OECD/OCDE

2001/12/17

試験ガイドライン No.420

急性経口毒性試験—固定用量法

ご利用に関する注意事項

本文書および本文書に掲載している翻訳は OECD による公式文書**ではありません**。本文書における翻訳と原文の間に用語ないし表現等の齟齬がある場合、**原文のみが有効とみなされます**。内容について疑義が生じた場合、もしくは研究に公的な認証を必要とする場合は、原文に準拠してください。

本翻訳を使用したことに起因する如何なる損害について、当所は一切責任を負いません。

This document and translation are NOT official work by OECD. In the event of any discrepancy between the original work and the translation, **only the text of the original work should be considered valid**. Refer to the original document when there is any doubt about the translation, or legal or official verification is needed for your study. NIHS takes no responsibility even if you get any damage by using this translation.

Original work:

OECD (2002), Test No. 420: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264070943-en.

©OECD (2002)

You are free to use this material subject to the terms and conditions available at

http://www.oecd.org/termsandconditions/

経済協力開発機構 （OECD）の化学物質の 試験に関するガイドライン Section 4 Health effects
邦訳: 国立医薬品食品衛生研究所(NIHS) 安全性予測評価部

2001 年 12 月 17 日採択

経済協力開発機構（OECD）の化学物質の試験に関するガイドライン

急性経口毒性試験 － 固定用量法

はじめに

1. OECD の化学物質の試験に関するガイドラインは、科学的進歩や実際の評価法の変化を踏まえて定期的に見直されている。ガイドライン 420 の初版は、試験ガイドライン 401 に記載された従来の急性毒性試験の最初の代替法として、1992 年 7 月に採択された。その後、数回の専門家委員会からの勧告に基づき、時宜を得て改訂が検討されたが、これは、i）化学物質の分類のための半数致死量（LD_{50}）の統一カットオフ値について国際的な合意がなされ、1992 年版のガイドラインの推奨カットオフ値と相違が生じたこと、また ii）現在では片性（原則として雌）の試験で十分であると考えられていること、によるものであった。

2. 従来の急性毒性の評価方法は動物の死亡を指標として用いているが、1984 年に英国毒性学会から、一連の固定用量の投与に基づく新しい急性毒性試験法が提案された(1)。この試験法は評価指標として動物の死亡を用いず、代わりに一連の固定用量のうちの 1 用量における明らかな毒性徴候の観察に依存するものであった。英国における(2)、また国際的な(3) *in vivo* バリデーション試験の結果、この方法は 1992 年に委員会により試験ガイドラインとして採択された。次いで、固定用量法の統計学的性質が一連の試験で数学モデルを用いて評価された(4)(5)(6)。これらの *in vivo* およびモデル試験により、同方法の再現性、従来の方法に比べた場合の使用動物数の削減と苦痛の軽減、さらに他の急性毒性試験方法（試験ガイドライン 423 および 425）と同様に物質の分類が可能なことが示された。

3. 目的に合った最適な試験方法の選択の仕方は、「急性経口毒性試験のガイダンス文書」(7)に記載されている。また、このガイダンス文書にはガイドライン 420 の実施と解釈に関するその他の情報も含まれている。

4. このガイドラインの中で用いる定義を補遺 1 に示す。

最初に考慮すべき事項

5. この方法で最も重要な点は、主試験では中等度の毒性を示す投与用量しか用いず、致死的であることが予測される用量の投与は避けなければならない点である。また、腐食性や高度の刺激作用により顕著な疼痛や苦痛を生じることがわかっている用量は投与する必要がない。瀕死動物や、明らかに痛がったり、強い持続的な苦痛の徴候を示したりしている動物は安楽死させ、試験結果の解釈ではこれらを死亡動物と同じものとして扱う。瀕死動物や非常に苦しんでいる動物を屠殺する際の判断基準、および予期される死亡や瀕死の見分け方については、別のガイダンス文書(8)に記載されている。

6. この方法は、有害性に関する情報を提供し、また急性毒性を生じる化学物質の分類に関する世界調和システム（GHS）(9)に従って物質を分類および等級付けすることを可能にする。

7. 試験の実施前に被験物質に関する入手可能なすべての情報を検討する。その中には物質の特定と化学構造、物理化学的性質、その物質に関する他のすべての *in vitro* および *in vivo* 毒性試験結果、構造関連物質の毒性データ、および予想される物質の使用法が含まれる。これらの情報は、ヒトの健康を守る上でその試験が役立つかどうかの懸念を払拭するのに必要であり、また適切な開始投与用量設定の参考にもなる。

試験の概要

8. 固定用量 5、50、300 および 2000 mg/kg（例外として追加の固定用量 5000 mg/kg を含む場合がある、段落 19 参照）を用い、片性の動物からなる群に段階的な方法で投与する。初回の投与用量としては、見当付け試験に基づき、高度な毒性影響や死亡を生じることなく何らかの毒性徴候を発現させると予測される用量を設定する。疼痛、苦痛、または瀕死と関連した臨床徴候や状態については、別の OECD ガイダンス文書(8)に詳述されている。毒性徴候や死亡の有無によっては、より高い固定用量、またはより低い固定用量を別の動物群に投与する場合もある。明らかな毒性か、1 匹を超えない死亡が認められる投与用量まで、または最高投与用量で何ら影響が認められないか、最低投与用量で死亡が認められるまで、この方法を続ける。

