

2003年 9月29日

#### 4 - メチル安息香酸のラットを用いる 急性経口投与毒性試験

厚生労働省医薬局審査管理課化学物質安全対策室 委託

財団法人食品薬品安全センター

秦野研究所

## 【 目 次 】

要 約 .....	1
試験目的 .....	2
材料および方法 .....	3
1. 被験物質 .....	3
2. 使用動物および飼育条件 .....	3
3. 群分けおよび個体識別 .....	4
4. 投与検体の調製 .....	4
5. 投与量、群構成および投与方法 .....	5
6. 観察方法 .....	6
7. データの解析 .....	7
結 果 .....	8
1. 死亡動物および一般状態 .....	8
2. 体重推移 .....	8
3. 病理学検査 .....	9
考 察 .....	10
文 献 .....	11

Figs. 1, 2

Tables 1-1~4

## 【 要 約 】

Sprague-Dawley 系 (Crj:CD) ラットの雌雄 (各 5 匹/群) に、4-メチル安息香酸 (MBA と略記) の 0 (媒体対照、0.5 % CMC Na 水溶液)、1000、1500 および 2000 mg/kg を 5 mL/kg の容量で単回経口投与し、投与日 (観察第 1 日) から 14 日間観察を行った。その間、体重を測定して対照群と比較し、観察第 15 日に屠殺して剖検した。

その結果、観察期間中に死亡動物は認められず瀕死動物もなかった。1500 mg/kg までの用量の MBA を単回経口投与しても雌雄の一般状態を変化させなかった。2000 mg/kg 投与により雌雄の一部に自発運動低下が認められたが翌日までに回復した。自発運動低下が認められた雌では投与翌日に排便量の減少が認められた。観察 3 日以降に一般状態の異常を認める例はなかった。1500 mg/kg 以上の投与量により雌では投与翌日までの体重増加量が軽度抑制された。しかし、その後、増加に転じ、観察 4~8 日の体重増加量が対照群に比べ有意な高値を示した。また、雄には MBA の用量に依存した体重増加抑制は認められなかった。病理学検査では、いずれの動物にも肉眼的異常所見は認められなかった。

以上の結果より、1000 mg/kg 以下の MBA の単回経口投与は雌雄の動物に影響を及ぼさず、2000 mg/kg を投与しても死亡させないと結論される。

## 【 試験目的 】

OECD による既存化学物質の安全性点検に係わる毒性調査事業の一環として、4-メチル安息香酸の急性経口投与毒性試験を実施したので、その結果を報告する。

本試験は、OECD 化学物質試験法ガイドライン「[401]急性経口毒性試験」(1987 年 2 月 24 日採択)および「化学物質 GLP」(平成 12 年 3 月 1 日改正、環保安第 41 号、生衛発第 268 号、平成 12・02・14 基局第 1 号)に準拠して実施した。

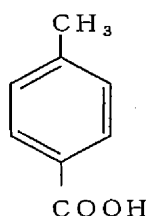
## 【 材料および方法 】

### 1. 被験物質

4-メチル安息香酸 (MBA と略記) は、英名: benzoic acid, 4-methyl-, 別名: パラトルイル酸、CAS No.: 99-94-5、分子式:  $C_8H_8O_2$ 、分子量: 136.15、融点: 180-181°C、沸点: 274-275°C、比重: 1.278 (25°C) の白色結晶性粉末で、下図に示した構造を有する。

本試験には、 から提供を受けた MBA (ロット番号: 純度: 98.85 % (分析値)、不純物: 水分 0.01 % および灰分 0.01 %) を用い、使用時まで室温保管した。本試験に使用した被験物質については、投与終了後に東レ株式会社に返却し、再分析して使用期間中の安定性を確認した (Table A)。

#### 図 構造式



### 2. 使用動物および飼育条件

試験には、日本チャールス・リバー株式会社厚木飼育センター生産の Sprague-Dawley (SD) 系 [Crj:CD (SD) IGS, SPF] ラットを使用した。雌雄動物は4週齢で購入し、入荷日を含む7日間、検疫と馴化を兼ねて飼育し、その間、外観および一般状態を観察して異常の認められなかった動物を使用した。動物の使用状況は Table B に示した。

各動物は、許容温湿度各 21.0~25.0°C および 40.0~75.0%、換気回数約 15 回/時間、照明 12 時間 (7時~19 時点灯) に制御された飼育室で、金属製金網床ケージ (220w × 270d × 190h mm) に個別に収容して飼育し、飲料水 (水道水、秦野市水道局給水) を自由に摂取させた。固形飼料 (CE-2、日本クレア株式会社) は、投与前日の 16 時以降、投与後 3 時間までの絶食時間以外は、自由に摂取させた。

