

2003年 9月26日

## 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

厚生労働省医薬局審査管理課化学物質安全対策室 委託

財団法人食品薬品安全センター  
秦野研究所

## 【 目 次 】

|                              |    |
|------------------------------|----|
| 要 約 .....                    | 1  |
| 試験目的 .....                   | 3  |
| 材料および方法 .....                | 4  |
| 1. 被験物質 .....                | 4  |
| 2. 使用動物および飼育条件 .....         | 4  |
| 3. 群分けおよび個体識別 .....          | 5  |
| 4. 投与検体の調製 .....             | 5  |
| 5. 投与量、群構成、投与期間および投与方法 ..... | 6  |
| 6. 観察方法 .....                | 7  |
| 7. 統計解析 .....                | 10 |
| 結 果 .....                    | 12 |
| 1. 一般状態 .....                | 12 |
| 2. 体重 .....                  | 12 |
| 3. 摂餌量 .....                 | 13 |
| 4. 性周期 .....                 | 13 |
| 5. 交配成績 .....                | 13 |
| 6. 分娩および哺育所見 .....           | 14 |
| 7. 黄体数および着床数 .....           | 14 |
| 8. 病理学検査所見 .....             | 14 |
| 9. 出生児所見 .....               | 16 |
| 考 察 .....                    | 18 |
| 1. 一般毒性学的影響 .....            | 18 |
| 2. 生殖発生毒性 .....              | 19 |
| 3. 無作用量 .....                | 22 |
| 文 献 .....                    | 23 |

Figs. 1~4

Tables 1~20

## 【 要 約 】

4-メチル安息香酸（MBA と略記）の、雌雄動物に対する一般毒性学的影響、ならびに親動物の生殖・発生および新生児の発育に及ぼす影響を検討するために、MBA の 0（媒体対照、0.5 % カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液）、100、300 および 1000 mg/kg を Sprague-Dawley 系 (Crj:CD (SD) IGS) ラットの雌雄（各 13 匹／群）に、10 週齢から経口投与を開始し、2 週間後に交配させた。雄は 2 週間の交配期間終了後、さらに 2 週間を経過した後剖検し、雌は交配後、自然分娩させ、4 日間出生児を哺育させた後、出生児とともに哺育 4 日に剖検した。また、分娩しなかった雌は妊娠 26 日相当日に剖検し、交尾しなかった雌は投与 53 日に剖検した。この間、雌雄動物に対して毎日 MBA あるいは媒体を投与し、一般状態を観察し、体重および摂餌量を測定した。また、雌動物は性周期を観察した。さらに親動物は、分娩および泌乳を含む繁殖能力を観察し、出生児は哺育 4 日までの発育を観察した。結果は、以下のように要約される。

### 1. 一般毒性学的影響

雌雄ともに死亡および瀕死による途中剖検はなかった。また、雌雄ともに 1000 mg/kg 投与群において投与期間の後半に流涎が観察された他に MBA 投与に起因した一般状態の変化は認められなかった。

雄では体重および摂餌量に MBA 投与の影響は認められなかった。最終剖検では、1000 mg/kg 投与群において精巣上体重量および相対重量の低下が認められたが、精巣重量には MBA 投与の影響は認められなかった。雌の体重増加については、着床率の低下や哺育児数の減少といった MBA の生殖毒性に起因すると考えられる抑制が 300 mg/kg 以上の投与群の妊娠末期および哺育期間中に認められた。摂餌量については 1000 mg/kg 投与群において投与初期および妊娠 14～15 日に軽度な増加が認められた。また哺育期間中には哺育児数の減少による生理的変化に起因すると考えられる軽度な低下が認められた。剖検時の肉眼観察においても MBA 投与に起因した異常は観察されなかった。

## 2. 生殖発生毒性

雄の病理組織学検査では、精巣には MBA 投与の影響は認められなかったが、1000 mg/kg 投与群の精巣上体尾部には精子の少ない管腔の増加が認められ、管腔に細胞残屑のごく軽度な増加を認める例もあった。雌については 1000 mg/kg までの MBA を投与しても性周期は変化せず、排卵数の指標である黄体数にも対照群と MBA 投与群との間で差は認められなかった。

交配については、交尾率、交尾までの平均発情回帰回数および平均同居日数ならびにその間に雌が回帰した発情の回数に MBA 投与の影響は認められなかった。しかし、MBA 投与により受胎率は有意に低下し、1000 mg/kg 投与群における受胎率は約 70%となった。また、300 mg/kg 以上の投与群において着床率が低下し、産児数が減少した。さらに、1000 mg/kg 投与群では産児数の減少に伴い、出產生児数ならびに哺育 4 日における生児数が減少した。

いずれの投与群も正常な妊娠期間を経て分娩し、分娩状態および哺育状態に投与の影響は認められなかった。また、出生時ならびに出生後における児の生存能の指標である生児出産率、出生率および新生児生存率にも投与の影響は認められなかった。さらに、哺育 0 および 4 日における性比ならびにこの時期における雌雄の体重にも投与の影響は認められず、また、MBA 投与に起因した出生児の形態異常も観察されなかった。

以上の結果から、300 mg/kg 以上の MBA は着床前の胚死亡を増加させ、1000 mg/kg の MBA は雄性生殖毒性を示し、また着床後胚死亡の軽度な増加を疑わせたが、雌の性周期、排卵、分娩および哺育、ならびに出生児の生存および発育に MBA 投与は影響を及ぼさず、また形態異常も誘発しないものと結論された。しかし、着床前胚死亡の増加が雌雄いずれに対する MBA の影響によるものであるかについては、本試験からは明らかにならなかった。

## 3. 評価

以上の試験成績から、本試験条件下では、MBA の一般毒性学的無作用量は、雌雄ともに 300 mg/kg/day であり、生殖発生毒性に関する無作用量は、雌雄ともに 100 mg/kg/day であり、出生児に対する無作用量は 1000 mg/kg/day であると結論された。

### 【試験目的】

4-メチル安息香酸は、染料、顔料、医薬品あるいは農薬の中間物質として生産されている有機化合物である。4-メチル安息香酸の安全性については、OECD 化学物質試験法ガイドライン 401/急性経口毒性試験に準拠して、秦野研究所において実施された「4-メチル安息香酸のラットを用いる急性経口投与毒性試験」<sup>1)</sup>（以下急性経口投与毒性試験と略記）において、2000 mg/kg の 4-メチル安息香酸を雌雄ラットに経口投与しても死亡する例はなく、また、OECD 化学物質試験法ガイドライン 407/28 日間反復投与毒性試験に準拠して秦野研究所において実施された「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」<sup>2)</sup>（以下反復経口投与毒性試験と略記）では、雌雄動物に対する無作用量は 300 mg/kg/day とされている。

