Journal of Food Hygiene and Safety 9(1), 31-36(1994)

Recombinant Human Epidermal Growth Factor, DWP-401의 랫드에서의 급성 독성

오미현 · 서경원 · 선우유신 · 이경민 · 심점순[+] · 김효정*
국립보건안전연구원, [+](주)대웅제약 중앙연구소

Acute Toxicity of Recombinant Human Epidermal Growth Factor, DWP-401 in Rats

Mi Hyune Oh, Kyung Won Seo, You Sin Sunwoo, Kyung Min Lee, Jeom Soon Shim[+] and Hyo Jung Kim*
National Institute of Safety Research, 5 Nokbundong, Eunpyungku, Seoul 122-020, Korea and [+]Research & Development Centerk, Daewoong Pharm. Co., 223-23 Sangdaewondong, Joongwonku, Sungnam 462-120, Korea

ABSTRACT–The acute toxicity of recombinant human epidermal growth factor, DWP-401 was evaluated in SD rats. Male and female rats aging 6 weeks were administered orally or subcutaneously with 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1 and 2 mg/kg of DWP-401. No deaths and no toxic symptoms related to the DWP-401 were observed. The body weights of treated animals were not significantly different from the controls. The results of necropsy revealed no abnormal gross findings of the organs in treated animals. LD_{50} values of DWP-401 for male and female rats were estimated to be over 2 mg/kg, which is approximately 2,000 times of expected clinical dose.

Keywords ☐ Recombinant human epidermal growth factor, DWP-401, Acute toxicity, Rats.

시험물질인 DWP-401은 체내에서 생리학적으로 중요한 역할을 담당하고 있는 분열유발물질로 알려져 있는 epidermal growth factor(EGF)로서 유전자 재조합 기법으로 합성되어 (주)대웅제약에서 개발중이다. EGF의 존재는 30여년전 nerve growth factor에 대한 연구과정 중 우연히 발견되었는데, 마우스의 submaxillary gland 추출물을 신생자에 투여했을때 내피성장과 케라틴화를 직접적으로 자극시켜 개안(eye opening) 및 치아붕출(teeth eruption)을 촉진시킴이 밝혀졌다.[1-3] 그후 내피성장과 케라틴화를 촉진하는 성분이 분리되었고,[2] Taylor등에 의해 EGF가 53 개의 아미노산 잔기를 가진 single polypeptide임이 알려졌으며[3], mouse EGF(mEGF)의 1차 구조와 생리작용에 필수적인 역할을 하는 3개의 intramolecular disulfide bond의 위치가 밝혀졌다 (Fig. 1).[3-5] Gregory에 의해 임산부의 뇨중에서 추출된 gastric antisecretory hormone, urogastrone이 human EGF(hEGF)와 동일한 것으로 증명되었고,[6] 그 구조가 규명되었다. hEGF의 체내합성부위는 분명하게 밝혀져있지 않으나 주로 Brunner's gland 와 sub-

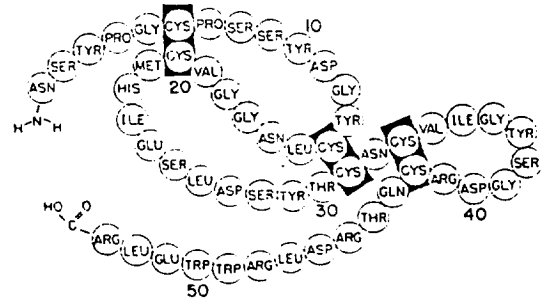

Fig. 1. The amino acid sequence of EGF with placement of disulfide bonds.

Received for publication March 4, 1994.
*To whom correspondence should be addressed.

maxillary gland일 것으로 생각되고 있으며, 사람의 체액중 널리 분포하는데 특히 뇨, 초유, 모유, 정액 등에 주로 존재한다. EGF의 주요 생리작용으로는 *in vivo*에서 피부, 각막, 폐와 기관지의 상피세포 증식과 분화, 위산분비의 억제, ornithine decarboxylase의 활성증가등이 알려져 있다.[3] EGF는 이러한 중요한 생리적 작용을 하지만, 생체내에 미량으로 존재하기 때문에 1983년 이후 hEGF유전자를 미생물에서 발현시켜 왔으며, 천연 hEGF와 유전자재조합 기법으로 제조된 EGF가 물리화학적 생물학적으로 동등함이 증명되었다.