試験期間中、秦野研究所中央温湿度監視装置により測定した飼育室の温度は 21.5~

24.0℃であり、相対湿度は、50.5～62.0%と許容範囲内の値であった。使用した飼料および水についても試験に支障を来す可能性の考えられる混入物はなかった。

### 3. 群分けおよび個体識別

雌雄とも、検疫終了時の測定体重をもとに体重別層化無作為抽出法により群分けした。群分けした動物には一連の動物番号を割り当て、フェルトペンで尾に動物番号を標識して個体を識別した。また、飼育ケージには、群ごとに色彩の異なった動物カードを掛け、これに試験計画番号、性別、群（投与量）および動物番号を記入して識別した。

### 4. 投与検体の調製

投与検体は、各濃度毎に被験物質を秤量し、乳鉢で磨砕後、0.5 % カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC Na) 水溶液を加え、ミキサー（商品名：あわとり練太郎）で攪拌して所定濃度（20、30 および 40% (w/v)）に調製した。いずれの用量においても投与液量が 5 mL/kg 体重になるように各濃度の投与検体を調製した。投与検体の調製に用いた CMC Na 水溶液はカルメロースナトリウム（製造元：丸石製薬株式会社、製造番号：2115）を注射用水（製造元：光製薬株式会社、製造番号：A106AA）に溶解して調製した。

投与検体の安定性については、投与に先立ち、0.1 および 20% (w/v) の調製検体について、冷蔵条件下における 8 日間の安定性を確認し、40% (w/v) の調製検体について、同条件下における 3 日間の安定性を確認した (Table C)。また、投与前日に、各濃度の調製検体について被験物質の含量測定および均一性試験を実施し、投与検体には所定量の MBA が均一に含まれていることを以下の高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法により確認した (Tables D, E)。

### 測定方法

各調製検体の 1 mL を採取し、メタノールで一定量とした後、メタノールで適宜希釈して試料溶液を調製した。別に、被験物質を必要量秤取し、メタノールに溶解して標準溶液 (2～10 μg/mL) を調製した。試料溶液および標準溶液を HPLC 法により測定し、標準溶液から作成する検量線を用いて濃度を求めた。

## 測定条件

分析カラム : Inertsil ODS-2

(内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒子径 5  $\mu\text{m}$ 、ジーエルサイエンス(株))

移動相 : 0.1%リン酸/アセトニトリル (6:4 v/v)

流速 : 1.0 mL/min

カラム温度 : 40°C

検出波長 : 254 nm

試料注入量 : 10  $\mu\text{L}$

## 5. 投与量、群構成および投与方法

本試験の投与量は、4-メチル安息香酸のラットを用いる急性経口投与毒性試験予備試験（試験計画番号：R-01-068、以下、予備試験と略記）の結果に基づいて決定した。すなわち、文献検索の結果、被験物質のラット経口投与時の 50%致死量は 400 mg/kg であった<sup>1)</sup>ことから、本試験に使用するのと同系統および同週齢の雌雄ラット各 3 匹に、絶食下で 250、500、および 1000 mg/kg を単回投与し（観察第 1 日）、観察第 8 日まで生死および一般状態を観察し、体重を測定した。その結果死亡例はなく、1000 mg/kg 投与群において、投与日（観察第 1 日）に立毛、自発運動低下が観察され、観察 1~2 日の体重増加抑制が認められたのみであった。以上のことから、本試験では、OECD 化学物質試験法ガイドラインに定める限度用量における毒性変化、ならびに予備試験において死亡が認められなかった用量における毒性変化を調べるために、雌雄両性を用いて、高用量には、2000 mg/kg を設定し、以下、1500 および 1000 mg/kg を中用量および低用量に設定した。また、媒体投与群を設定し、これと MBA 投与群における毒性変化および体重増加を比較した。

動物は、投与前日の 16 時から絶食させた。投与直前に体重を測定し、体重 1 kg 当たり 5 mL/kg の投与容量になるように投与液量を算出しラット用胃管を用いて 9 時から 12 時の間に単回経口投与した。給餌は投与後約 3 時間に行った。

各群の投与物質、投与量、濃度、投与容量および動物番号は以下の通りである。なお、対照群に振り分けられた雄の 1 例（動物番号：2）は投与前の一般状態観察時に右腰部に脱

毛が認められた。本例の全身状態に異常は認められなかったことから、試験の結果に影響を及ぼすことはないと判断し、試験に使用した。また、本例に認められた右腰部の脱毛は、投与前から認められた変化であることから、試験の評価から除外した。

群	投与物質	投与量 (mg/kg)	濃度 (% (w/v))	投与容量* (mL/kg)	動物番号	
					雄	雌
1	0.5 % CMC Na 水溶液	0	0	5	1～5	21～25
2	MBA	1000	20	5	6～10	26～30
3	MBA	1500	30	5	11～15	31～35
4	MBA	2000	40	5	16～20	36～40

## 6. 観察方法

### 1) 一般状態の観察

雌雄とも、全例について、投与日（観察第1日）は投与後約1時間にわたり継続的に観察し、その後は約1時間毎に投与後6時間まで観察した。観察第2日以降は、毎日1回観察した。

