

2003年 9月29日

4-メチル安息香酸の  
ラットを用いる28日間  
反復経口投与毒性試験  
(回復14日間)

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】

|                      | 頁  |
|----------------------|----|
| 要 約 -----            | 1  |
| 試験目的 -----           | 2  |
| 試験方法 -----           | 3  |
| 1. 被験物質 -----        | 3  |
| 2. 使用動物および飼育方法 ----- | 3  |
| 3. 投与検体の調製 -----     | 4  |
| 4. 群および群分け -----     | 5  |
| 5. 投与方法 -----        | 5  |
| 6. 観察および検査 -----     | 6  |
| 7. データ解析法 -----      | 9  |
| 結 果 -----            | 10 |
| 1. 死亡例 -----         | 10 |
| 2. 一般状態 -----        | 10 |
| 3. 詳細な臨床観察 -----     | 10 |
| 4. 体重 -----          | 10 |
| 5. 摂餌量 -----         | 11 |
| 6. 尿検査所見 -----       | 11 |
| 7. 血液学検査所見 -----     | 11 |
| 8. 血液生化学検査所見 -----   | 12 |
| 9. 病理学検査所見 -----     | 12 |
| 考 察 -----            | 14 |
| 参考文献 -----           | 16 |

Figures 1,2

Tables 1～11

## 【要 約】

4-メチル安息香酸の28日間反復経口投与毒性試験（回復14日間）を雌雄の Sprague-Dawley 系ラットを用いて実施した。雌雄とも4群構成とし1群には媒体である0.5%CMC Na水溶液を、他の3群には被験物質を、それぞれ100、300 および 1000 mg/kg の用量で28日間にわたり強制経口投与した。雌雄ともに用いた動物数は、対照群および 1000 mg/kg 投与群は回復試験の5匹を含む各10匹、その他の群は各5匹とした。

投与期間中、1000 mg/kg 投与群において、投与第16日から雄1例、雌2例に投与直後に一過性の流涎が認められた。また、1000 mg/kg 投与群の雌では投与第8日から摂餌量の増加が認められた。投与期間終了時の検査では、1000 mg/kg 投与群の雌で血小板数の減少傾向と AST 活性の上昇がみられた。その他には、一般状態および詳細な臨床観察、および各種臨床検査ならびに病理組織検査で被験物質投与によると思われる変化は認められなかった。

以上の結果から、4-メチル安息香酸の無作用量は雌雄とも 300 mg/kg/day と考えられた。

## 【試験目的】

4-メチル安息香酸は、染料、顔料、塗料、金属防錆・防蝕剤等として広く用いられている。その毒性についてはマウスとラットにおける急性毒性試験の報告があり、それによるとラットのLD<sub>50</sub>は経口投与で雄 3113 mg/kg、雌 2115 mg/kgであった<sup>1)</sup>。

今回、OECD既存化学物質安全性点検に係る毒性調査の一環として、4-メチル安息香酸の安全性確認のための資料を得ることを目的としてラットにおける28日間反復経口投与毒性試験および14日間回復試験を実施した。

なお、本試験は、OECD化学物質試験法ガイドライン「407げっ歯類における28日間反復経口投与毒性試験」（1995年7月27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。

## 【試 験 方 法】

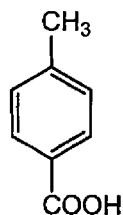
### 1. 被験物質

被験物質として用いた 4-メチル安息香酸の性状は下記のとおりである。

---

|         |                                                                                                                         |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 化学名     | 4-メチル安息香酸                                                                                                               |
| 別名      | パラトルイル酸                                                                                                                 |
| 略称      | MBA                                                                                                                     |
| 英名      | Benzoic acid, 4-methyl-                                                                                                 |
| CAS No. | 99-94-5                                                                                                                 |
| 分子式     | C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>                                                                            |
| 分子量     | 136.15                                                                                                                  |
| 物理化学的性質 | 性 状： 白色結晶性粉末（昇華性あり）<br>融 点： 180-181 °C<br>沸 点： 274-275 °C<br>蒸気圧： 提供元からのデータなし<br>分配係数： 提供元からのデータなし<br>比 重： 1.278 (25°C) |

構造式



---

本試験には、より提供された4-メチル安息香酸（ロット番号： 純度： 98.85 %、不純物：水分 0.01%、灰分0.01%）を用いた。被験物質は受領後、使用時まで被験物質受領保管室において室温で保管した。試験終了後に返却した被験物質について提供者が再度品質試験を実施して、試験期間中の安定性を確認した（Appendix A）。

### 2. 使用動物および飼育方法

生後4週で購入した雌雄の Sprague-Dawley 系ラット [Crj:CD(SD)IGS、SPF、日本チャールス・リバー株式会社、厚木飼育センター] [動物購入日：2002年7月15日、入荷匹数：雄34匹、雌34匹、入荷時体重：雄 75.0～85.1 g（平均79.4 g）、雌 64.0～73.5 g（平均 69.5 g）] を検疫と馴化を兼ね、入荷日も含めて8日間にわたり予備飼育した後、一般状態に異常の認められなかった雌雄各30匹を試験に供した[投与開始日：2002年7月22日、試験開始時体重：雄 135.5～166.2 g（平均148.8 g）、雌 115.5～138.1 g（平均126.7g）]。動物は、

全飼育期間を通じて、許容温度 21.0～25.0℃、許容湿度40.0～75.0%、換気回数約15回／時間、照明12時間（7～19時点灯）に設定された飼育室内で金属製金網床ケージ（220w×270d×190h mm）に1匹ずつ収容し、固型飼料（CE-2、日本クレア株式会社）および水道水（秦野市水道局給水）を自由に摂取させて飼育した。なお、飼育期間中、飼育室の温湿度の実測値（温度 21.5～24.5℃、湿度50.5～64.5%）は許容値の範囲内にあり、試験に支障を来す温湿度の異常は認められなかった。また、供給した飼料および水には試験に支障を来す可能性のある混入物はなかった。

各動物の耳介には耳パンチを用いて一連の個体番号を標識し、また、群ごとに色の異なる動物カードに試験計画番号、性別、群（投与量）、動物番号を記入して飼育ケージに掛け個体識別の補助とした。

### 3. 投与検体の調製

4-メチル安息香酸を各濃度ごとに秤量し、乳鉢で摩砕後、0.5 %CMC Na水溶液（カルメロースナトリウム；丸石製薬株式会社、製造番号:2115、注射用水；光製薬株式会社、製造番号:A106AA）を加え、ミキサー（あわとり練太郎 AR-360M、㈱シンキー）を用いて所定濃度の懸濁液を調製した。検体は投与時まで冷暗所（冷蔵庫内）に保管し、調製後7日以内に使用した。

本試験に先立ち、本被験物質の急性経口投与毒性試験（試験計画番号：A-01-069）において、0.1 および 20 w/v %の調製検体について冷暗所（冷蔵庫内）における調製後8日間の安定性を確認している（Appendix B）。また、初回調製検体について投与検体中の被験物質の含量および均一性（調製指示濃度の85.0～115%以内、測定濃度 95.2～99.0%）を測定し、規定範囲内にあることを確認した（Appendix C,D）。

調製検体中の被験物質濃度の測定は、各調製検体を1 mLずつ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高速液体クロマトグラフ（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。

HPLC 条件 分析カラム：Inertsil ODS-2（内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm、ジエールサイエンス㈱）  
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 µL

#### 4. 群および群分け

本試験の投与量は投与量設定のための予備試験（試験計画番号：C-01-005、投与量：0、40、200 および 1000 mg/kg）の結果に基づき決定した。すなわち、4-メチル安息香酸を雄動物に7日間反復経口投与した結果、投与第3日に200 mg/kg 投与群の1例で投与直後に一過性の軟便が認められた以外は、各群とも一般状態に変化は認められなかった。また、各群とも体重は順調に増加した。剖検においても、各群に被験物質の影響と考えられる所見はみられなかった。

以上の結果から、OECDガイドラインに定める限度用量である1000 mg/kgを本試験の高用量とし、以下公比約3で除して300 および 100 mg/kgを中用量および低用量とした。また、媒体である0.5%CMC Na水溶液を投与する対照群を設け、回復試験を行う対照群および1000 mg/kg投与群は各10匹、その他の群は各5匹の動物を使用した。

群分けは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行った。各群の投与量および動物番号等を以下に示した。

|      | 投与物質              | 投与量<br>(mg/kg) | 被験物質濃度<br>(w/v%) | 投与容量 <sup>a)</sup><br>(mL/kg) | 動物番号  |       | 剖検時期 <sup>b)</sup> |
|------|-------------------|----------------|------------------|-------------------------------|-------|-------|--------------------|
|      |                   |                |                  |                               | 雄     | 雌     |                    |
| 対照群  | 0.5%CMC Na<br>水溶液 | 0              | 0                | 5                             | 1～5   | 31～35 | 回復                 |
|      |                   |                |                  |                               | 6～10  | 36～40 | 投与                 |
| 低用量群 | MBA               | 100            | 2                | 5                             | 11～15 | 41～45 | 投与                 |
| 中用量群 | MBA               | 300            | 6                | 5                             | 16～20 | 46～50 | 投与                 |
| 高用量群 | MBA               | 1000           | 20               | 5                             | 21～25 | 51～55 | 回復                 |
|      |                   |                |                  |                               | 26～30 | 56～60 | 投与                 |

a) 雌雄とも最近時の体重をもとに個体別に投与液量 (mL) を算出した。

b) 回復：投与期間終了後は回復試験に用い、回復試験期間終了時に定期解剖を行った。  
投与：投与期間終了時に定期解剖を行った。

#### 5. 投与方法

投与経路はOECD化学物質試験法ガイドラインに従い経口とした。投与は9時から12時の間に1日1回、28日間計28回行い、調製検体をマグネチックスターラーで絶えず攪拌しながら採取し、ラット用胃管を用いて強制経口投与した。投与容量は5 mL/kg とし、各投与時に得られている最も近い時点の体重をもとに個体別に投与液量を算出した。

なお、投与期間中の日数および週の表記法は、投与開始日および投与開始週をそれぞれ投与第1日および投与第1週とし、回復試験期間中の日数および週の表記法もこれに準じて回復第1日および回復第1週とした。

## 6. 観察および検査

### 1) 一般状態

全例について毎日（投与期間中は投与前、投与直後および投与約2～3時間後、回復試験期間中は1日1回）一般状態の観察を行った。

### 2) 詳細な臨床観察

スコアリング法による詳細な臨床観察を、投与前および投与開始後は回復試験期間終了日まで1週間に1回、13時～15時の間にブラインドで行った。投与第4週には、刺激に対する反応性の観察も合わせて実施した。

#### 詳細な臨床観察項目

ケージ越し：姿勢・体位、自発運動、発声、振戦、痙攣

ハンドリング時：取り出し易さ、扱い易さ、心拍動、体温、被毛、皮膚色、  
可視粘膜、流涙、眼球突出、瞳孔径、流涎

作業台上の観察：姿勢・体位、探索行動、身づくろい、発声、挙尾反応、歩行、  
常同行動、奇妙な行動、振戦、痙攣、呼吸数、立毛、眼裂、  
排尿回数、排便回数、接触に対する反応、撤去反応、耳介反射

#### 刺激に対する反応性の観察

聴覚刺激に対する反応：驚愕反応、視覚刺激に対する反応：視覚定位、瞳孔反射、固有感覚刺激に対する反応：正向反射

### 3) 体重測定

体重は投与第1週には投与第1日の投与直前と投与第4日、投与第2週以降の投与期間および回復試験期間中は週に2回の頻度で測定した。その他、投与期間終了日、回復試験期間終了日および剖検日にも体重を測定した。

### 4) 摂餌量

摂餌量は投与第1週では投与第1日から2日にかけて1日あたりの摂餌量を測定し、以後回復試験期間終了週まで毎週1回の頻度で週の第1日から第2日にかけての摂餌量を測定した。



## 5) 尿検査

全例について投与第4週および回復試験第2週に動物を代謝ケージに収容して4時間尿あるいは新鮮尿を採取し、以下の項目について検査した。

| 項目                                                 | 測定法                    | 使用機器                                |
|----------------------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|
| 色調・混濁度<br>沈渣<br>pH・潜血・蛋白質・糖・ケトン体<br>ウロビリノーゲン・ビリルビン | 視診<br>鏡検<br>試験紙法<br>同上 | 光学顕微鏡<br>クリテック 200+ (パイエル・三共)<br>同上 |

また、24時間の蓄尿を採取し、天秤を用いて尿量の測定ならびに重量法により比重を求めた。

## 6) 血液学検査

投与期間終了時および回復試験期間終了時に解剖を行った動物(以下、定期解剖例と記す)全例を採血前(屠殺剖検前)に18~24時間絶食させた。その後、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で腹部後大静脈から抗凝固剤として EDTA-2K を用いて採血し、以下の項目について検査した。ただし、プロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間の測定には、上記の採血に先立って、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で、腹部後大静脈から抗凝固剤としてクエン酸ナトリウムを用いて採取した血液を分離して得た血漿を用いた。

| 項目                        | 測定法                                   | 使用機器                               |
|---------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|
| 赤血球数(RBC)                 | 自動(電気抵抗法)                             | 血液自動分析装置<br>CELL-DYN3500SL(ダイチボット) |
| 白血球数(WBC)                 | 同上(フローサイトメリー・レーザー光散乱法/<br>電気抵抗法)      | 同上                                 |
| 白血球分類                     | 同上(フローサイトメリー・レーザー光散乱法 <sup>a)</sup> ) | 同上                                 |
| 血色素量(Hb)                  | 同上(吸光度法)                              | 同上                                 |
| 平均赤血球容積(MCV)              | 同上(電気抵抗法)                             | 同上                                 |
| 血小板数                      | 同上(電気抵抗法)                             | 同上                                 |
| ヘマトクリット値(Ht)              | 計算( $RBC \times MCV \times 0.001$ )   |                                    |
| 平均赤血球血色素量(MCH)            | 計算( $Hb \times 1000 / RBC$ )          |                                    |
| 平均赤血球血色素濃度(MCHC)          | 計算( $Hb \times 100 / Ht$ )            |                                    |
| プロトロンビン時間(PT)             | 光散乱検出法                                | 全自動血液凝固測定装置<br>CA-1000(東亜医用電子)     |
| 活性部分トロンボプラスチン時間<br>(APTT) | 同上                                    | 同上                                 |

a) 白血球分類の検査の補助として静脈血塗抹標本(Wright-Giemsa 染色)を作製した。

## 7) 血液生化学検査

前述の採血に引き続き、同様の麻酔および採血部位の条件下で全例からヘパリンを抗凝固剤として採取した血液を分離して得た血漿について、以下の項目を検査した。

| 項目                       | 測定法                 | 使用機器                              |
|--------------------------|---------------------|-----------------------------------|
| 総蛋白濃度                    | ビレット法               | 遠心方式生化学自動分析装置<br>COBAS-FARA (ロシュ) |
| アルブミン濃度                  | BCG 法               | 同上                                |
| 総コレステロール濃度               | COD・HDAOS 法         | 同上                                |
| ブドウ糖濃度                   | ヘキサキナーゼ・G6PDH 法     | 同上                                |
| 尿素窒素濃度 (BUN)             | ウレアーゼ・G1DH法         | 同上                                |
| クレアチニン濃度                 | Jaffe 法             | 同上                                |
| ALP 活性                   | GSCC 法              | 同上                                |
| AST (GOT) 活性             | IFCC 法              | 同上                                |
| ALT (GPT) 活性             | 同上                  | 同上                                |
| γ-GTP 活性                 | IFCC 法              | 同上                                |
| トリグリセリド濃度                | GPO・HAOS 法、グリセリン消去法 | 同上                                |
| 総ビリルビン濃度                 | アゾ・ビリルビン変法          | 同上                                |
| 無機リン濃度<br>(Inorg. phos.) | モリブデン酸直接法           | 同上                                |
| カルシウム濃度                  | OCPC 法              | 同上                                |
| A/G 比                    | 計算                  |                                   |
| ナトリウム濃度                  | イオン電極法              | 全自動電解質分析装置 EA05 (A&T)             |
| カリウム濃度                   | 同上                  | 同上                                |
| 塩素濃度                     | 同上                  | 同上                                |