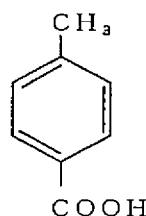
今回、OECD による既存化学物質の安全性点検に係わる毒性調査事業の一環として、OECD 化学物質試験法ガイドライン 421/生殖発生毒性スクリーニング試験（簡易生殖毒性試験）（1995 年 7 月 27 日、以下「OECD 化学物質試験法ガイドライン」）および「化学物質 GLP」（平成 12 年 3 月 1 日改正、環保安第 41 号、生衛発第 268 号、平成 12・02・14 基局第 1 号）に準拠して、4-メチル安息香酸の簡易生殖毒性試験を行い、同化合物の親動物に対する反復投与の影響ならびに新生児の生存能、発育および形態を含む生殖発生に及ぼす影響について検討したので報告する。

## 【材料および方法】

### 1. 被験物質

被験物質の、4-メチル安息香酸（MBA と略記、CAS No.：99-94-5、分子式： $C_8H_8O_2$ 、分子量：136.15、英名：benzoic acid, 4-methyl-）は、 から提供を受けたもので、下図に示した構造を有する。提供された被験物質（ロット番号： ）は、純度 98.85%の、昇華性を有する白色結晶性粉末で、不純物として、水分 0.01%、灰分 0.01%を含み、使用時まで室温保管した。本試験に使用した被験物質については、投与終了後に に返却し、再分析して使用期間中の安定性を確認した（Table A）。

図 構造式



### 2. 使用動物および飼育条件

試験には、日本チャールス・リバー株式会社厚木飼育センター生産の Sprague-Dawley (SD) 系 (Crj:CD (SD) IGS, SPF) ラットを使用した。雌雄動物は 7 週齢で購入し、入荷日を含む 7 日間、検疫と馴化を兼ねて飼育し、その間毎日一般状態を観察して異常が認められなかった動物を、さらに 2 週間予備飼育した。この間、動物は一般状態を観察し、さらに雌については性周期を観察した。動物の入荷、検疫ならびに群分け状況を、Table B に示した。

各動物は、許容温湿度各 21.0～25.0℃、および 40.0～75.0%、換気回数約 15 回/時間、照明 12 時間（7 時～19 時点灯）に制御された飼育室で、金属製金網床ケージ (220w×270d×190h mm) に個別に収容して飼育し、固形飼料（CE-2、日本クレア株式会社）および飲料水（水道水、秦野市水道局給水）を自由に摂取させた。妊娠 18 日（陰栓あるいは精子発見日＝妊娠 0 日）以後の母動物は、ラット用プラスチック製繁殖ケージ (350w×400d×180h mm) に収容し、哺育 4 日（哺育 0 日＝分娩日）まで紙パルプ製チップ（ペパークリーン、日本エスエルシー株式会社

社)を床敷として供給して飼育した。

試験期間中、秦野研究所中央温湿度監視装置により測定した飼育室の温度は 30 分以内の逸脱が 2 回認められたため、23.5～25.5℃となったが、短時間であり試験の結果に影響を及ぼすことはないと判断された。相対湿度については、53.5～74.5%と許容範囲内の値であった。使用した飼料、水および床敷についても試験に支障を来す可能性の考えられる混入物はなかった。

### 3. 群分けおよび個体識別

雌雄とも投与開始前日の体重に基づく体重別層化無作為抽出法により群分けし、各群に雌雄各 13 匹を配した。雌動物については、検疫終了後から群分け日まで性周期を毎日観察し、規則的に発情を回帰している動物を選択して群分けに用いた。

群分け後、すべての雌雄は、尾にフェルトペンで個体識別番号を示す番号を記して個体を識別した。各飼育ケージには、試験計画番号および個体識別番号を記入した、群ごとに色の異なる動物カードを掛けて個体識別の補助とした。出生児については、個体識別は行わなかった。

### 4. 投与検体の調製

投与検体の媒体には 0.5 %カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC Na) 水溶液を用いた。CMC Na 水溶液は、投与検体の調製前 3 日以内に、秤量したカルメロースナトリウム (製造元：丸石製薬株式会社、製造番号：2115) を注射用水 (製造元：光製薬株式会社、製造番号：A106AA) に溶解することにより調製し、使用時まで冷蔵保管した。投与検体は、被験物質を各濃度ごとに秤量し、乳鉢で磨砕後、CMC Na 水溶液を加え、ミキサー (あわとり練太郎 AR-360M、(株)シンキー：使用方法については添付資料参照) を用いて、公転速度 2000 rpm、自転速度 600 rpm で 5 分間ミキシングした後、2、6 および 20 % (w/v) の懸濁液とした。

投与検体の安定性については、本試験に先立ち、本被験物質のラットを用いる急性経口投与毒性試験 (試験計画番号：A-01-069) <sup>1)</sup> において、0.1 および 20 % (w/v) の調製検体について、

冷蔵条件下における 8 日間の安定性を確認した。これらの結果に基づき、投与検体は 1 週間に 1 回以上の頻度で調製し、冷蔵保管して調製後 7 日以内に使用した。

各濃度の投与検体に含まれる被験物質の含量および均一性は、投与開始前に 1 回、以下に示す方法で測定した。その結果、調製検体には所定量の MBA が均一に含まれていることを確認した (Tables D、E)。

#### 測定方法

各調製検体の 1 mL を採取し、メタノールで一定量とした後、メタノールで適宜希釈して試料溶液を調製した。別に、被験物質を必要量秤取し、メタノールに溶解して標準溶液 (2~10 µg/mL) を調製し、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 条件を以下に示す。

分析カラム : Inertsil ODS-2

(内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 µm、ジーエルサイエンス(株))

移動相 : 0.1%リン酸/アセトニトリル (6:4 v/v)

流速 : 1.0 mL/min

カラム温度 : 40°C

検出波長 : 254 nm

試料注入量 : 10 µL

#### 5. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

本試験の投与量は、4-メチル安息香酸のラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験 (試験計画番号 : C-01-006)<sup>2)</sup> の投与量設定のために実施された、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予備試験 (試験計画番号 : C-01-005)<sup>3)</sup> において、1000、200、40 mg/kg および媒体を、それぞれ 5 匹の雄に 7 日間反復経口投与しても、一般状態の異常、体重増加抑制ならびに、剖検における肉眼的異常所見が認められなかったことから、簡易生殖毒性試験においても反復経口投与毒性試験と同一の用量設定が可能であると判断し、高用量には OECD 化学物質試験法ガイドラインに定める限度用量である 1000 mg/kg を設定し、以下公比約 3 で除して、中用量には 300 mg/kg を、低用量には 100 mg/kg を設定した。