試験方法

動物種の選択

9. 試験の動物種としてはラットが望ましいが、他のげっ歯類動物を用いてもよい。原則として、雌を用いる(7)。これは、従来の LD_{50} 試験に関する文献調査から、感受性にはほとんど性差がないものの、性差が認められる場合には、雌の方が一般的にやや感受性が高いことが示されているためである(10)。ただし、構造関連物質の毒性学的性質やトキシコキネティクスに関する知見から、雄の方が感受性が高いと判断される場合には雄を用いる。雄で試験を実施する場合には、その妥当性を示す。

10. 一般的に用いられている系統の健康な若齢成熟動物を試験に使用する。雌は未経産で非妊娠のものを用いる。各動物は投与開始時において 8～12 週齢とし、体重は先に投与された動物の平均体重の± 20%以内とする。

飼育および給餌条件

11. 動物飼育室の温度は 22 ± 3 ℃とする。相対湿度は目標値を 50～60%とし、30%以上、70%を超えないこと（飼育室清掃時を除く）が望ましい。照明は人工照明で 12 時間明期、12 時間暗期とする。飼料は、通常の実験動物用飼料を用いてよい。飲水は自由に摂取させる。動物は投与用量ごとに群飼してよいが、1 ケージ当たりの動物数は各個体をしっかり観察できるような数とする。

動物の準備

12. 動物を無作為に選び、個体識別ができるように印を付け、投与開始前に飼育ケージで 5 日間以上飼育して試験環境に馴化させる。

投与の準備

13. 一般には投与液の濃度を変えることにより、試験する全投与用量で被験物質を一定容量で投与する。ただし、液体の最終製品またはその混合物を試験する際には、被験物質を希釈せずに（一定濃度で）用いる方が、その物質のその後のリスク評価にとってより適切な場合があり、また一部の規制当局で要求している方法でもある。なお、いずれの場合も最大投与容量を超えないこと。一回に投与可能な液体の最大容量は、試験動物の大きさによって異なる。げっ歯類の場合、その容量は原則として体重 100 g 当たり 1 mL を超えないようにするが、水溶液については体重 100 g 当たり 2 mL まで考慮できる。投与液の調製に関しては、可能な限り、まず水溶液／水性懸濁液／水性乳剤の使用を考慮し、次に油（コーン油など）の溶液／懸濁液／乳剤を、その後に他の溶媒の溶液を考慮することが推奨される。水以外の溶媒を用いる場合には、溶媒の毒性がわかっていなければならない。投与液の使用期間中の安定性が既知で、許容範囲内であることが示されていない限り、調製は投与直前に行なう必要がある。

手順

投与

14. 被験物質を胃ゾンデまたは適切な挿管カニューレを用いて単回強制経口投与する。一回で投与できないような例外的な場合には、24 時間以内に少量ずつ分割投与する。

15. 投与前に動物を絶食させる（ラットでは一晩、マウスでは 3～4 時間、飼料を与えない。ただし、いずれも水は与える）。絶食期間後に体重を測定し、被験物質を投与する。投与後、ラットでは更に 3～4 時間、マウスでは 1～2 時間、飼料を与えない場合もある。なお、一定時間内に分割投与する場合は、投与に要する時間により、給餌・給水を行なう必要があるかもしれない。

見当付け試験

16. 見当付け試験の目的は、主試験における適切な開始投与用量の設定である。被験物質を補遺 2 に示すフローチャートに従って、1 匹ずつに連続的な方法で投与する。主試験における開始投与用量を決定した時点で（または最低固定用量で動物が死亡した場合）見当付け試験を終了する。

17. 見当付け試験の開始投与用量は、可能であれば、その化学物質や構造関連物質の *in vivo* および *in vitro* のデータから得られた知見に基づき、明らかな毒性を生じると予測される用量を、5、50、300 および 2000 mg/kg の固定用量の中から選択する。そのような情報がない場合には、開始投与用量を 300 mg/kg とする。

18. 各動物には少なくとも 24 時間間隔で投与する。すべての動物について少なくとも 14 日間の観察を行なう。

19. 例外として、かつ特定の規制上の必要性から正当であると認められる場合に限り、より高い固定用量である 5000 mg/kg の追加を検討することがある（補遺 4）。しかし、動物愛護の観点から、GHS 区分 5 の範囲（2000～5000 mg/kg）での動物試験は勧められず、そのような試験は、その結果がヒトや動物の健康、または環境の保護に直接関係している可能性が非常に高い場合にのみ検討されるべきである。