본 연구에서는 유전자 재조합 기법으로 제조된 EGF인 DWP-401의 안전성 평가의 일환으로 랫드에 대한 급성경구독성과 급성피하독성시험을 실시하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 사육환경

국립보건안전연구원 동물실험실에서 모든 실험을 실시하였으며, 청정구역에서 생산된 SPF Sprague-Dawley계 랫드를 온도 23±1℃, 습도 55±5%, 배기 10-18회/hr, 형광등 명암 12 hr cycle, 조도 300-500 Lux의 사육환경에서 폴리카보네이트 사육상자(200W x 260L x 130H mm)에 5마리씩 넣어 사육하였다. 1주일간의 순화 사육기간을 두었으며, 사료는 신촌사료주식회사의 실험동물사료를, 음수는 멸균수돗물을 실험동물에 자유롭게 섭취시켰다.

군분리 및 투여량의 결정

암수 각 50 마리 중에서 1 주일간의 순화기간을 거쳐 투여전일 체중을 측정하고 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용 군분리를 실시하였다. 동물의 개체식별은 피모색소표시법 및 사육상자별 tag표시법을 이용하였다.

투여용량의 설정은 본 시험물질이 내인성의 유전자 재조합 의약품이므로 최고용량군을 추정임상용량의 2,000배인 2.0 mg/kg로 하고, 공비를 0.5로하여 1.0, 0.5, 0.25, 0.125 mg/kg의 투여군 및 대조군을 두었으며 각 군당 암수 5마리로 배정하였다.

시험물질의 조제 및 투여

시험물질은 (주)대웅제약으로부터 수령한 DWP-401을 사용하였으며 본 물질의 성상은 무정형의 동결건조된 흰색의 분말로서 -20℃이하에서 냉동보관하였다. 시험물질의 조제는 투여당일 DWP-401 2.77 mg이 충진되어 있는 vial에 생리식염수를 가한 후 가볍게 흔들어 용해하였다. 경구투여의 경우는 12시간 절식 후 랫드용 존데(sonde)를 이용하여 투여하였고, 피하투여의 경우는 주사기를 이용하여 1회 투여하였다. 투여액량은 2 ml/kg로 하였으며 투여 직전의 체중에 따라 산출하였다.

관찰 및 검사항목

모든 실험동물에 대하여 투여당일은 투여후 6시간 동안 매 시간마다, 경구투여한 경우는 투여익일부터 14일까지, 피하투여한 경우는 투여익일부터 7일까지 매일 1회씩 동물의 일반증상, 중독 증상 및 사망발현 유무를 관찰하였다. 모든 실험동물에 대하여 경구투여한 경우는 투여당일, 투여후 1일, 4일, 7일, 11일 및 14일째에, 피하투여한 경우는 투여당일, 투여후 1일, 3일, 7일째에 체중을 측정하였다. 시험 종료후 모든 동물을 ether로 마취하여 설하동맥 및 복대동맥 절단 방법으로 치사시킨 후, 외관 및 내부장기의 이상유무를 육안적으로 상세히 관찰하였다.

통계학적 분석

체중변화의 통계학적 분석은 Bartlett's test로 분산검정을 실시하여 등분산일 경우 one way analysis of variance(ANOVA) 검정, 부등분산일 경우 Kruskal-Wallis법으로 유의성을 검정하였다. ANOVA 검정에서 유의한 경우는 Scheffe법으로, Kruskal-Wallis법에서 유의성이 인정된 경우는 Distribution free multiple comparision 법에 의해 $p<0.05$ 수준으로 대조군과 시험물질 투여군을 비교하였다. LD_{50}치와 95% 신뢰한계는 Pharmacologic Calculation System(Ver. 4.1; Springer-Verlag, NY, 1986)을 이용하여 Litchfield-Wilcoxon법으로 산출하였다.

