

最終報告書

3-メチル安息香酸のラットを用いる反復
経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験
(試験番号 97-081-2)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

目次

要約	1
緒言	2
目的	2
材料および方法	
1. 被験物質	2
2. 供試動物および飼育条件	3
3. 群分けおよび個体識別	3
4. 投与量の設定、試験群の構成および投与方法	3
5. 観察および検査	
1) 親動物に関する項目	
(1) 一般状態観察	4
(2) 体重および摂餌量測定	4
(3) 交配および分娩状態観察	4
(4) 臨床病理学検査	5
(5) 病理学検査	8
2) 新生児に関する項目	
(1) 産児数および性比の観察	9
(2) 外表異常および一般状態観察	9
(3) 体重測定	9
(4) 病理学検査	9
6. 統計処理	9
結果	
1. 反復投与毒性	
1) 死亡動物	10
2) 一般状態	10
3) 体重	10
4) 摂餌量	10
5) 雄の尿検査	10
6) 雄の血液学検査	10
7) 雄の血液生化学検査	11
8) 剖検	11
9) 器官重量	11
10) 病理組織学検査	11

2. 生殖発生毒性

1) 親動物に及ぼす影響

(1) 交尾率および受胎率	1 2
(2) 黄体数、着床数および着床率	1 2
(3) 出産率および妊娠期間	1 2
(4) 分娩および哺育状態	1 2

2) 新生児に及ぼす影響

(1) 生存性および体重	1 3
(2) 形態	1 3

考察および結論

1. 反復投与毒性	1 3
2. 生殖発生毒性	1 4
文献	1 5

添付資料

A. 図・群別平均値表

Figures 1, 2	体重	1
Figures 3, 4	摂餌量	3
Tables 1, 2	死亡率	5
Tables 3, 4	一般状態	7
Tables 5, 6	体重	9
Tables 7, 8	摂餌量	1 1
Table 9	尿検査	1 3
Table 10	血液学検査	1 5
Table 11	血液生化学検査	1 6
Tables 12, 13	剖検	1 7
Tables 14, 15	器官重量	1 9
Tables 16, 17	病理組織学検査	2 1
Table 18	生殖に及ぼす影響	2 7
Table 19	新生児に及ぼす影響	2 8
Table 20	新生児の外表検査	2 9
Table 21	新生児の内臓検査	3 0

要約

m-キシレンを酸化して製造され、感光色素、蛍光染料、防錆剤、顔料、農薬などに用いられている3-メチル安息香酸について、反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験を、SD系〔Crj:CD(SD)〕ラットを用い、0、30、100、300および1000mg/kg/day用量で実施した。動物は1群雌雄各10匹とし、被験物質は交配開始14日前から雄は44日間、雌は分娩後哺育3日(41-45日間)まで投与した。

1. 反復投与毒性

雄親について、1000mg/kg群で自発運動の低下、血液プロトロンビン時間の延長、血小板数の減少および血清GOTの増加が認められた。一方、雌親について、病理組織学検査において300mg/kg以上の群で肝細胞の空胞変性が認められ、1000mg/kg群では肝臓の絶対および相対重量の増加が認められた。

以上の結果から、3-メチル安息香酸のラットにおける主な反復投与毒性は肝臓に対する影響で、血液凝固系に対する影響も認められた。無影響量は雄で300mg/kg/day、雌で100mg/kg/dayと推定された。

2. 生殖発生毒性

雌雄親の生殖能および児動物の発生について、変化は認められなかった。したがって、雌雄親の生殖能および児動物の発生に対する無影響量は、1000mg/kg/dayと推定された。

緒言

3-メチル安息香酸は、感光色素、蛍光染料、防錆剤、顔料、農薬などに使用されている化学物質で、*m*-キシレンを酸化して製造される¹⁾。また、本被験物質は、*m*-キシレンの生体内中間代謝物として知られており²⁾、*m*-キシレンはラットへの反復投与により肝臓に対して毒性影響を有することが報告されている³⁾。しかし、3-メチル安息香酸の毒性については、単回経口投与毒性についての報告⁴⁾は認められるが、反復経口投与毒性および生殖発生毒性については明らかにされていない。

この試験は、OECDにおける高生産量既存化学物質の安全性点検プログラムの一環として、実施したものである。

目的

3-メチル安息香酸を雌雄ラットに反復経口投与し、投与期間中に交配、妊娠および分娩させ、本物質の反復投与毒性ならびに生殖発生毒性を検討する。

材料および方法

1. 被験物質 (Appendices 1~4)

3-メチル安息香酸 (CAS No. 99-04-7) は、分子量 136.15、融点111.7℃、沸点263℃、有機溶剤に易溶、植物油にほとんど不溶、水に難溶な弱い刺激臭のある無色ないし淡黄色の粒状物である。試験には、の
もの (ロット番号 純度98.79%) を入手し、冷暗所 (4℃) で密栓保管し使用した。本物質の詳細はAppendix 1に示した。試験に用いた被験物質は使用期間中安定であったことを確認した (Appendix 2)。被験物質は溶媒として1%メチルセルロース水溶液 (メチルセルロース100cP:和光純薬工業株式会社, ロット番号 DLH5715 ; 局方精製水: 共栄製薬株式会社, ロット番号181107) を用い、所定の投与用量になるような濃度の懸濁液に調製して投与液とした。これを1日の使用量ごとに小分けし、使用時まで冷暗所 (4℃) で密栓し、保管した。投与液は少なくとも7日間は安定であることが確認された (Appendix 3) ので、週1~2回調製し、調製後7日以内に使用した。また、初回と最後に調製した投与液について分析し、所定濃度で調製されていることを確認した (Appendix 4)。なお、被験物質の分析のうち原体の分析は、に委託して実施した。

2. 供試動物および飼育条件 (Appendices 5~8)

動物はSD系〔Crj:CD(SD)〕のSPFラットを用いた。ラットは日本チャールス・リバー株式会社(神奈川県厚木市下古沢795)から雄は8週齢、雌は7週齢で搬入(雄57匹、雌57匹)し、5日間試験環境に馴化させ、その間に検疫を行い、発育が順調で一般健康状態の良好な雌雄各50匹を雄は9週齢、雌は8週齢で試験に供した。投与開始時の平均体重(体重範囲)は、雄 357(342~372)g、雌 222(209~237)gであった。

ラットは、温度 21~23℃、湿度53~60 % (温度・湿度の測定結果: Appendix 5)、換気回数10回以上/時(オールフレッシュエアー方式)、照明 12 時間(午前6時点灯、午後6時消灯)に制御されたバリアーシステム動物室(第1室)で、個体別にステンレス製金網ケージ〔260W×380D×180H(mm)〕に收容し、これをステンレス製5段のラックに配して飼育した。ただし、交尾確認後の雌は、巣作り材料〔日本チャールス・リバー株式会社、ホワイトフレーク(ロット番号9623)、汚染物質の分析結果: Appendix 6〕を入れたポリカーボネート製ケージ〔265W×426D×200H(mm)〕に收容した。飼料(日本農産工業株式会社、固型飼料ラボMRストック、ロット番号 971064、汚染物質の分析結果: Appendix 7)と水(神奈川県営水道水を1μmカートリッジフィルター濾過後紫外線照射して使用、汚染物質の分析結果: Appendix 8)は、それぞれ給餌器および自動給水装置または給水瓶(ポリカーボネート製ケージの場合)により自由摂取させた。動物室の温度・湿度測定結果、飼料、水および巣作り材料の分析結果などから、動物の飼育期間を通じて、試験成績の信頼性に影響を及ぼすと思われる環境要因の変化はなかったものと判断された。

3. 群分けおよび個体識別

各群の動物数は雌雄各10匹とし、各群への動物の割り付けは投与開始日(投与前)の体重に基づく層化無作為抽出法により行い、各群の体重分布が均一化するようにした。

群分け後の動物の個体識別は耳パンチ法により行い、ラックおよびケージには標識札を貼付した。

4. 投与量の設定、試験群の構成および投与方法

投与量設定試験として、ラットを1群雌雄各4匹とし、3-メチル安息香酸を0、80、150、300、600 および1000mg/kg/dayで14日間反復経口投与した。投与7日の夕方から交尾が成立するまで、雌雄各1匹ずつを同居させた。1000mg/kg群で、雌に投与の後半にお

いて体重増加の抑制傾向および摂餌量の減少傾向が認められた。さらに、1000mg/kg群で、雌雄に血小板数の減少が認められた。尿検査では、600mg/kg以上の群で雌雄に尿の酸性化傾向が認められた。一般状態、血液生化学検査、剖検、器官重量および交配成績には、被験物質の投与による変化は認められなかった。

以上の結果から、本試験における投与量については、反復投与毒性が確実に発現すると予測される1000mg/kg/dayを最高用量、投与の影響が発現しないと予測される30mg/kg/dayを最低用量とし、それらの間に300および100mg/kg/dayを設定した。

試験群の構成は、溶媒投与群（以下、対照群）、3-メチル安息香酸 30mg/kg/day投与群（30mg/kg群）、同100mg/kg/day投与群（100mg/kg群）、同300mg/kg/day投与群（300mg/kg群）、同1000mg/kg/day投与群（1000mg/kg群）の5群とした。

投与方法は、投与液量を体重1kg当たり5mLとし、テフロン製胃ゾンデを装着した注射筒を用いて3-メチル安息香酸の0.6w/v%液(30mg/kg群)、2w/v%液(100mg/kg群)、6w/v%液(300mg/kg群)あるいは20w/v%液(1000mg/kg群)を、雌雄とも交配開始14日前から雄は44日間、雌は分娩後の哺育3日(41~45日間)まで、1日1回(午前中)経口投与した。各個体の投与液量は、至近日の測定体重に基づいて算出した。対照群には、被験物質の溶媒として用いた1%メチルセルロース水溶液を同様に投与した。

5. 観察および検査

1) 親動物に関する項目

(1) 一般状態観察

投与期間中毎日、動物の生死、外観、行動等について観察した。

(2) 体重および摂餌量測定

体重の測定は、投与開始日(投与開始直前)およびその後は7日間隔で行い、さらに最終投与日と屠殺日に測定した。ただし、雌の妊娠後は、妊娠0、7、14 および 20日と哺育0および4日に測定した。摂餌量は、体重測定日に合わせて翌日までの24時間の飼料消費量を測定した。摂餌量の最終測定は、雄は投与43日、雌は哺育3日に行った。交配期間中は摂餌量を測定しなかった。これらの測定には、電子上皿天秤（エーアンドデー社、FY 3000）を用いた。

(3) 交配および分娩状態観察

投与15日の午後、雄のケージに同一群内の雌を入れて1対1の組み合わせを作り、交

尾が確認されるまで14日間を限度として連続同居させた。交尾の確認は毎朝一定時刻（9:30分頃）に行い、膣栓形成あるいは膣垢中に精子が確認された日を妊娠0日とした。分娩状態の観察も同じ時刻に行い、1腹ごとに分娩の終了が確認された日を哺育0日とした。交配および分娩の観察結果から、各群について同居開始から交尾成立までの日数、交尾率〔(交尾成立動物数/同居動物数) × 100〕、受胎率〔(受胎雌数/交尾成立雌数) × 100〕および出産率〔(生児出産雌数/生存妊娠雌数) × 100〕ならびに分娩の確認された例について妊娠期間（妊娠0日から分娩が確認された日までの日数）を算定した。

(4) 臨床病理学検査

雄について、以下の検査を実施した。

- a. 尿検査：投与39日あるいは42日に新鮮尿を採取し、試験紙法（バイエル・三共株式会社、マルティスティックス®）によるpH、潜血、タンパク、糖、ケトン体、ビリルビンおよびウロビリノーゲンの定性的検査を行った。また、ラットを代謝ケージに収容（約3時間）して得た蓄尿について、外観の観察、比重の測定（エルマ光学株式会社、屈折計）ならびに尿沈渣の検査〔URI-CELL®液（ケンブリッジケミカルプロダクト社）で染色して鏡検〕を行った。
- b. 血液学検査：供試血液の採取は投与期間終了翌日（投与開始45日）の解剖直前に行った。動物は採血前日の午後5時より除餌し、水のみを給与した。採血はエーテル麻酔下で開腹して腹大動脈より行ない、以下の項目について検査した。なお、採取した血液は3分割し、その一部は3.8%クエン酸ナトリウム液で凝固阻止処理して血漿を得、プロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間の測定に、一部は、EDTA-2K処理してその他の血液学検査に供した。