次頁に群構成を示す。



| 群番号 | 被験物質               | 投与量<br>(mg/kg) | 被験物質濃度<br>(% (w/v)) | 匹数 (動物番号)        |                  |
|-----|--------------------|----------------|---------------------|------------------|------------------|
|     |                    |                |                     | 雄                | 雌                |
| 1   | 0.5% CMC Na<br>水溶液 | 0              | 0                   | 13 (MX01001-013) | 13 (FB01001-013) |
| 2   | MBA                | 100            | 2                   | 13 (MX02001-013) | 13 (FB02001-013) |
| 3   | MBA                | 300            | 6                   | 13 (MX03001-013) | 13 (FB03001-013) |
| 4   | MBA                | 1000           | 20                  | 13 (MX04001-013) | 13 (FB04001-013) |

各用量の投与検体は、雄に対しては交配前 2 週間から最長 2 週間の交配期間を経て剖検前日に至るまでの連続 42 日間、また、雌に対しては交配前 2 週間、交尾までの交配期間、妊娠期間および哺育 3 日まで、交尾したが分娩しない雌は妊娠 25 日相当日まで、交尾しなかった雌には投与 52 日までそれぞれ毎日 1 回、一定時刻の間（9 時～13 時）に、調製検体をマグネティ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経口投与した。各動物の投与液量（5 mL/kg）は、雌雄とも最近時の体重をもとに、個体別に算出した。

## 6. 観察方法

### 1) 一般状態の観察

雌雄とも、全例について飼育期間中毎日 1 回以上観察した。投与期間中の動物については、投与前および投与終了後に観察した。症状が発現した場合、速やかな回復が期待されない所見を除き、症状の発現している間、断続的に可能な限り観察を継続した。

### 2) 体重測定

雄は全例について、投与 1（投与開始日）、7、14、21、28、35、42 日および解剖日に測定した。

雌は全例について、投与 1、7、14、21、28、35、42、49 日に測定し、交尾確認後は、妊娠 0、7、14、20 日に、分娩後は哺育 0、4 日および解剖日に測定した。これらのうち、投与 21～49 日の体重は、交尾が確認されていない動物についてのみ測定したものであることから評価の対象

から除外した。

### 3) 摂餌量測定

雄は全例について、投与 1～2、7～8、14～15、29～30、35～36、41～42 日に測定した。

雌は全例について、交配前期間は投与 1～2、7～8、14～15 日、交尾確認後は、妊娠 0～1、7～8、14～15、20～21 日に、分娩後は哺育 3～4 日に測定した。交尾が確認されなかった例は、投与 29～30、35～36、41～42、49～50 日に測定した。

### 4) 性周期

全例について群分け日までの性周期観察に引き続き、交尾確認日まで、膣スミア標本を作製して観察し、細胞構成から、発情期、発情前期および発情休止期に分類した。これらの分類に基づき、性周期の型を、4 日間隔で発情を回帰するものを 4 日周期、4～5 日間隔で発情を回帰するものを 4 および 5 日周期、それ以外を不正周期に分類し、投与開始後性周期の型が変化した動物の頻度を群毎に算出するとともに、群毎に平均発情回帰日数（個体毎の発情期から次回発情期までの日数の平均）を算出した。

### 5) 交配

交配は、雌雄ともに 2 週間投与後（投与 15 日）の 12 週齢から、交尾を確認するまで、2 週間を限度として同群内の雌雄 1：1 で連日同居させることによって行った。交尾の確認は、膣スミア中の精子の存在あるいは膣栓を確認することにより行い、いずれかが確認された日を妊娠 0 日と起算して雄から分離し、個別に飼育した。

交配結果から、各群について交尾率〔（交尾動物数／交配動物数）×100、％〕を求め、子宮に着床痕の確認された雌動物を妊娠動物として受胎率〔（妊娠動物数／交尾動物数）×100、％〕を算出した。また、同居開始日から交尾確認日までの日数およびその間に回帰した発情期の回数も求めた。

#### 6) 分娩・哺育状態の観察

各群とも、交尾した雌は、全例を自然分娩させて哺育させた。

分娩の確認は、妊娠 21 日から分娩が確認されるまで、妊娠 25 日を限度として毎日行い、11 時までに分娩が完了した例についてその日を哺育 0 日とした。分娩状態を直接観察できた例については、異常の有無を断続的に観察し、直接観察ができなかった例については、分娩前後の一般状態および産児の状態から異常の有無を判断した。

妊娠 25 日相当日までに分娩が確認されない動物は、翌日、後述の「剖検」および「病理学検査」の各項に示した方法に従って剖検し、子宮に着床痕の認められなかった例を不妊と判定した。

分娩を確認した全例については、妊娠期間（妊娠 0 日～分娩日の日数）を算定し、出産率  $[(\text{生児出産雌数} / \text{妊娠動物数}) \times 100, \%]$  を各群について求めた。また、哺育 1 日から毎日、哺育状態を観察し、哺育 4 日の剖検において数えられた着床数および妊娠黄体数から着床率  $[(\text{着床数} / \text{妊娠黄体数}) \times 100, \%]$  を算出した。

#### 7) F<sub>1</sub> 出生児の観察

哺育 0 日に、雌雄別に産児数（生存児＋死亡児）を調べ、分娩率  $[(\text{産児数} / \text{着床痕数}) \times 100, \%]$ 、生児出産率  $[(\text{出產生児数} / \text{着床痕数}) \times 100, \%]$  および出生率  $[(\text{出產生児数} / \text{産児数}) \times 100, \%]$  を算出した。生存児については外表奇形の有無を観察した。一般状態は、哺育 1 日から 4 日まで毎日観察し、生児数と死亡児数を雌雄別に数え、新生児生存率  $[(\text{哺育 4 日の生児数} / \text{哺育 0 日の生児数}) \times 100, \%]$  を算出した。生存児については、哺育 0 および 4 日に個別の体重を測定し、各腹ごとに雌雄別の平均値を算出するとともに、哺育 0 および 4 日における性比  $[(\text{哺育 0 あるいは 4 日雄生児数} / \text{哺育 0 あるいは 4 日総生児数}) \times 100, \%]$  を算出した。