결 과

임상증상 관찰 및 LD_{50}치

DWP-401의 추정임상적용량의 2000배인 2.0 mg/kg의 최고용량군을 포함한 모든 투여군에서 시험물질로 인한 사망이 관찰되지 않았으며(Table 1), 경구투여후 14일간, 피하투여후 7일간의 임상증상 관찰결과에서도 특이한 독성증상은 관찰되지 않았다(Table 2). 이러한 결과로 부터 DWP-401의 LD_{50}치는 경구투여와 피하투여한 경우 모두 2.0 mg/kg 이상으로 산출되었다.

체중측정 및 부검소견

체중을 측정한 결과, 시험물질 투여군과 대조군 사이에 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았으며(Table 3, 4), 생존동물에 대한 부검결과에서도 시험

Table 1. Mortality and LD_{50} values in rats administered orally or subcutaneously with DWP-401[a]

Sex	Dose (mg/kg)	0	1	2 ····· 12	13	14	Mortality	LD_{50} (mg/kg)	0	1	2 ····· 6	7	Mortality	LD_{50} (mg/kg)
		days after administration							days after administration					
		oral administration							subcutaneous administration					
Male	0	0/5	0/5	0/5 ····· 0/5	0/5	0/5	0/5	>2.0	0/5	0/5	0/5 ····· 0/5	0/5	0/5	>2.0
	0.125	0/5	0/5	0/5 ····· 0/5	0/5	0/5	0/5		0/5	0/5	0/5 ····· 0/5	0/5	0/5	
	0.25	0/5	0/5	0/5 ····· 0/5	0/5	0/5	0/5		0/5	0/5	0/5 ····· 0/5	0/5	0/5	
	0.50	0/5	0/5	0/5 ····· 0/5	0/5	0/5	0/5		0/5	0/5	0/5 ····· 0/5	0/5	0/5	
	1.0	0/5	0/5	0/5 ····· 0/5	0/5	0/5	0/5		0/5	0/5	0/5 ····· 0/5	0/5	0/5	
	2.0	0/5	0/5	0/5 ····· 0/5	0/5	0/5	0/5		0/5	0/5	0/5 ····· 0/5	0/5	0/5	
Female	0	0/5	0/5	0/5 ····· 0/5	0/5	0/5	0/5	>2.0	0/5	0/5	0/5 ····· 0/5	0/5	0/5	>2.0
	0.125	0/5	0/5	0/5 ····· 0/5	0/5	0/5	0/5		0/5	0/5	0/5 ····· 0/5	0/5	0/5	
	0.25	0/5	0/5	0/5 ····· 0/5	0/5	0/5	0/5		0/5	0/5	0/5 ····· 0/5	0/5	0/5	
	0.50	0/5	0/5	0/5 ····· 0/5	0/5	0/5	0/5		0/5	0/5	0/5 ····· 0/5	0/5	0/5	
	1.0	0/5	0/5	0/5 ····· 0/5	0/5	0/5	0/5		0/5	0/5	0/5 ····· 0/5	0/5	0/5	
	2.0	0/5	0/5	0/5 ····· 0/5	0/5	0/5	0/5		0/5	0/5	0/5 ····· 0/5	0/5	0/5	

[a] Values are expressed as dead number/total number of animals.

Table 2. Clinical signs in rats administered orally or subcutaneously with DWP-401

Sex	Dose (mg/kg)	Clinical sign	after administration: hours						days						hours						days			
			1	2	3	4	5	6	1	2	3---12	13	14		1	2	3	4	5	6	1	2	3---6	7
			oral administration												subcutaneous administration									
Male	0	NAD[a]	-	-	-	-	-	-	-	-	----	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	----	-
	0.125	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	----	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	----	-
	0.25	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	----	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	----	-
	0.5	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	----	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	----	-
	1.0	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	----	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	----	-
	2.0	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	----	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	----	-
Female	0	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	----	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	----	-
	0.125	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	----	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	----	-
	0.25	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	----	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	----	-
	0.5	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	----	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	----	-
	1.0	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	----	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	----	-
	2.0	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	----	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	----	-

[a] NAD, − : no abnormality detected.