項目 (略号)	測定法	測定機器
① 赤血球数(RBC)	電気抵抗検出方式	多項目自動血球計数 装置 [E-4000:東亜 医用電子 (株)]
② 血色素量(Hb)	ラウリル硫酸ナトリウム- ヘモグロビン法	
③ ヘマトクリット値(Ht)	パルス検出方式	
④ 平均赤血球容積(MCV)	計算値	
⑤ 平均赤血球血色素量(MCH)	計算値	
⑥ 平均赤血球血色素濃度(MCHC)	計算値	
⑦ 白血球数(WBC)	電気抵抗検出方式	
⑧ 血小板数(Plat.)	電気抵抗検出方式	
⑨ 網状赤血球数(Ret.)	Brilliant cresyl blue 染色した塗抹標本の鏡検	
⑩ 白血球百分率	May-Grünwald-Giemsa染色	血液凝固自動測定 装置(KC-10A :米 アメルング社)
好塩基球 (Baso.)	した塗抹標本の鏡検	
好酸球 (Eosin.)		
好中球 (Neutro.)		
桿状核 (Stab.)		
分節核 (Seg.)		
リンパ球 (Lymph.)		
単球 (Mono.)		
⑪ プロトロンビン時間(PT)	Quick一段法	
⑫ 活性化部分トロンボ プラスチン時間(APTT)	エラジン酸活性化法	

c. 血液生化学検査：採取した血液の一部から血清を分離し、次の項目を測定した。

項目 (略号)	測定法	測定機器
① 総タンパク (T.P.)	Biuret 法	生化学自動分析 装置 [JCA-VX- 1000 型クリナ ライザー：日本 電子(株)]
② アルブミン (Alb.)	BCG 法	
③ A/G比 (A/G)	計算値	
④ 血糖 (Glu.)	酵素法 (GK ¹⁾ -G6PDH ²⁾ -UV 系)	
⑤ トリグリセライド (T.G.)	酵素法 (LPL ³⁾ -GPO ⁴⁾ -POD ⁵⁾ 系)	
⑥ 総コレステロール (T-Cho.)	酵素法 (CES ⁶⁾ -COD ⁷⁾ -POD 系)	
⑦ 総ビリルビン (T-Bil.)	Jendrassik 法	
⑧ 尿素窒素 (BUN)	Urease-UV 法	
⑨ クレアチニン (Crea.)	Jaffé 法	
⑩ GOT (GOT)	SSCC ⁸⁾ 法	
⑪ GPT (GPT)	SSCC 法	
⑫ γ -GTP (γ -GTP)	SSCC 法	
⑬ LDH (LDH)	SSCC 法	
⑭ ALP (ALP)	GSCC ⁹⁾ 法	
⑮ コリンエステラーゼ (ChE)	BTC ¹⁰⁾ -DTNB ¹¹⁾ 法	
⑯ カルシウム (Ca)	OCPC 法	
⑰ 無機リン (P)	酵素法 (PNP ¹²⁾ -XOD ¹³⁾ -POD系)	
⑱ ナトリウム (Na)	イオン電極法	電解質自動分析 装置 [NAKL-132: 東亜電波工業(株)]
⑲ カリウム (K)	イオン電極法	
⑳ 塩素 (Cl)	イオン電極法	

1) グルコキナーゼ、2) グルコース6リン酸脱水素酵素、3) リポプロテイン
リパーゼ、4) グリセロリン酸酸化酵素、5) ペルオキシダーゼ、6) コレステ
ロールエステラーゼ、7) コレステロールオキシダーゼ、8) スカンジナビア臨
床化学会、9) ドイツ臨床化学会、10) ブチリルチオコリン、11) 5,5-ジチオピ
ス-2-ニトロ安息香酸、12) プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、13) キサンチ
ンオキシダーゼ

(5) 病理学検査

雄は採血に続いて、雌は哺育4日の観察終了後に、エーテル麻酔下で放血屠殺し、次の項目を検査した。なお、対照群、300および1000mg/kg群で各1匹認められた妊娠の成立しなかった雌、および30mg/kg群で1匹認められた分娩予定日を過ぎても分娩が認められなかった雌については分娩予定日の4日後に、300および1000mg/kg群で各1匹認められた交尾の成立しなかった雌については交配期間終了日に、同様に屠殺して検査した。

- a. 剖検：全身諸器官を肉眼的に観察した。さらに、雌については、卵巢の黄体数および子宮の着床数を調べ、着床率〔(着床数/黄体数) ×100〕を算定した。
- b. 器官重量測定：電子上皿天秤(メトラー社、AT 200)を用いて、雌雄の脳、下垂体、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、胸腺ならびに雄の精巣、精巣上体を秤量(絶対重量)し、対体重比(相対重量)を算出した。腎臓、副腎、精巣および精巣上体は左右を一括して、下垂体は固定後に秤量した。
- c. 病理組織学検査：次の器官を採取し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液(精巣および精巣上体のみブアン液)で固定した。

脳、下垂体、眼球、ハーダー腺、甲状腺(上皮小体含む)、唾液腺、胸腺、気管、肺、心臓、舌、食道、胃、腸、肝臓、脾臓、膵臓、副腎、腎臓、膀胱、精巣、精巣上体、前立腺、精囊、卵巢、子宮、膣、大動脈(胸部)、脊髄(頸部、胸部、腰部)、坐骨神経、骨・骨髄(胸骨、大腿骨)、リンパ節(頸部リンパ節、腸間膜リンパ節)、骨格筋(下腿三頭筋)、皮膚(背部)、乳腺(腹部)、その他肉眼的異常部位

病理組織学検査は、対照群および1000mg/kg群の全例、ならびに他の群の交尾あるいは妊娠の成立しなかった雌雄の脳、下垂体、胸腺、心臓、肺、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、膀胱、骨髄、その他肉眼的異常部位、さらに、雄では精巣、精巣上体について実施した。また、交尾・妊娠不成立の雌雄および分娩予定日を過ぎても分娩が認められなかった雌について、雄は前立腺および精囊、雌は卵巢および子宮についても検査した。30、100および300mg/kg群で交尾および妊娠が成立し、哺育も順調であった雌雄については、1000mg/kg群で毒性影響と考えられる変化の認められた雌の肝臓および肉眼的異常部位を検査した。検査は常法に従いパラフィン切片を作製し、H・E染色を施して鏡検した。また、沈着物を同定するため一部の例の肝臓についてはスダンⅢおよびPAS染色、脾臓については鉄染色(ベルリンブルー法)、腎臓についてはPAS染色も行った。

2) 新生児に関する項目

(1) 産児数および性比の観察

分娩の終了後各腹の産児数（生児と死亡児の合計）を調べ、分娩率〔(総出産児数/着床数) × 100〕を算定した。また、性別を肛門と生殖突起の距離の長短により判定し、群ごとの性比を算出した。

(2) 外表異常および一般状態観察

新生児について口腔内を含む外表の異常を観察した。また、毎日一般状態および生死を確認し、出生率〔(出産確認時生児数/総出産児数) × 100〕および新生児生存率〔(哺育4日生児数/出産確認時生児数) × 100〕を求めた。

(3) 体重測定

新生児について哺育0日および4日に雌雄別に各腹ごとの総体重を測定し、1匹当たりの平均体重を算出した。

(4) 病理学検査

死亡例はその都度、生存例は雌親の解剖時(哺育4日)にエーテル・クロロホルムで麻酔死させ、胸腹部における主要器官を肉眼的に観察した。

6. 統計処理

得られた平均値あるいは頻度について、対照群との間の有意差（危険率5%以下）を次の方法で検定した。

体重、摂餌量、血液学および血液生化学データ、器官重量、黄体数、着床数、妊娠期間、産児数などのパラメトリックデータは、Bartlettの分散検定を行った。分散が一樣な場合は一元配置の分散分析を行い、その結果有意差を認めた場合、Dunnett法またはScheffé法（群の大きさが異なる場合）により対照群に対する各群の比較検定を行った。分散が一樣でない場合ならびに着床率、出生率、分娩率、新生児生存率、尿検査の定性的データなどのノンパラメトリックデータはKruskal-Wallisの順位検定を行い、その結果有意差を認めた場合、Dunnett法またはScheffé法（群の大きさが異なる場合）により対照群に対する各群の比較検定を行った。カテゴリカルデータについては、交尾率、受胎率、出産率、出産児の性比は χ^2 検定、一般状態の変化および病理学的異常例の出現率はFisherの直接確率法を用いた。なお、新生児に関するデータは、1腹当たりの平均を1標本とした。

結果

1. 反復投与毒性

1) 死亡動物 (Tables 1, 2, Appendices 9, 10)

死亡は各群の雌雄とも認められなかった。

2) 一般状態 (Tables 3, 4, Appendices 11, 12)

雄では、1000mg/kg群で自発運動の低下が投与16日以降に4匹に認められた。雌では、被験物質の投与による変化は認められなかった。なお、散発的に認められ、被験物質の投与とは無関係と考えられる変化として、雄では、脱毛（両前腕あるいは右前腕）が300mg/kg群で2匹に、紅涙が30および1000mg/kg群で各1匹に認められた。雌では、脱毛（両前腕）が100mg/kg群で3匹および1000mg/kg群で1匹に、痂皮形成/脱毛（右肩部）が300mg/kg群の1匹に認められた。しかし、投与期間終了時においては300mg/kg群の雌1匹に脱毛が残存していたのを除いて、他の変化は認められなかった。

3) 体重 (Figures 1, 2, Tables 5, 6, Appendices 13, 14)

雌雄とも、被験物質の投与による有意な変化は認められなかった。また、投与期間中の体重増加量にも有意な差は認められなかった。なお、雌では1000mg/kg群で哺育0～4日間の体重増加量が有意に低値を示したが、これは哺育0日の体重が対照群に比べ高値傾向にあったための変化で、哺育4日の体重には対照群と差は認められなかった。

4) 摂餌量 (Figures 3, 4, Tables 7, 8, Appendices 15, 16)

雌雄とも、被験物質の投与による有意な変化は認められなかった。なお、雌の30および300mg/kg群で投与8日の摂餌量が対照群に比べ有意に低値を示したが、用量依存性のない変化であった。

5) 雄の尿検査 (Table 9, Appendix 17, 背景データ : Appendix 30)

各検査項目とも、被験物質の投与による有意な変化は認められなかった。

6) 雄の血液学検査 (Table 10, Appendix 18, 背景データ : Appendix 31)

1000mg/kg群で、プロトロンビン時間の有意な延長および血小板数の有意な減少が認め

られた。なお、30および1000mg/kg 群で白血球数が対照群に比べ有意に高値を示したが、用量依存性が認められず、また背景データにおける正常範囲内の変動であった。

7) 雄の血液生化学検査 (Table 11, Appendix 19, 背景データ : Appendix 31)

1000mg/kg群でGOTおよびナトリウムの有意な増加が認められた。ナトリウムの増加はごく軽微な変化であった。なお、300mg/kg群でアルカリフォスファターゼが対照群に比べ有意に高値を示したが、1000mg/kg群では変化は認められず、また背景データにおける正常範囲内の変動であった。

8) 剖検 (Tables 12, 13, Appendices 20, 21)