20. 見当付け試験において最低固定用量（5 mg/kg）で動物が死亡した場合には、原則として試験を終了し、その物質を GHS 区分 1 とする（補遺 2 参照）。しかし、更なる区分の確認が必要な場合には、以下のような任意の補足的手順を実施してもよい。この手順では、まず 2 匹目の動物に 5 mg/kg を投与する。この 2 匹目の動物が死亡した場合には GHS 区分 1 であることが確認され、試験を直ちに終了する。2 匹目の動物が生存した場合には、最大 3 匹の追加動物に 5 mg/kg を投与する。ただし、これらの動物は死亡する危険性が高いことから、動物愛護のため、投与は順を追って行ない、各動物の投与の間には、先の投与動物が生存する可能性が高いと確信できるまでの十分な間隔を空ける。2 番目の死亡が認められた場合には、順に行なっていた投与を直ちに終了し、それ以上の投与を行なわない。2 番目の死亡（試験終了時までの試験動物数は問わない）の発生は補遺 3 の転記 A（2 匹以上の死亡）に該当するため、固定用量 5 mg/kg における分類規則に従うこととなる（2 匹以上の死亡の場合は区分 1、1 匹を超えない死亡の場合は区分 2）。

主試験

動物数および投与用量

21. 開始投与用量での試験後になすべきことを補遺 3 のフローチャートに示す。ここでは試験を終了して適切な有害性区分を決定するか、より高い固定用量で試験するか、またはより低い固定用量で試験するか、三つのうち一つを行なう必要がある。ただし、動物保護のため、見当付け試験で死亡のみられた投与用量を主試験で再度用いることはしない（補遺 3 参照）。これまでの経験では、開始投与用量で被験物質が分類され、それ以上の試験を必要としない結果になる可能性が最も高い。

22. 原則として、検討する各投与用量について片性の動物を合計 5 匹使用する。この 5 匹の動物は、見当付け試験で当該用量を投与した 1 匹と、その他の 4 匹からなる（ただし、主試験で用いる投与用量が見当付け試験に含まれていなかった例外的な場合を除く）。

23. 各用量の投与間隔は、毒性徴候の発現の有無、持続性、および程度によって決定する。先の投与動物の生存が確実になるまでは、次の用量の投与は行なわない。遅発性毒性を観察できるように、必要であれば、各用量における投与間隔を 3～4 日にすることが推奨される。また、必要に応じて投与間隔を調整する（反応が不明瞭な場合など）。

24. より高い固定用量である 5000 mg/kg の投与を検討する場合は、補遺 4 に概略を示した手順に従う（19 段落も参照のこと）。

限度試験

25. 限度試験は、主として、被験物質に毒性がない（規制上の限界用量を超える用量でしか毒性を発現しない）可能性が高いことを示す情報がある場合に用いられる。被験物質の毒性に関する情報は、既に試験された類似物質や混合物または製品に関する知見に加えて、既知の毒性学的に重要な成分の有無やその割合を考慮することで得られる。毒性に関する情

報がほとんど、または全くない場合、また被験物質に毒性があることが予測される場合には、主試験を行なう。

26. 2000 mg/kg（例外的には 5000 mg/kg）を開始投与用量とする見当付け試験を通常の手順に従って行ない、さらに 4 匹の動物に同用量を投与すると、本ガイドラインにおける限度試験となる。

観察

27. 各動物について、投与後 30 分間以内に少なくとも 1 回、24 時間以内は定期的に（最初の 4 時間は特に注意深く）、およびその後は毎日 1 回、合計 14 日間観察を行なう（動物愛護のためその個体を試験から除いて安楽死させる必要がある場合、または死亡して発見された場合を除く）。ただし、観察期間は厳格に固定せずに毒性反応やその発現時期、また回復期間の長さに基づいて決め、必要と考えられる場合には延長する。毒性徴候の発現時期と消失時期は、特に毒性徴候が遅れて発現する傾向にある場合に重要である(11)。各動物についての個別の記録を残すとともに、すべての観察結果を体系的に記録する。

28. 動物が毒性徴候を示し続ける場合には、追加観察が必要となる。観察には、皮膚と被毛、眼および粘膜、ならびに呼吸器系、循環器系、自律神経系および中枢神経系、ならびに身体運動および行動様式の変化を含める。また、振戦、痙攣、流涎、下痢、嗜眠、睡眠、および昏睡について特に注意を払う。「人道的評価指標に関するガイダンス文書」(8)にまとめられている原則および基準を考慮し、瀕死状態で発見された動物や、高度の疼痛または強い持続性の苦痛の徴候を示している動物は安楽死させる。人道的理由により動物を安楽死させたり、死亡した状態で発見したりした場合には、その時間を可能な限り正確に記録する。

体重

29. 各動物の体重を、被験物質投与直前および投与後は少なくとも週 1 回測定する。また、体重変化を計算し、記録する。試験終了時に生存動物の体重を測定し、安楽死させる。

病理学的検査

30. すべての試験動物（試験中の死亡動物および動物愛護のため試験から除いた動物を含む）について剖検を行ない、すべての肉眼病理学的変化を動物ごとに記録する。初回投与後 24 時間以上生存した動物の器官で肉眼病理学的変化の認められたものについては、有用な情報が得られる場合があるため、病理組織学的検査を検討してもよい。