## 8) 病理学検査

採血後、必要に応じて腋窩動脈を切断して放血屠殺した後、全例の器官および組織を肉眼的に観察し各動物の脳、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣、精巣上体の重量を測定した。また、各器官重量を剖検日の体重で除してそれぞれの相対重量を算出した。

肉眼的観察に引き続き、以下の器官あるいは組織を摘出して保存した。なお、精巣および精巣上体はブアン液に固定し(長期保存は 0.1 M リン酸緩衝10%ホルマリン溶液を使用)、その他の器官・組織は 0.1 M リン酸緩衝10%ホルマリン溶液に固定した。さらに、対照群および高用量群の全例の固定・保存した器官・組織をパラフィン包埋して薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製した。その後、光学顕微鏡を用いて組織学検査を実施した。

---

## 固定・保存した器官・組織

---

脳、脊髄、甲状腺、心臓、気管、肺（気管支を含む）、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、副腎、小腸（回腸、パイエル板を含む）、大腸（結腸）、精巣、精巣上体、前立腺、精囊（凝固腺を含む）、子宮、膣、膀胱、下顎リンパ節、胃、卵巣、腸間膜リンパ節、坐骨神経、大腿骨骨髓、大腿骨、病変部

---

### 7. データ解析法

体重、摂餌量および半定量検査を除く尿検査、定期解剖例の血液学検査、血液生化学検査の値および器官重量は、各群ごとに平均値および標準偏差を求めた。次いで、試験群の構成が対照群を含めて3群以上の場合は、Bartlettの方法により分散の一樣性について検定（有意水準：5%）を行った。分散が一樣であった場合には一元配置型の分散分析を行い、群間に有意性（有意水準：5%）が認められた場合は Dunnett 法により多重比較を行った。また、分散が一樣でなかった場合は Kruskal-Wallis の順位検定を行い、群間に有意性（有意水準：5%）が認められた場合には Dunnett 型の検定法で多重比較を行った。ただし、いずれかの群で分散が0となった場合には、Bartlett による検定は行わずに Kruskal-Wallis の順位検定を行い、その結果、群間に有意性が認められた場合には Dunnett 型の検定法により多重比較を行った。一方、試験群が対照群を含め2群の場合には対照群と被験物質投与群の各平均値の差の検定はF検定（有意水準：5%）を行い、等分散の場合には Student の t 検定法、不等分散の場合には Aspin-Welch の t 検定法を用いて有意差検定を行った。ただし、どちらかの群で分散が0となった場合には t 検定は実施しなかった。

尿の半定量検査成績は、対照群を含めて3群以上ある場合、列の累積または  $m \times n$  の分割表を用いる  $\chi^2$  検定を行い、有意性（有意水準：5%）が認められた場合には Dunnett 型の検定法により多重比較を行った。ただし、周辺度数が0になった場合には、検定は実施しなかった。また、対照群を含めて2群の場合、Wilcoxon の順位和検定を行った。ただし、どちらかの群で分散が0となった場合は、検定は実施しなかった。

さらに、病理組織所見でグレード分けしたデータは Mann-Whitney の U 検定（両側検定）法により、また、陽性グレードの合計値は Fisher の直接確率検定（片側検定）法により、対照群と各被験物質投与群との間の有意差検定を行った（有意水準：5%）。

## 【結 果】

### 1. 死亡例

投与期間および回復試験期間中に、対照群を含むいずれの群にも死亡例はなかった。

### 2. 一般状態 (Table 1、Appendix 1)

投与第2日から第3日の間に、軟便が1000 mg/kg 投与群の雄で3例、雌で2例に一時的に認められたが、それ以後は認められなかったため、被験物質の影響によるものが不明であった。また、投与直後に一過性の流涎が1000mg/kg 投与群の雄1例、雌2例に投与第16日から認められ始めた。ただし、投与第27日は認められなかった。その他には、投与期間および回復試験期間中に対照群を含むいずれの群にも一般状態の変化は認められなかった。

### 3. 詳細な臨床観察 (Table 2、Appendix 2)

試験期間中に週一回行ったスコアリング法による観察では、ケージ越しからの観察で、投与期間中および回復試験期間中に雌雄各群に変化はなかった。ハンドリング時では、取り出し易さおよび扱い易さの観察で、試験期間中に動物の取り扱い時に発声がみられたが対照群と各被験物質投与群に差は認められなかった。作業台上の観察時では、排尿および排便回数で投与期間中に対照群と各被験物質投与群の間で雌雄に被験物質投与によると思われる明らかな差はなかったが、回復試験期間中に雄の1000 mg/kg 投与群で排尿した動物の数が対照群より多かった。しかし、投与期間中の成績に差がなかったことから被験物質による変化ではないと考えた。接触に対する反応では、投与第4週に雄の1000 mg/kg 投与群でやや過敏に反応する動物が多かった。しかし、雌では対照群と各被験物質投与群との間に差はなかったことから、被験物質による明らかな変化とは考えられず、被験物質投与による影響ではないと判断した。

投与第4週に行った刺激に対する反応性の観察では、いずれの観察項目にも対照群と各被験物質投与群との間に差は認められなかった。

### 4. 体重 (Fig. 1、Table 3、Appendix 3)

投与期間中および回復試験期間中、雌雄共に被験物質投与群と対照群との間で体重推移に差は認められなかった。

#### 5. 摂餌量 (Fig. 2、Table 4、Appendix 4)

1000 mg/kg 投与群の雌において、投与第8日に摂餌量の有意な増加がみられ、これ以後、投与期間中に増加傾向がみられた。雄では投与期間中、被験物質投与群と対照群との間で摂餌量に差は認められなかった。

回復試験期間中では、雌雄ともに摂餌量に有意な差は認められなかった。

#### 6. 尿検査所見 (Table 5、Appendix 5)

投与第4週の検査で 1000 mg/kg 投与群の雌雄に尿量の有意な増加が認められ、これにともなうと考えられる尿比重の有意な低下が雄にみられた。同様に 300 mg/kg 投与群の雄でも尿量の有意な増加と尿比重の低下がみられた。一方、被験物質投与群では、対照群に比べ、給水ビン中の水の量が少ないことから摂水量の増加がうかがえた。また、1000 および 100 mg/kg 投与群の雌雄に尿の pH の低下が見られた。その他、雄の1000および300 mg/kg 投与群の尿蛋白と1000 mg/kg 投与群のケトン体が有意差に減少した。

回復期間終了週の検査では、被験物質投与群と対照群との間に明らかな変化はなかった。沈渣では投与期間終了週および回復期間終了週の検査で被験物質投与群と対照群との間に明らかな変化はなかった。

#### 7. 血液学検査所見 (Table 6、Appendix 6)

投与期間終了時の検査では、1000 mg/kg 投与群の雌の血小板数に減少傾向がみられた。雄では好酸球比率が有意に減少したが、生理的変動の範囲内であった。また、プロトロンビン時間の短縮傾向がみられたが用量依存的な変化ではなく、雌では認められなかったことから、偶発的な変化と判断した。なお、1000 mg/kg 投与群の雌のNo. 58 において測定後、サンプルに凝固が認められ、これに関連した値の低いものがあったため赤血球数、白血球数、血色素量、ヘマトクリット値、赤血球容積、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度および血小板数は採用しなかった。

回復試験期間終了時の検査では、1000 mg/kg 投与群の雄において赤血球数、血色素量およびヘマトクリット値の有意な低下が認められたが、生理的変動の範囲内であり、被験物質投与による影響ではなかった。

## 8. 血液生化学検査所見 (Table 7、Appendix 7)

投与期間終了時の検査では、1000 mg/kg 投与群の雌で総蛋白濃度の減少と AST 活性の上昇に有意差が認められた。

回復試験期間終了時の検査では、対照群と比較して雌雄いずれにおいても有意な差は認められなかった。

## 9. 病理学検査所見

### 1) 器官重量 (Table 8 ~ 9、Appendix 8 ~ 9)

投与期間終了時および回復試験期間終了時のいずれの器官重量にも被験物質投与による変化は認められなかった。

### 2) 剖検所見 (Table 10、Appendix 10)

#### 投与期間終了時解剖例

対照群および各被験物質投与群のいずれの器官にも異常所見は観察されなかった。

#### 回復試験期間終了時解剖例

1000 mg/kg 投与群の雌で1例に脾臓の腫大が認められたほかに、異常所見は認められなかった。

### 3) 組織学検査所見 (Table 11、Appendix 11)

#### 投与期間終了時剖検例

肝臓では、1000 mg/kg 投与群および対照群の雌雄全例に門脈周囲性の脂肪化が観察され、1000 mg/kg 投与群では対照群よりやや程度の強い雄1例、雌3例がみられたが、脂肪化の程度は軽度であり、有意な差は認められなかった。その他、雌の1000 mg/kg 投与群の2例および対照群の1例、雄の1000 mg/kg 投与群の1例に小肉芽腫がみられた。

腎臓では、雌の1000 mg/kg 投与群の2例および対照群の4例、雄の1000 mg/kg 投与群の2例および対照群の1例で好塩基性尿細管が観察されたが、程度はいずれの例もごく軽度であった。また、雄の対照群の1例に好酸性小体が認められたほか、鉾質沈着が雄の1000 mg/kg 投与群の髓質および雌の対照群の皮髓境界部に各1例みられた。

脾臓では、1000 mg/kg 投与群および対照群で雌雄全例に髓外造血、雌全例に褐色色素の沈着がみられたが、それぞれ両群間に程度の差は認められなかった。

前立腺では、1000 mg/kg 投与群の1例および対照群の2例の上皮および間質にリンパ球および好中球の浸潤がみられた。

肺では、1000 mg/kg 投与群の雄 1 例の動脈で鉍質沈着が観察された。

甲状腺では、対照群の雄 1 例に異所性の胸腺組織が観察された。

その他の病理組織検査を実施した器官に異常所見は認められなかった。

#### 回復試験期間終了時剖検例

剖検時、1000 mg/kg 投与群の雌 1 例に認められた腫大した脾臓では、中等度の髄外造血像と軽度の褐色色素の沈着が観察された。

## 【考 察】

4-メチル安息香酸を100、300 および1000 mg/kg の用量で雌雄の Sprague-Dawley 系ラットに28日間にわたって強制経口投与し、その後14日間の回復試験期間を設けた。

一般状態では、1000 mg/kg 投与群の雄1例、雌2例で投与第16日から認められた流涎は、刺激性をもつ被験物質では良く認められる症状であった。さらに、1000 mg/kg 投与群の雌では、投与第8日に摂餌量が有意に増加し、それ以後も増加傾向が認められた。これも被験物質の刺激性に関連した影響によるものと思われた。これらの流涎および摂餌量の増加は、同時期に行った本被験物質の経口投与簡易生殖毒性試験（R-01-005）においても認められた<sup>2)</sup>。

尿検査では、投与第4週の検査で1000 mg/kg 投与群の雌雄および300 mg/kg 投与群の雄に尿量の増加が認められた。しかし、投与終了時の腎臓の病理組織検査では毒性を示唆する変化は認められず、被験物質投与群では、対照群に比べ飲水の増加が見られたことから、尿量増加の原因と考えられた。また、通常、雄では尿蛋白およびケトン体は偽陽性または陽性を示すが、今回の検査では本被験物質投与群に偽陽性を示したものはわずかで、陰性が多かった。これらは、尿量の増加により希釈された結果と考えられた。同様に尿比重の低下と pH の低下も尿量の増加によるものと考えた。

過去に行われたOECDの既存化学物質点検事業において、本被験物質の類似物質である3-メチル安息香酸では 300 mg/kg 以上で肝臓重量の増加と肝細胞の空胞化が認められ、血小板数の減少、プロトロンビン時間の延長、AST 活性の上昇が報告されている<sup>3)</sup>。本試験でも1000 mg/kg 投与群の雌で血小板数の減少傾向と AST 活性の上昇が認められたことから、被験物質投与の影響が考えられた。しかし、総蛋白濃度の減少については、雌の 1000 mg/kg 投与群のみであり、肝臓に病理組織学的変化は認められないことから偶発的な変化と判断した。また、同じく類似物質である4-ヒドロキシ安息香酸では病理組織学的変化は認められなかったが300 mg/kg以上で、体重増加抑制と AST、ALT 活性の低下が報告されている<sup>4)</sup>。しかし、本試験ではこれらの所見はいずれも認められなかった。

以上の結果から4-メチル安息香酸の28日間反復投与によって引き起こされた毒性作用は軽度ではあったが、1000 mg/kg 投与群の雌雄で認められた流涎と雌の摂餌量の増加、血小板数の減少傾向および AST 活性の上昇であった。以上の成績より、4-メチル安息香酸の無



作用量は雌雄の 300 mg/kg/day と考えられた。

## 【参 考 文 献】

- 1) 峰下 鏡雄、辻野 勲、油井 良文、古川 茂典、若林 啓子: *p*-Toluic acidの急性毒性試験. 基礎と臨床. 12: 1893-1904 (1978)
- 2) 代田 真理子、田子 和美: 4-メチル安息香酸のラットを用いる経口投与簡易生殖毒性試験 (R-01-005)
- 3) 山本 譲、伊藤 義彦、野田 篤、伊藤 雅也、赤木 博、星 史子. 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. 化学物質毒性試験報告Vol. 7: 302-308 (1999)
- 4) 長尾 哲二、桑形 麻樹子、加藤 博康、宮原 敬. 4-ヒドロキシ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. 化学物質毒性試験報告Vol. 5: 251-257 (1997)