### 2) 体重測定

全例について、投与日の投与直前、観察第2、4、8、11および15日に測定した。

### 3) 病理学検査

観察第15日にペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血・致死させてから剖検し、脳、下垂体、眼球、甲状腺、心臓、気管、肺、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、副腎、消化管、生殖器、乳腺、膀胱、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、大腿骨骨髓、膵臓、顎下腺、舌、食道、大動脈、ハーダー腺および皮膚の肉眼的観察を実施した。また、各群で動物番号の若い雌雄のそれぞれ1例ずつについて、主要器官・組織（脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、消化管）を0.1 M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液に固定保存した。固定保存器官の組織学検査は実施しなかった。



## 7. データの解析

体重については、各群の平均値および標準偏差値を算出した。まず、Bartlett の等分散検定により、各群の分散の一様性について検定を行った。分散が一様である場合には、一元配置型分散分析<sup>2)</sup>を行い、群間に有意性が認められる場合は、Dunnett<sup>3)</sup>の多重比較により、対照群と比較した。一方、いずれかの群で分散が0となる場合および分散が一様でない場合には、Kruskal-Wallis<sup>4)</sup>の順位検定を行い、対照群と比較した。全ての検定における有意水準は5%とした。

## 【 結 果 】

### 1. 死亡動物および一般状態 (Table 1)

死亡動物はいずれの投与群にも認められなかった。

雌雄ともに 1500 mg/kg 以下の投与群の動物に一般状態の異常は認められなかった。

2000 mg/kg 投与群では雌 1 例 (動物番号: 36) の投与後 1 時間に軟便が観察された。また、同群の雄 2 例 (動物番号: 19、20) および雌 1 例 (動物番号: 40) には、投与後 3 時間に自発運動低下が認められた。これらの動物のうち、雄はいずれも約 1 時間後の投与後 4 時間に回復が認められたが、雌の例は投与後 6 時間の観察終了時まで継続して認められた。観察第 2 日には自発運動低下は認められなくなったが、排便量の減少が認められた。

### 2. 体重推移

#### 1) 雄 (Fig. 1; Tables 2-1, 2, 3)

1500 mg/kg 投与群において投与日から観察第 2 日および 4 日までの増加量が対照群に比べ有意な ( $p < 0.05$ ) 低値を示したが、2000 mg/kg 投与群では対照群との間に有意差は認められなかった。観察第 2 日以降の体重増加については、対照群と MBA 各投与群との間に有意差は認められなかった。

#### 2) 雌 (Fig. 2; Tables 3-1, 2, 3)

1500 mg/kg 投与群では、観察第 1~4 日における累積体重増加量が低値の傾向を示した。その後、増加に転じ、観察第 4~8 日の増加量は有意な ( $p < 0.05$ ) 高値を示した。

2000 mg/kg 投与群では、投与日に比べて観察第 2 日の体重が減少した例 (動物番号: 40) もあり、観察第 2 日の体重および観察第 4 日までの累積体重増加量は低値の傾向を示した。しかし、観察第 2 日における体重および増加量のいずれも対照群との間に有意差は認められなかった。その後、これらの例の体重は順調に増加し、観察第 4~8 日の増加量は対照群と比べて有意 ( $p < 0.05$ ) な高値を示した。

### 3. 病理学検査 (Table 3)

雌雄いずれの例においても肉眼的異常所見は認められなかった。

## 【 考 察 】

2000 mg/kg までの MBA を投与しても死亡例はなく、瀕死に至る例もなかった。MBA のラットに対する経口投与による 50%致死量は 400 mg/kg とされている<sup>1)</sup> が、本試験から 2000 mg/kg を超える量であることが明らかとなった。MBA を 10%アラビアゴム液に懸濁して、絶食下の Wistar 系のラットに単回経口投与した試験<sup>5)</sup> では、死亡は 1250 mg/kg 以上の投与群で認められ、ラットに対する経口投与による 50%致死量は雄では 3113 mg/kg、雌では 2115 mg/kg と算出されている。本試験では 2000 mg/kg を投与しても死亡が認められず、50%致死量はさらに高いものと推測される。

1000 mg/kg までの用量では、MBA 投与による影響は認められなかった。

一般状態の変化として、2000 mg/kg 投与群では、投与後 3 時間に雌雄の動物に自発運動低下が認められた。前述の Wistar 系ラットを用いた急性毒性試験においても中枢神経系に対する軽度の麻痺作用を基礎作用とする静穏、挙動緩慢、自発運動減少および四肢脱力などが認められ、これらが時間の経過とともに強度となり、死に到ると報告されている。従って、軽度ではあるが本試験で認められた自発運動低下は MBA 投与に起因した変化であると考えられる。

対照群との間に有意差は認められなかったが、1500 mg/kg 以上の投与群の雌において投与翌日までの体重増加がやや抑制された。2000 mg/kg 投与群において体重減少の認められた例には投与日に自発運動低下が認められていることから、雌における体重増加抑制は MBA 投与に起因した変化であると考えられる。その後、体重増加抑制は回復し、これらの投与群では観察第 4~8 日の体重増加量は対照群と比べ有意な高値を示した。雄では 1500 mg/kg 投与群において観察第 1~2 および 1~4 日における体重増加量が有意に抑制されたが、その他の観察項目において異常が認められなかったこと、用量依存性がなかったことから偶発的变化であると考えられる。

