

OECD test guideline 420 고정용량 급성경구독성시험법에 대한 고찰

정용현* · 유일재

한국산업안전공단 산업안전보건연구원 산업화학물질연구센터

Review of Newly Adopted OECD Acute Oral Toxicity Test Guideline 420

Yong Hyun Chung* and Il Je Yu

Center for Occupational Toxicology, Occupational Safety & Health Research Institute,
Korea Occupational Safety and Health Agency, 104-8, Moonji-dong,
Yusung-gu, Taejon, 305-380, Korea
(Received July 26, 2001)
(Accepted August 17, 2001)

ABSTRACT : The OECD acute toxicity guideline has been revised recently to protect animal welfare. The GLP authority of the Ministry of Environment, the National Institute for Environmental Research, recommended GLP laboratories in Korea to use the revised acute toxicity guideline. This study was carried out to optimize newly adopted OECD test guideline 420 (TG 420). Bisphenol A was selected for test chemical. Following TG420, Bisphenol A was classified as class 5/unclassified group. The revised TG 420 was very effective test in minimizing animal number and classifying chemicals. The method, however, had shortcoming in evaluation of test results statistically because the test had no control group, and the test should be stopped when animals were dead at the lowest dose or alive at the highest dose. TG 420 required at least 20 animals to complete the test, but it could result in producing unused animals that need to sacrifice.

Key Words : OECD test guideline 420, Acute oral toxicity, LD₅₀, Rat

I. 서 론

1910년 Sudmerson 과 Glenny 가 디프테리아(diphtheria)에 대한 독성을 평가하기 위하여 기니아피에 대한 치사율을 도입한 이래(Sudmersen and Glenny, 1910), 화학물질의 독성 및 분류에 대한 정보를 제공하기 위하여 시험동물의 치사율을 이용한 LD₅₀(median lethal dosage)을 산출하여 시험물질에 대한 독성정도를 평가하여 왔다. 그 후, 1984년 영국독성학회(British Toxicology Society)가 동물의 사망수 뿐만 아니라, 동일용량 시험군에서 독성발현의 유무와 강도를 판단하여 시험물질의 독성정도를 결정하는 3단계제한시험법(a three-step limit test)을 제시한 바 있다(British, 1984). 이 3단계제한시험법은 1987년과 1990년 Van den Heuvel 등에 의하여 20가지 화학물질에 대하여 전통적인 LD₅₀ 시험에 의한 화학물질의 분류기준과 이 시험법에 의한 화학물질의 분류기준에 대한 일치율을 비교한 결과(Van den Heuvel *et al.*, 1987, 1990), 신뢰성이 인

정되어 OECD에서 1992년 test guideline 420으로 채택한 바 있으며, 이 시험법의 통계적 유의성은 Whitehead 등에 의하여 평가된 바 있다(Whitehead and Curnow, 1992; Stallard and Whitehead, 1995). 최근 시험동물수를 줄이고 시험동물의 고통을 줄이려는 노력이 시도되면서 OECD에서는 test guideline 401 급성경구독성시험법을 삭제하고, 1992년 제정된 test guideline 420을 2001년 새로 개정하고 있다(OECD, 2001). 주요 개정내용을 살펴보면, 시험물질 고정투여량을 5, 50, 500, 2000 mg/kg에서 5, 50, 300, 2000 mg/kg으로 조정하였으며, 개정전의 시험법에는 예비 시험용으로 각 군당 시험동물을 한 마리씩 사용하고 본 시험에서는 각 군별로 암수 각 5마리씩을 사용하였으나, 개정된 TG420 시험법에서는 예비시험용 동물수를 포함하여 각 군당 암컷 5마리로 줄였다. 개정된 TG420시험법의 시험수행원칙을 살펴보면, 적당한 투여농도를 사용하여 시험동물이 심한 고통이나 스트레스를 받지 않도록 하며 사망동물이 발생할 수 있는 투여 농도는 피하고, 빈사상태의 동물은 안락사 시켜 시험 중 사망동물로 간주토록 하였다. 또한 시험수행 전에 시험물질의 구조와 특성, 물리화학적

*To whom correspondence should be addressed

성질, 관련 독성시험결과, 구조적으로 관련된 물질의 독성 자료, 예측되는 용도 등 시험물질정보에 대한 충분한 검토를 거쳐 적당한 초기투여농도를 설정하여 예비시험을 실시한 다음, 시험동물의 독성발현정도에 따라 계단식 고정용량을 적용하여 본시험을 수행토록 하였다(Annex 1, 2).