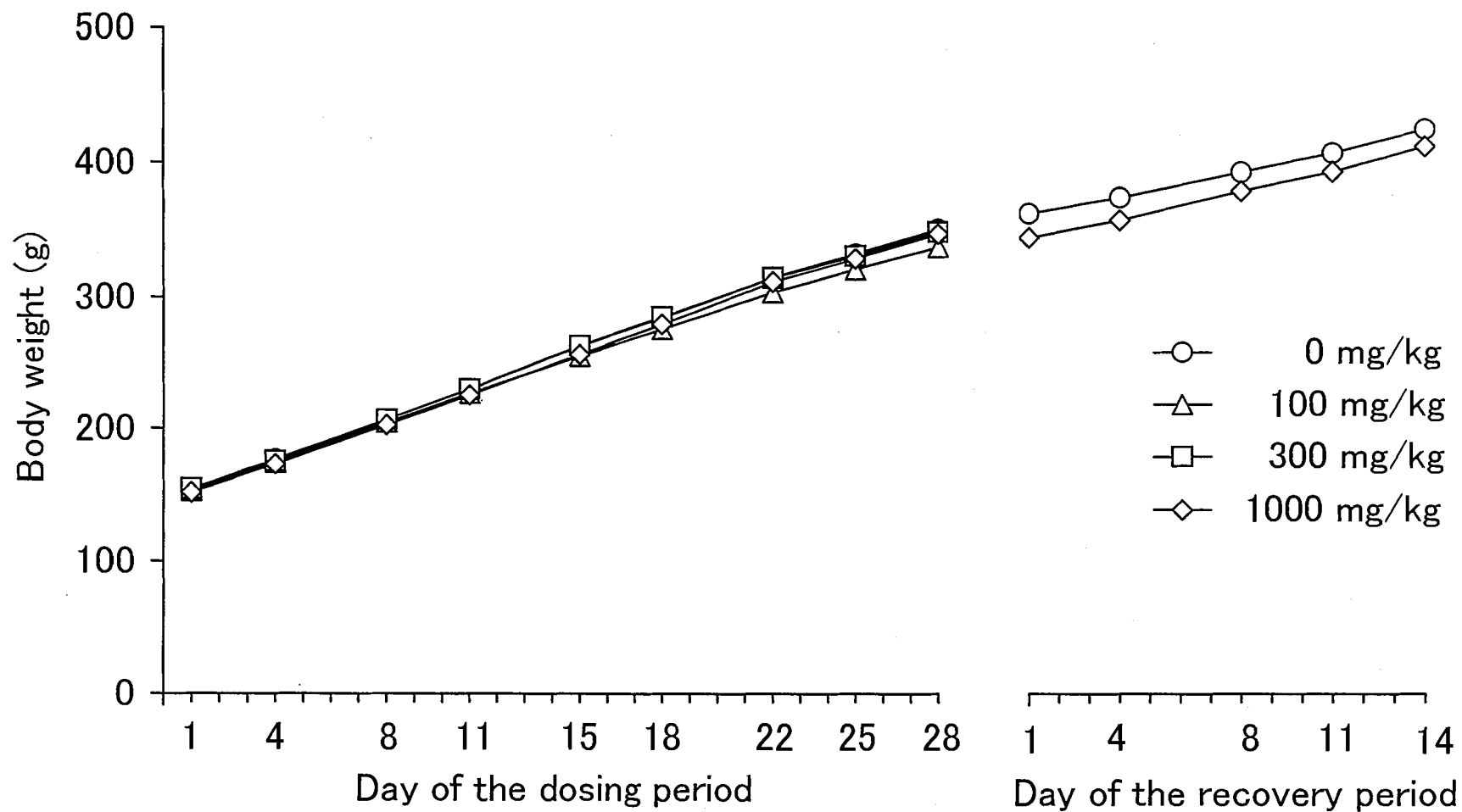


Fig. 1-1  
Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of benzoic acid,4-methyl- in rats  
Body weight changes in males

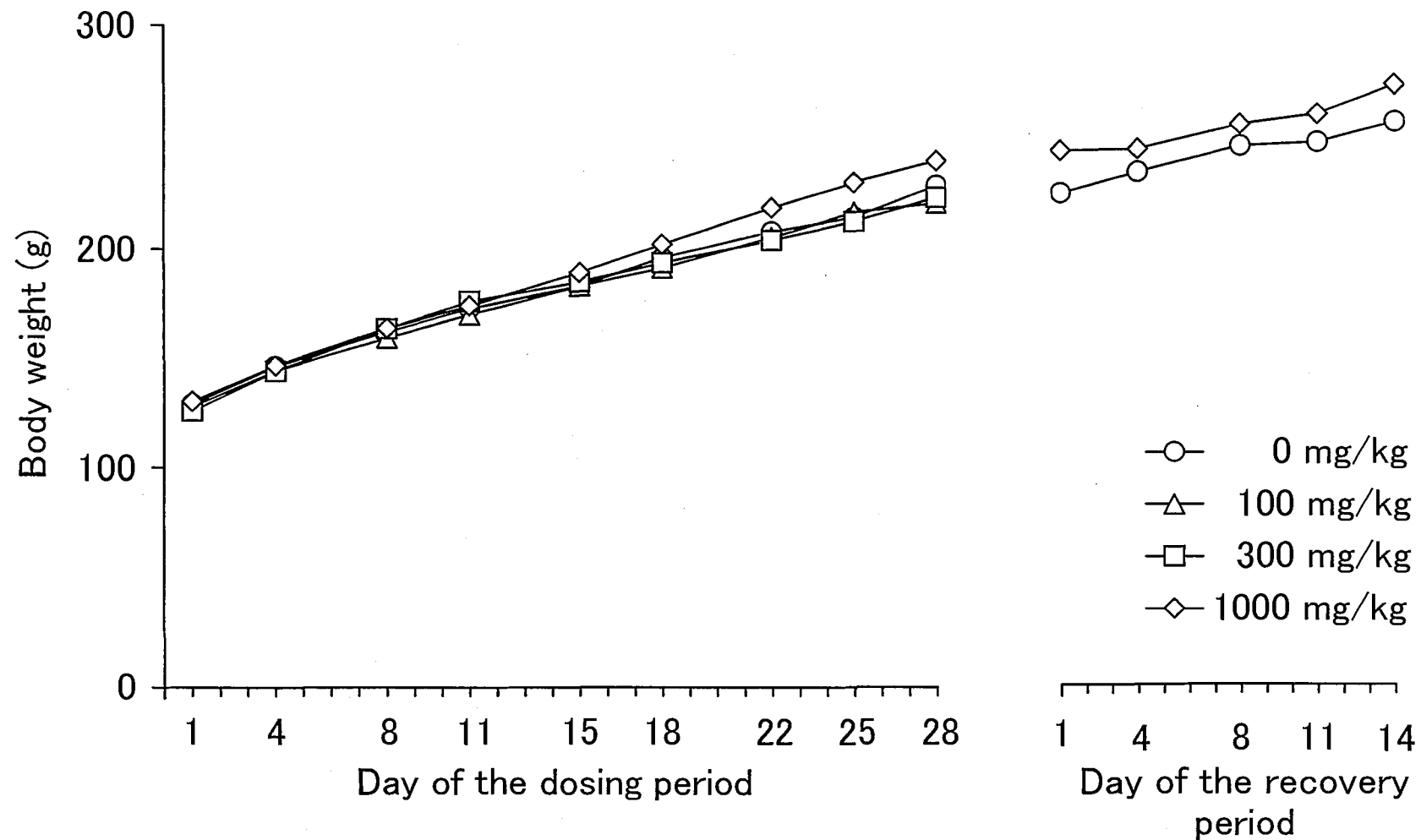


Fig. 1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of *benzoic acid,4-methyl-* in rats

Body weight changes in females

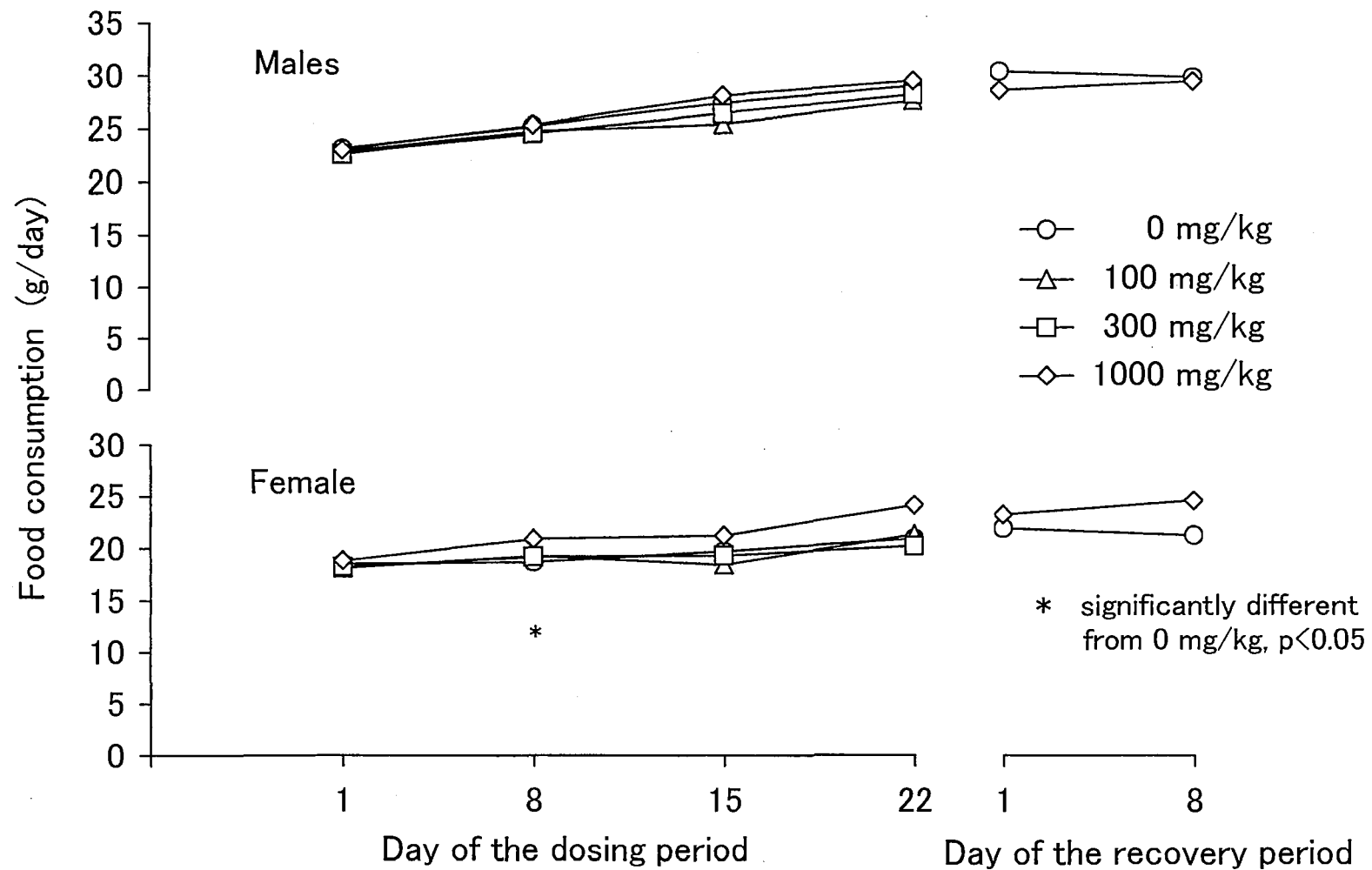


Fig. 2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of benzoic acid, 4-methyl- in rats

Food consumption in males and females

Table 1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of benzoic acid 4-methyl- in rats

Clinical signs in males

| Clinical signs | Dose (mg/kg) | Initial number of animals | Number of animals with clinical signs |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | Day of <sup>a)</sup> the recovery period |      | Total |
|----------------|--------------|---------------------------|---------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|------------------------------------------|------|-------|
|                |              |                           | Day of the dosing period              |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |                                          |      |       |
|                |              |                           | 1                                     | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 1                                        | 2-14 |       |
| Soft feces     | 0            | 10                        | -                                     | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -                                        | -    |       |
|                | 100          | 5                         | -                                     | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -                                        | -    |       |
|                | 300          | 5                         | -                                     | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -                                        | -    |       |
|                | 1000         | 10                        | -                                     | 3 | 1 | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -                                        | 3    |       |
| Salivation     | 0            | 10                        | -                                     | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -                                        | -    |       |
|                | 100          | 5                         | -                                     | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -                                        | -    |       |
|                | 300          | 5                         | -                                     | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -                                        | -    |       |
|                | 1000         | 10                        | -                                     | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | -  | 1  | -                                        | 1    |       |

-, no animal showed the sign

a), the recovery test was performed in 5 animals for each of the 0 and 1000 mg/kg groups

Table 1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of benzoic acid 4-methyl- in rats

Clinical signs in females

| Clinical signs | Dose (mg/kg) | Initial number of animals | Number of animals with clinical signs |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | Day of <sup>a)</sup> the recovery period |      | Total |
|----------------|--------------|---------------------------|---------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|------------------------------------------|------|-------|
|                |              |                           | Day of the dosing period              |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |                                          |      |       |
|                |              |                           | 1                                     | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 1                                        | 2-14 |       |
| Soft feces     | 0            | 10                        | -                                     | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -                                        |      |       |
|                | 100          | 5                         | -                                     | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -                                        |      |       |
|                | 300          | 5                         | -                                     | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -                                        |      |       |
|                | 1000         | 10                        | -                                     | 2 | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | 2                                        |      |       |
| Salivation     | 0            | 10                        | -                                     | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -                                        |      |       |
|                | 100          | 5                         | -                                     | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -                                        |      |       |
|                | 300          | 5                         | -                                     | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -                                        |      |       |
|                | 1000         | 10                        | -                                     | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | 1  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | -  | 2  | -  | 2                                        |      |       |

-, no animal showed the sign

a), the recovery test was performed in 5 animals for each of the 0 and 1000 mg/kg groups

Table 2-1

Twenty eight day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of benzoic acid 4-methyle acid- in rats  
Detailed clinical observations

## Before administration

|                       |                | Male |     |     |      | Female |     |     |      |    |
|-----------------------|----------------|------|-----|-----|------|--------|-----|-----|------|----|
| score or cord         |                | 0    | 100 | 300 | 1000 | 0      | 100 | 300 | 1000 |    |
| responses to handling | B.W.R.F.C.     | 0    | 8   | 4   | 5    | 10     | 5   | 5   | 5    | 8  |
|                       |                | 2    | 2   | 1   | 0    | 0      | 5   | 0   | 0    | 2  |
|                       | H.B.           | 0    | 10  | 4   | 5    | 10     | 9   | 5   | 5    | 10 |
|                       |                | 2    | 0   | 1   | 0    | 0      | 1   | 0   | 0    | 0  |
| outside of home cage  | Urination      | 0    | 8   | 0   | 5    | 3      | 7   | 5   | 5    | 7  |
|                       |                | 1    | 2   | 5   | 0    | 7      | 3   | 0   | 0    | 3  |
|                       | Defecation     | 0    | 6   | 1   | 4    | 8      | 9   | 4   | 5    | 9  |
|                       |                | 1    | 4   | 0   | 1    | 1      | 1   | 1   | 0    | 0  |
|                       |                | 2    | 0   | 3   | 0    | 0      | 0   | 0   | 0    | 1  |
|                       |                | 3    | 0   | 1   | 0    | 1      | 0   | 0   | 0    | 0  |
|                       | Touch response | 2    | 0   | 0   | 0    | 4      | 0   | 0   | 0    | 0  |
|                       |                | 4    | 10  | 5   | 5    | 6      | 10  | 5   | 5    | 10 |
|                       |                | 6    | 0   | 0   | 0    | 0      | 0   | 0   | 0    | 0  |

Dose: 0 (0mg/kg,0.5%CMC Na), 100 (100mg/kg),300 (300mg/kg), 1000 (1000mg/kg)

Number of animals: 0mg/kg 10 , 100mg/kg 5 , 300mg/kg 5 , 1000mg/kg 10

B.W.R.F.C.( Behavior while removing from cage ): 0 animal is easily removed, 2 vocalization without resisting being picked up

H.B.(Handling behavior): 0 no resistance, 2 vocalizes but dose not resist handling

Urination: number of stool observed during 30 sec.