2000 mg/kg 投与群の雌 1 例に投与後、軟便が認められた。しかし、軟便は一過性であったこと、ならびに Wistar 系ラットに MBA を単回経口投与した試験では、致死量を投与しても下痢や軟便などの症状が認められていないことから、MBA 投与に起因した変化ではないと考えられる。

以上の結果より、1000 mg/kg 以下の MBA の単回経口投与は雌雄の動物に影響を及ぼさず、2000 mg/kg を投与しても死亡させないと結論される。

【 文 献 】

- 1) NTP Chemical Repository *p*-Toluic acid, Chemical Health Safety Information, National Toxicology Program (2002)
- 2) 佐久間昭：薬効評価—計画と解析、東京大学出版会、東京（1977）.
- 3) Dunnett, C. W. : New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20: 482-491 (1964).
- 4) Kruskal, W. H., Wallis, W. A. : Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 47: 583-621 (1952).
- 5) 峯下 鍊雄, 沖野 勲, 油井 良文, 古川 茂典, 若林 啓子 : 基礎と臨床, 12(8), 79, 1978

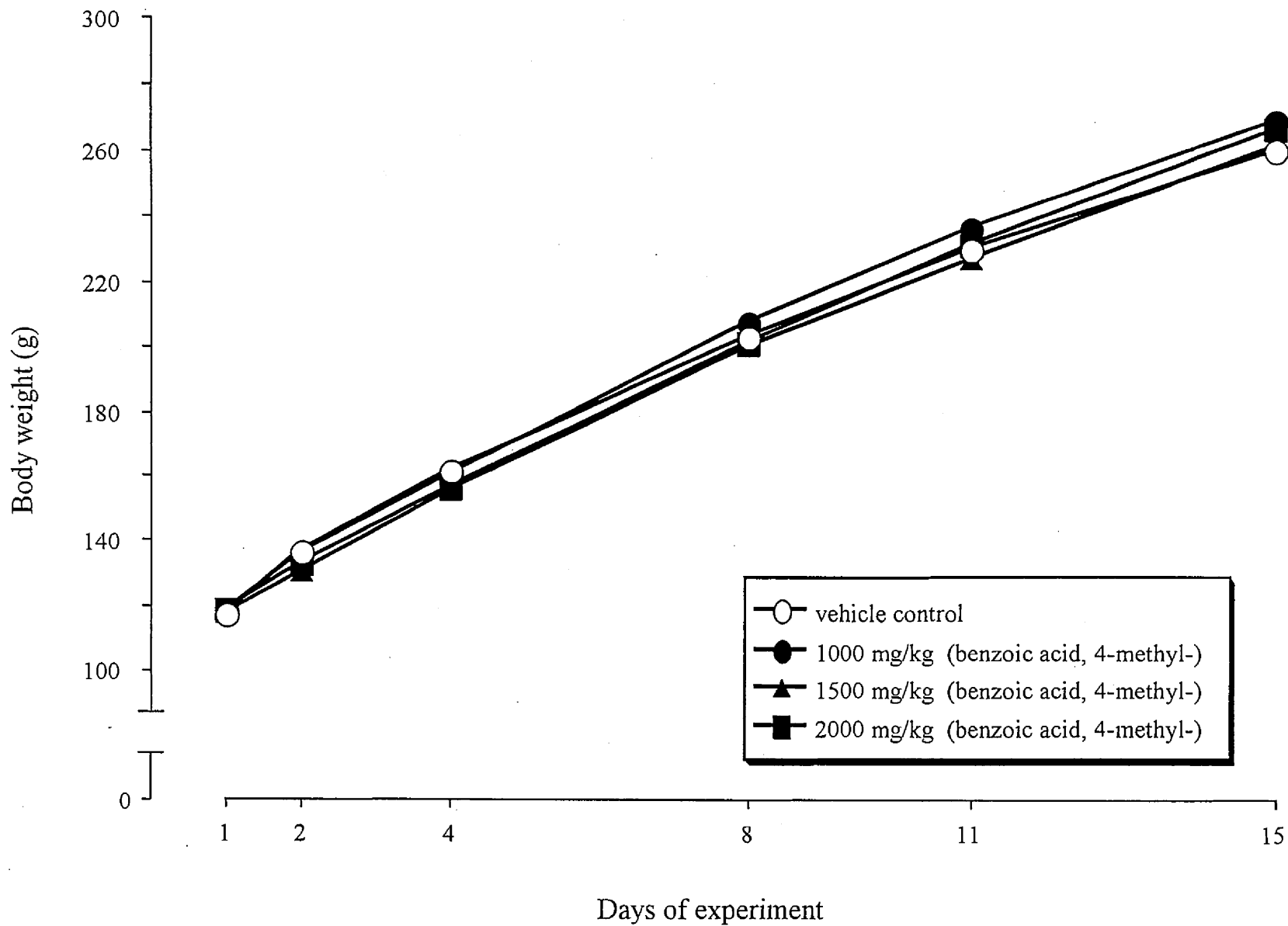


Fig.1 Body weight changes in males

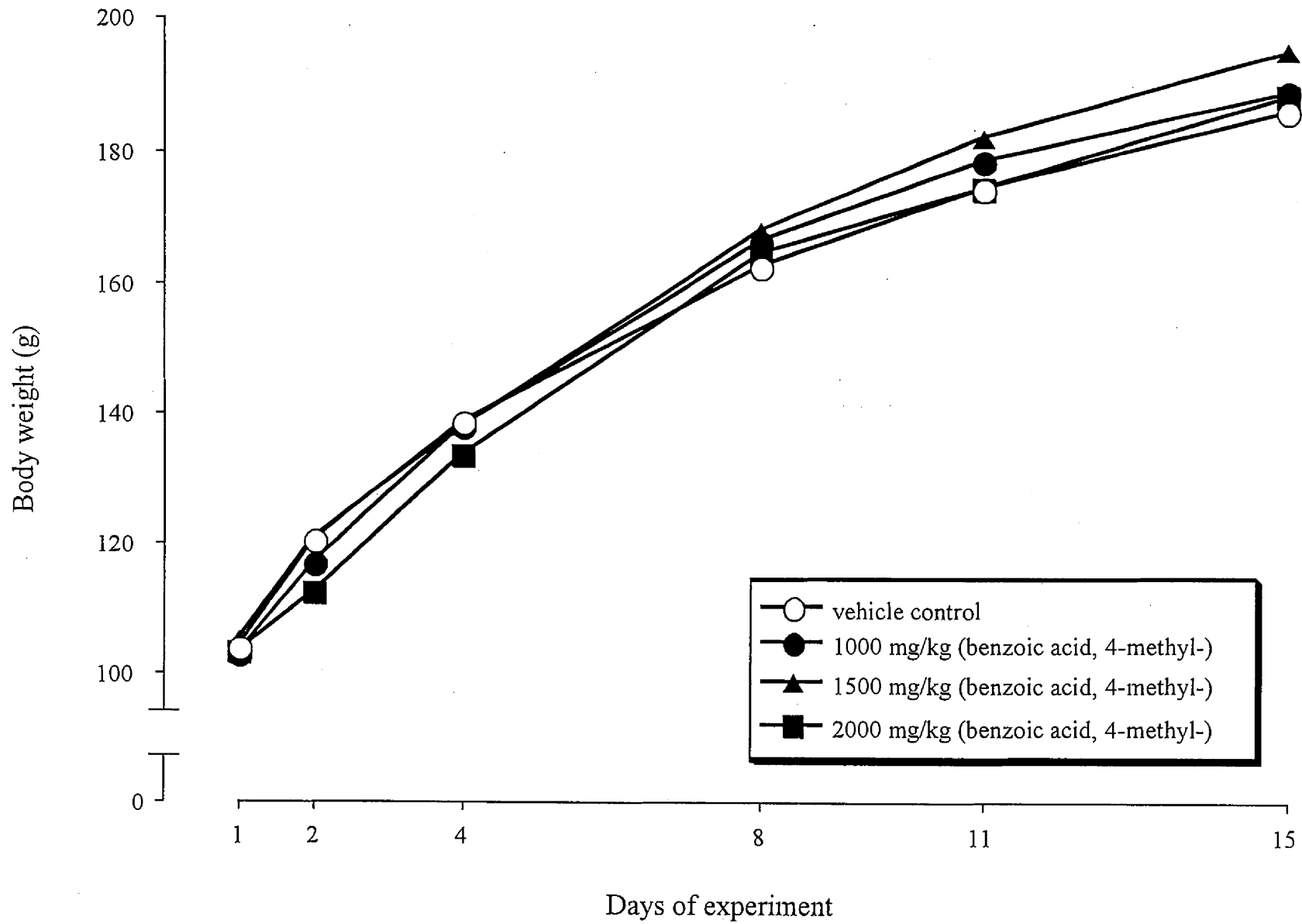


Fig.2 Body weight changes in females

Table 1-1

Acute oral toxicity test of benzoic acid, 4-methyl- in rats

Clinical findings in males

Dose (mg/kg)	Animal No.	Clinical findings	Experimental days																			
			1						2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
			~1	~2	~3	~4	~5	~6 hrs														
0 <sup>a)</sup>	1~5	Abnormality	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1000	6~10	Abnormality	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1500	11~15	Abnormality	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	16	Abnormality	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	17	Abnormality	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2000	18	Abnormality	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	19	Decrease in locomotor activity	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	Decrease in locomotor activity	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Day 1, The day of administration

a), 0.5 % CMC Na solution

-, not observed

+, observed



Table 1-2

Acute oral toxicity test of benzoic acid, 4-methyl- in rats

Clinical findings in females

Dose (mg/kg)	Animal No.	Clinical findings	Experimental days																			
			1						2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
			~1	~2	~3	~4	~5	~6 hrs														
0 <sup>a)</sup>	21~25	Abnormality	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1000	26~30	Abnormality	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1500	31~35	Abnormality	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	36	Loose stool	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	37	Abnormality	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2000	38	Abnormality	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	39	Abnormality	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	40	Decrease in locomotor activity	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Decrease of fecal volume	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Day 1, The day of administration  
a).0.5 % CMC Na solution-, not observed  
+, observed