データおよび報告

データ

31. 動物の個体ごとのデータを示す。また、すべてのデータを総括表にし、各試験群について使用動物数、毒性徴候発現動物数、試験中に死亡して発見されたり人道的理由により安楽

死させた動物数、各動物の死亡時期、毒性影響の内容と経過および可逆性、ならびに剖検所見を示す。

試験報告書

32. 試験報告書には、必要に応じて、以下の情報を含まなければならない。

被験物質
－物理的性質、純度、また必要に応じて物理化学的特性（異性化を含む）
－特定データ（CAS 番号を含む）

溶媒（必要に応じて）
－水以外の場合は、溶媒選択の妥当性

供試動物
－使用した動物種／系統
－動物の微生物学的状態（わかっている場合）
－動物数、週齢、性（必要であれば、雌ではなく雄を用いた理由を含む）
－供給元、飼育条件、飼料など

試験条件
－被験物質溶液の詳細（投与物質の物理的形状の詳細を含む）
－被験物質投与の詳細（投与容量および投与時間を含む）
－飼料および水の質の詳細（飼料の種類／供給元および水の供給元を含む）
－開始投与用量設定根拠

結果
－各動物の反応データおよび投与用量を示す表（生死を含め、毒性徴候を示した動物、またみられた影響の性質、程度、および持続性）
－体重および体重変化の表
－投与日、その後 1 週間ごと、および死亡または屠殺時の個体ごとの体重
－計画屠殺前の死亡の場合は、その試験日および時間
－各動物における毒性徴候の発現経過およびその可逆性
－各動物における剖検所見、および必要に応じて病理組織学的所見

考察および解釈

結論

参考文献

(1) 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.

(2) 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.

(3) 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 LD_{50} test. Fd. Chem. Toxicol. 28, 469-482.

(4) Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. Fd. Chem. Toxicol., 30, 313-324.

(5) Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. Human Exptl. Toxicol. 14, 315-323.

(6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2000). Statistical evaluation of modifications to the fixed dose procedure (manuscript in preparation).

(7) OECD (2000). Guidance Document on Acute Oral Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No.24.

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assesment No 19.

(9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p.11 [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

(10) 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 LD_{50}, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol. 33, 223-231.

(11) Chan P.K and A.W. Hayes (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.

補遺 1

定義

急性経口毒性とは、物質の経口による単回投与、または24時間以内の複数回投与によって生じる有害な影響をいう。

遅発性の死亡とは、動物が48時間以内に死亡または瀕死状態にならず、その後の14日間の観察期間中に死亡することをいう。

用量（投与用量）とは、投与される被験物質の量をいう。試験動物の単位体重当たりの被験物質の重量（mg/kgなど）で表わす。

明らかな毒性とは、被験物質投与後の明確な毒性徴候を示す一般的な用語であり（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. (3) などを参照のこと）、これより一段階上の固定用量では、大多数の動物で高度の疼痛や強い持続性の苦痛の徴候、瀕死状態（基準は「人道的評価指標に関するガイダンス文書」(8)に記載）、また場合によっては死亡が予測される。

GHS : 化学物質および混合物の分類に関する世界調和システム。OECD（健康または環境有害性）、国連危険物輸送専門委員会（物理化学的危険性）、および国際労働機関（ILO、危険有害性周知）の共同作業による。化学物質の適正管理のための国際機関間プログラム（IOMC）が調整。

瀕死：次の観察予定時間前に瀕死状態になるか、死亡することが予測されるとき。げっ歯類でこの状態を示す徴候としては、痙攣、側臥位、横臥、振戦などが挙げられる（更なる詳細については「人道的評価指標に関するガイダンス文書」(8)を参照のこと）。