## 8) 剖検

雄動物は、投与 42 日の翌日にペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血致死させ解剖し、病理学検査を実施するとともに、精巣および精巣上体の重量を測定し、相対重量を算出した。

雌動物のうち、交尾したが分娩しなかった例については妊娠 26 日相当日に、また、分娩した例は哺育 4 日に、交尾しなかった例は投与 53 日に、それぞれペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血致死させ解剖し病理学検査を実施した。

出生児については、死亡児は発見後速やかに剖検し、0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液に固定して保存した。生存児は、全例を哺育 4 日にエーテル吸入により致死させ剖検した。

## 9) 病理学検査

### (1) 肉眼検査

全例について剖検し、器官・組織の肉眼観察を行い、病変部を採取した。また、全例について、雄は精巣、精巣上体、前立腺腹葉および凝固腺を含む精嚢を採取し、雌は卵巣、子宮および膣を採取した。その際、子宮は着床痕数を数え、着床痕が認められた例については実体顕微鏡下で妊娠黄体数を数えた。採取した器官および組織のうち、精巣ならびに精巣上体はブアン液（長期保存は 0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液を使用）に固定し、その他は 0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液に固定して保存した。

### (2) 病理組織学検査

固定・保存器官のうち、病変部ならびに全例の精巣、精巣上体および卵巣について常法に従ってパラフィン切片とし、ヘマトキシリンーエオジン染色を行って病理組織標本を作製し、精巣および精巣上体は全例について、また、卵巣は対照群および 1000 mg/kg 投与群の全例について病理組織学検査を実施した。

## 7. 統計解析

性周期の変化した動物の頻度、交尾率、受胎率ならびに出生児の形態異常の出現頻度について

ては Fisher の直接確率検定<sup>4)</sup>を行った。病理組織学検査所見では、グレード分けをしたデータは、Mann-Whitney のU検定<sup>5)</sup>により、陽性グレードの合計値は Fisher の直接確率片側検定<sup>6)</sup>により対照群と MBA 投与群との間の有意差検定を行った。その他のデータは多重比較検定を行った。すなわち、個体ごとに得られた値、あるいは litter ごとの平均値を1標本として、先ず Bartlett 法<sup>7)</sup>により各群の分散の一樣性について検定を行った。分散が一樣である場合には、一元配置型の分散分析<sup>7)</sup>を行い、群間に有意性が認められる場合は、Dunnett 法<sup>8)</sup>により多重比較を行った。一方、いずれかの群で分散が 0 となる場合および分散が一樣でない場合には、Kruskal-Wallis<sup>9)</sup>の順位検定を行い、群間に有意性が認められる場合には、Dunnett 型<sup>8)</sup>の検定法により多重比較を行った。有意水準はいずれも 5 %とした。

## 【 結 果 】

### 1. 一般状態

#### 1) 雄 (Table 1; Appendices 1-1~1-4)

死亡あるいは瀕死動物はいずれの投与群にも認められなかった。

対照群を含めて 300 mg/kg 以下の投与群に一般状態の異常は認められなかった。1000 mg/kg 投与群では、投与 29~35 日の週から剖検前日まで、少数例に投与後一過性の流涎が認められた他に異常は認められなかった。

#### 2) 雌 (Table 2; Appendices 2-1~2-4)

死亡あるいは瀕死動物はいずれの投与群にも認められなかった。

対照群では、投与 30~41 日に脱毛が 1 例に認められた他に、異常は認められなかった。100 および 300 mg/kg 投与群に一般状態の異常は認められなかった。1000 mg/kg 投与群では、投与 25~32 日に、投与後一過性の流涎を示す例があった。また、投与 37 日から剖検日まで脱毛が 1 例に認められた。

### 2. 体重

#### 1) 雄 (Figure 1; Tables 3~5; Appendices 3-1~5-4)

体重、体重増加量ならびに累積体重増加量のいずれにも MBA 投与の影響は認められなかった。

#### 2) 雌 (Figure 2; Tables 6~8; Appendices 6-1~8-4)

100 mg/kg 投与群では、体重はいずれの時期においても対照群と同様に推移し、体重増加量および累積体重増加量にも対照群との間で有意差は認められなかった。300 mg/kg 以上の投与群では、交配前の投与期間中は、体重、体重増加量および累積体重増加量のいずれにも対照群との間に有意差は認められなかったが、妊娠期間中は、妊娠 14~20 日の体重増加量が対照群と比べて有意 ( $p<0.01$ ,  $p<0.05$ ) に低い値を示した。この時期の体重および累積体重増加量について

は対照群との間に有意差は認められなかった。哺育期間中は、300 mg/kg 以上の投与群において、分娩日である哺育 0 日の体重が対照群と比べて有意 ( $p < 0.05$ ) に高い値を示し、1000 mg/kg 投与群において哺育 0～4 日の体重増加量が対照群と比較して有意 ( $p < 0.01$ ) に低い値を示した。300 mg/kg 投与群における哺育 0～4 日の体重増加量には対照群との間に有意差は認められなかった。

### 3. 摂餌量

#### 1) 雄 (Figure 3; Table 9; Appendices 9-1～9-4)

いずれの投与群においても MBA 投与の影響は認められなかった。

#### 2) 雌 (Figure 4; Table 10; Appendices 10-1～10-4)

300 mg/kg 以下の投与群では、いずれの時期においても MBA 投与の影響は認められなかった。1000 mg/kg 投与群では投与 1～2 日および妊娠 14～15 日の値が対照群と比較して有意 ( $p < 0.05$ ) に増加した。また、哺育 3～4 日の値は対照群と比較して有意 ( $p < 0.01$ ) に低い値を示した。

### 4. 性周期 (Table 11; Appendices 11-1～11-4)

対照群および 100 mg/kg 投与群の各 1 例の性周期が投与開始後に変化したが、300 mg/kg 以上の投与群については、性周期が投与開始後に変化した例はなかった。また、性周期の変化した動物の頻度および平均発情回帰日数には、対照群と MBA 投与群との間で有意差は認められなかった。

### 5. 交配成績 (Tables 11、12; Appendices 11-1～12-4)

交配期間中に雌が発情を回帰しなかった 300 mg/kg 投与群の 1 組を除き、全例が交尾し、交尾率に対照群と MBA 投与群との間で有意差は認められなかった。また、交尾までの同居期間ならびにその間に回帰した発情の回数にも対照群と MBA 各投与群との間で有意差は認められなかった。しかし、交尾が確認されたにもかかわらず、雌が不妊であった例が 300 mg/kg 以上の投