Table 2-1

Acute oral toxicity test of benzoic acid, 4-methyl- in rats

Body weight changes in males (g)

Dose (mg/kg)	Animal no.	Experimental days					
		1	2	4	8	11	15
0 <sup>a)</sup>	1	117.6	135.8	162.1	203.3	226.6	253.4
	2	118.4	138.8	161.6	199.5	223.9	252.5
	3	116.1	131.8	156.6	197.6	223.4	256.0
	4	118.3	135.0	161.8	203.5	231.1	259.8
	5	116.3	139.5	162.9	209.1	240.3	274.1
	Mean	117.3	136.2	161.0	202.6	229.1	259.2
	±S.D.	1.1	3.1	2.5	4.4	7.0	8.8
N	5	5	5	5	5	5	
1000	6	119.1	136.6	160.9	211.2	244.8	278.9
	7	120.4	139.9	168.2	217.7	249.3	285.3
	8	114.1	132.4	154.3	198.9	222.3	248.5
	9	115.1	134.8	156.0	201.8	226.6	257.0
	10	120.1	135.4	159.3	205.4	234.7	270.8
	Mean	117.8	135.8	159.7	207.0	235.5	268.1
	±S.D.	2.9	2.7	5.4	7.5	11.5	15.2
N	5	5	5	5	5	5	
1500	11	115.9	125.6	148.2	189.9	217.7	251.1
	12	117.5	123.7	150.8	193.0	222.2	256.3
	13	122.6	138.5	164.1	214.3	240.3	276.0
	14	116.9	128.4	152.5	197.4	222.4	256.8
	15	115.1	133.9	158.6	202.8	229.7	263.2
	Mean	117.6	130.0	154.8	199.5	226.5	260.7
	±S.D.	2.9	6.1	6.4	9.6	8.9	9.6
N	5	5	5	5	5	5	
2000	16	122.6	138.6	160.4	208.3	237.8	280.1
	17	116.3	128.0	149.1	195.1	227.9	259.3
	18	118.3	132.3	162.2	209.3	237.0	275.3
	19	122.6	137.0	161.1	199.3	230.3	263.7
	20	112.2	125.9	148.4	192.5	219.6	249.4
	Mean	118.4	132.4	156.2	200.9	230.5	265.6
	±S.D.	4.4	5.5	6.9	7.6	7.4	12.3
N	5	5	5	5	5	5	

Day 1, the day of administration

a), 0.5 % CMC Na solution

Table 2-2

Acute oral toxicity test of benzoic acid, 4-methyl- in rats

Body weight gain in males (g)

Dose (mg/kg)	Animal no.	Experimental days				
		1~2	2~4	4~8	8~11	11~15
0 <sup>a)</sup>	1	18.2	26.3	41.2	23.3	26.8
	2	20.4	22.8	37.9	24.4	28.6
	3	15.7	24.8	41.0	25.8	32.6
	4	16.7	26.8	41.7	27.6	28.7
	5	23.2	23.4	46.2	31.2	33.8
	Mean	18.8	24.8	41.6	26.5	30.1
	±S.D.	3.0	1.7	3.0	3.1	3.0
N	5	5	5	5	5	
1000	6	17.5	24.3	50.3	33.6	34.1
	7	19.5	28.3	49.5	31.6	36.0
	8	18.3	21.9	44.6	23.4	26.2
	9	19.7	21.2	45.8	24.8	30.4
	10	15.3	23.9	46.1	29.3	36.1
	Mean	18.1	23.9	47.3	28.5	32.6
	±S.D.	1.8	2.8	2.5	4.4	4.2
N	5	5	5	5	5	
1500	11	9.7	22.6	41.7	27.8	33.4
	12	6.2	27.1	42.2	29.2	34.1
	13	15.9	25.6	50.2	26.0	35.7
	14	11.5	24.1	44.9	25.0	34.4
	15	18.8	24.7	44.2	26.9	33.5
	Mean	12.4*	24.8	44.6	27.0	34.2
	±S.D.	5.0	1.7	3.4	1.6	0.9
N	5	5	5	5	5	
2000	16	16.0	21.8	47.9	29.5	42.3
	17	11.7	21.1	46.0	32.8	31.4
	18	14.0	29.9	47.1	27.7	38.3
	19	14.4	24.1	38.2	31.0	33.4
	20	13.7	22.5	44.1	27.1	29.8
	Mean	14.0	23.9	44.7	29.6	35.0
	±S.D.	1.5	3.5	3.9	2.3	5.2
N	5	5	5	5	5	

Day 1, the day of administration

a), 0.5 % CMC Na solution

\*, significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$

Table 2-3

Acute oral toxicity test of benzoic acid, 4-methyl- in rats

Cumulative body weight gain in males (g)