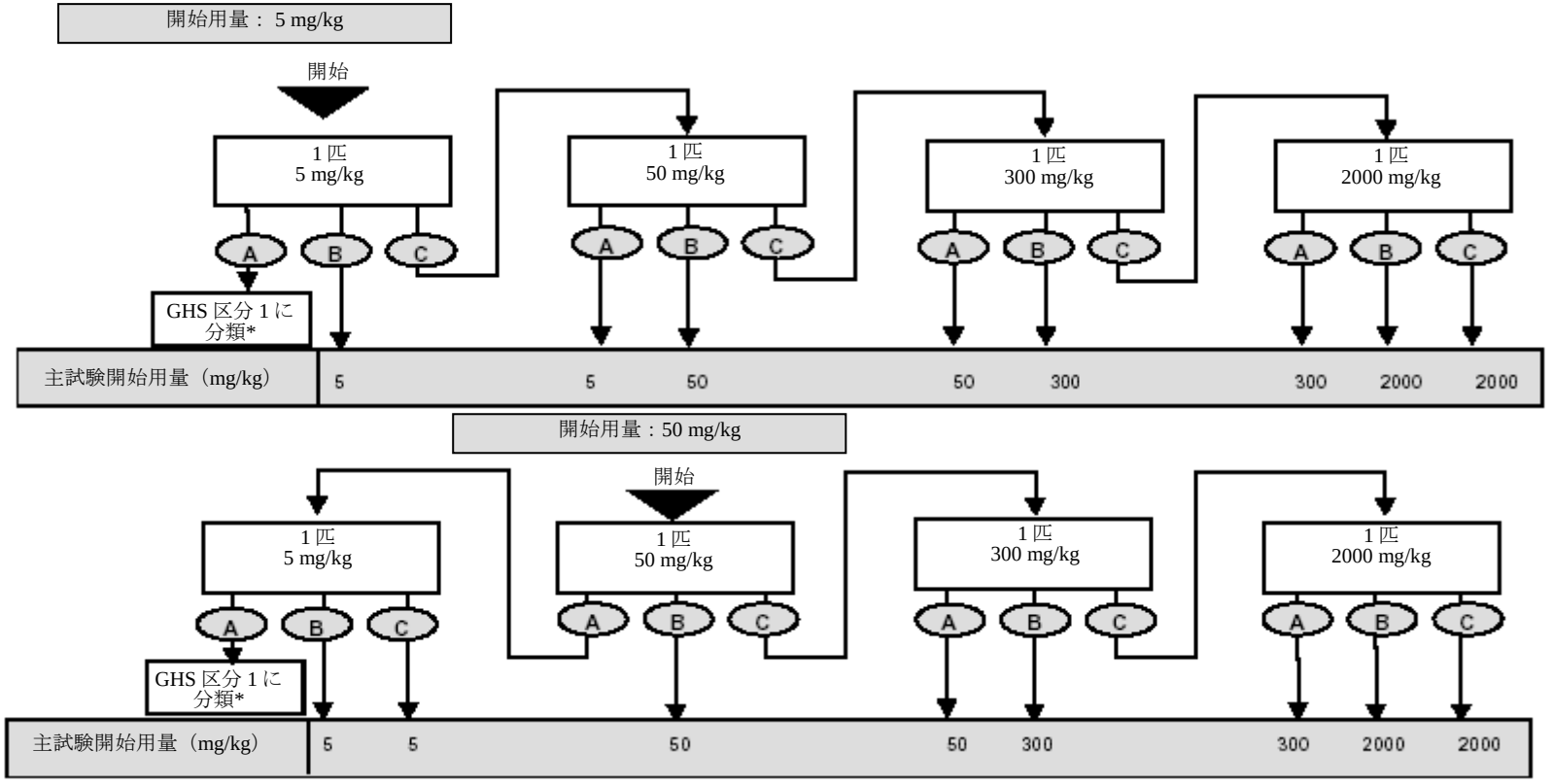
LD_{50}（経口半数致死量）とは、単回の経口投与により50%の動物が死亡すると予測される物質の量で統計学的に求められる。試験動物の単位体重当たりの被験物質の重量（mg/kg）で表わす。

限界用量とは、試験の上限の投与用量（2000または5000 mg/kg）をいう。

瀕死状態：死につつあるか、たとえ治療しても生存できない状態をいう（更なる詳細については「人道的評価指標に関するガイダンス文書」(8)を参照のこと）。

予期される死亡 : この先のある時期（試験終了予定前）の死亡を示唆する症状が認められる状態。水や飼料に到達できないなど（更なる詳細については「人道的評価指標に関するガイダンス文書」(8)を参照のこと）。