Defecation: number of stool observed during 30 sec.

Touch response: 2 decreased reaction, 4 normal, 6 refused slightly



Table 2-2

Twenty eight day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of benzoic acid 4-methyl- in rats  
Detailed clinical observations

1 week of administration

| 1 Week of administration |                | Male          |    |     |     | Female |    |     |     |      |
|--------------------------|----------------|---------------|----|-----|-----|--------|----|-----|-----|------|
|                          |                | score or cord | 0  | 100 | 300 | 1000   | 0  | 100 | 300 | 1000 |
| responses to handling    | B.W.R.F.C.     | 0             | 10 | 5   | 4   | 9      | 7  | 5   | 4   | 8    |
|                          |                | 2             | 0  | 0   | 1   | 1      | 3  | 0   | 1   | 2    |
|                          | H.B.           | 0             | 10 | 5   | 5   | 8      | 9  | 5   | 5   | 9    |
|                          |                | 2             | 0  | 0   | 0   | 2      | 1  | 0   | 0   | 1    |
| outside of home cage     | Urination      | 0             | 8  | 3   | 2   | 5      | 9  | 5   | 5   | 9    |
|                          |                | 1             | 3  | 2   | 3   | 5      | 1  | 0   | 0   | 1    |
|                          | Defecation     | 0             | 9  | 4   | 5   | 8      | 10 | 5   | 5   | 10   |
|                          |                | 1             | 1  | 0   | 0   | 2      | 0  | 0   | 0   | 0    |
|                          |                | 2             | 0  | 1   | 0   | 0      | 0  | 0   | 0   | 0    |
|                          |                | 3             | 0  | 0   | 0   | 0      | 0  | 0   | 0   | 0    |
|                          | Touch response | 2             | 0  | 0   | 0   | 0      | 0  | 0   | 0   | 0    |
|                          |                | 4             | 10 | 5   | 5   | 10     | 10 | 5   | 5   | 10   |
|                          |                | 6             | 0  | 0   | 0   | 0      | 0  | 0   | 0   | 0    |

Dose: 0 (0mg/kg,0.5%CMC Na), 100 (100mg/kg),300 (300mg/kg), 1000 (1000mg/kg)

Number of animals: 0mg/kg 10 , 100mg/kg 5 , 300mg/kg 5 , 1000mg/kg 10

B.W.R.F.C.( Behavior while removing from cage ): 0 animal is easily removed, 2 vocalization withant resisting being picked up

H.B.(Handling behavior): 0 no resistance, 2 vocalizes but dose not resist hadling

Urination: number of stool observed during 30 sec.

Defecation: number of stool observed during 30 sec.

Touch response: 2 decreased reaction, 4 normal, 6 refused slightly

Table 2-3

Twenty eight day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of benzoic acid 4-methyl- in rats  
Detailed clinical observations

## 2 week of administration

|                       |                | Male          |    |     |     | Female |    |     |     |      |
|-----------------------|----------------|---------------|----|-----|-----|--------|----|-----|-----|------|
|                       |                | score or cord | 0  | 100 | 300 | 1000   | 0  | 100 | 300 | 1000 |
| responses to handling | B.W.R.F.C.     | 0             | 9  | 5   | 4   | 9      | 9  | 4   | 4   | 8    |
|                       |                | 2             | 1  | 0   | 1   | 1      | 1  | 1   | 1   | 2    |
|                       | H.B.           | 0             | 9  | 5   | 4   | 10     | 9  | 4   | 5   | 8    |
|                       |                | 2             | 1  | 0   | 1   | 0      | 1  | 1   | 0   | 2    |
| outside of home cage  | Urination      | 0             | 9  | 3   | 4   | 8      | 9  | 5   | 5   | 8    |
|                       |                | 1             | 1  | 2   | 1   | 2      | 1  | 0   | 0   | 2    |
|                       | Defecation     | 0             | 10 | 3   | 5   | 9      | 10 | 5   | 5   | 10   |
|                       |                | 1             | 0  | 2   | 0   | 1      | 0  | 0   | 0   | 0    |
|                       |                | 2             | 0  | 0   | 0   | 0      | 0  | 0   | 0   | 0    |
|                       |                | 3             | 0  | 0   | 0   | 0      | 0  | 0   | 0   | 0    |
|                       | Touch response | 2             | 0  | 0   | 0   | 0      | 0  | 0   | 0   | 0    |
|                       |                | 4             | 10 | 5   | 5   | 10     | 10 | 5   | 5   | 9    |
|                       |                | 6             | 0  | 0   | 0   | 0      | 0  | 0   | 0   | 1    |

Dose: 0 (0mg/kg, 0.5% CMC Na), 100 (100mg/kg), 300 (300mg/kg), 1000 (1000mg/kg)

Number of animals: 0mg/kg 10, 100mg/kg 5, 300mg/kg 5, 1000mg/kg 10

B.W.R.F.C. (Behavior while removing from cage): 0 animal is easily removed, 2 vocalization without resisting being picked up

H.B. (Handling behavior): 0 no resistance, 2 vocalizes but does not resist handling

Urination: number of stool observed during 30 sec.

Defecation: number of stool observed during 30 sec.

Touch response: 2 decreased reaction, 4 normal, 6 refused slightly

Table 2-4

Twenty eight day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of benzoic acid 4-methyl- in rats

Detailed clinical observations

3 week of administration

|                       |                | Male |     |     |      | Female |     |     |      |    |
|-----------------------|----------------|------|-----|-----|------|--------|-----|-----|------|----|
| score or cord         |                | 0    | 100 | 300 | 1000 | 0      | 100 | 300 | 1000 |    |
| responses to handling | B.W.R.F.C.     | 0    | 9   | 4   | 4    | 9      | 8   | 5   | 4    | 9  |
|                       |                | 2    | 1   | 1   | 1    | 1      | 2   | 0   | 1    | 1  |
|                       | H.B.           | 0    | 10  | 4   | 4    | 10     | 8   | 5   | 4    | 10 |
|                       |                | 2    | 0   | 1   | 1    | 0      | 2   | 0   | 1    | 0  |
| outside of home cage  | Urination      | 0    | 10  | 3   | 5    | 9      | 10  | 5   | 4    | 10 |
|                       |                | 1    | 0   | 2   | 0    | 1      | 0   | 0   | 1    | 0  |
|                       | Defecation     | 0    | 10  | 5   | 5    | 8      | 10  | 5   | 5    | 10 |
|                       |                | 1    | 0   | 0   | 0    | 2      | 0   | 0   | 0    | 0  |
|                       |                | 2    | 0   | 0   | 0    | 0      | 0   | 0   | 0    | 0  |
|                       |                | 3    | 0   | 0   | 0    | 0      | 0   | 0   | 0    | 0  |
|                       | Touch response | 2    | 0   | 0   | 0    | 0      | 0   | 0   | 0    | 0  |
|                       |                | 4    | 9   | 3   | 5    | 10     | 8   | 5   | 4    | 9  |
|                       |                | 6    | 1   | 2   | 0    | 0      | 2   | 0   | 1    | 1  |

Dose: 0 (0mg/kg,0.5%CMC Na), 100 (100mg/kg),300 (300mg/kg), 1000 (1000mg/kg)

Number of animals: 0mg/kg 10 , 100mg/kg 5 , 300mg/kg 5 , 1000mg/kg 10

B.W.R.F.C.( Behavior while removing from cage ): 0 animal is easily removed, 2 vocalization withant resisting being picked up

H.B.(Handling behavior): 0 no resistance, 2 vocalizes but dose not resist hadling

Urination: number of stool observed during 30 sec.

Defecation: number of stool observed during 30 sec.

Touch response: 2 decreased reaction, 4 normal, 6 refused slightly

Table 2-5

Twenty eight day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of benzoic acid 4-methyl- in rats

Detailed clinical observations

4 week of administration

|                       |                | Male          |    |     |     | Female |    |     |     |      |
|-----------------------|----------------|---------------|----|-----|-----|--------|----|-----|-----|------|
|                       |                | score or cord | 0  | 100 | 300 | 1000   | 0  | 100 | 300 | 1000 |
| responses to handling | B.W.R.F.C.     | 0             | 10 | 5   | 4   | 9      | 9  | 2   | 4   | 9    |
|                       |                | 2             | 0  | 0   | 1   | 1      | 1  | 3   | 1   | 1    |
|                       | H.B.           | 0             | 10 | 5   | 4   | 9      | 9  | 2   | 4   | 10   |
|                       |                | 2             | 0  | 0   | 1   | 1      | 1  | 3   | 1   | 0    |
| outside of home cage  | Urination      | 0             | 8  | 2   | 5   | 9      | 10 | 5   | 5   | 10   |
|                       |                | 1             | 1  | 3   | 0   | 1      | 0  | 0   | 0   | 0    |
|                       |                | 2             | 1  | 0   | 0   | 0      | 0  | 0   | 0   | 0    |
|                       | Defecation     | 0             | 10 | 5   | 5   | 10     | 10 | 5   | 5   | 10   |
|                       |                | 1             | 0  | 0   | 0   | 0      | 0  | 0   | 0   | 0    |
|                       |                | 2             | 0  | 0   | 0   | 0      | 0  | 0   | 0   | 0    |
|                       |                | 3             | 0  | 0   | 0   | 0      | 0  | 0   | 0   | 0    |
|                       | Touch response | 2             | 0  | 0   | 0   | 0      | 0  | 0   | 0   | 0    |
|                       |                | 4             | 10 | 5   | 3   | 5      | 7  | 4   | 3   | 7    |
|                       |                | 6             | 0  | 0   | 2   | 5      | 3  | 1   | 2   | 3    |

Dose: 0 (0mg/kg, 0.5%CMC Na), 100 (100mg/kg), 300 (300mg/kg), 1000 (1000mg/kg)

Number of animals: 0mg/kg 10, 100mg/kg 5, 300mg/kg 5, 1000mg/kg 10

B.W.R.F.C.( Behavior while removing from cage ): 0 animal is easily removed, 2 vocalization without resisting being picked up

H.B.(Handling behavior): 0 no resistance, 2 vocalizes but does not resist handling

Urination: number of stool observed during 30 sec.

Defecation: number of stool observed during 30 sec.

Touch response: 2 decreased reaction, 4 normal, 6 refused slightly

Table 2-6

Twenty eight day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of benzoic acid 4-methyl- in rats  
Detailed clinical observations

1 week of recovery

|                                  |                | Male |      | Female |      |
|----------------------------------|----------------|------|------|--------|------|
|                                  | score or cord  | 0    | 1000 | 0      | 1000 |
| responses to handling B.W.R.F.C. | 0              | 5    | 5    | 5      | 5    |
|                                  | 2              | 0    | 0    | 0      | 0    |
|                                  | H.B.           | 5    | 5    | 5      | 5    |
|                                  | 2              | 0    | 0    | 0      | 0    |
| outside of home cage             | Urination      | 0    | 5    | 5      | 5    |
|                                  |                | 1    | 0    | 0      | 0    |
|                                  |                | 2    | 0    | 0      | 0    |
|                                  | Defecation     | 0    | 5    | 5      | 5    |
|                                  |                | 1    | 0    | 0      | 0    |
|                                  |                | 2    | 0    | 0      | 0    |
|                                  |                | 3    | 0    | 0      | 0    |
|                                  | Touch response | 2    | 0    | 0      | 0    |
|                                  |                | 4    | 5    | 5      | 5    |
|                                  |                | 6    | 0    | 0      | 0    |

Dose: 0 (0mg/kg,0.5%CMC Na), 100 (100mg/kg),300 (300mg/kg), 1000 (1000mg/kg)

Number of animals: 0mg/kg 5 , 1000mg/kg 5

B.W.R.F.C.( Behavior while removing from cage ): 0 animal is easily removed, 2 vocalization withant resisting being picked up

H.B.(Handling behavior): 0 no resistance, 2 vocalizes but dose not resist hadling

Urination: number of stool observed during 30 sec.

Defecation: number of stool observed during 30 sec.

Touch response: 2 decreased reaction, 4 normal, 6 refused slightly

Table 2-7

Twenty eight day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of benzoic acid 4-methyl- in rats  
Detailed clinical observations

## 2 week of recovery

|                                  |               | Male |      | Female |      |
|----------------------------------|---------------|------|------|--------|------|
|                                  | score or cord | 0    | 1000 | 0      | 1000 |
| responses to handling B.W.R.F.C. | 0             | 5    | 5    | 5      | 5    |
|                                  | 2             | 0    | 0    | 0      | 0    |
| H.B.                             | 0             | 5    | 5    | 5      | 5    |
|                                  | 2             | 0    | 0    | 0      | 0    |
| outside of home cage Urination   | 0             | 5    | 2    | 5      | 5    |
|                                  | 1             | 0    | 3    | 0      | 0    |
|                                  | 2             | 0    | 0    | 0      | 0    |
| Defecation                       | 0             | 5    | 3    | 5      | 5    |
|                                  | 1             | 0    | 2    | 0      | 0    |
|                                  | 2             | 0    | 0    | 0      | 0    |
|                                  | 3             | 0    | 0    | 0      | 0    |
| Touch response                   | 2             | 0    | 0    | 0      | 0    |
|                                  | 4             | 5    | 5    | 5      | 5    |
|                                  | 6             | 0    | 0    | 0      | 0    |

Dose: 0 (0mg/kg, 0.5%CMC Na), 100 (100mg/kg), 300 (300mg/kg), 1000 (1000mg/kg)

Number of animals: 0mg/kg, 5, 1000mg/kg 5

B.W.R.F.C.( Behavior while removing from cage ): 0 animal is easily removed, 2 vocalization without resisting being picked up

H.B.(Handling behavior): 0 no resistance, 2 vocalizes but does not resist handling

Urination: number of stool observed during 30 sec.

Defecation: number of stool observed during 30 sec.