雌雄とも、被験物質の投与と関連性がみられると考えられる変化は認められなかった。被験物質の投与とは無関係に散発的に認められた変化として、雌において肺の赤/黒色点に対照群、30および300mg/kg群の各1匹、胸腺の赤色点/域に対照群、100および300mg/kg群の各1匹、ならびに脾臓の隆起部が30mg/kg群の1匹に認められた。また、30mg/kg群で分娩予定日を過ぎても分娩が認められなかった1匹には、子宮に出血を伴った胎盤遺残が認められた。

9) 器官重量 (Tables 14, 15, Appendices 22~25)

雄では、1000mg/kg群で体重の絶対重量の減少傾向および下垂体の相対重量の有意な増加が認められた。雌では、1000mg/kg群で肝臓の絶対および相対重量の有意な増加が認められた。

10) 病理組織学検査 (Tables 16, 17, Appendices 20, 21, Photos 1, 2)

雄では、被験物質の投与と関連する変化は認められなかった。雌では、被験物質の投与に起因すると考えられる変化として、肝臓に門脈周囲性の肝細胞空胞変性が300mg/kg群で3匹にみられ、1000mg/kg群では7匹と有意に増加した。この空胞はズダンⅢ染色陰性で、PAS染色によりグリコーゲンの蓄積を示唆する所見も認められなかった。被験物質の投与とは無関係と考えられる変化としては、雄で腎臓の近位尿細管上皮におけるPAS染色陽性硝子滴の出現、ならびに雌雄に脾臓における髓外造血巣およびヘモジデリン沈着が、対照群および1000mg/kg群の全例に認められた。しかし、変化の程度は両群間に差は認められ

なかった。また、1000mg/kg群の雄で精巣の精細胞変性が2匹に認められたが、限局性、かつ、片側性の変化であった。一般状態の観察で認められた脱毛部位には皮膚の角化亢進が、剖検で認められた肺の赤/黒色点および胸腺の赤色点/域には出血が、また隆起した脾臓にはリンパ様増生が認められた。また、各群に散発的に認められた妊娠不成立の雌雄で、妊娠不成立と関連すると考えられる変化としては、雄で前立腺の炎症が1000mg/kg群の1匹に、雌で子宮内膜の炎症が100mg/kg群の1匹に認められた。また、分娩予定日が過ぎても分娩が認められず、剖検で胎盤遺残が認められた30mg/kg群の雌の1匹には、胎盤の出血性壊死が認められた。

これらの変化以外にも、検査した各器官に変化が認められたが、散発的なあるいは用量依存性の認められない所見であった。

2. 生殖発生毒性

1) 親動物に及ぼす影響 (Table 18, Appendix 26)

(1) 交尾率および受胎率

交尾の成立しなかった例が300および1000mg/kg群で、また交尾は成立したが妊娠の成立しなかった例が対照群、100、300および1000mg/kg群で認められたが、いずれも各々1対のみで、交尾率および受胎率には有意な変化は認められなかった。また、交配開始から交尾成立までの日数にも有意な変化は認められなかった。

(2) 黄体数、着床数および着床率

黄体数、着床数および着床率について、有意な変化は認められなかった。

(3) 出産率および妊娠期間

妊娠は成立したが分娩が認められない例が30mg/kg群で1匹認められたのみで、出産率に有意な変化は認められなかった。また、妊娠期間についても有意な変化は認められなかった。

(4) 分娩および哺育状態

被験物質の投与に起因する分娩および哺育状態の変化は認められなかった。被験物質の投与とは無関係と考えられる変化として、分娩状態については、30mg/kg群の1匹は妊娠

26日においても分娩せず、剖検では、左子宮角内に胎児のない1個の胎盤が認められ、他に着床痕は認められなかった。また、300mg/kg群の1匹は17匹出産したが、その内7匹は死産であった。哺育状態については、対照群の1匹が哺育0日に新生児1匹、1000mg/kg群の1匹が哺育0日に新生児3匹および同群の他の2匹が哺育1日に各々新生児1匹を食殺した。しかし、哺育1～2日以降はいずれも哺育状態に変化は認められなかった。

2) 新生児に及ぼす影響

(1) 生存性および体重 (Table 19, Appendix 27)

新生児の生存性に関する各指標および体重について、1000mg/kg群で総出産児数、生児数、分娩率、出生率および哺育0日の新生児体重は対照群と比べやや低値を示したが、いずれも統計学的に有意な差ではなかった。出産児の性比、哺育4日の体重および哺育4日の生存率には変化は認められなかった。

(2) 形態 (Tables 20, 21, Appendices 28, 29)

被験物質の投与に起因する外表および内臓異常ならびに内臓変異は認められなかった。被験物質の投与とは無関係な変化として、30mg/kg群の1匹に痕跡尾、癒合腎および精巢低形成など外表および内臓にわたる複合異常が認められた。また、内臓変異について、300mg/kg群で胸腺の頸部遺残、1000mg/kg群で左臍動脈遺残が対照群と比べ高値を示し、またこれらに伴い300mg/kg以上の群で内臓変異数が高値を示したが、いずれも統計学的に有意な変化ではなかった。その他に、1000mg/kg群で腎盂拡張が1匹に認められた。

考察および結論

1. 反復投与毒性

3-メチル安息香酸のラットへの反復投与において、主に肝臓に対する毒性影響が認められた。

すなわち、雌において、肝臓の絶対および相対重量の増加が1000mg/kg群に認められ、病理組織学的に肝細胞の空胞変性が300mg/kg以上の群に観察された。雄においては、肝臓に重量および病理組織学的変化は認められなかったが、血液生化学検査でGOTの増加が1000mg/kg群に認められ、肝臓に対する影響が窺われた。また、血液学検査で1000mg/kg群の雄に認められたプロトロンビン時間の延長も、肝臓に対する影響と関連する変化と考えら

れる。

3-メチル安息香酸は μ -キシレンの中間代謝物として知られており²⁾、 μ -キシレンは肝毒性を有することが報告³⁾されているが、本試験では3-メチル安息香酸も肝臓に対する毒性影響の有ることが確認された。また、類縁化合物であるメチル化ベンゼン類のラットへの反復投与により発現する肝障害は肝細胞における空胞形成を特徴とする⁴⁾が、3-メチル安息香酸においても雌で類似した形態的变化が観察された。

肝臓に対する影響に加えて、1000mg/kg群で血小板数の減少、血清ナトリウムおよび下垂体の相対重量の増加および自発運動の低下が、いずれも雄に認められた。

血小板数の減少については、14日間反復投与による投与量設定試験では雌雄に認められており、プロトロンビン時間の延長と併せて、3-メチル安息香酸の血液凝固系に対する影響が示唆された。しかし、病理組織学検査では骨髄や脾臓の造血細胞に変化は認められず、また血小板数の減少の程度も軽度なものであった。

下垂体の相対重量のみの増加について、病理組織学検査では下垂体に変化は認められなかったことから、主に体重が対照群をやや下回ったことによる変化と推察される。また、血清ナトリウムの増加についても、対照群をわずかに上回るごく軽微な変化で、他に関連する変化も認められなかった。したがって、下垂体相対重量の増加および血清ナトリウムの増加については、毒性学的に特に問題とすべき変化ではないと判断される。

以上の結果から、3-メチル安息香酸の主な反復投与毒性は肝臓に対する影響であり、血液凝固系に対する影響も認められた。無影響量は、雄で300mg/kg、雌で100mg/kgと推定された。

2. 生殖発生毒性

雄親および雌親の生殖能に対する被験物質の投与による影響について、観察した各指標とも対照群と比べ有意な変化は認められなかった。

児動物の発生に対する影響については、1000mg/kg群で総出産児数、生児数、分娩率、出生率および哺育0日の新生児体重が減少傾向を示し、軽微な影響が認められたが、いずれも統計学的には対照群と比べ有意な差は認められなかった。

したがって、無影響量は、雌雄親に対する生殖能および児動物の発生に対して、いずれも1000mg/kg/dayと推定された。

文献

- 1) 化学工業日報社編, "12394 の化学商品," 化学工業日報社, 東京, 1994, p. 610.
- 2) 山本郁男, "薬物代謝学辞典," 榊 廣川書店, 東京, 1994, p. 110.
- 3) L. W. Condie, et al., *DRUG AND CHEMICAL TOXICOLOGY*, 11(4), 329(1988).
- 4) M. L. Richardson, S. Gangolli, "The dictionary of substances and their effects", vol. 7 (S-Z), The royal society of chemistry, Cambridge, 1994, pp. 487-488.
- 5) D. E. Bowers, et al., *Am. J. Vet. Res.*, 43(4), 679(1982).

3-メチル安息香酸のラットを用いる反復
経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験
(試験番号 97-081-2)

最終報告書 添付資料 A

(図・群別平均値表)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

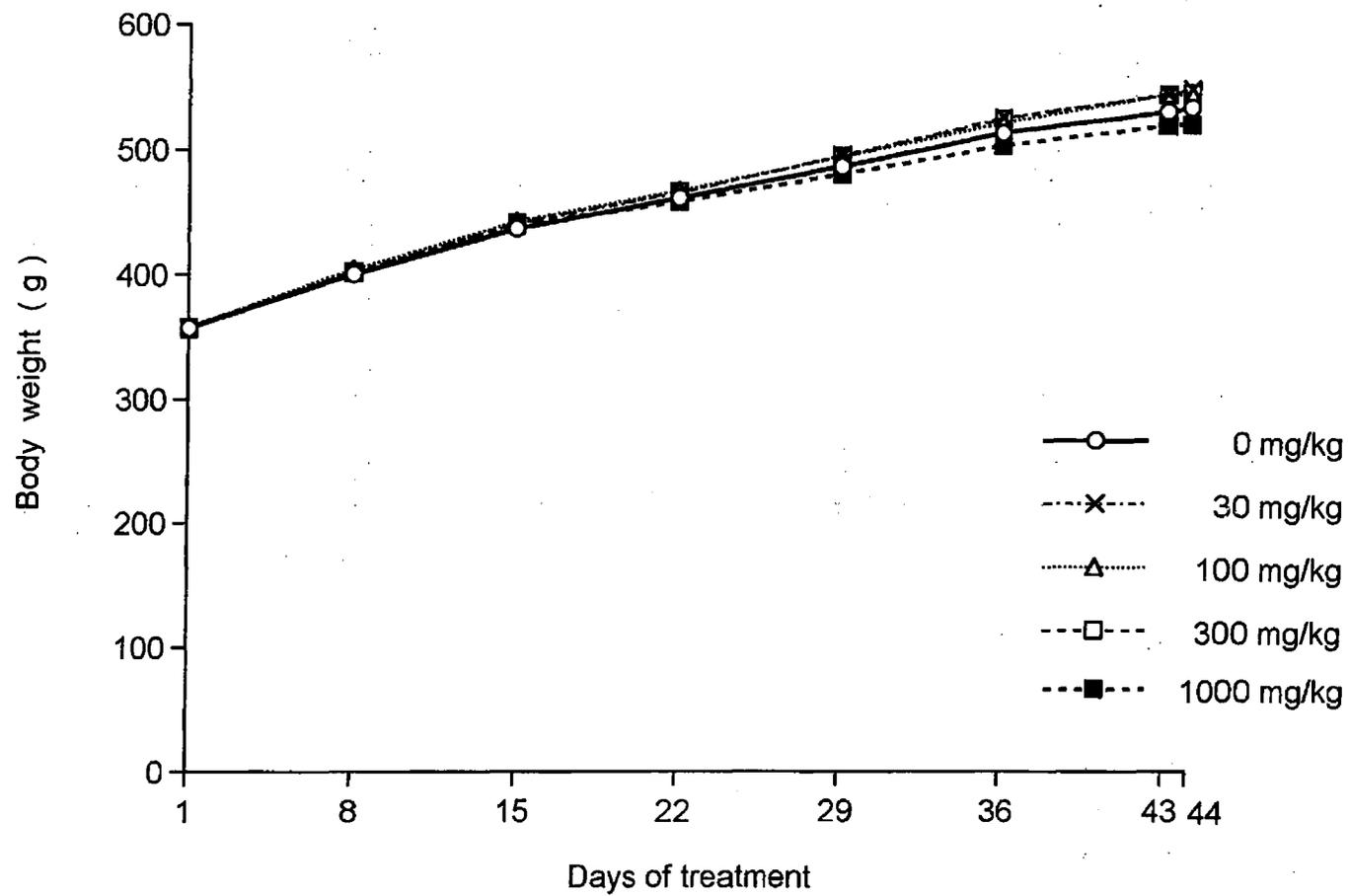


Fig.1 Body weight change in male rats treated orally with 3-methyl benzoic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