補遺 2：見当付け試験のフローチャート



結果

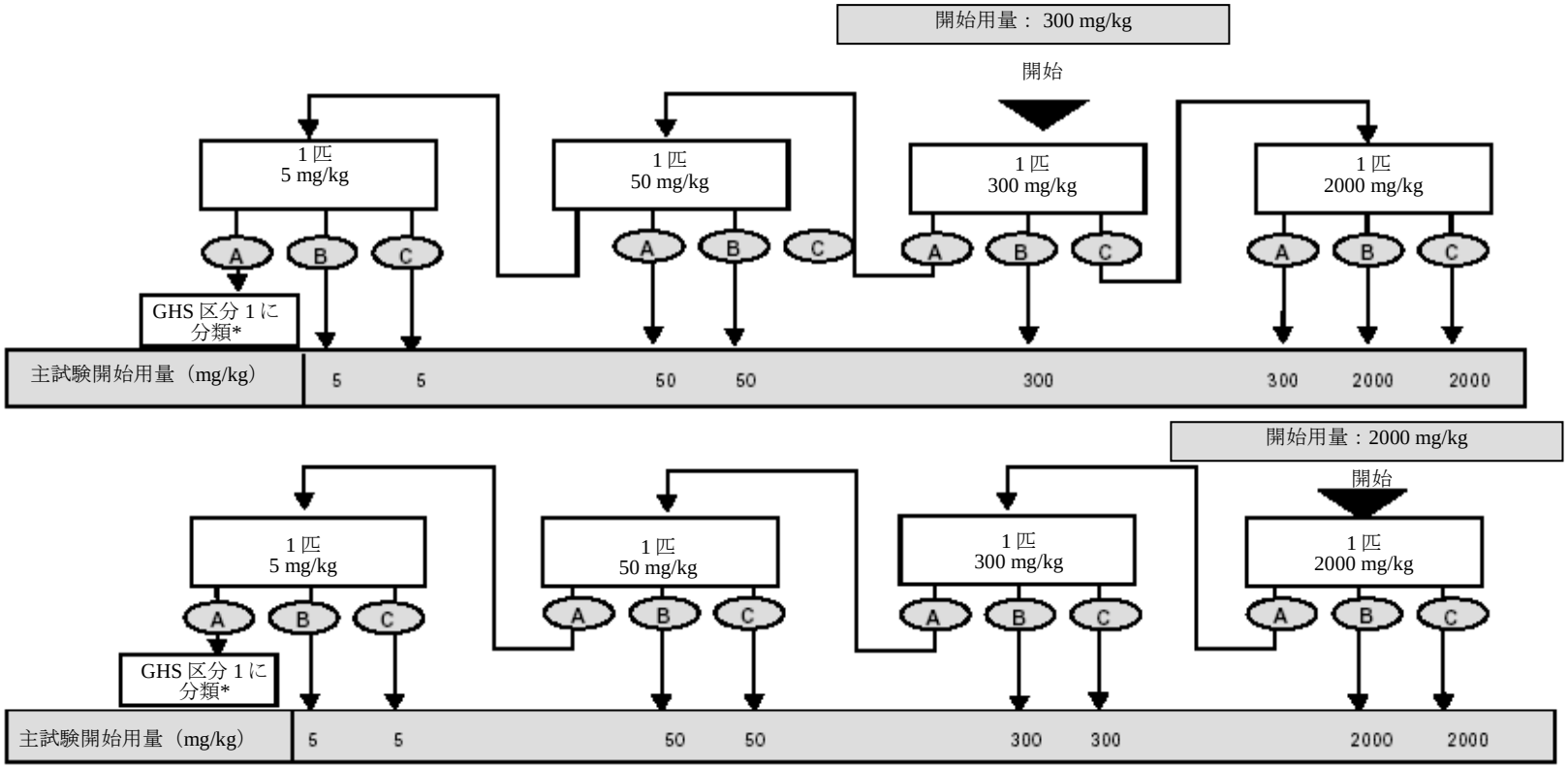
A 死亡

B 明らかな毒性

C 無毒性

*5 mg/kg の結果が A の場合には、GHS 区分を確認するための任意の補足的手順がある（20 段落参照）。

補遺 2：見当付け試験のフローチャート



結果

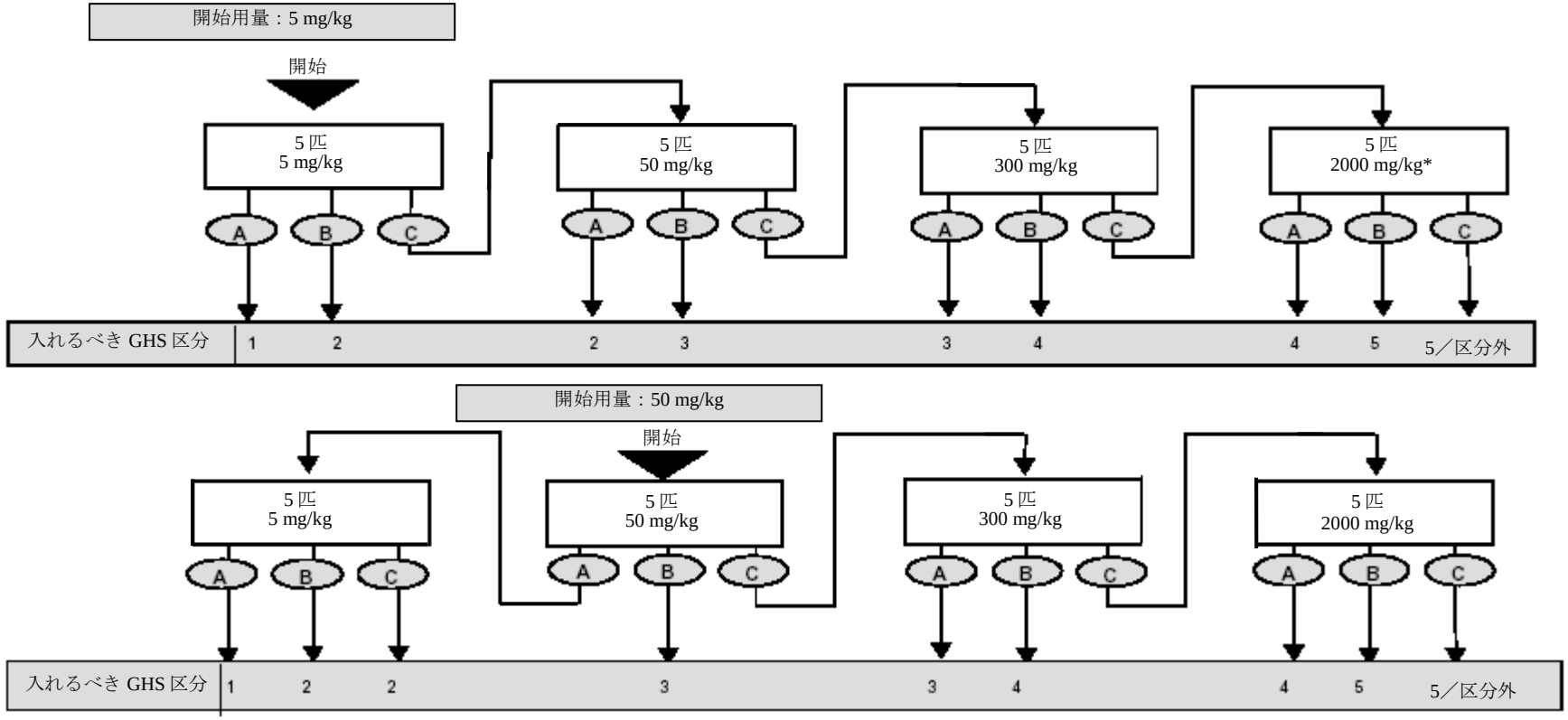