与群に認められ、1000 mg/kg 投与群では、受胎率が低値を示し、受胎率は対照群と MBA 投与群との間で有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められた。

#### 6. 分娩および哺育所見 (Table 13; Appendices 13-1~13-4)

妊娠動物の全例が生児を出産した。これらのうち、分娩の直接観察が可能であったのは、対照群および 100 mg/kg 投与群の 13 例中 3 および 4 例、300 mg/kg 投与群の 11 例中 5 例ならびに 1000 mg/kg 投与群の 9 例中 2 例であった。その他の動物は、分娩後の所見から分娩状態の良・不良を判断したが、いずれの投与群においても分娩状態の不良は認められなかった。また、妊娠期間は対照群と MBA 各投与群との間で有意差は認められなかった。

1000 mg/kg 投与群の 1 例 (動物番号: FB04013) は、哺育 2 日に出生児の全例 (2 匹) が死亡したが、この例を含めていずれの投与群の動物にも哺育状態の不良は認められなかった。

#### 7. 黄体数および着床数 (Table 13; Appendices 13-1~13-4)

黄体数は対照群と MBA 各投与群との間で有意差が認められなかったが、着床数は 1000 mg/kg 投与群において低値の傾向を示し、着床率は 300 mg/kg 以上の投与群において対照群と比較して有意 ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ) に低い値を示した。

#### 8. 病理学検査所見

##### 1) 剖検所見

##### (1) 雄 (Table 14; Appendix 14)

対照群および 100 mg/kg 投与群の動物に異常は認められなかった。300 mg/kg 投与群では、1 例 (動物番号: MX03006、交尾雌妊娠例) の右側精巣上体尾部に黄白色の結節が認められた。1000 mg/kg 投与群では、1 例 (動物番号: MX04002、交尾雌不妊例) の両側精巣上体尾部に透明化が認められた。



## (2) 雌 (Table 15; Appendix 15)

対照群および 100 mg/kg 投与群の動物に異常は認められなかった。300 mg/kg 投与群では、交尾しなかった 1 例 (動物番号: FB03005) および交尾したが不妊であった 1 例 (動物番号: FB03008) の子宮が拡張し、管腔内に白濁液の貯留が認められた。また、これらの動物のうち、不妊であった例の両側卵巣は小さかった。これらの他に、病変部として、300 mg/kg 投与群では、哺育 4 日に剖検した 1 例 (動物番号: FB03012) に脾臓および腸間膜リンパ節の腫大が認められた。また、1000 mg/kg 投与群では、哺育 4 日に剖検した 1 例 (動物番号: FB04004) の胸部皮膚に脱毛が認められた。

## 2) 病理組織学検査所見

### (1) 雄 (Table 16; Appendix 16)

精巣では、限局性の精細管の萎縮が対照群および 100 mg/kg 投与群の各 1 例の両側に観察された。また、1000 mg/kg 投与群では、1 例の精細管に多核巨細胞が認められたが、交尾した雌は妊娠していた。これらの所見の頻度および程度に対照群との間で差は認められなかった。300 mg/kg 投与群の精巣に異常は観察されなかった。

対照群では、精細管の萎縮が認められた例において、両側の管腔内に細胞残屑のごく軽度な増加が認められた。300 mg/kg 投与群において剖検時に精巣上体尾部に黄白色の結節が認められた例には、結節部に精子肉芽腫が認められた。1000 mg/kg 投与群では、対照群には認められなかった精子の少ない管腔 (Photos 1 および 2) が全例の両側に観察され、対照群と比較して頻度および程度ともに有意 ( $p < 0.01$ ) に増強されていた。これらのうち、交尾した雌が不妊であった 2 例を含む 5 例には細胞残屑のごく軽度な増加も認められた。100 mg/kg 投与群に異常は認められなかった。

### (2) 雌 (Table 17; Appendix 17)

剖検時に卵巣の小型化が認められた 300 mg/kg 投与群の 1 例を含めて、300 mg/kg 以下の投与群の卵巣に異常は認められなかった。1000 mg/kg 投与群では、不妊であった 1 例の両側卵巣に

に閉鎖卵胞が顕著に認められたが対照群との間に有意差は認められなかった。

子宮については、剖検時に拡張および白濁液の貯留が認められた 300 mg/kg 投与群の 2 例に、管腔の拡張ならびに子宮内膜の上皮および間質に好中球の浸潤が認められ、それらの内、不妊であった方の内膜間質には浮腫も認められた。その他の投与群の子宮には、異常は認められなかった。

腔については、300 mg/kg 投与群の子宮に異常が認められた 2 例の上皮に好中球の浸潤が認められ、それらの内、不妊であった例の上皮は分泌期を示していた他に、対照群を含むいずれの投与群にも異常は認められなかった。

剖検時に病変部として採取された 300 mg/kg 投与群の 1 例の脾臓および腸間膜リンパ節は、いずれにも壊死巣の散在ならびに好中球およびマクロファージの浸潤が観察された。しかし、脱毛の認められた 1000 mg/kg 投与群の胸部皮膚に異常は認められなかった。

#### 5) 器官重量 (Table 18; Appendices 18-1~18-4)

精巣については、重量および相対重量のいずれにおいても対照群と MBA 各投与群との間に有意差は認められなかった。精巣上体については、300 mg/kg 以下の投与群では対照群との間に有意差は認められなかったが、1000 mg/kg 投与群では重量および相対重量のいずれも対照群と比較して有意 ( $p < 0.01$ ) に低い値を示した。

### 9. 出生児所見

#### 1) 一般状態および生存能 (Table 13; Appendices 13-1~13-4)

いずれの投与群の動物も行動を含む一般状態に異常は認められなかった(表に示さず)。

生存能については、100 mg/kg 以下の投与群に MBA 投与の影響は認められなかったが、産児数は 300 mg/kg 以上の投与群において、また、出產生児数は 1000 mg/kg 投与群において、それぞれ対照群と比較して有意な低値を示し、そのために哺育 4 日における生児数も有意 ( $p < 0.05$ ) な低値を示した。しかし、分娩率、生児出産率、出生率、新生児生存率については対照群との

間に有意差は認められなかった。また、哺育 0 日および哺育 4 日における性比にも対照群と MBA 各投与群との間で有意差は認められなかった。

## 2) 体重 (Table 19; Appendices 19-1~19-4)

雌雄ともにいずれの時期も対照群と MBA 各投与群との間で有意差は認められなかった。

## 3) 形態観察所見 (Table 20)

生存産児の形態観察では、1000 mg/kg 投与群の 1 腹（母動物番号：FB04005）の雄の 1 例にチアノーゼが観察されたが、翌日には回復し、チアノーゼを認める例はなかった。その他の投与群の生存産児には形態異常は認められなかった。また、死亡児の剖検では、いずれの投与群においても形態異常は認められなかった。哺育 4 日の剖検では、1000 mg/kg 投与群の 1 例（母動物番号：FB04005）の雄の 1 例に、腎盂拡張が観察されたが、その他の動物に異常は認められなかった。