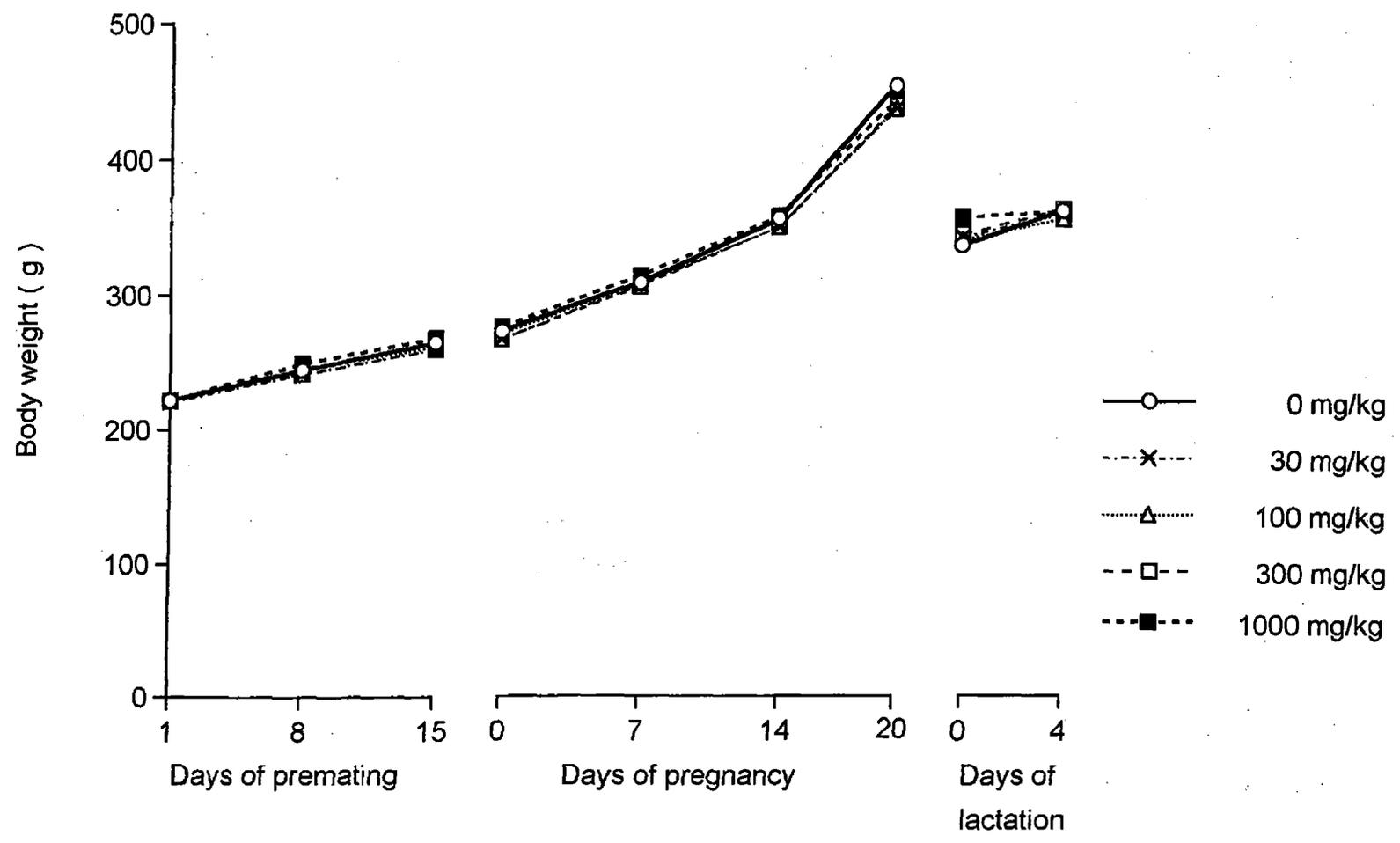


Fig. 2 Body weight change in female rats treated orally with 3-methyl benzoic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

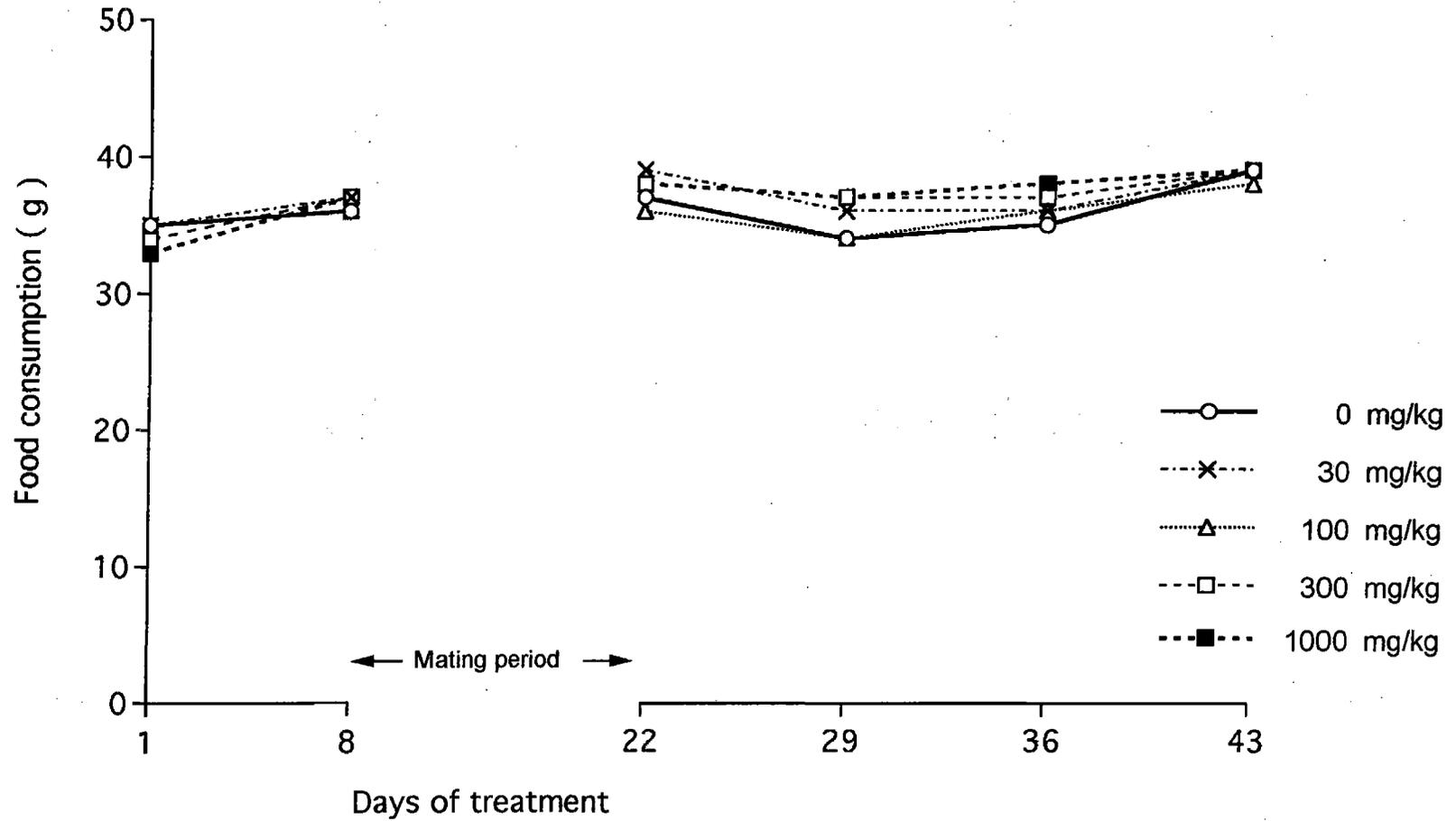


Fig. 3 Food consumption of male rats treated orally with 3-methyl benzoic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

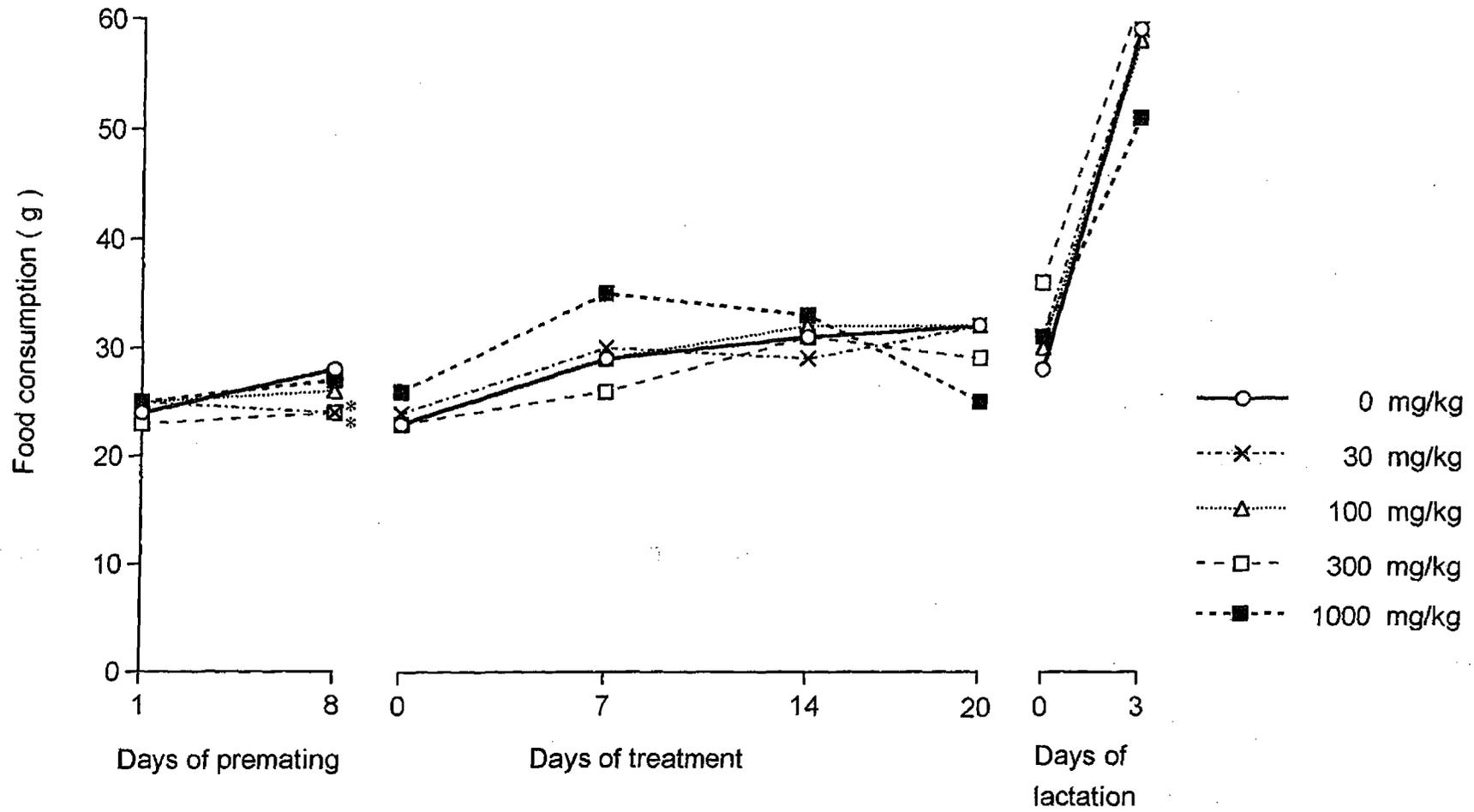


Fig. 4 Food consumption of female rats treated orally with 3-methyl benzoic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test
Significantly different from control(* : $p < 0.05$)

Table 1 Mortality rate of male rats treated orally with 3-methyl benzoic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000
No. of animals examined	10	10	10	10	10
No. of animals that died	0	0	0	0	0

Mortality (%)	0	0	0	0	0

Table 2 Mortality rate of female rats treated orally with 3-methyl benzoic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000
No. of animals examined	10	10	10	10	10
No. of animals that died	0	0	0	0	0

Mortality (%)	0	0	0	0	0

Table 3 Incidence of clinical signs of male rats treated orally with 3-methyl benzoic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test.