Touch response: 2 decreased reaction, 4 normal, 6 refused slightly

Table 3-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of benzoic acid,4-methyl- in rats

Body weight changes in males

| Dose<br>(mg/kg) | Number<br>of<br>animals | Day of the dosing period |               |                |                |                |                |                |                |                |
|-----------------|-------------------------|--------------------------|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                 |                         | 1                        | 4             | 8              | 11             | 15             | 18             | 22             | 25             | 28             |
| 0               | 10                      | 154.2<br>±6.8            | 176.1<br>±8.6 | 206.3<br>±11.9 | 229.4<br>±14.4 | 262.0<br>±15.5 | 283.2<br>±19.6 | 313.3<br>±21.8 | 330.7<br>±26.0 | 349.0<br>±28.2 |
| 100             | 5                       | 153.0<br>±6.6            | 173.6<br>±9.8 | 204.2<br>±14.4 | 226.2<br>±17.0 | 254.5<br>±20.2 | 274.6<br>±24.8 | 302.3<br>±29.8 | 319.1<br>±34.3 | 335.8<br>±37.2 |
| 300             | 5                       | 154.4<br>±6.4            | 174.9<br>±8.1 | 206.2<br>±9.7  | 229.5<br>±9.4  | 262.5<br>±8.6  | 283.8<br>±8.8  | 313.0<br>±6.6  | 329.2<br>±6.3  | 347.2<br>±6.1  |
| 1000            | 10                      | 151.6<br>±4.9            | 172.6<br>±8.0 | 202.2<br>±11.4 | 224.8<br>±15.1 | 255.7<br>±18.1 | 278.5<br>±20.6 | 310.0<br>±23.6 | 327.1<br>±24.7 | 345.6<br>±25.5 |

| Dose<br>(mg/kg) | Number<br>of<br>animals | Day of the recovery period |                |                |                |                |
|-----------------|-------------------------|----------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                 |                         | 1                          | 4              | 8              | 11             | 14             |
| 0               | 5                       | 360.3<br>±33.0             | 372.1<br>±37.0 | 390.5<br>±41.5 | 404.3<br>±43.7 | 421.7<br>±46.8 |
| 1000            | 5                       | 342.6<br>±12.1             | 355.4<br>±10.8 | 376.7<br>±13.0 | 390.7<br>±14.1 | 409.0<br>±14.7 |

Parameter, mean(g)±S.D.

Table 3-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of benzoic acid,4-methyl- in rats

Body weight changes in females

| Dose<br>(mg/kg) | Number<br>of<br>animals | Day of the dosing period |               |               |               |                |                |                |                |                |
|-----------------|-------------------------|--------------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                 |                         | 1                        | 4             | 8             | 11            | 15             | 18             | 22             | 25             | 28             |
| 0               | 10                      | 129.1<br>±4.9            | 146.0<br>±6.0 | 161.8<br>±9.0 | 172.3<br>±8.0 | 182.5<br>±9.0  | 195.4<br>±8.9  | 207.4<br>±11.2 | 213.7<br>±12.8 | 227.9<br>±12.5 |
| 100             | 5                       | 128.0<br>±4.3            | 144.0<br>±6.6 | 158.8<br>±6.2 | 169.4<br>±8.4 | 182.5<br>±8.9  | 190.7<br>±9.2  | 204.6<br>±13.6 | 216.1<br>±13.8 | 220.0<br>±15.8 |
| 300             | 5                       | 125.9<br>±4.0            | 143.8<br>±5.6 | 163.2<br>±6.6 | 175.4<br>±6.2 | 184.4<br>±7.3  | 193.0<br>±12.5 | 203.4<br>±8.8  | 211.8<br>±12.2 | 222.6<br>±9.1  |
| 1000            | 10                      | 130.3<br>±4.7            | 146.2<br>±4.7 | 163.5<br>±5.7 | 173.5<br>±7.5 | 188.7<br>±10.2 | 201.6<br>±13.5 | 218.2<br>±14.3 | 229.5<br>±17.8 | 239.0<br>±22.4 |

| Dose<br>(mg/kg) | Number<br>of<br>animals | Day of the recovery period |                |                |                |                |
|-----------------|-------------------------|----------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                 |                         | 1                          | 4              | 8              | 11             | 14             |
| 0               | 5                       | 230.1<br>±11.0             | 239.8<br>±8.5  | 251.3<br>±9.3  | 252.9<br>±9.9  | 262.3<br>±9.2  |
| 1000            | 5                       | 249.6<br>±18.4             | 250.2<br>±16.9 | 261.4<br>±19.4 | 265.9<br>±19.3 | 279.7<br>±21.6 |

Parameter, mean(g)±S.D.



Table 4

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of benzoic acid, 4-methyl- in rats

Food consumption in males and females

| Sex    | Dose<br>(mg/kg) | Initial number <sup>a)</sup><br>of<br>animals | Day of the dosing period |                |              |              | Day of the recovery period |              |
|--------|-----------------|-----------------------------------------------|--------------------------|----------------|--------------|--------------|----------------------------|--------------|
|        |                 |                                               | 1                        | 8              | 15           | 22           | 1                          | 8            |
| Male   | 0               | 10                                            | 23.1<br>±1.6             | 25.3<br>±2.3   | 27.3<br>±1.7 | 28.8<br>±2.1 | 30.3<br>±3.9               | 29.6<br>±2.6 |
|        | 100             | 5                                             | 22.8<br>±0.5             | 24.7<br>±0.8   | 25.3<br>±3.2 | 27.4<br>±3.7 |                            |              |
|        | 300             | 5                                             | 22.6<br>±2.4             | 24.5<br>±1.8   | 26.2<br>±1.5 | 28.0<br>±1.1 |                            |              |
|        | 1000            | 10                                            | 23.0<br>±1.1             | 25.3<br>±2.5   | 28.0<br>±2.2 | 29.4<br>±2.0 | 28.5<br>±2.2               | 29.2<br>±1.6 |
| Female | 0               | 10                                            | 18.6<br>±1.2             | 18.7<br>±1.9   | 19.7<br>±1.6 | 20.9<br>±2.9 | 21.7<br>±3.1               | 21.0<br>±4.6 |
|        | 100             | 5                                             | 18.2<br>±1.5             | 19.4<br>±1.3   | 18.4<br>±3.0 | 21.3<br>±1.3 |                            |              |
|        | 300             | 5                                             | 18.3<br>±0.7             | 19.2<br>±1.7   | 19.3<br>±2.4 | 20.2<br>±1.6 |                            |              |
|        | 1000            | 10                                            | 18.9<br>±1.0             | 20.9 *<br>±1.6 | 21.2<br>±2.5 | 24.1<br>±3.7 | 23.0<br>±3.7               | 24.3<br>±2.9 |

Parameter, mean(g)±S.D.

\*, significantly different from 0 mg/kg, p&lt;0.05

a), the recovery test was performed in 5 animals for each of the 0 and 100 mg/kg groups

Table 5-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of benzoic acid, 4-methyl- in rats

Urinalysis in males and females on day 23 of the dosing period

| Sex    | Dose<br>(mg/kg) | Number of<br>animals | Color<br>ly | Turbidity<br>- | pH  |     |     |     |     |     |     |      | Protein |   |     | Glucose | Ketone |     | Bilirubin | Occult blood | Urobilinogen |   |
|--------|-----------------|----------------------|-------------|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|---------|---|-----|---------|--------|-----|-----------|--------------|--------------|---|
|        |                 |                      |             |                | 5.5 | 6.0 | 6.5 | 7.0 | 7.5 | 8.0 | 8.5 | ≥9.0 | -       | ± | +   | -       | -      | ±   | -         | -            | ±            | + |
| Male   | 0               | 10                   | 10          | 10             | 0   | 0   | 0   | 3   | 5   | 1   | 1   | 0    | 0       | 2 | 8   | 10      | 1      | 9   | 10        | 10           | 9            | 1 |
|        | 100             | 5                    | 5           | 5              | 0   | 0   | 2   | 3   | 0   | 0   | 0   | 0*   | 0       | 2 | 3   | 5       | 1      | 4   | 5         | 5            | 5            | 0 |
|        | 300             | 5                    | 5           | 5              | 0   | 1   | 0   | 4   | 0   | 0   | 0   | 0    | 4       | 0 | 1*  | 5       | 3      | 2   | 5         | 5            | 5            | 0 |
|        | 1000            | 10                   | 10          | 10             | 0   | 1   | 4   | 4   | 1   | 0   | 0   | 0**  | 8       | 2 | 0** | 10      | 10     | 0** | 10        | 10           | 10           | 0 |
| Female | 0               | 10                   | 10          | 10             | 0   | 0   | 1   | 3   | 2   | 1   | 1   | 2    | 8       | 2 | 0   | 10      | 9      | 1   | 10        | 10           | 9            | 1 |
|        | 100             | 5                    | 5           | 5              | 0   | 1   | 2   | 2   | 0   | 0   | 0   | 0**  | 5       | 0 | 0   | 5       | 5      | 0   | 5         | 5            | 5            | 0 |
|        | 300             | 5                    | 5           | 5              | 0   | 0   | 2   | 2   | 1   | 0   | 0   | 0    | 5       | 0 | 0   | 5       | 5      | 0   | 5         | 5            | 5            | 0 |
|        | 1000            | 10                   | 10          | 10             | 1   | 1   | 3   | 5   | 0   | 0   | 0   | 0**  | 10      | 0 | 0   | 10      | 10     | 0   | 10        | 10           | 10           | 0 |

| Sex    | Dose<br>(mg/kg) | Number of<br>animals | Microscopic examination of urinary sediment |         |      |                      |                     |            | Urinary<br>volume<br>(mL/24hr) | Specific<br>gravity |
|--------|-----------------|----------------------|---------------------------------------------|---------|------|----------------------|---------------------|------------|--------------------------------|---------------------|
|        |                 |                      | Red blood<br>cells                          | Crystal | Cast | White blood<br>cells | Epithelial<br>cells |            |                                |                     |
|        |                 |                      | -                                           | - ±     | -    | -                    | - ±                 |            |                                |                     |
| Male   | 0               | 10                   | 10                                          | 0 10    | 10   | 10                   | 9 1                 | 15.6±2.2   | 1.058±0.008                    |                     |
|        | 100             | 5                    | 5                                           | 0 5     | 5    | 5                    | 5 0                 | 15.6±2.1   | 1.051±0.007                    |                     |
|        | 300             | 5                    | 5                                           | 0 5     | 5    | 5                    | 5 0                 | 20.9±4.7*  | 1.043±0.011**                  |                     |
|        | 1000            | 10                   | 10                                          | 3 7     | 10   | 10                   | 10 0                | 23.8±4.7** | 1.045±0.006**                  |                     |
| Female | 0               | 10                   | 10                                          | 0 10    | 10   | 10                   | 10 0                | 11.7±3.5   | 1.045±0.012                    |                     |
|        | 100             | 5                    | 5                                           | 2 3     | 5    | 5                    | 5 0                 | 11.9±3.4   | 1.046±0.008                    |                     |
|        | 300             | 5                    | 5                                           | 0 5     | 5    | 5                    | 5 0                 | 13.0±4.3   | 1.043±0.007                    |                     |
|        | 1000            | 10                   | 10                                          | 4 6     | 10   | 10                   | 10 0                | 22.1±7.5** | 1.038±0.009                    |                     |

Color ly, light yellow

Turbidity -, negative

Protein -, negative; ±, trace; +, 30 mg/dL

Glucose -, negative

Ketone -, negative; ±, trace

Bilirubin -, negative

Occult blood -, negative

Urobilinogen ±, 0.1 EU/dL; +, 1.0 EU/dL

\*, significantly different from 0 mg/kg, p&lt;0.05

\*\*, significantly different from 0 mg/kg, p&lt;0.01

Table 5-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of benzoic acid,4-methyl- in rats

Urinalysis in males and females on day 9 of the recovery period

| Sex    | Dose<br>(mg/kg) | Number of<br>animals | Color<br>ly | Turbidity<br>- | pH  |     |     |     |     |      | Protein |   |   | Glucose |   | Ketone |   |   | Bilirubin<br>- | Occult blood<br>- | Urobilinogen |   |
|--------|-----------------|----------------------|-------------|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|---------|---|---|---------|---|--------|---|---|----------------|-------------------|--------------|---|
|        |                 |                      |             |                | 6.5 | 7.0 | 7.5 | 8.0 | 8.5 | ≥9.0 | -       | ± | + | -       | ± | +      | - | ± |                |                   | +            | ± |
| Male   | 0               | 5                    | 5           | 5              | 1   | 3   | 0   | 0   | 1   | 0    | 0       | 1 | 4 | 5       | 0 | 3      | 2 | 5 | 5              | 4                 | 1            |   |
|        | 1000            | 5                    | 5           | 5              | 0   | 0   | 1   | 2   | 2   | 0    | 1       | 2 | 2 | 5       | 1 | 3      | 1 | 5 | 5              | 4                 | 1            |   |
| Female | 0               | 5                    | 5           | 5              | 2   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 4       | 0 | 1 | 5       | 5 | 0      | 0 | 5 | 5              | 4                 | 1            |   |
|        | 1000            | 5                    | 5           | 5              | 0   | 0   | 3   | 0   | 1   | 1    | 4       | 1 | 0 | 5       | 5 | 0      | 0 | 5 | 5              | 4                 | 1            |   |

| Sex    | Dose<br>(mg/kg) | Number of<br>animals | Microscopic examination of urinary sediment |         |      |                      |                     | Urinary<br>volume<br>(mL/24hr) | Specific<br>gravity |
|--------|-----------------|----------------------|---------------------------------------------|---------|------|----------------------|---------------------|--------------------------------|---------------------|
|        |                 |                      | Red blood<br>cells                          | Crystal | Cast | White blood<br>cells | Epithelial<br>cells |                                |                     |
| Male   | 0               | 5                    | 5                                           | 0 5     | 5    | 5                    | 5                   | 18.3±4.7                       | 1.056±0.009         |
|        | 1000            | 5                    | 5                                           | 0 5     | 5    | 5                    | 5                   | 24.3±4.6                       | 1.038±0.006**       |
| Female | 0               | 5                    | 5                                           | 0 5     | 5    | 5                    | 5                   | 13.3±2.8                       | 1.041±0.010         |
|        | 1000            | 5                    | 5                                           | 0 5     | 5    | 5                    | 5                   | 18.3±5.6                       | 1.044±0.011         |

Color ly, light yellow  
 Turbidity -, negative  
 Protein -, negative; ±, trace; +, 30 mg/dL  
 Glucose -, negative  
 Ketone -, negative; ±, trace  
 Bilirubin -, negative  
 Occult blood -, negative  
 Urobilinogen ±, 0.1 EU/dL; +, 1.0 EU/dL

\*, significantly different from 0 mg/kg, p&lt;0.05

\*\*, significantly different from 0 mg/kg, p&lt;0.01

Table 6-1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of benzoic acid,4-methyl- in rats