A 死亡

B 明らかな毒性

C 無毒性

*5 mg/kg の結果が A の場合には、GHS 区分を確認するための任意の補足的手順がある（20 段落参照）。

補遺 3：主試験のフローチャート



結果

A 2 匹以上の死亡

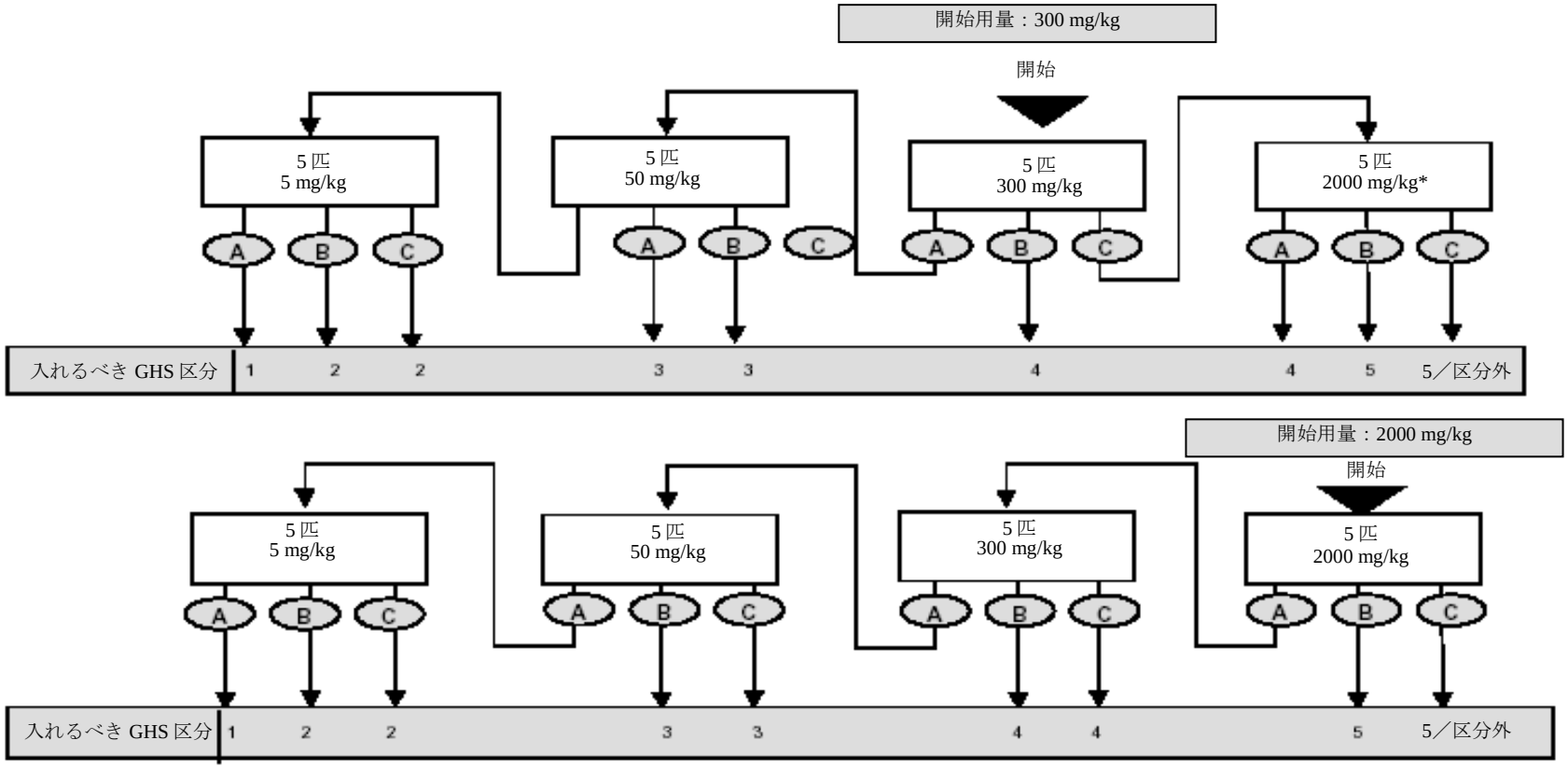
B 「1 匹の死亡」、「1 匹以上の明らかな毒性」、または「1 匹の死亡および 1 匹以上の明らかな毒性」