물질과 관련된 내부장기의 이상소견은 관찰되지 않았다(Table 5).

고 찰

본 연구에서는 생물공학적으로 제조된 EGF인 DWP-401에 대하여 독성 평가의 첫 단계로서 급성독성시험을 랫드에 대하여 경구와 피하로 실시하였다. (주)대웅제약에서 개발 중인 시험물질 DWP-401은 유전자 재조합 기법으로 제조된 epidermal growth factor로서, 다양한 상피세포의 강력한 세포성장 촉진인자로 알려져 있다. 1962년 Stanley Cohen에 의해 mouse submaxillary gland로부터 mouse epidermal growth factor(mEGF)가 최초로 발견된 이후,[3] EGF의 다양한 생리작용이 발표되었다. EGF는 *in vivo*에서 각막상피세포의 증식과 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있으며,[7-9] *in vitro* 실험에서는 단백합성과 RNA합성을 강화시키고,[10-12] glycolysis의 촉진 및 hyaluronic acid 등의 macromolecule의 합성을 증가시킨다.[13,14] 1975년에는 사람의 뇨에서 human epidermal growth factor(hEGF)가 밝혀졌다.[15,16] Gregory는 위산분비를 억제하는 urogastrone이 hEGF와 생리적 화학적으로 동일하다는 것을 증명하였으며, mEGF와 마찬가지로 hEGF도 세포증식을 촉진시키고 gastric acid 분비를 억제한다는 것을 밝혔다.[6,17]

Table 3. Changes of body weights in rats administered orally with DWP-401[a]

Sex	Dose (mg/kg)	Days after administration					
		0	1	4	7	11	14
Male	0	197±10.5	219±11.0	253±15.1	278±14.9	313±17.4	329±21.9
	0.125	196± 7.5	215± 8.5	251±10.6	271±13.3	300±14.8	319±12.3
	0.25	200±10.6	218±12.2	254±16.1	276±15.8	314±20.3	329±18.1
	0.5	201±13.6	221±15.6	254±15.1	276±16.3	305±15.1	321±13.5
	1.0	200±13.5	219±14.0	250±18.7	276±21.5	308±21.9	327±28.1
	2.0	197±13.7	215±15.6	249±16.3	271±21.6	303±21.7	322±24.5
Female	0	155± 9.1	163± 9.7	177±12.4	187±13.1	202±11.6	208±14.4
	0.125	158±12.5	168±11.3	188±15.7	198±14.5	207±16.6	220±17.6
	0.25	157± 7.7	168± 7.8	184±10.8	191± 8.8	212± 9.8	215± 7.0
	0.5	155± 7.7	164± 8.9	183± 8.5	192±11.6	211±16.1	218±15.5
	1.0	156± 9.3	169± 9.4	181± 7.5	193±12.3	207±14.1	212±15.6
	2.0	155± 9.7	163± 9.0	178± 9.1	186± 9.1	195±11.9	209± 9.3

[a] Values are expressed as means±SD for 5 rats.

Table 4. Changes of body weights in rats administered subcutaneously with DWP-401[a]

Sex	Dose (mg/kg)	Days after administration			
		0	1	3	7
Male	0	215±12.4	232±12.4	232±10.1	250±11.8
	0.125	214±11.5	231±12.1	243±13.2	251±13.9
	0.25	217±13.0	234±10.7	238± 9.3	248± 6.9
	0.5	215±12.3	232±12.7	247±10.4	250±11.7
	1.0	215± 7.6	236±13.9	237± 8.5	244± 7.9
	2.0	212±10.7	228±11.1	235± 9.2	243±10.4
Female	0	161± 4.6	168± 8.9	170± 7.6	178±10.4
	0.125	158± 3.0	166± 5.3	170± 4.7	177± 4.3
	0.25	160± 7.2	170± 6.4	175± 6.3	174± 7.2
	0.5	161±10.7	172±10.0	176± 8.2	177±10.1
	1.0	160± 7.4	172± 5.4	177± 8.4	178± 8.1
	2.0	162± 9.0	170± 7.6	172± 4.9	175± 6.0

[a] Values are expressed as means±SD for 5 rats.

