0.17	1.36 ± 0.09*	1.69 ± 0.26	1.32 ± 0.07	1.67 ± 0.20	1.29 ± 0.06*
TP (g/dl)	7.3 ± 0.2	8.3 ± 0.5*	7.7 ± 0.4	8.7 ± 0.4*	7.7 ± 1.0	9.1 ± 0.7	7.6 ± 0.6	8.7 ± 0.4
ALB (g/dl)	4.6 ± 0.1	4.9 ± 0.2	4.8 ± 0.1	5.0 ± 0.2	4.8 ± 0.3	5.2 ± 0.4	4.7 ± 0.2	4.9 ± 0.1
CPK (IU/l)	275.0 ± 89.8	303.0 ± 45.3	420.0 ± 88.0	424.0 ± 87.1	380.0 ± 115.7	410 ± 46.7	277.0 ± 115.1	452.0 ± 68.9
T-BIL (mg/dl)	0.16 ± 0.06	0.21 ± 0.05	0.19 ± 0.02	0.27 ± 0.08	0.18 ± 0.02	0.27 ± 0.03	0.18 ± 0.01	0.28 ± 0.05*
IP (mg/dl)	4.7 ± 0.7	6.8 ± 0.7	4.9 ± 0.3	6.7 ± 0.3	4.1 ± 0.7	5.9 ± 0.5	5.0 ± 0.8	5.9 ± 0.6
Ca (mg/dl)	8.8 ± 0.5	9.0 ± 0.4	9.1 ± 0.3	9.2 ± 0.5	9.2 ± 0.5	9.7 ± 0.8	9.3 ± 0.4	9.5 ± 0.5
Cl (mmol/l)	113.0 ± 1.5	112.0 ± 6.1	107.0 ± 2.3	106.0 ± 2.1	106.0 ± 1.5	105.0 ± 2.3	105.0 ± 0.7	104.0 ± 3.8
Na (mmol/l)	146.0 ± 1.0	148.0 ± 1.0	147.0 ± 0.6	150 ± 1.5	147.0 ± 0.6	152 ± 1.7*	149.0 ± 2.1	149.0 ± 0.6
K (mmol/l)	4.2 ± 0.2	4.5 ± 0.8	4.3 ± 0.7	4.5 ± 0.4	4.8 ± 0.8	6.0 ± 0.8	5.3 ± 0.1	4.6 ± 1.3

Each value represents as mean ± SD (n = 3). Significant difference from VC group (* p < 0.05, ** p < 0.01).

AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphate; BUN, blood urea nitrogen; CREA, creatinine; GLU, glucose; T-CHO, total cholesterol; A/G, albumin/globulin; TP, total protein; ALB, albumin; CPK, creatine phosphokinase; TG, triglyceride; T-BIL, total bilirubin; IP, inorganic phosphate.

Table 6. Histopathological changes of target organs in cynomolgus monkeys treated with/without EPO for 4 weeks

Organs	Vehicle control	EPO
Kidney		
Congestion	2 (66.6)	3 (100)
Urinary bladder	NPF	NPF
Heart		
Congestion	2 (66.6)	3 (100)
Cardiomyopathy	1 (33.3)	1 (33.3)
Liver		
Ito cell hyperplasia	2 (66.6)	0 (0)
Inflammatory foci	0 (0)	2 (66.6)
Lung		
Congestion	0 (0)	1 (33.3)
Spleen		
Extramedullary hemopoiesis	0 (0)	3 (100)
Thymus	NPF	NPF
Cerebrum	NPF	NPF
Mesenteric lymph node	NPF	NPF
Submandibular lymph node	NPF	NPF
Adrenal gland	NPF	NPF
Pancreas	NPF	NPF
Stomach	NPF	NPF
Duodenum	NPF	NPF
Jejunum	NPF	NPF
Ileum	NPF	NPF
Cecum	NPF	NPF
Colon	NPF	NPF
Rectum	NPF	NPF
Sternum		
Hyperplasia, bone marrow	0 (0)	3 (100)
Femur		
Hyperplasia, bone marrow	0 (0)	2 (66.6)
Testis		
Seminiferous tubular atrophy	0 (0)	0 (0)

All tissues taken from each group (n = 3) at necropsy were examined microscopically. NPF represents no pathological finding.

승이에 있어 혈소판 수의 증가가 관찰되었다(Furuno *et al.*, 1990). 본 시험에서는 혈소판 관련지표에 있어 혈소판 수가 통계학적으로 유의성은 없었으나 증가경향이 관찰되었고 PDW는 투여개시 후 10일째부터 증가하여 28일째까지 지속적으로 유의성 있게 증가(Table 4) 하였고 RDW도 투여개시 후 7일째부터 현저히 증가함(Fig. 1)이 관찰되었다. 따라서, 본 시험결과인 혈소판 수의 증가경향 및 RDW와 PDW의 동반하는 증가패턴으로 일치하는 결과를 보였다. 혈액생화학적 결과에서 유의성이 관찰된 CREA, A/G, TP, T-BIL 및 Na은 생리적 범위(Kim *et al.*, 2004) 내의 변화로 독성학적 의미가 적은 것으로 생각된다.

조직병리학적 검사 결과, 비장(spleen)에서 골수외 조혈과 흉골 및 대퇴골에서 골수의 과형성이 관찰되었다(Table 6). 이들 소견은 혈액학적 검사에서 관찰된 적혈구계 지표의 현저한 증가와 관련되며 13주간 EPO를 정맥투여한 붉은털원숭이에서의 골수 적혈구계 증가(Furuno *et al.*, 1990)와도 일치하는 결과이었다.