본 연구에서는 시험물질 Bisphenol A를 사용하여 개정된 OECD test guideline 420(TG420) 시험법의 확립과 적용방법을 검토하기 위하여 본 연구를 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질

개정된 TG420시험법에 의하면, 시험물질에 관한 내용에는 시험물질의 성질, 순도, 물리화학적 특성(이성체 포함), CAS 번호 등의 확인자료와 물을 부형제로 사용하지 않고 다른 적절한 부형제를 사용하였을 경우, 적용한 부형제 선택의 정당성에 관한 내용이 포함되도록 되어 있다. 본 연구에서는 시험물질로 Bisphenol A를 사용하였다. Bisphenol A(CAS No. 80-05-7, $C_{15}H_{16}O_2$)는 랫드에 경구로 투여한 결과 LD_{50} 이 3,250 mg/kg으로 나타나있다(NIOSH, 1999). 본 연구에서는 이 시험자료를 근거로 개정된 TG420 시험법에 따라 예비시험의 초기투여량은 2000 mg/kg으로 정하고 예비시험과 본시험을 실시하였다.

2. 시험방법

1) 시험동물 선택

개정된 TG420시험법에 의하면 시험동물은 사용된 종과 계통, 시험동물에서 확인된 미생물학적인 상태, 사용 시험동물수, 주령(age), 성(sex), 동물 구입처 등에 관한 내용이 포함되도록 되어 있다. 시험동물은 다른 설치류도 가능하지만 일반적으로 암컷 랫드가 더 수컷 랫드보다 더 민감하므로 8~12주령의 암컷 랫드를 권장하고 있다. 수컷 랫드를 사용할 때는 정당성을 입증할 수 있어야 한다고 되어 있다. 본 연구에서는 출산 경험이 없고 임신되어 있지 않는 건강한 8주령의 암컷 S.D.랫드를 바이오제노믹스사로부터 도입하여 사용하였다.

2) 사육조건

개정된 TG420 시험법에 따르면 시험동물에 공급되는 사료의 형태와 물 공급원의 질에 관한 내용이 명시되어야 하며, 사육실 온도는 $22\pm 3^{\circ}C$, 상대습도는 30~70%, 환기횟수는 시간당 12~17회, 조도는 150~300 Lux, 소음은 60 dB(A)이하, 명암조절은 12시간 주기로 조절되어야 한다고 하였다. 본 연구에서도 시험동물에게 물은 제한 없이 공급

하였으며, 랫드용 사료는 살균처리 된 PMI NUTRITION INTERNATIONAL, INC. 제품(5L79) 고형사료를 공급받아 사용하였다. 실험동물은 개별인식 처리한 후 각각의 동물을 관찰하는데 방해가 되지 않는 범위에서 폴리보네이트 케이지에 투여용량별로 5마리씩 구성하여 사육하였다.

3) 동물준비

개정된 TG420 시험법에 따라 사용할 동물은 무작위로 선택하여 개별인식 처리를 하였다. 순화기간은 적어도 5일 이상이 되도록 하고 있는데, 본 연구에서는 시험물질을 투여하기 전에 10일간 시험실내 케이지에서 순화시켰다.

4) 시험동물 군구성

개정된 TG420시험법에 따라 각 군의 시험동물은 평균 체중 $\pm 20\%$ 이내로 선별하여 예비시험용으로 5 mg/kg, 50 mg/kg, 300 mg/kg, 2000 mg/kg 등 4가지 투여농도별로는 5마리씩을 두고, 본시험용으로 각 군당 5마리씩(예비시험용 동물 포함) 4개군으로 군구성을 하였다.