Dose (mg/kg)	Animal no.	Experimental days				
		1~2	1~4	1~8	1~11	1~15
0 <sup>a)</sup>	1	18.2	44.5	85.7	109.0	135.8
	2	20.4	43.2	81.1	105.5	134.1
	3	15.7	40.5	81.5	107.3	139.9
	4	16.7	43.5	85.2	112.8	141.5
	5	23.2	46.6	92.8	124.0	157.8
	Mean	18.8	43.7	85.3	111.7	141.8
	±S.D.	3.0	2.2	4.7	7.4	9.4
N	5	5	5	5	5	
1000	6	17.5	41.8	92.1	125.7	159.8
	7	19.5	47.8	97.3	128.9	164.9
	8	18.3	40.2	84.8	108.2	134.4
	9	19.7	40.9	86.7	111.5	141.9
	10	15.3	39.2	85.3	114.6	150.7
	Mean	18.1	42.0	89.2	117.8	150.3
	±S.D.	1.8	3.4	5.4	9.1	12.5
N	5	5	5	5	5	
1500	11	9.7	32.3	74.0	101.8	135.2
	12	6.2	33.3	75.5	104.7	138.8
	13	15.9	41.5	91.7	117.7	153.4
	14	11.5	35.6	80.5	105.5	139.9
	15	18.8	43.5	87.7	114.6	148.1
	Mean	12.4*	37.2*	81.9	108.9	143.1
	±S.D.	5.0	5.0	7.7	6.9	7.5
N	5	5	5	5	5	
2000	16	16.0	37.8	85.7	115.2	157.5
	17	11.7	32.8	78.8	111.6	143.0
	18	14.0	43.9	91.0	118.7	157.0
	19	14.4	38.5	76.7	107.7	141.1
	20	13.7	36.2	80.3	107.4	137.2
	Mean	14.0	37.8	82.5	112.1	147.2
	±S.D.	1.5	4.0	5.8	4.9	9.4
N	5	5	5	5	5	

Day 1, the day of administration

a), 0.5 % CMC Na solution

\*, significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$

Table 3-1

Acute oral toxicity test of benzoic acid, 4-methyl- in rats

Body weight changes in females (g)

Dose (mg/kg)	Animal no.	Experimental days					
		1	2	4	8	11	15
0 <sup>a)</sup>	21	101.5	114.3	135.3	157.9	165.2	178.1
	22	106.7	123.9	143.9	170.0	182.1	192.7
	23	103.9	122.2	137.2	157.5	170.4	181.7
	24	100.3	119.0	140.3	163.9	177.0	186.5
	25	106.9	121.9	135.2	161.1	176.0	188.3
	Mean	103.9	120.3	138.4	162.1	174.1	185.5
	±S.D.	3.0	3.8	3.7	5.1	6.5	5.7
N	5	5	5	5	5	5	
1000	26	102.9	117.3	137.6	166.6	177.2	190.3
	27	101.9	118.3	138.3	167.8	179.2	190.9
	28	104.0	117.6	142.0	170.6	181.9	191.6
	29	105.4	117.8	139.0	163.7	174.9	179.9
	30	100.1	113.6	132.2	162.4	176.9	188.1
	Mean	102.9	116.9	137.8	166.2	178.0	188.2
	±S.D.	2.0	1.9	3.6	3.3	2.7	4.8
N	5	5	5	5	5	5	
1500	31	107.5	128.6	144.0	175.6	196.0	211.3
	32	103.8	112.6	131.8	165.8	178.2	194.1
	33	101.1	116.0	129.7	155.0	170.4	181.0
	34	107.6	126.5	145.1	180.7	193.8	206.4
	35	105.1	118.6	138.5	161.7	169.4	178.5
	Mean	105.0	120.5	137.8	167.8	181.6	194.3
	±S.D.	2.7	6.9	7.0	10.4	12.7	14.7
N	5	5	5	5	5	5	
2000	36	102.3	115.8	135.3	169.6	177.2	190.5
	37	106.9	121.4	146.2	179.8	192.3	212.3
	38	102.2	118.1	137.5	164.1	174.1	185.2
	39	97.2	101.0	121.2	147.4	153.8	161.8
	40	107.4	105.5	126.7	159.2	173.3	188.4
	Mean	103.2	112.4	133.4	164.0	174.1	187.6
	±S.D.	4.2	8.7	9.7	12.0	13.7	18.0
N	5	5	5	5	5	5	

Day 1, the day of administration

a), 0.5 % CMC Na solution

Table 3-2

Acute oral toxicity test of benzoic acid, 4-methyl- in rats

Body weight gain in females (g)