본 연구에서 cynomolgus monkey를 이용하여 rHuEPO를 2730 IU/0.1 ml/kg 용량으로 4주간 정맥투여는 혈액학적으로 적혈구 및 혈소판 관련지표의 증가 그리고 조직병리학적으로 비장의 골수 외조혈, 흉골 및 대퇴골의 골수 과형성을 유발하였다.

감사의 말씀

본 논문은 식품의약품안전청(05132독성평642, 영장류

를 이용한 일반독성평가기술 확립, 2005)지원에 의해 수행되었으며, 영장류 독성시험수행에 수고해 주신 한수철, 허정두, 이필수, 임선택, 박남수 선생님께 감사드립니다.

참고문헌

- 김달현, 임동문, 조효진, 박관하, 하병집, 김현수 (1994): 새로운 유전 공학적 방법에 의해 생산한 Erythropoietin의 rat에서의 4주 아급성 독성. *Korean J. Toxicol.*, **10**, 243-254.
- 남정석, 제정환, 이석만, 양재만, 강병철, 이학모, 박재학, 송동호, 유선희, 이영순 (1997): 랫드에서 EPO(erythropoietin)의 4주간 정맥 반복투여 독성시험. *Korean J. Toxicol.*, **13**, 131-138.
- 정광희 (2004): 유전자재조합 의약품 연구동향. 보건산업기술동향, 가을호, 30-38.
- 제정환, 남정석, 이석만, 강병철, 이학모, 박재학, 송동호, 유선희, 이영순(1997): 토끼에서 EPO(erythropoietin)의 4주간 정맥 반복투여 독성시험에 관한 연구. *Korean J. Toxicol.*, **13**, 139-147.
- 조명행, 성하정, 광승준, 천선아, 임소영, 김원배, 김병문, 안병욱, 이병무(1998): 비글결에서 인체 재조합 적혈구 조혈인자, rHu-EPO의 급성독성에 관한 연구. *J. Appl. Pharmacol.*, **6**, 317-327.
- Cazzola, M. (2003): Erythropoietin therapy: need for rationality and active surveillance. *Haematologica*, **88**, 601-605.
- Ekblom, B., Goldberg, A.N. and Gullbring, B. (1972): Response to exercise after blood loss and reinfusion. *J. Appl. Physiol.*, **33**, 175-180.
- Eschbach, J.W. and Adamson, J.W. (1989): Guidelines for recombinant human erythropoietin therapy. *Am. J. Kidney Dis.*, **14**, 2-8.
- Fisher, J.W (1993): Recent advances in erythropoietin research. *Prog. Drug Res.*, **41**, 293-311.
- Furuno, T., Komastu, H., Noguchi, N., Noguchi, G., Suzuki, S., Kataoka, S., Usami, M., Saito, K. and Tatsumi, T. (1990): Thirteen-week intravenous toxicity study of EPOCH in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Rinshouigaku*, **6**, 271-289.
- Jacobs, K., Shoemaker, C., Rudersdorf, R., Neil, S.D., Kaufman, R.J., Mufson, A., Seehra, J., Jones, S.S., Hewick, R., Fretch, E.F., Kawakita, M., Shimizu, T. and Miyake, T. (1985): Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature*, **313**, 806-810.
- Jelkmann, W. (2000): Use of recombinant human erythropoietin as an anti-anemic and performance enhancing drug. *Curr. Pharmaceut. Biotechnol.*, **1**, 11-31.
- Gebbia, V., Palmeri, S., Valenza, R., Rausam, L. and Citarrella, P. (1991): The *in vivo* effects of recombinant human erythropoietin on cisdiamminodichloroplatinum-induced anemia in Golden Syrian hamsters. *In Vivo*, **5**, 149-152.
- Kim, C.-Y., Han, S.-C., Heo, J.-D., Lee, H.-S., Ha, C.-S., Kang, B.-H., Kwon, M.-S. and Han, S.-S. (2004): Effect of transportation on hematological and serum biochemical values in cynomolgus monkeys. *Korean J. Lab. Ani. Sci.*, **20**, 328-332.
- Koury, S.T., Bondurant, M.C. and Koury, M.J. (1988): Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by *in situ* hybridization. *Blood*, **71**, 524-527.
- Lin, F.K., Suggs, S., Kin, C.H., Browne, J.K., Smalling, R., Egrie, J.C., Cjen, K.K., Fox, G.M., Martin, F., Stabinsky, Z., Badrawi, S.M., Lai, P.H. and Goldwasser, E. (1985): Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7580-7584.
- Ng, T., Marx, G., Littlewood, T. and Macdougall, I. (2003): Recombinant erythropoietin in clinical practice. *Postgrad Med. J.*, **79**, 367-376.
- Shriver, Z., Raguram, S. and Sasisekharan, R. (2004) Glycomics: a pathway to a class of new and improved therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **3**, 863-873.
- Vaziri, N.D., Zhou, X.J. and Liao, S.Y. (1994): Erythropoietin enhances recovery from cisplatin-induced acute renal failure. *Am. J. Physiol.*, **266**, F360-F366.
- Wiwanitkit, V. (2004): Plateletcrit, mean platelet volume, platelet distribution width: its expected values and correlation with parallel red blood cell parameters. *Clin. Appl. Thrombo. Hemost.*, **10**, 175-178.