5) 시험물질투여

개정된 TG420 시험법에 의하면, 시험물질의 물리적인 형태를 포함한 시험물질 조제내용, 시험물질의 투여시간과 시험물질 투여용량을 포함하는 시험물질 투여에 관한 내용을 기록하게 되어있으며, 시험물질은 각 시험농도 단계별로 일정한 용량으로 투여되어야 하며, 각 시험농도 단계별 시험물질은 농도확인 후 투여되어야 한다. 설치류의 투여 최대용량은 1 ml/100g 미만이다. 수용액일 경우에는 2 ml/100 g까지는 가능하다. 시험물질의 조제는 수용액, 현탁액, 유제 등으로 사용할 수 있으나 부형제의 독성학적 특성은 알고 있어야 한다. 시험물질이 안정성이 없다면, 투여하기 직전에 제조되어야 한다. 시험물질 투여는 적당한 존데 등의 삽입관을 사용하여 단회용량으로 투여한다. 단회용량투여가 불가능할 경우에는 시험물질을 나누어 줄 수 있으나, 24시간을 초과하지 않는다. 경구로 시험물질을 투여할 경우에는 절식을 하게 되는데 랫드의 경우에는 투여 전에 하루밤 동안 절식시키고 마우스의 경우에는 3~4 시간 동안 절식시킨다. 절식 후 체중을 측정하고, 시험물질을 투여한다. 시험기간 동안 물은 계속 공급한다. 시험물질 투여 후 랫드는 3~4시간 사료를 제한하고, 마우스는 1~2시간 사료를 제한한다. 시험물질을 나누어 줄 경우(24 시간 이내)에는 시험물질 투여기간을 고려하여 사료와 물을 공급하는 것이 필요하다. 본 연구에서도 시험물질투여 전에 시험동물은 하루밤 절식시켰으며, 시험물질은 각 단계별 농도로 4 ml씩 일정한 용량으로 증류수에 혼합 조제하여 투여 당일 오전 2 ml, 오후 2 ml 2회 분할하여 투여 직전에 흔들어서 농도를 균일하게 한 후 존데를 이용하여

투여하였다. 시험동물에 시험물질투여 후 4시간 동안은 사료를 제한하였으며, 시험기간 동안 물은 계속 공급하였다.

6) 예비시험 및 본시험

개정된 TG420 시험법에 의하면, 예비시험에는 각 단계별 고정용량 투여군을 각 군당 한 마리씩 두며, 각 투여군당 최소 24시간의 시간 간격을 유지하여 시험물질을 투여한 후 최소 14일간 관찰하도록 되어 있으며, 예비시험결과로 본시험의 초기투여량을 결정하도록 되어 있다. 예비시험의 초기투여량은 시험물질에 대한 특별한 정보가 없으면 300 mg/kg을 할 것을 권유하고 있다. 본시험의 각 투여농도 단계별 투여시간은 3~4일의 간격을 유지하라고 하였다. 본 연구에서는 시험물질의 LD₅₀가 3,250 mg/kg 이라는 독성정보를 입수하여 초기투여량은 2000 mg/kg으로 정하고, 예비시험용 동물 한 마리에 2000 mg/kg을 투여하였다. 투여 후 24시간 동안 특별한 증상이 발현되지 않아 본시험 초기투여용량도 2000 mg/kg으로 정하고 4마리의 시험동물에 2000 mg/kg을 투여하고, 4일 동안 관찰하였으나 특별한 독성발현 증상을 보이지 않아, 5 mg/kg 군, 50 mg/kg 군, 300 mg/kg 군에는 시험물질을 투여하지 않고, 2000 mg/kg 투여군만 14일간 관찰하였다.

7) 임상증상관찰 및 검사항목

개정된 TG420 시험법에 따라 시험동물은 아래와 같은 기준을 가지고 임상증상을 관찰하고 체중 및 병리학적검사를 하였다.

가. 관찰

- 투여 후 첫 30분간은 각 개체별로 적어도 한번 관찰한다.

- 투여 후 첫 24시간은 주기적으로 관찰하되, 처음 4시간 동안은 특별한 주의를 가지고 관찰한다.

- 시험물질투여 후 14일 동안 매일 관찰한다.

- 시험동물의 관찰기간은 엄격하게 지정하지는 않는다.