Hematological findings in males at the end of the dosing period

| Dose<br>(mg/kg) | Number<br>of<br>animals | RBC<br>( $\times 10^4/\mu\text{L}$ ) | Hemoglobin<br>(g/dL) | Hematocrit<br>(%) | MCV<br>(fL)       | MCH<br>(pg)       | MCHC<br>(g/dL)    |
|-----------------|-------------------------|--------------------------------------|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 0               | 5                       | 755<br>$\pm 53$                      | 14.9<br>$\pm 0.6$    | 44.8<br>$\pm 2.9$ | 59.4<br>$\pm 2.2$ | 19.8<br>$\pm 0.8$ | 33.3<br>$\pm 0.1$ |
| 100             | 5                       | 780<br>$\pm 15$                      | 15.2<br>$\pm 0.2$    | 46.0<br>$\pm 0.7$ | 58.9<br>$\pm 0.8$ | 19.5<br>$\pm 0.6$ | 33.0<br>$\pm 0.7$ |
| 300             | 5                       | 770<br>$\pm 27$                      | 15.2<br>$\pm 0.3$    | 45.4<br>$\pm 1.1$ | 59.0<br>$\pm 1.3$ | 19.8<br>$\pm 0.6$ | 33.6<br>$\pm 0.3$ |
| 1000            | 5                       | 755<br>$\pm 18$                      | 15.0<br>$\pm 0.2$    | 45.2<br>$\pm 0.4$ | 60.0<br>$\pm 1.5$ | 19.9<br>$\pm 0.5$ | 33.2<br>$\pm 0.2$ |

| Dose<br>(mg/kg) | Number<br>of<br>animals | WBC<br>( $\times 100/\mu\text{L}$ ) | Neutrophil<br>(%) | Eosinophil<br>(%) | Basophil<br>(%) | Monocyte<br>(%) | Lymphocyte<br>(%) | Platelet<br>( $\times 10^4/\mu\text{L}$ ) | PT<br>(sec)       | APTT<br>(sec)     |
|-----------------|-------------------------|-------------------------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-------------------------------------------|-------------------|-------------------|
| 0               | 5                       | 90.8<br>$\pm 16.7$                  | 10<br>$\pm 5$     | 1<br>$\pm 0$      | 0<br>$\pm 0$    | 3<br>$\pm 1$    | 85<br>$\pm 5$     | 102.9<br>$\pm 13.9$                       | 18.4<br>$\pm 3.0$ | 22.1<br>$\pm 0.8$ |
| 100             | 5                       | 61.5<br>$\pm 20.5$                  | 11<br>$\pm 2$     | 1<br>$\pm 0$      | 0<br>$\pm 0$    | 4<br>$\pm 1$    | 85<br>$\pm 3$     | 104.5<br>$\pm 16.3$                       | 18.9<br>$\pm 3.1$ | 22.9<br>$\pm 1.7$ |
| 300             | 5                       | 67.7<br>$\pm 17.6$                  | 10<br>$\pm 2$     | 1<br>$\pm 0$      | 0<br>$\pm 0$    | 5<br>$\pm 1$    | 85<br>$\pm 3$     | 106.6<br>$\pm 8.1$                        | 17.2<br>$\pm 4.0$ | 20.5<br>$\pm 2.4$ |
| 1000            | 5                       | 74.4<br>$\pm 21.7$                  | 11<br>$\pm 3$     | 0 *<br>$\pm 0$    | 0<br>$\pm 0$    | 4<br>$\pm 1$    | 85<br>$\pm 3$     | 101.6<br>$\pm 10.4$                       | 14.9<br>$\pm 1.7$ | 20.1<br>$\pm 1.0$ |

Parameter, mean  $\pm$  S.D.\*, significantly different from 0 mg/kg,  $p < 0.05$

Table 6-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of benzoic acid,4-methyl- in rats

Hematological findings in females at the end of the dosing period

| Dose<br>(mg/kg) | Number<br>of<br>animals | RBC<br>( $\times 10^4/\mu\text{L}$ ) | Hemoglobin<br>(g/dL) | Hematocrit<br>(%) | MCV<br>(fL)       | MCH<br>(pg)       | MCHC<br>(g/dL)    |
|-----------------|-------------------------|--------------------------------------|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 0               | 5                       | 742<br>$\pm 19$                      | 14.8<br>$\pm 0.3$    | 44.2<br>$\pm 1.0$ | 59.5<br>$\pm 1.1$ | 20.0<br>$\pm 0.6$ | 33.6<br>$\pm 0.4$ |
| 100             | 5                       | 771<br>$\pm 26$                      | 15.1<br>$\pm 0.5$    | 44.9<br>$\pm 1.3$ | 58.3<br>$\pm 1.2$ | 19.6<br>$\pm 0.3$ | 33.7<br>$\pm 0.3$ |
| 300             | 5                       | 750<br>$\pm 25$                      | 14.9<br>$\pm 0.3$    | 44.4<br>$\pm 0.7$ | 59.2<br>$\pm 1.4$ | 19.8<br>$\pm 0.6$ | 33.5<br>$\pm 0.2$ |
| 1000            | 4 <sup>a)</sup>         | 751<br>$\pm 30$                      | 14.7<br>$\pm 0.5$    | 43.6<br>$\pm 1.9$ | 58.0<br>$\pm 1.1$ | 19.6<br>$\pm 0.3$ | 33.8<br>$\pm 0.6$ |

| Dose<br>(mg/kg) | Number<br>of<br>animals | WBC<br>( $\times 100/\mu\text{L}$ ) | Neutrophil<br>(%) | Eosinophil<br>(%) | Basophil<br>(%) | Monocyte<br>(%) | Lymphocyte<br>(%) | Platelet<br>( $\times 10^4/\mu\text{L}$ ) | PT<br>(sec)       | APTT<br>(sec)     |
|-----------------|-------------------------|-------------------------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-------------------------------------------|-------------------|-------------------|
| 0               | 5                       | 61.0<br>$\pm 18.1$                  | 7<br>$\pm 2$      | 1<br>$\pm 0$      | 0<br>$\pm 0$    | 3<br>$\pm 1$    | 89<br>$\pm 3$     | 96.3<br>$\pm 7.0$                         | 12.6<br>$\pm 0.7$ | 18.5<br>$\pm 1.0$ |
| 100             | 5                       | 54.9<br>$\pm 14.8$                  | 6<br>$\pm 3$      | 1<br>$\pm 1$      | 0<br>$\pm 0$    | 4<br>$\pm 1$    | 88<br>$\pm 3$     | 100.5<br>$\pm 9.4$                        | 12.7<br>$\pm 0.5$ | 18.2<br>$\pm 1.4$ |
| 300             | 5                       | 46.7<br>$\pm 12.4$                  | 8<br>$\pm 4$      | 1<br>$\pm 0$      | 0<br>$\pm 0$    | 3<br>$\pm 1$    | 88<br>$\pm 4$     | 93.3<br>$\pm 9.3$                         | 12.9<br>$\pm 0.6$ | 17.8<br>$\pm 1.2$ |
| 1000            | 4 <sup>a)</sup>         | 59.8<br>$\pm 7.8$                   | 8<br>$\pm 4$      | 1<br>$\pm 0$      | 0<br>$\pm 0$    | 3<br>$\pm 1$    | 88<br>$\pm 4$     | 83.9<br>$\pm 3.1$                         | 13.2<br>$\pm 0.6$ | 16.7<br>$\pm 1.4$ |

Parameter, mean  $\pm$  S.D.\*, significantly different from 0 mg/kg,  $p < 0.05$ \*\*, significantly different from 0 mg/kg,  $p < 0.01$ 

a), The blood of one animale(No.58) was clotted

Table 6-2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of benzoic acid,4-methyl- in rats

Hematological findings in males at the end of the recovery period

| Dose<br>(mg/kg) | Number<br>of<br>animals | RBC<br>( $\times 10^4/\mu\text{L}$ ) | Hemoglobin<br>(g/dL) | Hematocrit<br>(%)   | MCV<br>(fL)       | MCH<br>(pg)       | MCHC<br>(g/dL)    |
|-----------------|-------------------------|--------------------------------------|----------------------|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 0               | 5                       | 797<br>$\pm 13$                      | 15.2<br>$\pm 0.1$    | 45.3<br>$\pm 0.8$   | 56.8<br>$\pm 1.4$ | 19.1<br>$\pm 0.4$ | 33.5<br>$\pm 0.6$ |
| 1000            | 5                       | 766 *<br>$\pm 22$                    | 14.6 **<br>$\pm 0.3$ | 43.5 *<br>$\pm 1.0$ | 56.8<br>$\pm 0.8$ | 19.0<br>$\pm 0.3$ | 33.5<br>$\pm 0.4$ |

| Dose<br>(mg/kg) | Number<br>of<br>animals | WBC<br>( $\times 100/\mu\text{L}$ ) | Neutrophil<br>(%) | Eosinophil<br>(%) | Basophil<br>(%) | Monocyte<br>(%) | Lymphocyte<br>(%) | Platelet<br>( $\times 10^4/\mu\text{L}$ ) | PT<br>(sec)       | APTT<br>(sec)     |
|-----------------|-------------------------|-------------------------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-------------------------------------------|-------------------|-------------------|
| 0               | 5                       | 69.4<br>$\pm 13.4$                  | 13<br>$\pm 5$     | 1<br>$\pm 0$      | 0<br>$\pm 0$    | 4<br>$\pm 1$    | 81<br>$\pm 4$     | 96.1<br>$\pm 19.6$                        | 16.4<br>$\pm 2.7$ | 21.6<br>$\pm 1.5$ |
| 1000            | 5                       | 65.4<br>$\pm 14.2$                  | 15<br>$\pm 3$     | 1<br>$\pm 1$      | 0<br>$\pm 0$    | 4<br>$\pm 2$    | 79<br>$\pm 4$     | 99.3<br>$\pm 8.4$                         | 15.2<br>$\pm 1.4$ | 21.0<br>$\pm 0.4$ |

Parameter, mean  $\pm$  S.D.\*, significantly different from 0 mg/kg,  $p < 0.05$ \*\*, significantly different from 0 mg/kg,  $p < 0.01$

Table 6-2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of benzoic acid,4-methyl- in rats

Hematological findings in females at the end of the recovery period

| Dose<br>(mg/kg) | Number<br>of<br>animals | RBC<br>( $\times 10^4/\mu\text{L}$ ) | Hemoglobin<br>(g/dL) | Hematocrit<br>(%) | MCV<br>(fL)       | MCH<br>(pg)       | MCHC<br>(g/dL)    |
|-----------------|-------------------------|--------------------------------------|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 0               | 5                       | 749<br>$\pm 25$                      | 14.5<br>$\pm 0.4$    | 42.6<br>$\pm 1.3$ | 56.9<br>$\pm 1.2$ | 19.4<br>$\pm 0.4$ | 34.0<br>$\pm 0.3$ |
| 1000            | 5                       | 766<br>$\pm 24$                      | 14.4<br>$\pm 0.7$    | 42.7<br>$\pm 1.9$ | 55.8<br>$\pm 2.0$ | 18.8<br>$\pm 0.7$ | 33.7<br>$\pm 0.3$ |

| Dose<br>(mg/kg) | Number<br>of<br>animals | WBC<br>( $\times 100/\mu\text{L}$ ) | Neutrophil<br>(%) | Eosinophil<br>(%) | Basophil<br>(%) | Monocyte<br>(%) | Lymphocyte<br>(%) | Platelet<br>( $\times 10^4/\mu\text{L}$ ) | PT<br>(sec)       | APTT<br>(sec)     |
|-----------------|-------------------------|-------------------------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-------------------------------------------|-------------------|-------------------|
| 0               | 5                       | 43.9<br>$\pm 2.9$                   | 10<br>$\pm 4$     | 2<br>$\pm 1$      | 0<br>$\pm 0$    | 4<br>$\pm 1$    | 85<br>$\pm 5$     | 101.8<br>$\pm 12.7$                       | 11.9<br>$\pm 0.7$ | 17.1<br>$\pm 0.8$ |
| 1000            | 5                       | 58.8<br>$\pm 14.5$                  | 10<br>$\pm 3$     | 1<br>$\pm 1$      | 0<br>$\pm 0$    | 4<br>$\pm 2$    | 85<br>$\pm 5$     | 102.7<br>$\pm 10.2$                       | 11.5<br>$\pm 0.7$ | 16.9<br>$\pm 0.8$ |

Parameter, mean  $\pm$  S.D.

Table 7-1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of benzoic acid,4-methyl- in rats

Biochemical findings in males at the end of the dosing period

| Dose<br>(mg/kg) | Number<br>of<br>animals | Total<br>protein<br>(g/dL) | Albumin<br>(g/dL) | A/G           | BUN<br>(mg/dL) | Creatinine<br>(mg/dL) | Glucose<br>(mg/dL) | Total<br>cholesterol<br>(mg/dL) | Tri-<br>glyceride<br>(mg/dL) | Total<br>bilirubin<br>(mg/dL) |
|-----------------|-------------------------|----------------------------|-------------------|---------------|----------------|-----------------------|--------------------|---------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| 0               | 5                       | 5.0<br>±0.2                | 3.0<br>±0.2       | 1.48<br>±0.15 | 16<br>±2       | 0.6<br>±0.1           | 130<br>±13         | 34<br>±8                        | 19<br>±5                     | 0.07<br>±0.04                 |
| 100             | 5                       | 5.2<br>±0.2                | 3.0<br>±0.3       | 1.46<br>±0.27 | 17<br>±2       | 0.6<br>±0.1           | 137<br>±32         | 33<br>±4                        | 22<br>±7                     | 0.08<br>±0.03                 |
| 300             | 5                       | 5.1<br>±0.1                | 3.0<br>±0.1       | 1.38<br>±0.16 | 16<br>±3       | 0.6<br>±0.0           | 143<br>±13         | 37<br>±5                        | 28<br>±14                    | 0.09<br>±0.05                 |
| 1000            | 5                       | 5.0<br>±0.0                | 3.0<br>±0.1       | 1.44<br>±0.08 | 16<br>±1       | 0.6<br>±0.1           | 155<br>±24         | 40<br>±5                        | 35<br>±15                    | 0.07<br>±0.03                 |

| Dose<br>(mg/kg) | Number<br>of<br>animals | Inorg.<br>phos.<br>(mg/dL) | Ca<br>(mg/dL) | Na<br>(mEq/L) | K<br>(mEq/L)  | Cl<br>(mEq/L) | ALP<br>(U/L) | ALT<br>(U/L) | AST<br>(U/L) | γ-GTP<br>(U/L) |
|-----------------|-------------------------|----------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|----------------|
| 0               | 5                       | 9.0<br>±0.7                | 8.9<br>±0.1   | 145.8<br>±0.6 | 4.48<br>±0.53 | 109.0<br>±1.7 | 441<br>±143  | 31<br>±6     | 72<br>±10    | 0<br>±1        |
| 100             | 5                       | 8.7<br>±0.8                | 8.9<br>±0.3   | 145.1<br>±0.9 | 4.33<br>±0.36 | 108.3<br>±1.7 | 451<br>±58   | 27<br>±4     | 66<br>±11    | 0<br>±1        |
| 300             | 5                       | 8.4<br>±0.3                | 9.0<br>±0.1   | 145.8<br>±1.3 | 4.08<br>±0.26 | 108.1<br>±1.2 | 511<br>±190  | 29<br>±3     | 67<br>±7     | 1<br>±0        |
| 1000            | 5                       | 8.6<br>±0.4                | 9.2<br>±0.2   | 145.5<br>±0.9 | 4.29<br>±0.24 | 107.8<br>±1.4 | 459<br>±56   | 37<br>±15    | 88<br>±24    | 1<br>±1        |

Parameter, mean ±S.D.