## 【 考 察 】

### 1. 一般毒性学的影響

雌雄ともに1000 mg/kg 投与群において、少数例に投与後一過性の流涎が観察された。同様の変化は反復経口投与毒性試験<sup>2)</sup>においても観察されていることから MBA 投与による影響であると考えられる。雄では、流涎の他に一般状態の異常は認められず、体重増加および摂餌量にも MBA 投与の影響は認められなかった。また、病理学検査においても MBA の一般毒性学的影響を示唆する変化はいずれの投与群においても認められなかった。しかし、1000 mg/kg 投与群において精巣上体重量が有意に低下したことから、MBA の雄動物に対する一般毒性学的無作用量は300 mg/kg であると考えられる。

雌では、300 mg/kg 以上の投与群において体重増加の抑制が認められた。しかし、その時期は妊娠 14～20 日であり、分娩日すなわち哺育 0 日における体重はむしろ高値を示していた。ラットにおいて妊娠 14～20 日の時期は胎児の発育期に当たり、この時期における母動物の体重増加は、胎児の数および発育に負うところが大きい。300 mg/kg 以上の投与群では、着床率および産児数が低下していたことから、この時期にみられた体重増加抑制は、母動物に対する MBA の一般毒性学的な影響ではなく、生存胎児数の減少による二次的変化であると考えられる。1000 mg/kg 投与群における哺育 0～4 日の体重増加抑制も、産児数が少なかったために、分娩による体重減少が少なくなり、そのために哺育期間中の回復幅が小さくなったためであると考えられる。

雌における摂餌量については、1000 mg/kg 投与群において投与 1～2 日および妊娠 14～15 日の値が軽度増加し、哺育 0～4 日の値が減少した。反復経口投与毒性試験<sup>2)</sup>においても雌において摂餌量の増加が認められていたことから、投与 1～2 日および妊娠 14～15 日における摂餌量の増加は MBA 投与による影響であると考えられる。一方、哺育期間中における摂餌量の減少は、MBA 投与による直接作用よりもむしろ、哺育児数が少なかったため、泌乳に必要とされる栄養要求量が低かったことによる生理的変化であると考えられる。剖検では、300 mg/kg 投与群

において脾臓および腸間膜リンパ節の腫大が認められ、病理組織学検査において壊死巣の散在ならびに好中球およびマクロファージの浸潤が観察された。これらの変化は 1 例にのみ認められたものであり、1000 mg/kg 投与群に関連した変化が認められなかったことから、MBA 投与の影響ではないと考えられる。これらのことから、雌における MBA の一般毒性学的無作用量は、流涎および体重増加の認められなかった 300 mg/kg であると考えられる。

## 2. 生殖発生毒性

雄では、病理組織学検査において 1000 mg/kg 投与群の全例の精巣上体尾部に精子の少ない管腔が認められ、細胞残屑の増加する例もあった。精巣上体管は、精巣で形成された精子が精巣網液とともに通過する管腔組織で、通過の過程で精子は運動性を増しながら成熟するとともに、精巣網液が再吸収されることにより、精子の密度が高くなる。従って、精巣上体における精子の最終到達点である尾部において精子の少ない管腔が認められたことは、精巣における精子形成の障害あるいは精巣上体における精子の生存あるいは成熟の障害があったものと推測され、1000 mg/kg の MBA は雄に対して生殖毒性を示す用量であると考えられる。精巣重量に MBA 投与の影響は認められず、病理組織学検査においても MBA 投与に起因した異常は観察されなかったことから、精子形成が障害を受けた可能性は乏しい。

本試験と同じ用量の MBA を、本試験に用いたのと同系統のラットに 28 日間反復投与しても、精巣上体に重量変化や病理学的変化は認められていない<sup>2)</sup>。本試験と反復投与毒性試験<sup>2)</sup>との間では、投与期間および投与開始時週齢が異なる。本試験において認められた変化が、投与期間の相違によって生じたものか、投与開始時における性成熟の程度の違いによって生じたものであるのかは、本試験結果からは明らかにならなかった。

MBA 投与を受けた雄の生殖器に認められたその他の変化として、精細管の萎縮 (100 mg/kg 投与群)、精巣上体尾部の精子肉芽腫 (300 mg/kg 投与群) ならびに精細管の多核巨細胞 (1000 mg/kg 投与群) があるが、いずれも 1 例のみの変化であるか、対照群にも同程度に認められた変化であることから、MBA 投与による変化ではないと考えられる。

雌については、性周期に投与の影響は認められなかった。また、黄体数にも投与の影響は認められなかったことから、1000 mg/kg までの MBA は排卵に影響を及ぼさないものと考えられる。

交尾能力については、300 mg/kg 投与群の 1 組を除いて全例が交尾し、交尾率、交尾までの同居期間ならびに同居期間中に雌が回帰した発情の回数にも投与の影響は認められなかったことから、1000 mg/kg までの MBA は影響を及ぼさないものと考えられる。交尾の認められなかった 300 mg/kg 投与群の 1 組については、交配期間中に雌が性周期の回帰を停止したことにより交尾しなかったものと考えられる。本例の剖検では、子宮管腔が拡張して内部に白濁液が貯留しているのが認められ、病理組織学検査では子宮内膜の上皮あるいは間質に好中球の浸潤が認められたことから、子宮蓄膿であったと判断された。子宮蓄膿は、300 mg/kg 投与群において不妊であった 1 例にも認められているが、1000 mg/kg 投与群には、妊・不妊にかかわらず認められていないことから、自然発生によるものと考えられる。

受胎能力については、MBA 投与群における受胎率が対照群と比較して有意に低下した。対照群および 100 mg/kg 投与群では交尾した全例が受胎した一方で、1000 mg/kg 投与群では受胎率が約 70%に低下したことから、1000 mg/kg の MBA は受胎に影響を及ぼすものと考えられる。300 mg/kg 投与群においても不妊が 1 例に認められたが、本例は、前述のように子宮蓄膿であったことから、MBA 投与による不妊である可能性は乏しい。