- 시험동물의 독성반응, 독성발현과 독성소실의 횟수 등을 고려하여 관찰기간을 조절한다(최소 14일 관찰한다).

- 독성발현이 연장되는 경향이 있을 때는 관찰기간을 연장한다.

- 모든 시험동물 관찰사항은 체계적으로 기록을 유지한다.

- 시험동물의 독성발현이 계속되면, 더욱 면밀히 관찰한다.

- 시험동물의 피부, 털, 눈, 점막, 호흡기, 순환기, 자율신경계, 중추신경계, 신체 운동 활동성, 행동형태 등에 대하여 관찰한다.

- 시험동물의 진전(tremors), 경련(convulsions), 유연(salivation), 설사(diarrhoea), 기면(lethargy), 수면(sleep),

혼수(coma) 등은 주의하여 관찰한다.

- 시험동물이 빈사상태에 있거나, 심한 고통이나 곤란(distress)을 받고 있으면 희생시킨다.

- 시험동물을 안락사 시키거나, 사망동물이 발생되면 사망시간을 정확하게 기록한다.

나. 체중

- 시험동물의 개별체중은 시험물질을 투여하기 전과 시험기간 중에는 적어도 1주일에 1회 측정한다.

- 체중변화는 계산해서 기록한다.

- 시험이 종결될 때까지 살아있는 시험동물은 체중을 측정하고 희생시킨다.

다. 병리학

- 시험에 사용된 모든 동물에 대한 육안병리검사를 한다.

- 시험중에 사망하거나, 제거한 동물에 대해서도 육안병리검사를 한다.

- 개체 시험동물의 육안병리검사결과는 기록하여 두어야 한다.

- 시험물질 투여 후 24시간 이상 살아 있던 시험동물의 육안병리검사서 병리 소견이 관찰된 장기들은 현미경검사를 하여야한다.

8) 시험결과 평가방법

개정된 TG420 시험법에서는 예비시험결과도 본시험의 결과해석에 포함시키고, 각 고정용량 시험군에서 1) 뚜렷한 독성발현이 나타날 때, 2) 1마리 이하의 동물이 사망했을 때, 3) 2000 mg/kg 투여시 독성반응이 없을 때, 4) 5 mg/kg 투여시 사망했을 때 시험을 종료하고 시험물질을 평가하게 된다. 해당 시험군에서 3~4일 동안 특별한 독성반응이 없으면 한 단계 높은 고정용량시험군에 정해진 시험물질을 투여하며, 2마리 이상의 시험동물이 사망하면 한 단계 낮은 고정용량시험군에 정해진 시험물질을 투여하여 독성정도를 다시 판단하게 된다. 만약 5 mg/kg 고정용량 예비시험에서 동물이 사망할 경우에는 정상적인 시험절차를 중지하고, 시험물질을 GHS(Globally Harmonised System) Class 1로 지정한다. 이러한 분류에 대한 확인이 필요하면, 보충시험을 수행할 수 있다. 즉, 두 번째 동물에 5 mg/kg을 투여하여 사망하면 시험물질을 GHS Class 1로 인정하고, 시험을 즉시 중단한다. 만약 두 번째 동물이 생존하면, 본 시험을 위한 세 마리의 추가동물의 투여량을 5 mg/kg으로 한다. 왜냐하면 이 용량에서 시험동물이 사망할 수 있는 가능성이 많기 때문이다. 이 때 각 투여 동물간의 시간적 간격은 충분히 유지하여, 먼저 투여한 동물의 생존여부를 충분히 판단할 수 있어야한다. 만약 두 번째 사망동물이 발생하면 시험을 즉시 중단하고 더 이상 동물에 시험물질을 투여하지 않고 GHS Class 1로 분류하고, 5 mg/kg을 투여한 5마리 시험동물 가운데 한 마리만 사망

하면, GHS Class 2로 분류한다.

III. 시험결과

개정된 TG420 시험법에 의하면, 시험결과에 포함되어야 할 항목으로 각 시험동물의 투여량과 시험동물의 빈사, 독성발현의 특성, 독성정도, 독성발현기간 등의 반응결과표, 시험동물의 체중과 체중변화표, (시험물질 투여시, 시험기간 중 1주 간격, 시험동물 사망 혹은 시험동물을 희생시킬 때), 시험계획보다 먼저 사망한 시험동물의 날짜와 시간, 시험개체동물의 독성발현과 회복 시기, 시험개체동물의 유효한 부검소견과 조직병리소견 등이다.