Table 5. Gross findings of necropsy in rats administered orally or subcutaneously with DWP-401[a]

Sex	Dose (mg/kg)	oral administration		subcutaneous administration	
		Observation	Frequency	Observation	Frequency
Male	0	N.G.L.[b]	5/5	N.G.L.	5/5
	0.125	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5
	0.25	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5
	0.5	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5
	1.0	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5
	2.0	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5
Female	0	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5
	0.125	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5
	0.25	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5
	0.5	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5
	1.0	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5
	2.0	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5

[a]Values are expressed as animal rumber.
[b]N.G.L. : no gross lesion.

Biotechnology 제품 즉 생물공학제품이란 hormone, 효소, 성장인자, 면역조절인자 및 백신, 단클론 항체 등 생체유래성분 또는 유래성분을 생성케하는 물질로서, 주로 고분자 단백질이고 미량으로 강한 생물학적 작용 및 그 종류마다 특이적인 작용기전을 가진다. EGF, DWP-401은 생체 내에 존재하는 물질이며, 추정임상적용량이 1μg으로서 극미량이고, 원료자체가 고가이므로 급성 독성시험의 용량결정에 있어 일반화학물질에 적용하는 방법은 적절하지 않은 것으로 판단되었다.

참고로 기존 백신 및 생물공학제품에 대한 급성독성시험의 예를 보면 임상적용량을 기준으로하여 최고 투여용량을 500-5000배 사이로 설정하고 있으며 1000배로 설정한 예가 많았다.[18-21]

본 시험에서는 기존 급성독성시험 예, 시험물질의 특성과 함께, '추정임상용량이 미량이고 현저하게 독성이 약한 피험물질에 대하여는 추정임상적용량의 1000배를 한도로 하도록 권고'하고 있는 일본 의약품 가이드라인 규정 등을 참고로 하여 최고용량을 추정임상적용량의 2,000배인 2 mg/kg로 설정하였다.[22]

EGF를 랫드에 경구 및 피하로 0.125 mg/kg 부터 2.0 mg/kg 용량으로 1회 투여한 결과 시험기간동안 투여군 모두에서 사망 동물, 독성증상, 유의성 있는 체중변화와 육안적 이상소견이 관찰 되지 않았다. 따라서 DWP-401의 LD_{50}치는 랫드에서 경구투여와 피하투여시 모두 추정 임상적용량의 2,000배인 2.0 mg/kg 이상으로 평가되었으며, 2.0 mg/kg 용량까지는 경구와 피하투여에 의한 독성이 나타나지 않는 것으로 판단되었다.

국문 요약

유전자 재조합기법으로 제조된 epidermal growth factor(EGF)인 DWP-401의 급성경구독성 및 급성피하독성을 SD계 랫드에서 조사하였다. 본 시험물질을 최저 0.125 mg/kg부터 최고 2.0 mg/kg 용량까지 경구 또는 피하로 1회 투여하였으며 경구투여한 경우는 14일간, 피하투여한 경우는 7일간 관찰하였다. 투여군 모두에서 사망 및 특기할 만한 독성증상은 관찰되지 않았으며 대조군과의 유의성 있는 체중변화도 관찰되지 않았다. 부검후 내부장기의 육안적 검사결과에서도 시험물질과 관련된 이상소견은 관찰되지 않았다. 이상의 결과를 종합하여 보면 시험물질인 DWP-401은 랫드에 경구 및 피하투여시 LD_{50} 치가 추정임상용량의 2000배인 2.0 mg/kg이상이며, 2.0 mg/kg용량까지 특이할 만한 독성은 유발하지 않은 것으로 판단된다.