MBA の受胎に及ぼす影響が、雄に認められた精巣上体の病理学的変化に起因するものであるか、受精から着床までの間における胚死亡の増加によるものであるのかは明らかではない。しかし、精巣上体に異常の認められなかった 300 mg/kg 投与群においても着床率が有意に低下したこと、1000 mg/kg 投与群では交尾確認時に採取した膣スメアに精子が確認された例の中にも不妊が認められたことから、受胎率の低下は胚の着床前死亡による可能性が高い。また、MBA に類似した構造を有する *m*-nitrobenzoic acid (CAS No.: 121-92-6) の CD-1 マウスを用いた混餌投与による連続交配試験<sup>10)</sup>においても同腹生児数の低下が報告されている。同報告<sup>10)</sup>では、雌の生殖が雄のそれに比して *m*-nitrobenzoic acid に対して高い感受性を有していると結論されているが、

本試験では認められなかった性周期の異常あるいは妊娠期間の延長も認められている。また、優性致死作用など雄に対する影響によっても、着床率が低下することから、本試験において認められた受胎率および着床率の低下が、雌雄いずれに対する MBA の影響によって生じた変化であるのかは、さらに検討を要するものと考えられる。

300 mg/kg 以上の投与群では産児数が減少した。300 mg/kg 投与群の各動物における分娩率(75.0~100%)は、対照群および 100 mg/kg 投与群の各動物における分娩率の範囲内(71.4~100%)に入っていたことから、着床率の低下に起因した変化であると推測される。1000 mg/kg 投与群については、対照群との間に有意差は認められなかったが、9 例中 2 例がこれらの群における分娩率の範囲を下回っていたことから、着床後における胚死亡の軽度な増加が疑われた。

分娩に対して MBA 投与の影響は認められなかった。哺育については、1000 mg/kg 投与群において 1 腹の全出生児が哺育 2 日に死亡した。本例は、産児数が 2 と著しく少なかった例であり、分娩状態および哺育状態に異常は認められなかった。また、本例以外に新生児生存率の低い例は認められなかったことから、偶発的变化であると考えられ、MBA 投与は哺育に影響を及ぼさないと考えられる。

雌の病理組織学検査では、300 mg/kg 投与群において子宮蓄膿が認められた既述の例に、子宮内膜間質の浮腫、腔上皮の好中球浸潤が認められたが、いずれも子宮蓄膿に随伴した変化であると考えられる。また、300 mg/kg 投与群における腔上皮粘膜の分泌期像および 1000 mg/kg 投与群の卵巣における顕著な閉鎖卵胞はいずれも 1 例にのみ認められた変化であることから、MBA 投与による影響である可能性は乏しいと考えられる。

出生児の生存能については、1000 mg/kg 投与群において出產生児数および哺育 4 日の生児数の減少が認められたが、出生率および新生児生存率には投与の影響が認められなかったことから、産児数の減少に起因した変化であると考えられる。性比および発育についても MBA 投与の影響は認められなかった。形態異常については、1000 mg/kg 投与群の生存産児の観察において 1 例の雄にチアノーゼが認められた。また、哺育 4 日の剖検では、チアノーゼが認められたのと同じ腹の雄の 1 例に腎盂拡張が観察された。これらの変化は 1 腹のみに認められたものであり、

哺育 1 日以降の一般状態に異常も観察されなかった。また、腎盂の拡張は本試験に使用した系統のラットではしばしば認められる変化であることから、MBA 投与による影響である可能性は乏しい。従って、1000 mg/kg までの MBA は出生児の形態に影響を及ぼさないものと考えられる。

### 3. 無作用量

以上の試験成績から、本試験条件下では、MBA の無作用量は、一般毒性に関しては、雌雄ともに 1000 mg/kg 投与群において流産が認められ、雄では精巣上体重量が低下し、雌では摂餌量の増加が認められたことから雌雄いずれに対しても 300 mg/kg/day であると判断された。生殖発生毒性に関しては、300 mg/kg 以上の投与群において着床率の低下が認められたが、それが雌雄いずれに対する影響であるか特定できなかったため、雌雄いずれに対しても 100 mg/kg/day であると判断された。出生児に関しては影響が認められなかったことから 1000 mg/kg/day であると判断された。



【 文 献 】

- 1) 代田 眞理子：「4-メチル安息香酸のラットを用いる急性経口投与毒性試験」報告書  
(未公刊)
- 2) 関 剛幸：「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」報告書  
(未公刊)
- 3) 関 剛幸：「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予備試験」  
報告書 (未公刊)
- 4) 吉村 功：毒性・薬効データの統計解析 (吉村 功編)、サイエンティスト社、東京  
(1977).
- 5) 丹後俊郎：医学への統計学 (古川俊之 監修)、朝倉書店、東京 (1985).
- 6) 石居 進：生物統計学入門、培風館、東京 (1992).
- 7) 佐久間昭：薬効評価—計画と解析、東京大学出版会、東京 (1977).
- 8) Dunnett, C. W.: New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*,  
20: 482-491 (1964).
- 9) Kruskal, W. H., Wallis, W. A.: Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J.*  
*Amer. Statist. Assoc.*, 47: 583-621 (1952).
- 10) m-Nitrobenzoic acid: in "Reproductive Toxicology", *Environ. Health Perspect.*, 105:  
Supple., pp.325-326 (1997).