Clinical sign	Dose(mg/kg)	0			30			100			300			1000		
		TK	FP	(Total)	TK	TK	FP	(Total)	TK	FP	UC	(Total)	TK	FP	UC	(Total)
Fate		9	1	(10)	10	9	1	(10)	8	1	1	(10)	8	1	1	(10)
No. of animals																
Reddish tear	-	9	1	(10)	9	9	1	(10)	8	1	1	(10)	7	1	1	(9)
	+	0	0	(0)	1	0	0	(0)	0	0	0	(0)	1	0	0	(1)
Alopecia	-	9	1	(10)	10	9	1	(10)	6	1	1	(8)	8	1	1	(10)
	+	0	0	(0)	0	0	0	(0)	2	0	0	(2)	0	0	0	(0)
Decrease in locomotor activity	-	9	1	(10)	10	9	1	(10)	8	1	1	(10)	5	0	1	(6)
	+	0	0	(0)	0	0	0	(0)	0	0	0	(0)	3	1	0	(4)*

TK : Terminal kill

FP : Failed to cause pregnancy, killed at the termination

UC : Animal with unsuccessful copulation, killed at the termination

- : Negative

+ : Slight

* : Significantly different from control at 5% level of probability

Table 4 Incidence of clinical signs of female rats treated orally with 3-methyl benzoic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Clinical sign	Dose(mg/kg)	0			30			100			300			1000				
		Fate		TK NP (Total)	TK ED (Total)	TK NP (Total)	TK NP UC (Total)	TK NP UC (Total)										
		No. of animals																
Alopecia/Crust	-	9	1	(10)	9	1	(10)	7	0	(7)	7	1	1	(9)	7	1	1	(9)
	+	0	0	(0)	0	0	(0)	2	1	(3)	1	0	0	(1)	1	0	0	(1)

TK : Terminal kill

NP : Non-pregnant, killed on 26 days after copulation

ED : Animal with embryonic death, killed on 26 days after copulation

UC : Animal with unsuccessful copulation, killed at the termination of mating period

- : Negative

+ : Slight

Table 5 Body weights of male rats treated orally with 3-methyl benzoic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

(g)

Dose (mg/kg)	Days of treatment								Gain 1~44
	1	8	15	22	29	36	43	44	
0	357 ± 7 (10)	400 ± 13 (10)	436 ± 19 (10)	460 ± 25 (10)	485 ± 25 (10)	512 ± 28 (10)	529 ± 27 (10)	532 ± 27 (10)	176 ± 22 (10)
30	357 ± 7 (10)	402 ± 14 (10)	440 ± 21 (10)	464 ± 28 (10)	494 ± 32 (10)	524 ± 36 (10)	543 ± 39 (10)	547 ± 38 (10)	189 ± 34 (10)
100	358 ± 8 (10)	404 ± 13 (10)	442 ± 19 (10)	466 ± 22 (10)	493 ± 26 (10)	520 ± 31 (10)	543 ± 36 (10)	542 ± 36 (10)	185 ± 35 (10)
300	356 ± 9 (10)	401 ± 16 (10)	441 ± 21 (10)	465 ± 28 (10)	493 ± 33 (10)	523 ± 35 (10)	543 ± 38 (10)	544 ± 37 (10)	188 ± 33 (10)
1000	358 ± 8 (10)	402 ± 8 (10)	439 ± 11 (10)	457 ± 15 (10)	479 ± 20 (10)	502 ± 25 (10)	518 ± 26 (10)	519 ± 26 (10)	160 ± 24 (10)

Each value is expressed as mean±S.D. and (number of animals available).

Table 6 Body weights of female rats treated orally with 3-methyl benzoic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

(g)

Dose (mg/kg)	Days of pre mating				Days of pregnancy					Days of lactation		
	1	8	15	Gain 1~15	0	7	14	20	Gain 0~20	0	4	Gain 0~4
0	222 ± 7 (10)	245 ± 11 (10)	265 ± 10 (10)	44 ± 9 (10)	273 ± 11 (9)	309 ± 12 (9)	356 ± 20 (9)	454 ± 31 (9)	181 ± 27 (9)	336 ± 20 (9)	362 ± 17 (9)	25 ± 9 (9)
30	221 ± 8 (10)	242 ± 9 (10)	260 ± 11 (10)	39 ± 8 (10)	267 ± 11 (10)	307 ± 11 (10)	350 ± 15 (10)	437 ± 35 (10)	170 ± 35 (10)	342 ± 27 (9)	360 ± 22 (9)	17 ± 14 (9)
100	222 ± 6 (10)	245 ± 8 (10)	262 ± 10 (10)	40 ± 10 (10)	271 ± 7 (9)	308 ± 8 (9)	350 ± 13 (9)	437 ± 27 (9)	166 ± 23 (9)	340 ± 20 (9)	356 ± 16 (9)	15 ± 12 (9)
300	222 ± 7 (10)	242 ± 8 (10)	260 ± 7 (10)	39 ± 9 (10)	267 ± 10 (8)	306 ± 14 (8)	350 ± 16 (8)	439 ± 26 (8)	173 ± 20 (8)	344 ± 12 (8)	363 ± 15 (8)	20 ± 12 (8)
1000	222 ± 8 (10)	250 ± 11 (10)	268 ± 14 (10)	45 ± 11 (10)	276 ± 15 (8)	314 ± 15 (8)	358 ± 22 (8)	444 ± 28 (8)	169 ± 16 (8)	357 ± 24 (8)	361 ± 20 (8)	5* ± 13 (8)

Each value is expressed as mean±S.D. and (number of animals available).

* : Significantly different from control at 5% level of probability

Table 7 Food consumption of male rats treated orally with 3-methyl benzoic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

(g/rat/day)

Dose (mg/kg)	Days of treatment					
	1	8	22	29	36	43
0	35 ± 2 (10)	36 ± 3 (10)	37 ± 2 (10)	34 ± 2 (10)	35 ± 2 (10)	39 ± 3 (10)
30	35 ± 2 (10)	37 ± 3 (10)	39 ± 3 (10)	36 ± 4 (10)	36 ± 4 (10)	39 ± 4 (10)
100	35 ± 2 (10)	36 ± 3 (10)	36 ± 3 (10)	34 ± 2 (10)	36 ± 3 (10)	38 ± 4 (10)
300	34 ± 3 (10)	37 ± 3 (10)	38 ± 4 (9)	37 ± 5 (10)	37 ± 3 (10)	39 ± 4 (10)
1000	33 ± 3 (10)	37 ± 2 (10)	38 ± 4 (9)	37 ± 3 (10)	38 ± 4 (10)	39 ± 3 (10)

Each value is expressed as mean ± S.D. and (number of animals available).

Table 8 Food consumption of female rats treated orally with 3-methyl benzoic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	(g/rat/day)							
	Days of pre mating		Days of pregnancy				Days of lactation	
	1	8	0	7	14	20	0	3
0	24 ± 3 (10)	28 ± 2 (10)	23 ± 2 (9)	29 ± 6 (9)	31 ± 5 (9)	32 ± 5 (9)	28 ± 12 (9)	59 ± 6 (9)
30	25 ± 4 (10)	24* ± 4 (10)	24 ± 2 (10)	30 ± 8 (10)	29 ± 5 (10)	32 ± 3 (10)	31 ± 8 (9)	59 ± 9 (9)
100	25 ± 2 (10)	26 ± 2 (10)	23 ± 4 (9)	29 ± 11 (9)	32 ± 4 (9)	32 ± 3 (9)	30 ± 10 (9)	58 ± 8 (9)
300	23 ± 3 (10)	24* ± 4 (10)	23 ± 2 (8)	26 ± 8 (8)	31 ± 2 (8)	29 ± 11 (8)	36 ± 4 (8)	62 ± 7 (8)
1000	25 ± 3 (10)	27 ± 2 (10)	26 ± 2 (8)	35 ± 12 (8)	33 ± 3 (8)	25 ± 10 (8)	31 ± 6 (8)	51 ± 9 (8)

Each value is expressed as mean±S.D. and (number of animals available).

* : Significantly different from control at 5% level of probability

Table 9 - 1 Urinary findings of male rats treated orally with 3-methyl benzoic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	No. of animals	Color				Cloudy		Specific gravity	pH							Protein								
		C	PY	Y	PB	-	+		≤5.0	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5≤	-	±	+	++	+++	++++			
0	10		5	4	1	2	8	1.039 ^{a)} ± 0.018					2	5	3			3	4	3				
30	10		9	1		5	5	1.031 ± 0.010					3	5	2			3	7					
100	10		10			6	4	1.037 ± 0.017				1	3	5	1			3	7					
300	10	1	8	1		5	5	1.045 ± 0.022		1		1	3	5				4	6					
1000	10	1	7	2		5	5	1.049 ± 0.017		1			4	4	1			4	6					

Dose (mg/kg)	No. of animals	Glucose					Ketone body					Occult blood					Urobilinogen				Bilirubin			
		-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	0.1	1	2	4	-	+	++	+++
0	10	10					4	2	2	2		9	1						10					10
30	10	10					5	4	1			7	3						10					10
100	10	10					2	7	1			10							10					10
300	10	10					5	5				10							10					10
1000	10	10					3	7				8	2						10					10

a) : Mean ± S.D.

Color : C(colorless), PY(pale yellow), Y(yellow), PB(pale brown)

Cloudy : -(negligible), +(cloudy)

Protein : -(negligible), ±(15~30mg/dL), +(30mg/dL), ++(100mg/dL), +++(300mg/dL), ++++(1000mg/dL)

Glucose : -(negligible), ±(0.1g/dL), +(0.25g/dL), ++(0.5g/dL), +++(1g/dL)

Ketone body : -(negligible), ±(5mg/dL), +(15mg/dL), ++(40mg/dL), +++(80mg/dL)

Occult blood : -(negligible), ±(trace), +(slight), ++(moderate), +++(marked)

Urobilinogen : Ehrlich unit/dL

Bilirubin : -(negligible), +(slight), ++(moderate), +++(marked)

Table 9 - 2 Urinary findings of male rats treated orally with 3-methyl benzoic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	No. of animals	Erythrocytes				Leukocytes				Crystals											
										Mg				Ca				Ams			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
0	10	10				10				1	5	4	10							10	
30	10	10				9	1				6	3	1	10						10	
100	10	10				10					5	4	1	10						10	
300	10	10				10					3	6	1	10						10	
1000	10	9		1		9	1			1	4	4	1	10						10	

Dose (mg/kg)	No. of animals	Epithelial cells									Casts						Fat globules							
		Sq				R			S		G		H		W									
		-	+	++	+++	-	+	++	-	+	++	-	+	-	+	-	+	-	+	++	+++			
0	10		9	1				10		10			10	10	10					10				
30	10	2	7	1				10		10			10	10	10					9				1
100	10	1	8	1				10		10			10	10	10					10				
300	10		9	1				10		10			10	10	10					10				
1000	10		10					10		10			10	10	10					10				

- : Not observed; + : A few in some fields; ++ : A few in all fields; +++ : Many in all fields

Crystals: Mg(ammonium magnesium phosphate) Ca(calcium phosphate) Ams(amorphous)