Table 7-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of benzoic acid,4-methyl- in rats

Biochemical findings in females at the end of the dosing period

| Dose<br>(mg/kg) | Number<br>of<br>animals | Total<br>protein<br>(g/dL) | Albumin<br>(g/dL) | A/G           | BUN<br>(mg/dL) | Creatinine<br>(mg/dL) | Glucose<br>(mg/dL) | Total<br>cholesterol<br>(mg/dL) | Tri-<br>glyceride<br>(mg/dL) | Total<br>bilirubin<br>(mg/dL) |
|-----------------|-------------------------|----------------------------|-------------------|---------------|----------------|-----------------------|--------------------|---------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| 0               | 5                       | 5.4<br>±0.3                | 3.2<br>±0.2       | 1.51<br>±0.17 | 23<br>±3       | 0.6<br>±0.1           | 109<br>±13         | 41<br>±8                        | 11<br>±5                     | 0.09<br>±0.03                 |
| 100             | 5                       | 5.3<br>±0.3                | 3.2<br>±0.2       | 1.48<br>±0.17 | 21<br>±2       | 0.6<br>±0.1           | 113<br>±21         | 48<br>±9                        | 9<br>±3                      | 0.07<br>±0.03                 |
| 300             | 5                       | 5.2<br>±0.3                | 3.2<br>±0.2       | 1.64<br>±0.11 | 23<br>±1       | 0.7<br>±0.1           | 118<br>±7          | 45<br>±10                       | 10<br>±3                     | 0.09<br>±0.04                 |
| 1000            | 5                       | 4.8 **<br>±0.3             | 2.9<br>±0.2       | 1.56<br>±0.09 | 20<br>±2       | 0.7<br>±0.1           | 108<br>±10         | 31<br>±8                        | 9<br>±2                      | 0.09<br>±0.03                 |

| Dose<br>(mg/kg) | Number<br>of<br>animals | Inorg.<br>phos.<br>(mg/dL) | Ca<br>(mg/dL) | Na<br>(mEq/L) | K<br>(mEq/L)  | Cl<br>(mEq/L) | ALP<br>(U/L) | ALT<br>(U/L) | AST<br>(U/L) | γ-GTP<br>(U/L) |
|-----------------|-------------------------|----------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|----------------|
| 0               | 5                       | 7.9<br>±0.8                | 9.1<br>±0.1   | 145.5<br>±0.8 | 4.18<br>±0.39 | 109.1<br>±1.2 | 319<br>±65   | 25<br>±2     | 69<br>±3     | 1<br>±0        |
| 100             | 5                       | 8.1<br>±0.7                | 9.1<br>±0.2   | 144.7<br>±0.7 | 4.31<br>±0.20 | 107.5<br>±1.0 | 261<br>±62   | 22<br>±2     | 66<br>±5     | 1<br>±0        |
| 300             | 5                       | 8.2<br>±1.1                | 9.1<br>±0.2   | 145.6<br>±0.8 | 4.20<br>±0.28 | 109.9<br>±1.1 | 299<br>±75   | 22<br>±5     | 69<br>±8     | 1<br>±1        |
| 1000            | 5                       | 8.4<br>±0.5                | 8.8<br>±0.4   | 146.0<br>±1.4 | 4.05<br>±0.38 | 109.3<br>±2.3 | 266<br>±46   | 29<br>±5     | 94 *<br>±16  | 1<br>±0        |

Parameter, mean ± S.D.

\*, significantly different from 0 mg/kg, p&lt;0.05

\*\*, significantly different from 0 mg/kg, p&lt;0.01

Table 7-2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of benzoic acid,4-methyl- in rats

Biochemical findings in males at the end of the recovery period

| Dose<br>(mg/kg) | Number<br>of<br>animals | Total<br>protein<br>(g/dL) | Albumin<br>(g/dL) | A/G           | BUN<br>(mg/dL) | Creatinine<br>(mg/dL) | Glucose<br>(mg/dL) | Total<br>cholesterol<br>(mg/dL) | Tri-<br>glyceride<br>(mg/dL) | Total<br>bilirubin<br>(mg/dL) |
|-----------------|-------------------------|----------------------------|-------------------|---------------|----------------|-----------------------|--------------------|---------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| 0               | 5                       | 5.6<br>±0.4                | 3.0<br>±0.2       | 1.14<br>±0.08 | 19<br>±3       | 0.7<br>±0.0           | 137<br>±10         | 41<br>±15                       | 24<br>±13                    | 0.08<br>±0.02                 |
| 1000            | 5                       | 5.4<br>±0.1                | 3.0<br>±0.1       | 1.28<br>±0.14 | 15<br>±3       | 0.6<br>±0.1           | 129<br>±16         | 38<br>±10                       | 29<br>±12                    | 0.09<br>±0.03                 |

| Dose<br>(mg/kg) | Number<br>of<br>animals | Inorg.<br>phos.<br>(mg/dL) | Ca<br>(mg/dL) | Na<br>(mEq/L) | K<br>(mEq/L)  | Cl<br>(mEq/L) | ALP<br>(U/L) | ALT<br>(U/L) | AST<br>(U/L) | γ-GTP<br>(U/L) |
|-----------------|-------------------------|----------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|----------------|
| 0               | 5                       | 7.2<br>±0.9                | 8.9<br>±0.2   | 146.2<br>±0.4 | 4.03<br>±0.26 | 108.2<br>±1.1 | 366<br>±80   | 35<br>±5     | 83<br>±14    | 0<br>±1        |
| 1000            | 5                       | 6.5<br>±0.6                | 8.8<br>±0.1   | 145.9<br>±0.6 | 3.96<br>±0.12 | 108.7<br>±0.6 | 374<br>±29   | 32<br>±4     | 66<br>±2     | 1<br>±1        |

Parameter, mean ±S.D.

Table 7-2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of benzoic acid,4-methyl- in rats

Biochemical findings in females at the end of the recovery period

| Dose<br>(mg/kg) | Number<br>of<br>animals | Total<br>protein<br>(g/dL) | Albumin<br>(g/dL) | A/G           | BUN<br>(mg/dL) | Creatinine<br>(mg/dL) | Glucose<br>(mg/dL) | Total<br>cholesterol<br>(mg/dL) | Tri-<br>glyceride<br>(mg/dL) | Total<br>bilirubin<br>(mg/dL) |
|-----------------|-------------------------|----------------------------|-------------------|---------------|----------------|-----------------------|--------------------|---------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| 0               | 5                       | 5.5<br>±0.1                | 3.2<br>±0.2       | 1.41<br>±0.20 | 21<br>±1       | 0.7<br>±0.0           | 125<br>±12         | 48<br>±9                        | 13<br>±2                     | 1.10<br>±0.04                 |
| 1000            | 5                       | 5.7<br>±0.3                | 3.3<br>±0.4       | 1.37<br>±0.24 | 24<br>±3       | 0.8<br>±0.1           | 128<br>±10         | 54<br>±4                        | 22<br>±12                    | 0.08<br>±0.02                 |

| Dose<br>(mg/kg) | Number<br>of<br>animals | Inorg.<br>phos.<br>(mg/dL) | Ca<br>(mg/dL) | Na<br>(mEq/L) | K<br>(mEq/L)  | Cl<br>(mEq/L) | ALP<br>(U/L) | ALT<br>(U/L) | AST<br>(U/L) | γ-GTP<br>(U/L) |
|-----------------|-------------------------|----------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|----------------|
| 0               | 5                       | 7.4<br>±0.9                | 9.1<br>±0.2   | 143.1<br>±0.8 | 4.11<br>±0.28 | 107.2<br>±0.6 | 219<br>±36   | 24<br>±3     | 62<br>±3     | 1<br>±1        |
| 1000            | 5                       | 7.5<br>±0.5                | 9.2<br>±0.2   | 143.4<br>±0.2 | 3.98<br>±0.32 | 107.8<br>±0.6 | 231<br>±39   | 28<br>±5     | 66<br>±5     | 1<br>±1        |

Parameter, mean ±S.D.

Table 8-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of benzoic acid,4-methyl- in rats

Absolute organ weights in males and females at the end of the dosing period

| Sex     | Dose<br>(mg/kg) | Number<br>of<br>animals | Body<br>weight<br>(g) | Brain<br>(mg)    | Thymus<br>(mg)  | Heart<br>(mg)    | Liver<br>(mg)      | Kidneys<br>(mg)  | Spleen<br>(mg)  | Testes<br>(mg)   | Epidi-<br>dymides<br>(mg) | Adrenal<br>glands<br>(mg) |
|---------|-----------------|-------------------------|-----------------------|------------------|-----------------|------------------|--------------------|------------------|-----------------|------------------|---------------------------|---------------------------|
| Males   | 0               | 5                       | 307.9<br>±24.7        | 1919.8<br>±65.7  | 586.5<br>±86.1  | 1098.6<br>±87.6  | 9620.9<br>±990.1   | 2391.5<br>±195.6 | 706.5<br>±191.5 | 2689.7<br>±211.0 | 671.7<br>±38.7            | 50.9<br>±3.6              |
|         | 100             | 5                       | 301.4<br>±32.0        | 1869.8<br>±55.9  | 493.4<br>±60.5  | 1006.6<br>±57.9  | 9969.7<br>±1874.3  | 2420.8<br>±243.7 | 610.7<br>±74.0  | 2844.9<br>±138.9 | 711.4<br>±67.1            | 45.6<br>±5.6              |
|         | 300             | 5                       | 311.2<br>±4.2         | 1891.6<br>±67.8  | 537.1<br>±95.0  | 1003.1<br>±48.8  | 9727.9<br>±458.0   | 2432.8<br>±167.3 | 643.4<br>±84.9  | 3003.3<br>±276.0 | 703.7<br>±15.3            | 54.6<br>±4.6              |
|         | 1000            | 5                       | 311.8<br>±30.7        | 1843.9<br>±70.5  | 535.2<br>±98.1  | 1062.9<br>±106.3 | 10257.0<br>±1149.8 | 2422.5<br>±282.0 | 590.8<br>±106.1 | 2869.5<br>±349.6 | 686.9<br>±101.3           | 47.1<br>±6.3              |
| Females | 0               | 5                       | 200.6<br>±13.6        | 1775.2<br>±80.4  | 443.2<br>±115.2 | 702.4<br>±82.6   | 6021.9<br>±355.1   | 1652.3<br>±55.1  | 462.2<br>±47.1  | 59.7<br>±7.0     |                           |                           |
|         | 100             | 5                       | 202.6<br>±12.5        | 1782.0<br>±27.7  | 438.0<br>±64.0  | 717.4<br>±100.0  | 6350.0<br>±627.5   | 1814.5<br>±147.7 | 443.8<br>±75.0  | 60.9<br>±5.7     |                           |                           |
|         | 300             | 5                       | 200.9<br>±9.9         | 1716.8<br>±32.8  | 449.6<br>±97.0  | 723.4<br>±42.0   | 6168.8<br>±268.3   | 1705.7<br>±111.6 | 485.7<br>±60.9  | 62.9<br>±6.3     |                           |                           |
|         | 1000            | 5                       | 207.3<br>±21.0        | 1724.2<br>±141.7 | 416.0<br>±83.6  | 751.7<br>±132.1  | 6753.8<br>±1317.2  | 1791.4<br>±168.2 | 519.5<br>±155.1 | 62.5<br>±5.9     |                           |                           |

Parameter, mean ±S.D.

Table 8-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of benzoic acid,4-methyl- in rats

Absolute organ weights in males and females at the end of the recovery period

| Sex     | Dose<br>(mg/kg) | Number<br>of<br>animals | Body<br>weight<br>(g) | Brain<br>(mg)    | Thymus<br>(mg)  | Heart<br>(mg)    | Liver<br>(mg)      | Kidneys<br>(mg)  | Spleen<br>(mg)  | Testes<br>(mg)   | Epidi-<br>dymides<br>(mg) | Adrenal<br>glands<br>(mg) |
|---------|-----------------|-------------------------|-----------------------|------------------|-----------------|------------------|--------------------|------------------|-----------------|------------------|---------------------------|---------------------------|
| Males   | 0               | 5                       | 380.8<br>±43.4        | 1920.6<br>±113.9 | 423.3<br>±42.3  | 1208.0<br>±153.8 | 10946.7<br>±2001.9 | 2716.0<br>±295.5 | 743.2<br>±114.3 | 2942.1<br>±156.1 | 905.8<br>±56.3            | 52.7<br>±6.0              |
|         | 1000            | 5                       | 370.2<br>±15.1        | 1910.9<br>±71.2  | 481.1<br>±132.3 | 1178.7<br>±116.7 | 10879.2<br>±463.1  | 2685.7<br>±268.2 | 694.1<br>±93.0  | 2948.3<br>±153.6 | 898.3<br>±42.6            | 55.8<br>±6.8              |
| Females | 0               | 5                       | 238.8<br>±9.6         | 1854.9<br>±72.7  | 412.8<br>±23.4  | 799.4<br>±25.9   | 7284.3<br>±362.0   | 2026.3<br>±114.1 | 518.4<br>±46.8  | 68.7<br>±12.1    |                           |                           |
|         | 1000            | 5                       | 249.5<br>±19.3        | 1857.9<br>±30.4  | 447.4<br>±34.8  | 843.2<br>±87.7   | 8080.0<br>±1207.7  | 1943.3<br>±146.3 | 678.9<br>±372.9 | 74.1<br>±7.9     |                           |                           |

Parameter, mean ± S.D.

Table 9-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of benzoic acid,4-methyl- in rats

Relative organ weights in males and females at the end of the dosing period

| Sex   | Dose<br>(mg/kg) | Number<br>of<br>animals | Body<br>weight<br>(g) | Brain<br>(mg/g) | Thymus<br>(mg/g) | Heart<br>(mg/g) | Liver<br>(mg/g)  | Kidneys<br>(mg/g) | Spleen<br>(mg/g) | Testes<br>(mg/g) | Epidi-<br>dymides<br>(mg/g) | Adrenal<br>glands<br>(mg/g) |
|-------|-----------------|-------------------------|-----------------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Males | 0               | 5                       | 307.9<br>±24.7        | 6.258<br>±0.406 | 1.904<br>±0.236  | 3.584<br>±0.380 | 31.222<br>±1.602 | 7.779<br>±0.481   | 2.272<br>±0.444  | 8.818<br>±1.323  | 2.196<br>±0.255             | 0.167<br>±0.022             |
|       | 100             | 5                       | 301.4<br>±32.0        | 6.248<br>±0.548 | 1.646<br>±0.226  | 3.359<br>±0.264 | 32.911<br>±3.635 | 8.046<br>±0.500   | 2.030<br>±0.179  | 9.527<br>±1.123  | 2.369<br>±0.191             | 0.151<br>±0.007             |
|       | 300             | 5                       | 311.2<br>±4.2         | 6.080<br>±0.268 | 1.728<br>±0.320  | 3.223<br>±0.147 | 31.272<br>±1.736 | 7.816<br>±0.506   | 2.070<br>±0.290  | 9.651<br>±0.881  | 2.261<br>±0.040             | 0.176<br>±0.015             |
|       | 1000            | 5                       | 311.8<br>±30.8        | 5.955<br>±0.561 | 1.712<br>±0.235  | 3.413<br>±0.199 | 32.890<br>±1.350 | 7.779<br>±0.618   | 1.890<br>±0.254  | 9.193<br>±0.466  | 2.196<br>±0.154             | 0.151<br>±0.009             |

| Sex     | Dose<br>(mg/kg) | Number<br>of<br>animals | Body<br>weight<br>(g) | Brain<br>(mg/g) | Thymus<br>(mg/g) | Heart<br>(mg/g) | Liver<br>(mg/g)  | Kidneys<br>(mg/g) | Spleen<br>(mg/g) | Adrenal<br>glands<br>(mg/g) |
|---------|-----------------|-------------------------|-----------------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|-------------------|------------------|-----------------------------|
| Females | 0               | 5                       | 200.6<br>±13.6        | 8.892<br>±0.837 | 2.192<br>±0.443  | 3.511<br>±0.444 | 30.050<br>±1.167 | 8.257<br>±0.418   | 2.308<br>±0.229  | 0.300<br>±0.050             |
|         | 100             | 5                       | 202.6<br>±12.5        | 8.823<br>±0.535 | 2.156<br>±0.217  | 3.550<br>±0.511 | 31.326<br>±1.878 | 8.953<br>±0.335   | 2.196<br>±0.389  | 0.301<br>±0.019             |
|         | 300             | 5                       | 200.9<br>±9.9         | 8.557<br>±0.319 | 2.241<br>±0.509  | 3.607<br>±0.260 | 30.739<br>±1.522 | 8.495<br>±0.511   | 2.415<br>±0.248  | 0.313<br>±0.033             |
|         | 1000            | 5                       | 207.3<br>±21.0        | 8.375<br>±1.016 | 2.006<br>±0.361  | 3.606<br>±0.308 | 32.390<br>±3.285 | 8.651<br>±0.317   | 2.476<br>±0.574  | 0.304<br>±0.044             |

Parameter, mean ±S.D.