1. 임상증상

전 시험기간을 통하여 전 시험동물에서 시험물질에 의한 어떠한 임상증상도 관찰되지 않았으며, 시험기간 중 빈사나 폐사동물도 없었다(Table 1). 체중의 변화는 Table 2에서 보는 바와 같이 시험물질 2000 mg/kg 투여 후 7일에는 정상적인 체중증가를 보였으나, 투여 후 11일에는 전반적으로 체중증가가 둔화되었다. 즉, 1번 시험동물은 비교적 정상적인 체중증가를 보였으나, 2번과 3번 동물은 체중증가가 다소 둔화되었으며, 4번과 5번 시험동물은 체중증가가 거의 이루어지지 않았다.

2. 해부병리소견

시험 종료 후 2000 mg/kg 투여군 5마리를 부검하여 육

Table 1. Toxicity response of female rats treated with Bisphenol A 2000 mg/kg

Animal No.	Dose	Toxicity Response
1	2000 mg/kg	no finding
2	2000 mg/kg	no finding
3	2000 mg/kg	no finding
4	2000 mg/kg	no finding
5	2000 mg/kg	no finding

Table 2. Body weight and body weight changes of female rats treated with Bisphenol A 2000 mg/kg

Animal No.	Treatment day	unit : g	
		7 days after treatment	11 days after treatment
1	219.1	242.0 (+25.1)	254.2 (+12.2)
2	218.8	241.7 (+22.9)	245.7 (+4.0)
3	209.4	227.4 (+18.0)	235.7 (+8.3)
4	238.6	254.8 (+16.2)	254.8 (+0.0)
5	224.2	251.3 (+27.1)	251.8 (+0.5)

() : body weight changes.

Table 3. Necropsy finding of female rats treated with Bisphenol A 2000 mg/kg

Animal No.	Dose	Necropsy findings
1	2000 mg/kg	no
2	2000 mg/kg	no
3	2000 mg/kg	no
4	2000 mg/kg	no
5	2000 mg/kg	no

안적 해부소견을 관찰하였으나, 간장, 비장, 생식기, 폐, 심장, 신장, 부신 등 모든 장기에서 시험물질에 의한 어떠한 육안소견도 발견되지 않았다(Table 3).

IV. 고찰 및 결론

종래의 TG420 시험법과 개정된 TG420 시험법을 비교해 보면, 사용하는 시험동물수는 기존 시험법에서는 예비시험에 사용하는 동물수는 각 군당 암컷 5마리 이하, 본시험에서는 각 시험군당 암수 각각 5마리를 사용하였으나, 개정된 시험법에서는 예비시험용으로 각 투여농도별로 암컷 1마리를 사용하고 예비시험에 사용된 시험동물을 포함하여 본시험에서는 각 군별로 암컷 5마리를 사용하도록 되어 있다. 즉 개정된 시험법에서는 사용하는 시험동물수를 예비시험에서는 1/5로 줄였고, 본시험에서는 4/10로 줄였다. 투여농도도 개정된 시험법에서는 4가지 투여농도 중 500 mg/kg 투여농도를 300 mg/kg 투여농도로 낮추어 시험동물에 대한 복지 수준을 높였다. 급성독성시험은 기본적으로 시험동물의 사망수를 기준으로 독성을 평가하는 방법이다. 개정된 TG420 시험법도 시험동물의 사망수를 기본으로 하고 있으면서도 뚜렷한 독성발현을 보이는 시험동물에 대한 평가 기준을 마련하여 독성을 평가함으로써 동물 복지를 중요시 한 시험법이다. 그러나 개정된 TG420 시험법은 투여군 간의 투여시간을 3~4일 두어야 하기 때문에 동일한 주령의 시험동물을 도입하여 투여군별로 체중변화를 측정할 경우 군구성 후 시험물질 투여시, 시험기간 중, 시험동물을 희생시킬 때 투여군 별로 시험동물의 주령 차이가 발생하게 되는 단점이 있다. 개정된 TG420 시험법의 확립과 적용방법을 검토하기 위하여 본 연구에 사용된 시험물질은 LD₅₀이 3,250 mg/kg으로(NIOSH, 1999) 독성이 낮은 물질이다. 독성이 낮은 물질에 적용할 수 있는 한도시험법은 예비시험으로 시험동물 한 마리에 2000 mg/kg(특별한 경우에는 5000 mg/kg)을 투여하고 본 시험에 동일용량을 4마리의 추가 동물에 투여하는 방법으로 시험물질이 무독성일 가능성이 많을 때 사용할 수 있는 방법이다. 본 연구에서도 시험동물 군구성을 5 mg/kg, 50 mg/kg, 300 mg/kg, 2000 mg/kg 등으로 구성하였지만, 시험물질의 독성이 낮아 2000 mg/kg 군 5마리에만 시험물