Epithelial cells: Sq(squamous) R(round) S(spindle)

Casts: G(granule) H(hyaline) W(waxy)

Table 10

Hematological findings of male rats treated orally with 3-methyl benzoic acid
in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	No. of animals	RBC (10 ⁴ /μL)	Hb (g/dL)	Ht (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (%)	Ret. (%)	PT (sec)	APTT (sec)
0	10	785 ± 26	14.8 ± 0.4	44.3 ± 1.2	57 ± 1	18.8 ± 0.5	33.3 ± 0.4	31 ± 7	13.1 ± 0.5	18.8 ± 1.2
30	10	794 ± 32	14.9 ± 0.5	44.3 ± 1.5	56 ± 2	18.7 ± 0.7	33.5 ± 0.3	25 ± 6	13.1 ± 0.4	18.6 ± 0.9
100	10	798 ± 44	14.8 ± 0.4	44.6 ± 0.9	56 ± 2	18.6 ± 0.7	33.2 ± 0.5	33 ± 12	13.3 ± 0.6	18.1 ± 1.1
300	10	796 ± 21	14.7 ± 0.3	44.1 ± 1.2	55 ± 1	18.5 ± 0.4	33.4 ± 0.4	27 ± 8	13.4 ± 0.5	17.8 ± 0.9
1000	10	785 ± 26	14.8 ± 0.4	45.0 ± 1.0	57 ± 2	18.9 ± 0.6	32.9 ± 0.6	25 ± 5	14.3** ± 0.5	18.8 ± 1.5

Dose (mg/kg)	No. of animals	WBC (10 ² /μL)	Differential leukocyte counts (%)							Plat. (10 ⁴ /μL)
			Baso.	Eosin.	Neutro.		Lymph.	Mono.	Other	
					Stab.	Seg.				
0	10	70 ± 24	0 ± 0	1 ± 1	0 ± 0	20 ± 5	78 ± 6	0 ± 1	0 ± 0	134 ± 10
30	10	94* ± 17	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	15 ± 5	84 ± 5	0 ± 1	0 ± 0	139 ± 12
100	10	85 ± 21	0 ± 0	1 ± 1	0 ± 0	19 ± 8	80 ± 9	1 ± 0	0 ± 0	137 ± 11
300	10	81 ± 17	0 ± 0	1 ± 1	0 ± 0	16 ± 5	82 ± 5	1 ± 1	0 ± 0	137 ± 17
1000	10	97* ± 24	0 ± 0	1 ± 1	0 ± 0	17 ± 5	82 ± 5	0 ± 1	0 ± 0	119* ± 13

Each value is expressed as mean ± S.D.

* : Significantly different from control at 5% level of probability

** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 11

Blood biochemical findings of male rats treated orally with 3-methyl benzoic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	No. of animals	LDH (IU/L)	GOT (IU/L)	GPT (IU/L)	ALP (IU/L)	γ -GTP (IU/L)	ChE (IU/L)	T.P. (g/dL)	Alb. (g/dL)	A/G	T-Cho. (mg/dL)
0	10	225 ± 55	64 ± 5	37 ± 6	217 ± 29	0.49 ± 0.34	46 ± 20	6.24 ± 0.25	2.44 ± 0.38	0.65 ± 0.15	75 ± 20
30	10	307 ± 100	64 ± 7	36 ± 5	205 ± 31	0.31 ± 0.24	57 ± 31	6.22 ± 0.18	2.57 ± 0.32	0.72 ± 0.15	71 ± 18
100	10	271 ± 67	64 ± 9	37 ± 4	223 ± 35	0.47 ± 0.30	54 ± 17	6.33 ± 0.24	2.43 ± 0.38	0.63 ± 0.14	84 ± 27
300	10	282 ± 103	65 ± 5	38 ± 4	257* ± 33	0.62 ± 0.48	39 ± 13	6.25 ± 0.26	2.74 ± 0.29	0.79 ± 0.13	78 ± 16
1000	10	196 ± 38	77* ± 13	43 ± 9	248 ± 32	0.50 ± 0.50	65 ± 28	6.02 ± 0.25	2.47 ± 0.35	0.70 ± 0.15	60 ± 14

Dose (mg/kg)	No. of animals	T.G. (mg/dL)	Glu. (mg/dL)	T-Bil. (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea. (mg/dL)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)
0	10	77 ± 25	121 ± 17	0.29 ± 0.03	15.4 ± 2.2	0.51 ± 0.07	10.6 ± 0.2	7.6 ± 0.8	144 ± 1	4.68 ± 0.26	102 ± 1
30	10	105 ± 50	127 ± 26	0.30 ± 0.03	15.9 ± 1.7	0.45 ± 0.06	10.5 ± 0.3	7.7 ± 0.7	143 ± 1	4.78 ± 0.29	102 ± 2
100	10	77 ± 23	128 ± 18	0.30 ± 0.03	16.8 ± 3.3	0.49 ± 0.03	10.5 ± 0.3	7.4 ± 0.6	144 ± 1	4.76 ± 0.32	103 ± 2
300	10	99 ± 44	127 ± 21	0.28 ± 0.04	15.3 ± 1.8	0.49 ± 0.06	10.5 ± 0.3	7.6 ± 0.7	144 ± 1	4.74 ± 0.36	102 ± 1
1000	10	66 ± 23	114 ± 21	0.31 ± 0.02	13.6 ± 2.3	0.54 ± 0.08	10.4 ± 0.3	7.6 ± 0.7	145* ± 1	4.66 ± 0.24	102 ± 2

Each value is expressed as mean ± S.D.

* : Significantly different from control at 5% level of probability

Table 12 Incidence of necropsy findings of male rats treated orally with 3-methyl benzoic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs : Findings	Dose (mg/kg) 0		30		100			300			1000		
	Fate No. of animals	TK FP (T)	TK (T)	TK FP (T)	TK FP (T)	TK FP UC (T)							
	9	1 (10)	10 (10)	9	1 (10)	8	1	1 (10)	8	1	1 (10)		
Abnormalities	0	0 (0)	0 (0)	0	0 (0)	0	0	0 (0)	0	0	0 (0)		

TK : Terminal kill; FP : Failed to cause pregnancy, killed at the termination; UC : Animal with unsuccessful copulation, killed at the termination; T : Total

Table 13 Incidence of necropsy findings of female rats treated orally with 3-methyl benzoic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

		Dose (mg/kg)		0		30		100		300		1000			
Organs : Findings	Grade	Fate No. of animals	TK	NP	(T)	TK	ED	(T)	TK	NP	(T)	TK	NP	UC	(T)
			9	1	(10)	9	1	(10)	9	1	(10)	8	1	1	(10)
Lung	: Red/black spot(s)	-	8	1	(9)	8	1	(9)	9	1	(10)	7	1	1	(9)
		+	1	0	(1)	0	0	(0)	0	0	(0)	1	0	0	(1)
		++	0	0	(0)	1	0	(1)	0	0	(0)	0	0	0	(0)
					(1)			(1)			(0)				(1)
Uterus	: Placental remnant /bleeding	-	9	1	(10)	9	0	(9)	9	1	(10)	8	1	1	(10)
		+	0	0	(0)	0	1	(1)	0	0	(0)	0	0	0	(0)
Thymus	: Red spots /area	-	8	1	(9)	9	1	(10)	8	1	(9)	7	1	1	(9)
		+	1	0	(1)	0	0	(0)	1	0	(1)	1	0	0	(1)
Spleen	: Elevated areas	-	9	1	(10)	8	1	(9)	9	1	(10)	8	1	1	(10)
		+	0	0	(0)	1	0	(1)	0	0	(0)	0	0	0	(0)

- : Negative; + : Slight; ++ : Moderate; TK : Terminal kill; NP : Non-pregnant, killed on 26 days after copulation; UC : Animal with unsuccessful copulation, killed at the termination; ED : Animal with embryonic death, killed at the termination; T : Total

Table 14

Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with 3-methyl benzoic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

	Dose (mg/kg)	No. of animals	B.W. (g)	Brain (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Spleen (g)	Heart (g)	Thymus (g)	Pitui. (mg)	Adrenal (mg)	Testis (g)	Epidid. (g)
Absolute	0	10	496 ± 28	2.15 ± 0.08	13.50 ± 1.55	3.10 ± 0.25	0.83 ± 0.10	1.43 ± 0.07	0.34 ± 0.08	13.3 ± 2.0	63.8 ± 7.9	3.52 ± 0.21	1.50 ± 0.14
	30	10	510 ± 39	2.06 ± 0.10	13.95 ± 1.67	3.15 ± 0.22	0.89 ± 0.12	1.43 ± 0.07	0.34 ± 0.07	13.3 ± 1.8	69.0 ± 6.5	3.52 ± 0.13	1.44 ± 0.10
	100	10	509 ± 35	2.11 ± 0.05	13.93 ± 1.55	3.23 ± 0.20	0.86 ± 0.11	1.48 ± 0.09	0.39 ± 0.05	13.5 ± 1.4	63.3 ± 9.9	3.45 ± 0.20	1.46 ± 0.16
	300	10	508 ± 34	2.13 ± 0.11	13.62 ± 1.63	3.05 ± 0.21	0.82 ± 0.10	1.42 ± 0.12	0.38 ± 0.11	12.1 ± 1.6	59.0 ± 10.5	3.65 ± 0.25	1.46 ± 0.12
	1000	10	474 ± 26	2.06 ± 0.08	13.29 ± 1.46	3.10 ± 0.31	0.77 ± 0.08	1.43 ± 0.12	0.35 ± 0.06	14.8 ± 2.2	64.8 ± 5.9	3.31 ± 0.19	1.35 ± 0.13
Relative [®]	0	10	496 ± 28	0.44 ± 0.03	2.72 ± 0.22	0.63 ± 0.06	0.17 ± 0.01	0.29 ± 0.02	0.07 ± 0.01	2.7 ± 0.4	12.9 ± 1.5	0.71 ± 0.07	0.30 ± 0.02
	30	10	510 ± 39	0.41 ± 0.03	2.73 ± 0.18	0.62 ± 0.05	0.17 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.07 ± 0.01	2.6 ± 0.3	13.6 ± 1.8	0.69 ± 0.06	0.28 ± 0.03
	100	10	509 ± 35	0.42 ± 0.04	2.73 ± 0.17	0.64 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.08 ± 0.01	2.7 ± 0.3	12.4 ± 1.6	0.68 ± 0.07	0.29 ± 0.03
	300	10	508 ± 34	0.42 ± 0.03	2.68 ± 0.17	0.60 ± 0.03	0.16 ± 0.01	0.28 ± 0.03	0.07 ± 0.02	2.4 ± 0.2	11.6 ± 2.0	0.72 ± 0.06	0.29 ± 0.03
	1000	10	474 ± 26	0.44 ± 0.03	2.80 ± 0.18	0.65 ± 0.06	0.16 ± 0.01	0.30 ± 0.03	0.07 ± 0.01	3.1* ± 0.4	13.7 ± 0.9	0.70 ± 0.03	0.28 ± 0.03

Each value is expressed as mean ± S.D.