C 無毒性

各群の動物数
主試験の各群 5 匹には、見当付け試験で当該用量を投与した 1 匹を含む。

動物愛護の優先
*見当付け試験においてこの投与用量で死亡がみられた場合には、それ以上動物に投与せず、直接結果 A に進む。

補遺 3：主試験のフローチャート



結果

A 2 匹以上の死亡

B 「1 匹の死亡」、「1 匹以上の明らかな毒性」、または「1 匹の死亡および 1 匹以上の明らかな毒性」

C 無毒性

各群の動物数
主試験の各群 5 匹には、見当付け試験で当該用量を投与した 1 匹を含む。

動物愛護の優先
*見当付け試験においてこの投与用量で死亡がみられた場合には、それ以上動物に投与せず、直接結果 A に進む。

補遺4

試験を必要とせずに被験物質を推定LD_{50}値2000 mg/kg超と分類するための基準

1. 有害性区分5の判定基準は急性毒性の有害性は比較的低いが、ある状況下では高感受性集団に対して危険を及ぼすような物質を識別できるようにすることを目的としている。こうした物質は、経口または経皮LD_{50}値が2000～5000 mg/kg、また他の経路でも同程度の投与量であると推定されている。被験物質は以下のような場合に、「2000 mg/kg < LD_{50} < 5000 mg/kg」と定義される有害性区分（GHS区分5）に分類される。

a） この区分に該当することが補遺3に示す試験計画のいずれかで死亡率から示された場合

b） LD_{50}が区分5の範囲内にあることを示す信頼できる証拠が既に得られている場合、またその他の動物試験やヒトにおける毒性影響から、ヒトの健康に対する急性的な懸念が示唆される場合

c) データの外挿、推定または測定から、より有害性の高い区分へ分類されないことが確かで、かつ、
- ヒトにおける意味のある毒性影響を示唆する信頼できる情報が得られている場合、または
- 経口により区分 4 の数値に至るまで試験したときに 1 匹でも死亡が認められた場合、または
- 区分 4 の数値に至るまで試験したとき、専門家の判断により意味のある毒性症状（下痢、立毛、不十分な毛づくろいは除く）が確認された場合、または
- 専門家の判断により、その他の動物試験から意味のある急性作用の可能性を示す信頼できる情報があると確認された場合。

2000 mg/kg超の投与用量での試験

2. 例外として、かつ特定の規制上の必要性から正当であると認められる場合に限り、より高い固定用量である 5000 mg/kg の追加を検討することがある。しかし、動物愛護の必要性を考慮すると、5000 mg/kg での試験は勧められず、そのような試験は、その結果がヒトや動物の健康の保護に直接関係している可能性が非常に高い場合にのみ検討されるべきである(9)。

見当付け試験

3. 補遺2に示す段階的方法に適用されている決定規則を5000 mg/kgの投与用量を含むように拡張する。すなわち、見当付け試験の開始投与用量を5000 mg/kgとした場合、結果がA（死亡）であれば、2匹目の動物について2000 mg/kgで試験する必要がある。結果BまたはC（明らかな毒性または無毒性）であれば、主試験の開始投与用量として5000 mg/kgを設定できる。同様に、開始投与用量を5000 mg/kgとしなかった場合、2000 mg/kgでの結果がBまたはCであれば、試験は5000 mg/kgに進む。その結果、5000 mg/kgでの結果がAであれば、主試験の開始投与用量は2000 mg/kgに決定し、結果がBまたはCであれば、主試験の開始投与用量は5000 mg/kgに決定する。

主試験

4. 補遺3に示す段階的方法に適用されている決定規則を5000 mg/kgの投与用量を含むように拡張する。すなわち、主試験の開始投与用量を5000 mg/kgとした場合、結果がA（2匹以上の死亡）であれば、2番目の群について2000 mg/kgで試験する必要がある。結果がB（「1匹の死亡」、「1匹以上の明らかな毒性」、または「1匹の死亡および1匹以上の明らかな毒性」）またはC（無毒性）であれば、その物質はGHSでは区分外となる。

同様に、開始投与用量を5000 mg/kgとしなかった場合、2000 mg/kgでの結果がCであれば、試験は5000 mg/kgに進む。その結果、5000 mg/kgでの結果がAであれば、その物質はGHS区分5となり、結果がBまたはCであれば、その物質は区分外となる。