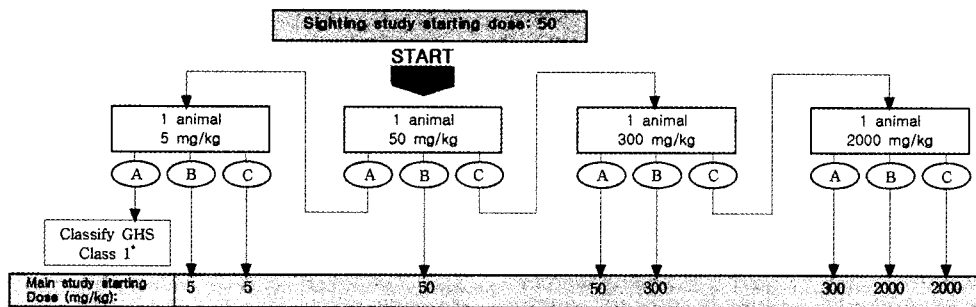
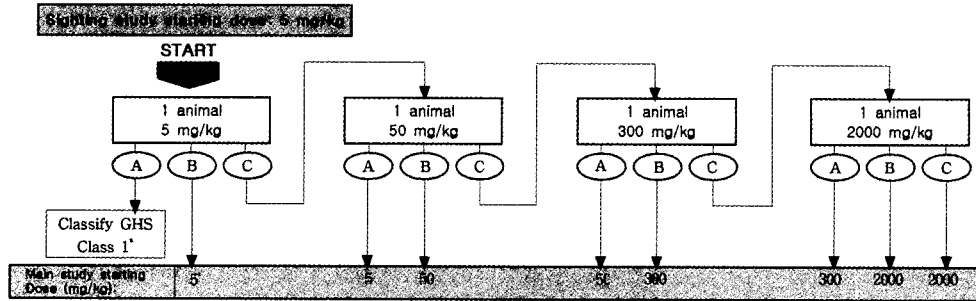
질을 투여하여 임상증상관찰 후 시험을 종료하였다. 시험 결과, 시험물질은 2000 mg/kg 급성경구투여시험에서 시험물질에 의한 영향은 없는 것으로 판단되어 GHS(Globally Harmonised System) class 5/unclassified 로 분류되었다. 본 연구에 실제로 사용된 시험동물수는 5마리에 불과하여 기존의 급성경구독성시험법에 비하여는 획기적으로 사용 시험동물수를 줄였다고 할 수 있다. 개정된 TG420 시험법에 따라 시험물질에 대한 급성경구독성시험을 수행하여 개정된 시험법을 검토한 결과, 독성이 낮을 것으로 예측되는 시험물질의 경우에는 2000 mg/kg 농도부터 적용하여 점차 낮은 농도를 적용시키고, 독성이 높을 것으로 예측되는 시험물질의 경우에는 5 mg/kg 농도부터 적용하여 점차 높은 농도를 적용시키고, 독성자료가 충분치 않을 경우에는 중간 농도인 300 mg/kg 농도를 적용시키는 방법이 가장 동물복지를 고려하고, 시험동물수를 줄일 수 있는 방법이 될 것으로 판단되었다. 그러나 본 시험에서 볼 수 있는 것처럼 개정된 TG420 시험법에서는 대조군을 두지 않고, 초기 투여농도군에서 사망동물이 나타나거나 뚜렷한 독성을 보이는 시험군이 있거나, 2000 mg/kg 투여군에서 독성이 나타나지 않으면 시험을 종료하기 때문에 각 군간의 통계적 유의성을 평가를 할 수는 없는 아쉬움이 있고, 개정된 TG420 시험법에는 기본적으로 시험을 수행하기 위해서는 20마리의 시험동물이 필요한데, 시험물질의 독성정도와 초기투여농도의 선택에 따라 준비한 시험동물 중 일부만을 사용하는 경우가 생겨 잔여 동물을 의미 없이 처리해야 하는 단점이 있다.