Table 9-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of benzoic acid,4-methyl- in rats

Relative organ weights in males and females at the end of the recovery period

| Sex   | Dose<br>(mg/kg) | Number<br>of<br>animals | Body<br>weight<br>(g) | Brain<br>(mg)   | Thymus<br>(mg)  | Heart<br>(mg)   | Liver<br>(mg)    | Kidneys<br>(mg) | Spleen<br>(mg)  | Testes<br>(mg)  | Epidi-<br>dymides<br>(mg) | Adrenal<br>glands<br>(mg) |
|-------|-----------------|-------------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------|---------------------------|
| Males | 0               | 5                       | 380.8<br>±43.4        | 5.071<br>±0.339 | 1.127<br>±0.188 | 3.191<br>±0.454 | 28.672<br>±3.246 | 7.178<br>±0.884 | 1.951<br>±0.207 | 7.781<br>±0.677 | 2.394<br>±0.214           | 0.139<br>±0.011           |
|       | 1000            | 5                       | 370.2<br>±15.1        | 5.162<br>±0.067 | 1.301<br>±0.363 | 3.185<br>±0.305 | 29.391<br>±0.809 | 7.255<br>±0.687 | 1.873<br>±0.231 | 7.976<br>±0.568 | 2.430<br>±0.157           | 0.151<br>±0.018           |

| Sex     | Dose<br>(mg/kg) | Number<br>of<br>animals | Body<br>weight<br>(g) | Brain<br>(mg)   | Thymus<br>(mg)  | Heart<br>(mg)   | Liver<br>(mg)    | Kidneys<br>(mg) | Spleen<br>(mg)  | Adrenal<br>glands<br>(mg) |
|---------|-----------------|-------------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|---------------------------|
| Females | 0               | 5                       | 238.8<br>±9.6         | 7.778<br>±0.465 | 1.731<br>±0.134 | 3.353<br>±0.205 | 30.548<br>±2.153 | 8.507<br>±0.776 | 2.173<br>±0.202 | 0.289<br>±0.056           |
|         | 1000            | 5                       | 249.5<br>±19.3        | 7.479<br>±0.536 | 1.797<br>±0.123 | 3.376<br>±0.151 | 32.248<br>±2.597 | 7.814<br>±0.682 | 2.726<br>±1.468 | 0.298<br>±0.042           |

Parameter, mean ± S.D.

Table 10-1-1  
 Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of benzoic acid,4-methyl- in rats

Summary of macroscopical findings in males at the end of the dosing period

| Group name<br>Grade         | 0 mg/kg |   |   | Pos. | 100 mg/kg |   |   | Pos. | 300 mg/kg |   |   | Pos. | 1000 mg/kg |   |   | Pos. |
|-----------------------------|---------|---|---|------|-----------|---|---|------|-----------|---|---|------|------------|---|---|------|
|                             | —       | + |   |      | —         | + |   |      | —         | + |   |      | —          | + |   |      |
| (All organs)<br>Abnormality | [ 5 ]   | 5 | 0 | 0    | [ 5 ]     | 5 | 0 | 0    | [ 5 ]     | 5 | 0 | 0    | [ 5 ]      | 5 | 0 | 0    |

—, Negative; +, Positive; Pos., Total of positive grade  
 [ ], Number of animals examined



Table 10-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of benzoic acid,4-methyl- in rats

Summary of macroscopical findings in females at the end of the dosing period

| Group name<br>Grade         | 0 mg/kg |   |   | Pos. | 100 mg/kg |   |   | Pos. | 300 mg/kg |   |   | Pos. | 1000 mg/kg |   |   | Pos. |
|-----------------------------|---------|---|---|------|-----------|---|---|------|-----------|---|---|------|------------|---|---|------|
|                             | —       | + |   |      | —         | + |   |      | —         | + |   |      | —          | + |   |      |
| (All organs)<br>Abnormality | [ 5 ]   | 5 | 0 | 0    | [ 5 ]     | 5 | 0 | 0    | [ 5 ]     | 5 | 0 | 0    | [ 5 ]      | 5 | 0 | 0    |

—, Negative; +, Positive; Pos., Total of positive grade

[ ], Number of animals examined

Table 10-2-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of benzoic acid,4-methyl- in rats

Summary of macroscopical findings in males at the end of the recovery period

| Group name<br>Grade | 0 mg/kg |   |  | Pos. | 1000 mg/kg |   |  | Pos. |
|---------------------|---------|---|--|------|------------|---|--|------|
|                     | —       | + |  |      | —          | + |  |      |
| (All organs)        | [ 5 ]   |   |  |      | [ 5 ]      |   |  |      |
| Abnormality         | 5       | 0 |  | 0    | 5          | 0 |  | 0    |

—, Negative; +, Positive; Pos., Total of positive grade

[ ], Number of animals examined

Table 10-2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of benzoic acid,4-methyl- in rats

Summary of macroscopical findings in females at the end of the recovery period

| Group name<br>Grade | 0 mg/kg |   |      | 1000 mg/kg |   |      |
|---------------------|---------|---|------|------------|---|------|
|                     | —       | + | Pos. | —          | + | Pos. |
| (Spleen)            | [ 5 ]   |   |      | [ 5 ]      |   |      |
| Enlargement         | 5       | 0 | 0    | 4          | 1 | 1    |

—, Negative; +, Positive; Pos., Total of positive grade

[ ], Number of animals examined

Other organs without spleen were no abnormality.

Table 11-1-1

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of benzoic acid,4-methyl- in rats

Summary of histopathological findings in males at the end of the dosing period

| Group name<br>Grade                  | 0 mg/kg |   |   |    |     |      | 100 mg/kg |   |   |    |     |      | 300 mg/kg |   |   |    |     |      | 1000 mg/kg |   |   |    |     |      |
|--------------------------------------|---------|---|---|----|-----|------|-----------|---|---|----|-----|------|-----------|---|---|----|-----|------|------------|---|---|----|-----|------|
|                                      | —       | ± | + | ++ | +++ | Pos. | —         | ± | + | ++ | +++ | Pos. | —         | ± | + | ++ | +++ | Pos. | —          | ± | + | ++ | +++ | Pos. |
| (Brain)                              | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change                 |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |
| (Spinal cord)                        | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change                 |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |
| (Heart)                              | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change                 |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |
| (Lung & Bronchus)                    | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| Mineralization, artery               | 5       | 0 | 0 | 0  | 0   | 0    |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      | 4          | 1 | 0 | 0  | 0   | 1    |
| (Trachea)                            | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change                 |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |
| (Thyroid gland)                      | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| Ectopic, thymus                      | 4       | 1 | 0 | 0  | 0   | 1    |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      | 5          | 0 | 0 | 0  | 0   | 0    |
| (Thymus)                             | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change                 |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |
| (Submandibular lymph node)           | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change                 |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |
| (Liver)                              | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| Fatty change, periportal             | 0       | 5 | 0 | 0  | 0   | 5    |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      | 0          | 4 | 1 | 0  | 0   | 5    |
| Microgranuloma                       | 5       | 0 | 0 | 0  | 0   | 0    |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      | 4          | 1 | 0 | 0  | 0   | 1    |
| (Kidney)                             | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| Eosinophilic body                    | 4       | 0 | 1 | 0  | 0   | 1    |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      | 5          | 0 | 0 | 0  | 0   | 0    |
| Basophilic tubule, cortex            | 4       | 1 | 0 | 0  | 0   | 1    |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      | 3          | 2 | 0 | 0  | 0   | 2    |
| Mineralization,<br>medulla & papilla | 5       | 0 | 0 | 0  | 0   | 0    |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      | 4          | 1 | 0 | 0  | 0   | 1    |
| (Spleen)                             | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| Hematopoiesis, extramedullary        | 0       | 0 | 4 | 1  | 0   | 5    |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      | 0          | 1 | 2 | 2  | 0   | 5    |

—, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade

[ ], Number of animals examined

(continued)

Table 11-1-1(Continued)

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of benzoic acid,4-methyl- in rats

Summary of histopathological findings in males at the end of the dosing period

| Group name<br>Grade                                                          | 0 mg/kg |   |   |    |     |      | 100 mg/kg |   |   |    |     |      | 300 mg/kg |   |   |    |     |      | 1000 mg/kg |   |   |    |     |      |
|------------------------------------------------------------------------------|---------|---|---|----|-----|------|-----------|---|---|----|-----|------|-----------|---|---|----|-----|------|------------|---|---|----|-----|------|
|                                                                              | —       | ± | + | ++ | +++ | Pos. | —         | ± | + | ++ | +++ | Pos. | —         | ± | + | ++ | +++ | Pos. | —          | ± | + | ++ | +++ | Pos. |
| (Stomach)                                                                    | [ 4 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change                                                         |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |
| (Ileum)                                                                      | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change                                                         |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |
| (Colon)                                                                      | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change                                                         |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |
| (Mesenteric lymph node)                                                      | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change                                                         |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |
| (Adrenal gland)                                                              | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change                                                         |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |
| (Sciatic nerve)                                                              | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change                                                         |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |
| (Urinary bladder)                                                            | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change                                                         |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |
| (Testis)                                                                     | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change                                                         |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |
| (Epididymis)                                                                 | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change                                                         |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |
| (Prostate)                                                                   | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| Cellular infiltration, lymphocyte & neutrophil,<br>interstitium & epithelium |         | 3 | 1 | 0  | 1   | 0    | 2         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      | 4          | 0 | 1 | 0  | 0   | 1    |
| (Seminal vesicle & Coagulating gl)                                           | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change                                                         |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |
| (Femur)                                                                      | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change                                                         |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |
| (Bone marrow of Femur)                                                       | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change                                                         |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |

—, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade

[ ], Number of animals examined

Table 11-1-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of benzoic acid, 4-methyl- in rats

Summary of histopathological findings in females at the end of the dosing period

| Group name                                    | 0 mg/kg |   |   |    |     |      | 100 mg/kg |   |   |    |     |      | 300 mg/kg |   |   |    |     |      | 1000 mg/kg |   |   |    |     |      |
|-----------------------------------------------|---------|---|---|----|-----|------|-----------|---|---|----|-----|------|-----------|---|---|----|-----|------|------------|---|---|----|-----|------|
| Grade                                         | —       | ± | + | ++ | +++ | Pos. | —         | ± | + | ++ | +++ | Pos. | —         | ± | + | ++ | +++ | Pos. | —          | ± | + | ++ | +++ | Pos. |
| (Brain)                                       | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change                          |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |
| (Spinal cord)                                 | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change                          |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |
| (Heart)                                       | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change                          |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |
| (Lung & Bronchus)                             | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change                          |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |
| (Trachea)                                     | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change                          |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |
| (Thyroid gland)                               | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change                          |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |
| (Thymus)                                      | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change                          |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |
| (Submandibular lymph node)                    | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change                          |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |
| (Liver)                                       | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| Fatty change, periportal                      | 0       | 5 | 0 | 0  | 0   | 5    |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      | 0          | 2 | 3 | 0  | 0   | 5    |
| Microgranuloma                                | 4       | 1 | 0 | 0  | 0   | 1    |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      | 3          | 2 | 0 | 0  | 0   | 2    |
| (Kidney)                                      | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| Basophilic tubule, cortex                     | 1       | 4 | 0 | 0  | 0   | 4    |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      | 3          | 2 | 0 | 0  | 0   | 2    |
| Mineralization,<br>cortico-medullary junction | 4       | 0 | 1 | 0  | 0   | 1    |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      | 5          | 0 | 0 | 0  | 0   | 0    |
| (Spleen)                                      | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| Hematopoiesis, extramedullary                 | 0       | 4 | 1 | 0  | 0   | 5    |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      | 0          | 5 | 0 | 0  | 0   | 5    |
| Deposit, pigment, brown                       | 0       | 5 | 0 | 0  | 0   | 5    |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      | 0          | 5 | 0 | 0  | 0   | 5    |

—, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe

[ ], Number of animals examined

(continued)

Table 11-1-2(Continued)

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of benzoic acid,4-methyl- in rats

Summary of histopathological findings in females at the end of the dosing period

| Group name<br>Grade     | 0 mg/kg |   |   |    |     |      | 100 mg/kg |   |   |    |     |      | 300 mg/kg |   |   |    |     |      | 1000 mg/kg |   |   |    |     |      |
|-------------------------|---------|---|---|----|-----|------|-----------|---|---|----|-----|------|-----------|---|---|----|-----|------|------------|---|---|----|-----|------|
|                         | —       | ± | + | ++ | +++ | Pos. | —         | ± | + | ++ | +++ | Pos. | —         | ± | + | ++ | +++ | Pos. | —          | ± | + | ++ | +++ | Pos. |
| (Stomach)               | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change    |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |
| (Ileum)                 | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change    |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |
| (Colon)                 | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change    |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |
| (Mesenteric lymph node) | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change    |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |
| (Adrenal gland)         | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change    |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |
| (Sciatic nerve)         | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change    |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |
| (Urinary bladder)       | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change    |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |
| (Ovary)                 | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change    |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |
| (Uterus)                | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change    |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |
| (Vagina)                | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change    |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |
| (Femur)                 | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change    |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |
| (Bone marrow of Femur)  | [ 5 ]   |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 0 ]     |   |   |    |     |      | [ 5 ]      |   |   |    |     |      |
| No remarkable change    |         |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |           |   |   |    |     |      |            |   |   |    |     |      |

—, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe  
 [ ], Number of animals examined

Table 11-2-2

Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity study with subsequent 14-day recovery test of benzoic acid,4-methyl- in rats

Summary of histopathological findings in females at the end of the recovery period

| Group name<br>Grade           | 0 mg/kg |   |   |    |     | Pos. | 1000 mg/kg |   |   |    |     | Pos. |
|-------------------------------|---------|---|---|----|-----|------|------------|---|---|----|-----|------|
|                               | —       | ± | + | ++ | +++ |      | —          | ± | + | ++ | +++ |      |
| (Spleen)                      | [ 0 ]   |   |   |    |     |      | [ 1 ]      |   |   |    |     |      |
| Hematopoiesis, extramedullary |         |   |   |    |     |      | 0          | 0 | 0 | 1  | 0   | 1    |
| Deposit, pigment, brown       |         |   |   |    |     |      | 0          | 0 | 1 | 0  | 0   | 1    |

—, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe

[ ], Number of animals examined