[®] : Relative organ weight per 100g body weight

* : Significantly different from control at 5% level of probability

Table 15

Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with 3-methyl benzoic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

	Dose (mg/kg)	No. of animals	B.W. (g)	Brain (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Spleen (g)	Heart (g)	Thymus (g)	Pitui. (mg)	Adrenal (mg)
Absolute	0	9	362 ± 17	1.97 ± 0.09	14.62 ± 1.26	1.99 ± 0.14	0.66 ± 0.07	1.04 ± 0.03	0.27 ± 0.06	19.7 ± 2.5	76.4 ± 10.0
	30	9	360 ± 22	1.99 ± 0.07	14.45 ± 1.26	2.04 ± 0.23	0.69 ± 0.09	1.03 ± 0.07	0.27 ± 0.05	19.6 ± 2.0	77.9 ± 9.3
	100	9	356 ± 16	1.94 ± 0.07	13.95 ± 1.21	2.08 ± 0.13	0.65 ± 0.10	1.06 ± 0.08	0.28 ± 0.05	20.0 ± 1.5	74.7 ± 8.2
	300	8	363 ± 15	1.93 ± 0.08	15.22 ± 1.66	2.04 ± 0.13	0.66 ± 0.08	1.05 ± 0.08	0.26 ± 0.04	17.9 ± 2.5	76.8 ± 8.6
	1000	8	361 ± 20	1.92 ± 0.09	17.55** ± 1.42	2.16 ± 0.22	0.66 ± 0.07	1.08 ± 0.09	0.25 ± 0.06	19.5 ± 2.6	75.6 ± 10.2
Relative@	0	9	362 ± 17	0.55 ± 0.02	4.04 ± 0.23	0.55 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.29 ± 0.01	0.07 ± 0.02	5.4 ± 0.6	21.2 ± 3.0
	30	9	360 ± 22	0.56 ± 0.04	4.02 ± 0.29	0.57 ± 0.05	0.19 ± 0.03	0.29 ± 0.02	0.08 ± 0.01	5.5 ± 0.5	21.7 ± 3.2
	100	9	356 ± 16	0.55 ± 0.03	3.92 ± 0.28	0.59 ± 0.04	0.18 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.08 ± 0.01	5.6 ± 0.4	21.0 ± 2.3
	300	8	363 ± 15	0.53 ± 0.03	4.19 ± 0.45	0.56 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.29 ± 0.01	0.07 ± 0.01	5.0 ± 0.8	21.2 ± 2.7
	1000	8	361 ± 20	0.53 ± 0.04	4.85** ± 0.23	0.60 ± 0.05	0.18 ± 0.02	0.30 ± 0.01	0.07 ± 0.02	5.4 ± 0.7	21.0 ± 2.8

Each value is expressed as mean ± S.D.

@ : Relative organ weight per 100g body weight

** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 16-1 Incidence of histopathological findings of male rats treated orally with 3-methyl benzoic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs: Findings	Grade	Dose(mg/kg) 0				30		100			300				1000			
		Fate No. of animals	TK 9	FP 1	(T) (10)	TK 10	(T) (10)	TK 9	FP 1	(T) (10)	TK 8	FP 1	UC 1	(T) (10)	TK 8	FP 1	UC 1	(T) (10)
Heart : Myocardial degeneration/ fibrosis	-		7	1	(8)	-	-	1	(1)	-	0	1	(1)	8	0	1	(9)	
	+		2	0	(2)	-	-	0	(0)	-	1	0	(1)	0	1	0	(1)	
Cellular infiltration, neutrophil, focal	-		9	1	(10)	-	-	1	(1)	-	1	0	(1)	8	1	1	(10)	
	+		0	0	(0)	-	-	0	(0)	-	0	1	(1)	0	0	0	(0)	
Lung : Mineralization, artery	-		7	1	(8)	-	-	1	(1)	-	1	0	(1)	6	1	0	(7)	
	+		2	0	(2)	-	-	0	(0)	-	0	1	(1)	2	0	1	(3)	
Metaplasia, osseous	-		9	1	(10)	-	-	1	(1)	-	1	1	(2)	7	1	1	(9)	
	+		0	0	(0)	-	-	0	(0)	-	0	0	(0)	1	0	0	(1)	
Accumulation, foam cell	-		9	1	(10)	-	-	1	(1)	-	1	1	(2)	7	1	1	(9)	
	+		0	0	(0)	-	-	0	(0)	-	0	0	(0)	1	0	0	(1)	
Liver : Degeneration, fatty, hepatocyte, periportal	-		9	1	(10)	-	-	1	(1)	-	1	1	(2)	7	1	1	(9)	
	+		0	0	(0)	-	-	0	(0)	-	0	0	(0)	1	0	0	(1)	
Necrosis, focal	-		9	1	(10)	-	-	1	(1)	-	1	1	(2)	7	1	1	(9)	
	+		0	0	(0)	-	-	0	(0)	-	0	0	(0)	1	0	0	(1)	
Microgranuloma	-		7	1	(8)	-	-	1	(1)	-	0	1	(1)	5	1	0	(6)	
	+		2	0	(2)	-	-	0	(0)	-	1	0	(1)	3	0	1	(4)	
Kidney: Hyaline droplet, proximal tubular epithelium	-		0	0	(0)	-	-	0	(0)	-	0	0	(0)	0	0	0	(0)	
	+		9	1	(10)	-	-	1	(1)	-	1	1	(2)	8	1	1	(10)	

- : Negative; + : Slight; - : Not examined; TK : Terminal kill; FP : Failed to cause pregnancy, killed at the termination; UC : Animal with unsuccessful copulation, killed at the termination; T : Total

Table 16-2 Incidence of histopathological findings of male rats treated orally with 3-methyl benzoic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs: Findings	Grade	Dose (mg/kg) 0				30		100			300			1000			
		Fate No. of animals	TK	FP	(T)	TK	(T)	TK	FP	(T)	TK	FP	UC	(T)	TK	FP	UC
Kidney: Eosinophilic body, proximal tubular epithelium (continued)	-	8	1	(9)	-	-	1	(1)	-	0	1	(1)	8	1	1	(10)	
	+	0	0	(0)	-	-	0	(0)	-	1	0	(1)	0	0	0	(0)	
	++	1	0	(1)	(1)	-	0	(0)	(0)	-	0	0	(0)	(1)	0	0	0
Cyst, solitary/multiple	-	8	0	(8)	-	-	1	(1)	-	1	1	(2)	7	0	1	(8)	
	+	1	1	(2)	-	-	0	(0)	-	0	0	(0)	1	1	0	(2)	
Cast, hyaline	-	8	1	(9)	-	-	1	(1)	-	1	1	(2)	8	1	1	(10)	
	+	1	0	(1)	-	-	0	(0)	-	0	0	(0)	0	0	0	(0)	
Cellular infiltration, lymphocyte, cortex	-	8	1	(9)	-	-	1	(1)	-	1	1	(2)	7	1	1	(9)	
	+	1	0	(1)	-	-	0	(0)	-	0	0	(0)	1	0	0	(1)	
Mineralization, cortex	-	8	1	(9)	-	-	1	(1)	-	1	1	(2)	8	1	1	(10)	
	+	1	0	(1)	-	-	0	(0)	-	0	0	(0)	0	0	0	(0)	
Basophilic tubules	-	6	0	(6)	-	-	1	(1)	-	0	1	(1)	4	1	1	(6)	
	+	3	1	(4)	-	-	0	(0)	-	1	0	(1)	4	0	0	(4)	
Fibrosis, cortex	-	8	1	(9)	-	-	1	(1)	-	1	1	(2)	7	1	1	(9)	
	+	1	0	(1)	-	-	0	(0)	-	0	0	(0)	1	0	0	(1)	
Testis: Degeneration, germ cell, focal, unilateral	-	9	1	(10)	-	-	1	(1)	-	1	1	(2)	6	1	1	(8)	
	+	0	0	(0)	-	-	0	(0)	-	0	0	(0)	2	0	0	(2)	
Epididymis: Granuloma, spermatic	-	9	1	(10)	-	-	1	(1)	-	1	1	(2)	7	1	1	(9)	
	+	0	0	(0)	-	-	0	(0)	-	0	0	(0)	1	0	0	(1)	

- : Negative; + : Slight; ++ : Moderate; - : Not examined; TK : Terminal kill; FP : Failed to cause pregnancy, killed at the termination; UC : Animal with unsuccessful copulation, killed at the termination; T : Total

Table 16-3 Incidence of histopathological findings of male rats treated orally with 3-methyl benzoic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs: Findings	Grade	Dose(mg/kg) 0				30		100			300			1000			
		Fate No. of animals	TK 9	FP 1	(T) (10)	TK 10	(T) (10)	TK 9	FP 1	(T) (10)	TK 8	FP 1	UC 1	(T) (10)	TK 8	FP 1	UC 1
Epididymis: Cell debris, lumen, (continued) unilateral	-		9	1	(10)	-	-	1	(1)	-	1	1	(2)	7	1	1	(9)
	+		0	0	(0)	-	-	0	(0)	-	0	0	(0)	1	0	0	(1)
Prostate : Inflammation	-		-	1	(1)	-	-	1	(1)	-	1	1	(2)	-	0	1	(1)
	+		-	0	(0)	-	-	0	(0)	-	0	0	(0)	-	1	0	(1)
Thymus : Hemorrhage	-		8	1	(9)	-	-	1	(1)	-	1	1	(2)	7	1	0	(8)
	+		1	0	(1)	-	-	0	(0)	-	0	0	(0)	1	0	1	(2)
Spleen : Hematopoiesis, extramedullary	-		0	0	(0)	-	-	0	(0)	-	0	0	(0)	0	0	0	(0)
	+		9	1	(10)	-	-	1	(1)	-	1	1	(2)	8	1	1	(10)
Deposit, hemosiderin	-		0	0	(0)	-	-	0	(0)	-	0	0	(0)	0	0	0	(0)
	+		9	1	(10)	-	-	1	(1)	-	1	1	(2)	8	1	1	(10)
Fibrosis, capsule	-		8	1	(9)	-	-	1	(1)	-	1	1	(2)	7	1	1	(9)
	+		1	0	(1)	-	-	0	(0)	-	0	0	(0)	1	0	0	(1)

- : Negative; + : Slight; - : Not examined; TK : Terminal kill; FP : Failed to cause pregnancy, killed at the termination;
 UC : Animal with unsuccessful copulation, killed at the termination; T : Total
 No abnormalities were detected in the urinary bladder, pituitary, adrenal, bone marrow and brain from animals of control and 1000mg/kg groups, and FP and UC animals, and in the prostate and seminal vesicle from FP and UC animals.

Table 17-1 Incidence of histopathological findings of female rats treated orally with 3-methyl benzoic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs: Findings	Grade	Dose (mg/kg) 0				30			100			300				1000			
		Fate No. of animals	TK	NP	(T)	TK	ED	(T)	TK	NP	(T)	TK	NP	UC	(T)	TK	NP	UC	(T)
Heart : Myocardial degeneration /fibrosis	-		8	1	(9)	-	1	(1)	-	1	(1)	-	1	1	(2)	7	1	1	(9)
	+		1	0	(1)	-	0	(0)	-	0	(0)	-	0	0	(0)	1	0	0	(1)
Lung : Cellular infiltration/ hemorrhage	-		7	1	(8)	0/1 ^a	1	(1)	-	1	(1)	0/1 ^a	1	1	(2)	7	1	1	(9)
	+		2	0	(2)	1/1	0	(1)	-	0	(0)	1/1	0	0	(1)	0	0	0	(0)
	++		0	0	(0)	0/1	0	(0)	(1)	0	(0)	0/1	0	0	(0)	1	0	0	(1)
Mineralization, artery	-		7	1	(8)	-	1	(1)	-	1	(1)	1/1	1	1	(3)	8	0	1	(9)
	+		2	0	(2)	-	0	(0)	-	0	(0)	0/1	0	0	(0)	0	1	0	(1)
Accumulation, foam cell	-		8	1	(9)	-	1	(1)	-	1	(1)	1/1	1	1	(3)	6	1	1	(8)
	+		1	0	(1)	-	0	(0)	-	0	(0)	0/1	0	0	(0)	2	0	0	(2)
Liver : Degeneration, vacuolar, hepatocyte, periportal	-		9	1	(10)	9	1	(10)	9	1	(10)	6	0	1	(7)	2	0	1	(3)
	+		0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)	2	0	0	(2)	4	1	0	(5)
	++		0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)	0	1	0	(1)	2	0	0	(2)
Necrosis, focal	-		7	1	(8)	9	1	(10)	9	1	(10)	8	1	1	(10)	7	1	1	(9)
	+		2	0	(2)	0	0	(0)	0	0	(0)	0	0	0	(0)	1	0	0	(1)
Microgranuloma	-		9	1	(10)	9	1	(10)	8	1	(9)	8	1	1	(10)	8	1	1	(10)
	+		0	0	(0)	0	0	(0)	1	0	(1)	0	0	0	(0)	0	0	0	(0)
Kidney: Cellular infiltration, lymphocyte, cortex	-		8	1	(9)	-	0	(0)	-	1	(1)	-	1	1	(2)	8	1	1	(10)
	+		1	0	(1)	-	1	(1)	-	0	(0)	-	0	0	(0)	0	0	0	(0)