Dose (mg/kg)	Animal no.	Experimental days				
		1~2	2~4	4~8	8~11	11~15
0 <sup>a)</sup>	21	12.8	21.0	22.6	7.3	12.9
	22	17.2	20.0	26.1	12.1	10.6
	23	18.3	15.0	20.3	12.9	11.3
	24	18.7	21.3	23.6	13.1	9.5
	25	15.0	13.3	25.9	14.9	12.3
	Mean	16.4	18.1	23.7	12.1	11.3
	±S.D.	2.5	3.7	2.4	2.9	1.3
N	5	5	5	5	5	
1000	26	14.4	20.3	29.0	10.6	13.1
	27	16.4	20.0	29.5	11.4	11.7
	28	13.6	24.4	28.6	11.3	9.7
	29	12.4	21.2	24.7	11.2	5.0
	30	13.5	18.6	30.2	14.5	11.2
	Mean	14.1	20.9	28.4	11.8	10.1
	±S.D.	1.5	2.2	2.2	1.5	3.1
N	5	5	5	5	5	
1500	31	21.1	15.4	31.6	20.4	15.3
	32	8.8	19.2	34.0	12.4	15.9
	33	14.9	13.7	25.3	15.4	10.6
	34	18.9	18.6	35.6	13.1	12.6
	35	13.5	19.9	23.2	7.7	9.1
	Mean	15.4	17.4	29.9*	13.8	12.7
	±S.D.	4.8	2.7	5.4	4.6	2.9
N	5	5	5	5	5	
2000	36	13.5	19.5	34.3	7.6	13.3
	37	14.5	24.8	33.6	12.5	20.0
	38	15.9	19.4	26.6	10.0	11.1
	39	3.8	20.2	26.2	6.4	8.0
	40	-1.9	21.2	32.5	14.1	15.1
	Mean	9.2	21.0	30.6*	10.1	13.5
	±S.D.	7.8	2.2	3.9	3.2	4.5
N	5	5	5	5	5	

Day 1, the day of administration

a), 0.5 % CMC Na solution

\*, significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$

Table 3-3

Acute oral toxicity test of benzoic acid, 4-methyl- in rats

Cumulative body weight gain in females (g)

Dose (mg/kg)	Animal no.	Experimental days				
		1~2	1~4	1~8	1~11	1~15
0 <sup>a)</sup>	21	12.8	33.8	56.4	63.7	76.6
	22	17.2	37.2	63.3	75.4	86.0
	23	18.3	33.3	53.6	66.5	77.8
	24	18.7	40.0	63.6	76.7	86.2
	25	15.0	28.3	54.2	69.1	81.4
	Mean	16.4	34.5	58.2	70.3	81.6
	±S.D.	2.5	4.4	4.9	5.6	4.5
N	5	5	5	5	5	
1000	26	14.4	34.7	63.7	74.3	87.4
	27	16.4	36.4	65.9	77.3	89.0
	28	13.6	38.0	66.6	77.9	87.6
	29	12.4	33.6	58.3	69.5	74.5
	30	13.5	32.1	62.3	76.8	88.0
	Mean	14.1	35.0	63.4	75.2	85.3
	±S.D.	1.5	2.3	3.3	3.4	6.1
N	5	5	5	5	5	
1500	31	21.1	36.5	68.1	88.5	103.8
	32	8.8	28.0	62.0	74.4	90.3
	33	14.9	28.6	53.9	69.3	79.9
	34	18.9	37.5	73.1	86.2	98.8
	35	13.5	33.4	56.6	64.3	73.4
	Mean	15.4	32.8	62.7	76.5	89.2
	±S.D.	4.8	4.4	7.9	10.5	12.7
N	5	5	5	5	5	
2000	36	13.5	33.0	67.3	74.9	88.2
	37	14.5	39.3	72.9	85.4	105.4
	38	15.9	35.3	61.9	71.9	83.0
	39	3.8	24.0	50.2	56.6	64.6
	40	-1.9	19.3	51.8	65.9	81.0
	Mean	9.2	30.2	60.8	70.9	84.4
	±S.D.	7.8	8.3	9.8	10.7	14.7
N	5	5	5	5	5	

Day 1, the day of administration

a), 0.5 % CMC Na solution

Table 4

Acute oral toxicity test of benzoic acid, 4-methyl- in rats

Macroscopic findings

Sex	Dose (mg/kg)	Animal No.	Findings
Male	0a)	1	No abnormality
		2	No abnormality
		3	No abnormality
		4	No abnormality
		5	No abnormality
	1000	6	No abnormality
		7	No abnormality
		8	No abnormality
		9	No abnormality
		10	No abnormality
	1500	11	No abnormality
		12	No abnormality
		13	No abnormality
		14	No abnormality
		15	No abnormality
2000	16	No abnormality	
	17	No abnormality	
	18	No abnormality	
	19	No abnormality	
	20	No abnormality	
Female	0a)	21	No abnormality
		22	No abnormality
		23	No abnormality
		24	No abnormality
		25	No abnormality
	1000	26	No abnormality
		27	No abnormality
		28	No abnormality
		29	No abnormality
		30	No abnormality
	1500	31	No abnormality
		32	No abnormality
		33	No abnormality
		34	No abnormality
		35	No abnormality
2000	36	No abnormality	
	37	No abnormality	
	38	No abnormality	
	39	No abnormality	
	40	No abnormality	

a), 0.5 % CMC Na solution