참고 문헌

1. Cohen, S. : Purification and metabolic effects of a nerve growth-promoting protein from snake venom. *J. Biol. Chem,*. **234**, 1129-1137 (1959).
2. Cohen, S. : Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J. Biol. Chem.*, **237**, 1555-1562 (1962).
3. Taylor, J.M., Mitchell, W.M. and Cohen, S. : Epidermal growth factor : Physical and chemical properties. *J. Biol. Chem.*, **247**, 5928-5934 (1972).
4. Savage, C.R. Jr., Inagami, T. and Cohen, S. : The primary structure of epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.*, **247**, 7612-7621 (1972).
5. Savage, C.R. Jr., Hash, J.H. and Cohen, S. : Epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.*, **248**, 7669-7672 (1973).
6. Gregory, H. : Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor. *Nature*, **257**, 325-327 (1975).
7. Savage, C.R. Jr. and Cohen, S. : Proliferation of corneal epithelium induced by epidermal growth factor. *Exp. Eye Res.*, **15**, 361-366 (1973).
8. Frati, L., Daniele, S., Delogu, A. and Covelli, I. : Selective binding of the epidermal growth factor and its specific effects on the epithelial cells of the cornea. *Exp. Eye Res.*, **14**, 135-141 (1972).
9. Ho, P.C., Davis, W.H., Elliott, J.H. and Cohen, S. : Kinetics of corneal epithelial regeneration and epidermal growth factor. *Invest. Ophthalmol.*, **13**, 804-809 (1974).
10. Hoober, J.K. and Cohen, S. : Epidermal growth factor.I. The stimulation of protein and ribonucleic acid synthesis in chick embryo epidermis. *Biochim. Biophys. Acta.*, **138**, 347-356 (1967).
11. Hoober, J.K. and Cohen, S. : Epidermal growth factor.II. Increased activity of ribosomes from chick embryo epidermis for cell-free protein synthesis. *Biochim. Biophys. Acta.*, **138**, 357-368 (1967).
12. Cohen, S. and Stastny, M. : Epidermal growth factor. III. The stimulation of polysome formation in chick embryo epidermis. *Biochim. Biophys. Acta.*, **166**, 427-437 (1968).
13. Diamond, I., Legg, A., Schneider, J.A. and Rozengurt, E. : Glycolysis in quiescent cultures of 3T3 cells. *J. Biol. Chem.*, **253**, 866-871 (1978).
14. Lembach, K.J. : Enhanced synthesis and extracellular accumulation of hyaluronic acid during stimulation of quiescent human fibroblasts by mouse epidermal growth factor. *J. Cell. Physiol.*, **89**, 277-288 (1976).
15. Cohen, S. and Carpenter, G. : Human epidermal growth factor : Isolation and chemical and biological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **72**, 1317-1321 (1975).
16. Starkey, R.H., Cohen, S. and Orth, D.N. : Epidermal growth factor : Identification of a new hormone in human urine. *Science*, **189**, 800-802 (1975).
17. Carpenter. G. : The regulation of cell proliferation : advances in the biology and mechanism of action of epidermal growth factor. *J. Invest. Dermatol.*, **71**, 283-287 (1978).
18. 강경선, 신동진, 김형욱, 조재진, 서광원, 이영순 : 랫드와 마우스에서 유전자 재조합 돼지 성장 호르몬 (PST)의 급성독성에 관한 연구. *Korean J. of Lab. Ani. Sci.*, **8**, 207-211 (1992).
19. Munt, P.L., Barker, M.H., Algate, D.R. and Ames, S.A. : The single dose toxicity of MC-HB(Hepatitis B Vaccine) in the mouse, rat, dog. *기초와 임상*, **26**, 6-17 (1992).
20. Noguchi, G., Masuda, K., Noguchi, N., Sugimoto, T., Matsuoka, A., Furuno, T. and Yamada, S. : Single-dose oral toxicity study of EPOCH in mice and rats. *임상의학*, **6**, suppl. **2**, 93-96 (1990).
21. Noguchi, G., Ohishi, T., Suzuki, S., Masuda, K., Sugimoto, T., Noguchi, N., Kataoka, S., Fujita, S. and Fukushima, N. : Single-dose intravenous toxicity study of EPOCH in mice and rats. *임상의학*, **6**, suppl. **2**, 73-81 (1990).
22. 의약품 독성시험법 가이드라인 1990 해설. 일본 후생성 약무국심사제일과 감수. 약사일보사 (1990).