참고문헌

British Toxicology Society Working Party on Toxicity

- (1984): Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. *Human Toxicol.*, **3**, 85-92.
- Chan, P.K. and Hayes, A.W. (1994): Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation. In: Principles and Methods of Toxicology (3rd Edition), A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.
- Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995): Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD₅₀, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol.*, **33**, 223-231.
- OECD (2001): OECD guideline for test of chemicals revised draft guideline 420.
- Stallard, N. and Whitehead, A. (1995): Reducing numbers in the fixed-dose procedure. *Human Exptl. Toxicol.*, **14**, 315-323.
- Sudmersen, H. and Glenny, A. (1910): Variations in susceptibility of guinea pigs to diphtheria toxin. *J. Hygiene*, **9**, 399-408.
- Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O. (1987): Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. *Human Toxicol.*, **6**, 279-291.
- Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990): The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD₅₀ test. *Fd. Chem. Toxicol.*, **28**, 469-482.
- Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992): Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. *Fd. Chem. Toxicol.*, **30**, 313-324.

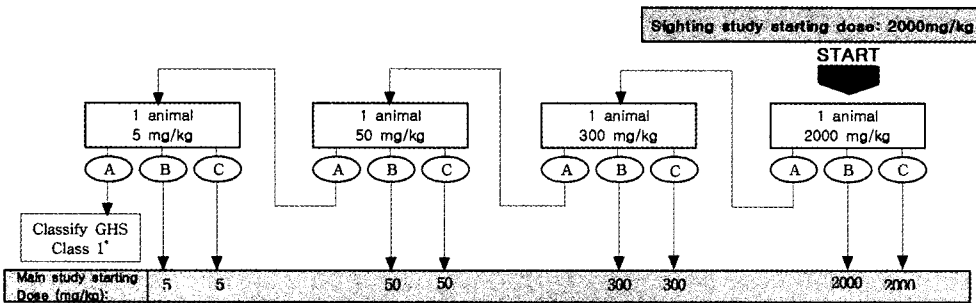
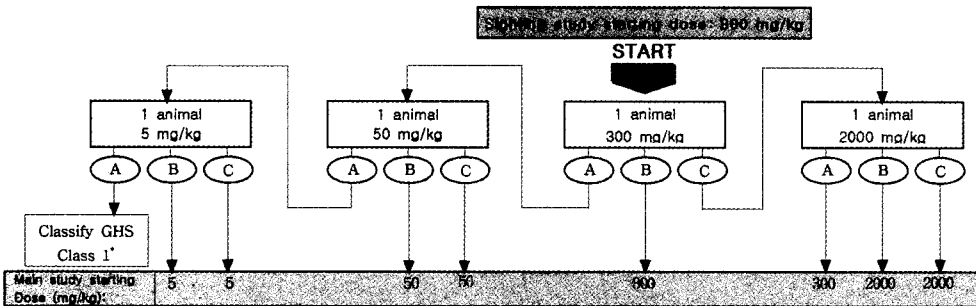
ANNEX 1 ; FLOW CHART FOR THE SIGHTING STUDY



Outcome

- A death
- B evident toxicity
- C no toxicity

* for outcome ○ at 5mg/kg there is an optional supplementary procedure to confirm the GHS classification



Outcome

- A death
- B evident toxicity
- C no toxicity

* for outcome ○ at 5mg/kg there is an optional supplementary procedure to confirm the GHS classification

ANNEX 2 : FLOW CHART FOR THE MAIN STUDY