- : Negative; + : Slight; ++ : Moderate; - : Not examined; TK : Terminal kill; NP : Non-pregnant, killed on 26 days after copulation; UC : Animal with unsuccessful copulation, killed at the termination; ED : Animal with embryonic death, killed at the termination; T : Total; a : Examined the animal with macroscopical abnormalities in the lung
 ** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 17-2 Incidence of histopathological findings of female rats treated orally with 3-methyl benzoic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs : Findings	Grade	Dose (mg/kg) 0		30		100		300		1000	
		Fate No. of animals	TK NP (T)	TK ED (T)	TK NP (T)	TK NP UC (T)	TK NP UC (T)				
Kidney : Mineralization, (continued) cortico-medullary junction	-		8 1 (9)	- 1 (1)	- 1 (1)	- 1 (1)	- 1 1 (2)	7 1 1 (9)			
	+		1 0 (1)	- 0 (0)	- 0 (0)	- 0 (0)	- 0 0 (0)	1 0 0 (1)			
Basophilic tubules	-		8 1 (9)	- 1 (1)	- 1 (1)	- 1 (1)	- 1 0 (1)	7 1 1 (9)			
	+		1 0 (1)	- 0 (0)	- 0 (0)	- 0 (0)	- 0 1 (1)	1 0 0 (1)			
Uterus : Hemorrhagic necrosis, placenta	-		- 1 (1)	- 0 (0)	- 1 (1)	- 1 (1)	- 1 1 (2)	- 1 1 (2)			
	+++		- 0 (0)	- 1 (1)	- 0 (0)	- 0 (0)	- 0 0 (0)	- 0 0 (0)			
Inflammation endometrium	-		- 1 (1)	- 1 (1)	- 0 (0)	- 1 (1)	- 1 1 (2)	- 1 1 (2)			
	++		- 0 (0)	- 0 (0)	- 1 (1)	- 0 (0)	- 0 0 (0)	- 0 0 (0)			
Adrenal: Necrosis/mineralization, cortex, unilateral	-		9 1 (10)	- 1 (1)	- 1 (1)	- 1 (1)	- 1 1 (2)	8 0 1 (9)			
	++		0 0 (0)	- 0 (0)	- 0 (0)	- 0 (0)	- 0 0 (0)	0 1 0 (1)			
Thymus : Hemorrhage	-		8 1 (9)	- 1 (1)	0/1 ^a 1 (1)	- 0/1 ^a 1 (1)	- 0/1 ^a 1 (1)	8 1 1 (10)			
	+		1 0 (1)	- 0 (0)	1/1 0 (1)	- 1/1 0 (1)	- 1/1 0 (1)	0 0 0 (0)			
Spleen : Hematopoiesis, extramedullary	-		0 0 (0)	0/1 ^a 0 (0)	0/1 ^a 0 (0)	0/1 ^a 0 (0)	0 0 (0)	0 0 0 (0)			
	+		8 1 (9)	1/1 1 (2)	1/1 1 (2)	1/1 1 (2)	1 1 (2)	7 1 1 (9)			
	++		1 0 (1)	0/1 0 (0)	0/1 0 (0)	0/1 0 (0)	0 0 (0)	1 0 0 (1)			
Deposit, hemosiderin	-		0 0 (0)	0/1 0 (0)	0/1 0 (0)	0/1 0 (0)	0 0 (0)	0 0 0 (0)			
	+		9 1 (10)	1/1 1 (2)	1/1 1 (2)	1/1 1 (2)	1 1 (2)	8 1 1 (10)			
Hyperplasia, lymphoid cell	-		9 1 (10)	0/1 1 (1)	0/1 1 (1)	0/1 1 (1)	0/1 1 (2)	8 1 1 (10)			
	+		0 0 (0)	1/1 0 (1)	1/1 0 (1)	1/1 0 (1)	1/1 0 (1)	0 0 0 (0)			

- : Negative; + : Slight; ++ : Moderate; +++ : Severe; - : Not examined; TK : Terminal kill; NP : Non-pregnant, killed on 26 days after copulation; UC : Animal with unsuccessful copulation, killed at the termination; ED : Animal with embryonic death, killed at the termination; T : Total; a : Examined the animal with macroscopical abnormalities in the spleen or thymus

Table 17-3 Incidence of histopathological findings of female rats treated orally with 3-methyl benzoic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs: Findings	Dose(mg/kg) 0			30			100			300			1000											
	Grade	Fate	No. of animals	TK	NP	(T)	TK	ED	(T)	TK	NP	(T)	TK	NP	UC	(T)	TK	NP	UC	(T)				
			9	1		(10)	9	1		(10)	9	1		(10)	8	1	1		(10)	8	1	1		(10)
Skin : Hyperkeratosis, focal	-			-	-		-	-		-	-		0/1 ^a	-	-		(0)	-	-	-		-	-	
	+			-	-		-	-		-	-		1/1	-	-		(1)	-	-	-		-	-	

- : Negative; + : Slight; - : Not examined; TK : Terminal kill; NP : Non-pregnant, killed on 26 days after copulation; UC : Animal with unsuccessful copulation, killed at the termination; ED : Animal with embryonic death, killed at the termination; T : Total; a : Examined the animal with macroscopical abnormalities in the skin
 No abnormalities were detected in the urinary bladder, pituitary, adrenal, bone marrow and brain from animals of control and 1000 mg/kg groups, and NP, UC and ED animals, and in the ovary from NP, UC and ED animals.

Table 1 8 Reproduction results of rats treated orally with 3-methyl benzoic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

	Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000
No. of pairs mated		10	10	10	10	10
No. of pairs with successful copulation		10	10	10	9	9
Copulation index (%)		100	100	100	90	90
Pairing days until copulation(days, Mean±S.D.)		2.2±1.1	2.2±1.0	2.1±1.1	2.4±1.2	1.9±1.1
No. of pregnant females		9	10	9	8	8
Fertility index (%)		90.0	100	90.0	88.9	88.9
No. of corpora lutea (Mean±S.D.)		19.3±2.3	17.9±3.9	19.4±3.8	17.5±3.0	17.9±2.2
No. of implantation sites (Mean±S.D.)		17.8±2.5	15.2±5.4	15.9±3.5	16.0±4.0	16.6±3.2
Implantation index (% Mean±S.D.)		92.2±9.5	81.9±27.5	84.4±23.2	90.3±14.0	93.5±15.7
No. of pregnant females with parturition		9	9	9	8	8
Gestation length (days, Mean±S.D.)		22.6±0.5	22.6±0.5	22.7±0.5	22.8±0.5	22.6±0.5
No. of pregnant females with live pups		9	9	9	8	8
Gestation index (%)		100	90.0	100	100	100
No. of pregnant females with live pups on day 4		9	9	9	8	8

Copulation index = (No. of pairs with successful copulation/No. of pairs mated)×100

Fertility index = (No. of pregnant females/No. of pairs with successful copulation)×100

Gestation index = (No. of females with live pups/No. of pregnant females)×100

Table 19

Litter results of female rats treated orally with 3-methyl benzoic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000
No. of pups born	16.4 ± 2.9	15.9 ± 2.8	15.0 ± 3.7	14.6 ± 3.4	14.3 ± 3.2
Delivery index (%)	92.1 ± 7.3	94.4 ± 5.8	94.6 ± 10.1	92.2 ± 4.8	85.4 ± 8.5
No. of pups alive on day 0 of lactation					
Total	16.2 ± 2.9	15.7 ± 2.3	14.8 ± 3.7	13.6 ± 3.6	13.3 ± 3.2
Male	8.2 ± 2.3	8.3 ± 2.9	7.0 ± 2.3	6.9 ± 3.2	6.8 ± 3.2
Female	8.0 ± 2.2	7.3 ± 2.4	7.8 ± 2.3	6.8 ± 2.1	6.5 ± 3.2
Live birth index (%)	98.7 ± 2.7	98.9 ± 3.2	98.6 ± 2.8	94.0 ± 14.4	92.9 ± 8.1
Sex ratio (Male/Female)	1.03	1.17	0.90	1.02	1.00
No. of pups alive on day 4 of lactation					
Total	16.0 ± 3.1	15.7 ± 2.3	14.7 ± 3.6	13.6 ± 3.6	12.8 ± 3.0
Male	8.0 ± 2.3	8.3 ± 2.9	7.0 ± 2.3	6.9 ± 3.2	6.6 ± 2.9
Female	8.0 ± 2.2	7.3 ± 2.4	7.7 ± 2.3	6.8 ± 2.1	6.1 ± 3.2
Viability index (%)	98.5 ± 4.4	100 ± 0	99.4 ± 1.8	100 ± 0	96.7 ± 5.0
Body weight of live pups (g)					
on day 0					
Male	7.3 ± 0.9	7.3 ± 0.6	7.5 ± 0.7	7.6 ± 0.7	6.7 ± 0.6
Female	6.9 ± 0.9	6.9 ± 0.5	7.1 ± 0.7	7.3 ± 0.8	6.2 ± 0.6
on day 4					
Male	11.6 ± 2.0	11.6 ± 1.2	12.3 ± 1.9	12.9 ± 2.1	11.0 ± 1.5
Female	11.3 ± 1.9	10.8 ± 0.9	11.7 ± 1.8	12.3 ± 2.3	10.2 ± 1.3

Delivery index = (No. of pups born / No. of implantation sites) × 100

Live birth index = (No. of live pups on day 0 / No. of pups born) × 100

Viability index = (No. of live pups on day 4 / No. of live pups on day 0) × 100

Sex ratio = Total No. of male pups / Total No. of female pups

Each value is expressed as Mean ± S.D., except sex ratio.

Table 20

Incidence of external findings of rats treated orally with 3-methyl benzoic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Findings	Dose(mg/kg)	0	30	100	300	1000
External	No. of pups examined	147	143	135	117	111
	No. of pups with external anomalies	0 (0)	1 (0.5±1.6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	External anomalies					
	Vestigial tail	0 (0)	1 (0.5±1.6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

() : No. of pups (Mean±S.D. of individual litter percentages)

Table 21 - 1 Incidence of visceral findings of rats treated orally with 3-methyl benzoic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Findings	Dose(mg/kg)	0	30	100	300	1000
Visceral	No. of pups examined	147	143	135	117	109
	No. of pups with visceral anomalies	0 (0)	1 (0.5±1.6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Visceral anomalies					
	Multiple anomalies ^a	0 (0)	1 (0.5±1.6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

() : No. of pups (Mean±S.D. of individual litter percentages)

a : Fused kidney and testicular hypoplasia

Table 21 - 2

Incidence of visceral findings of rats treated orally with 3-methyl benzoic acid in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Findings	Dose(mg/kg)	0	30	100	300	1000
Visceral	No. of pups examined	147	143	135	117	109
	No. of pups with visceral variations	2 (1.2±3.7)	6 (3.8±5.0)	4 (3.7±7.4)	10 (7.9±8.1)	11 (9.4±7.4)
	Visceral variations					
	Thymic remnant in neck	1 (0.6±1.9)	2 (1.4±2.9)	4 (3.7±7.4)	10 (7.9±8.1)	3 (2.5±3.5)
	Persistent left umbilical artery	1 (0.6±1.9)	4 (2.4±3.9)	0 (0)	0 (0)	7 (6.1±6.0)
	Dilatation of renal pelvis	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.7±2.1)

() : No. of pups (Mean±S.D. of individual litter percentages)