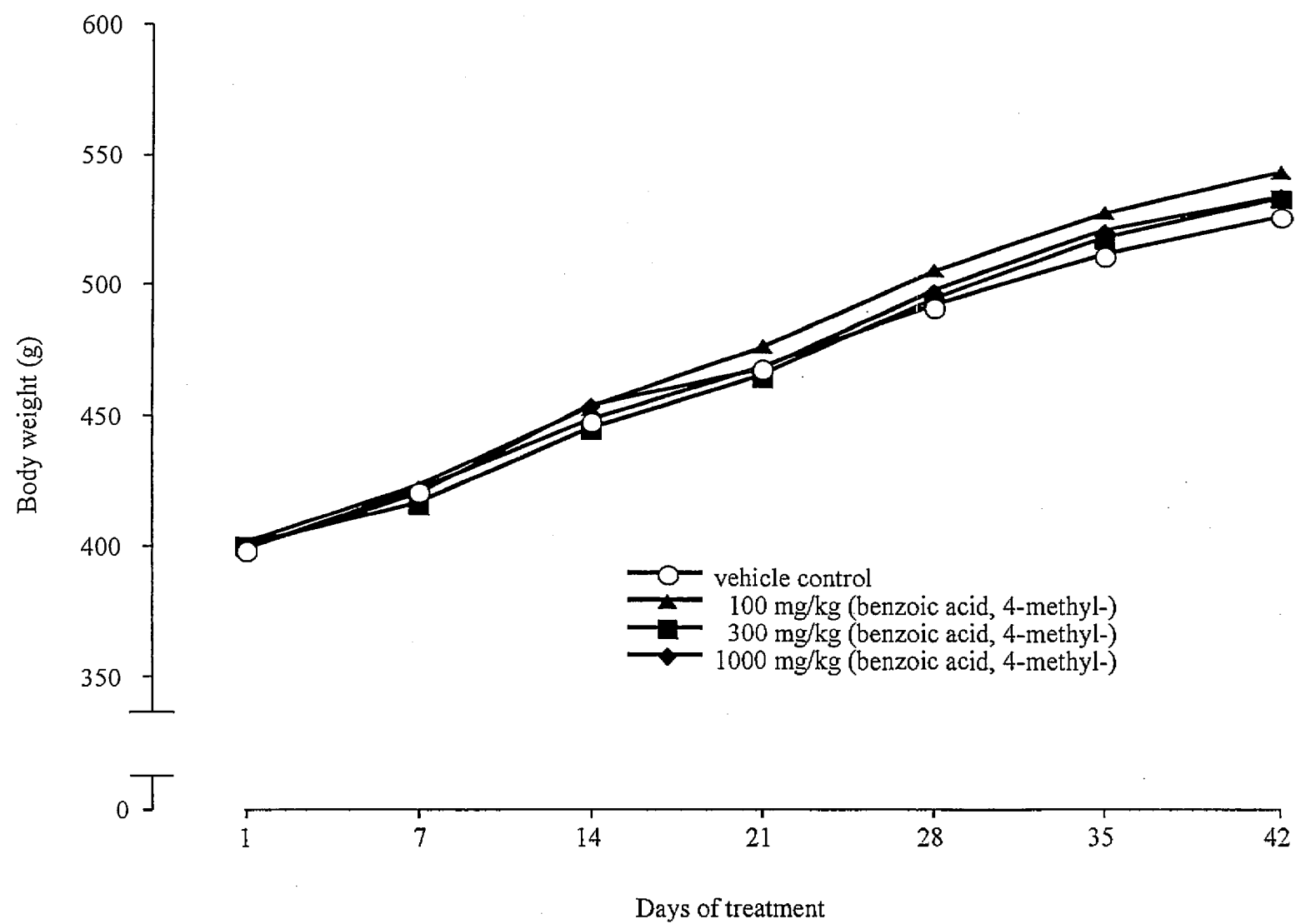


Fig. 1 Body weight changes of males

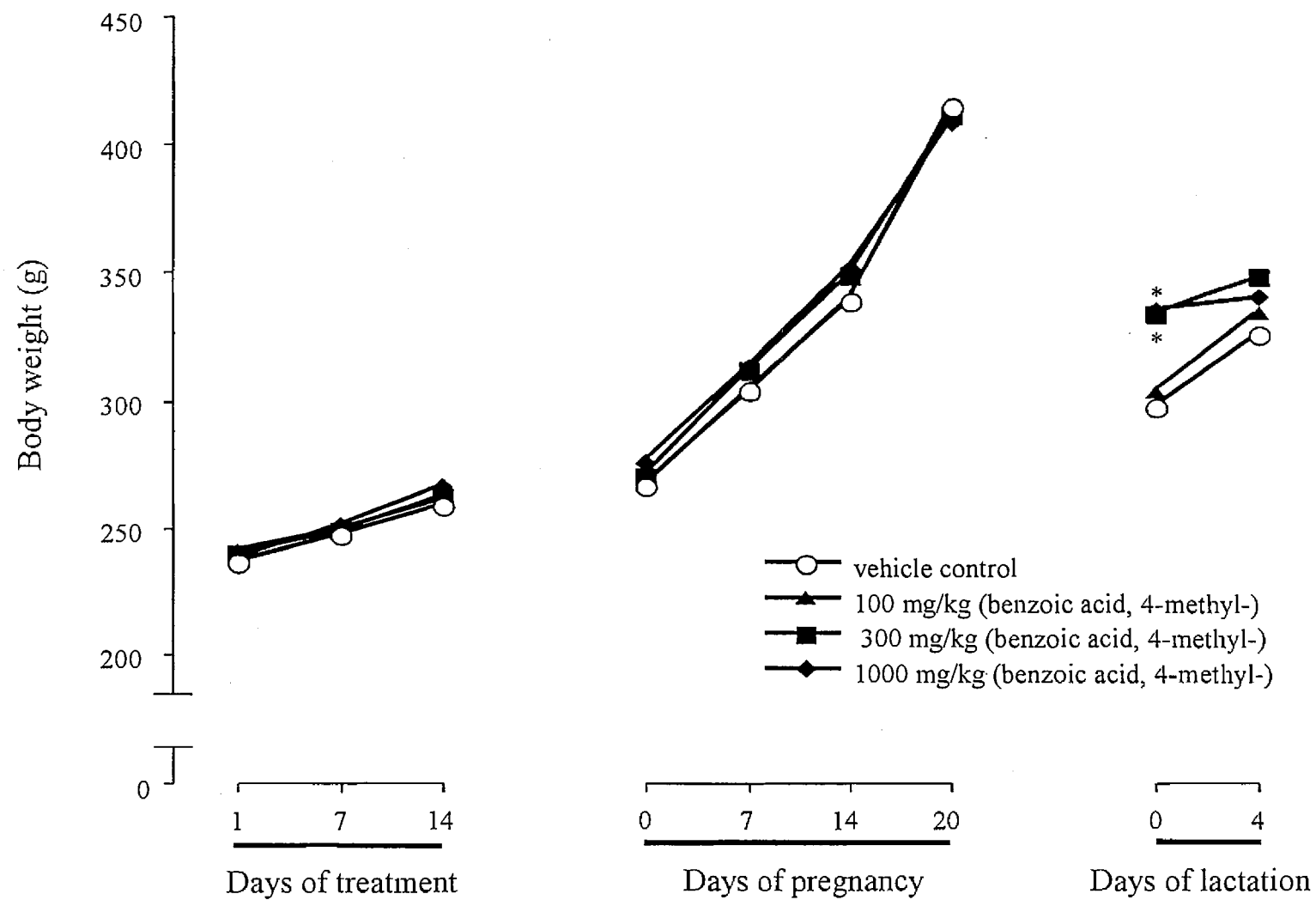


Fig. 2 Body weight changes of females

\*, significant difference from control,  $p < 0.05$

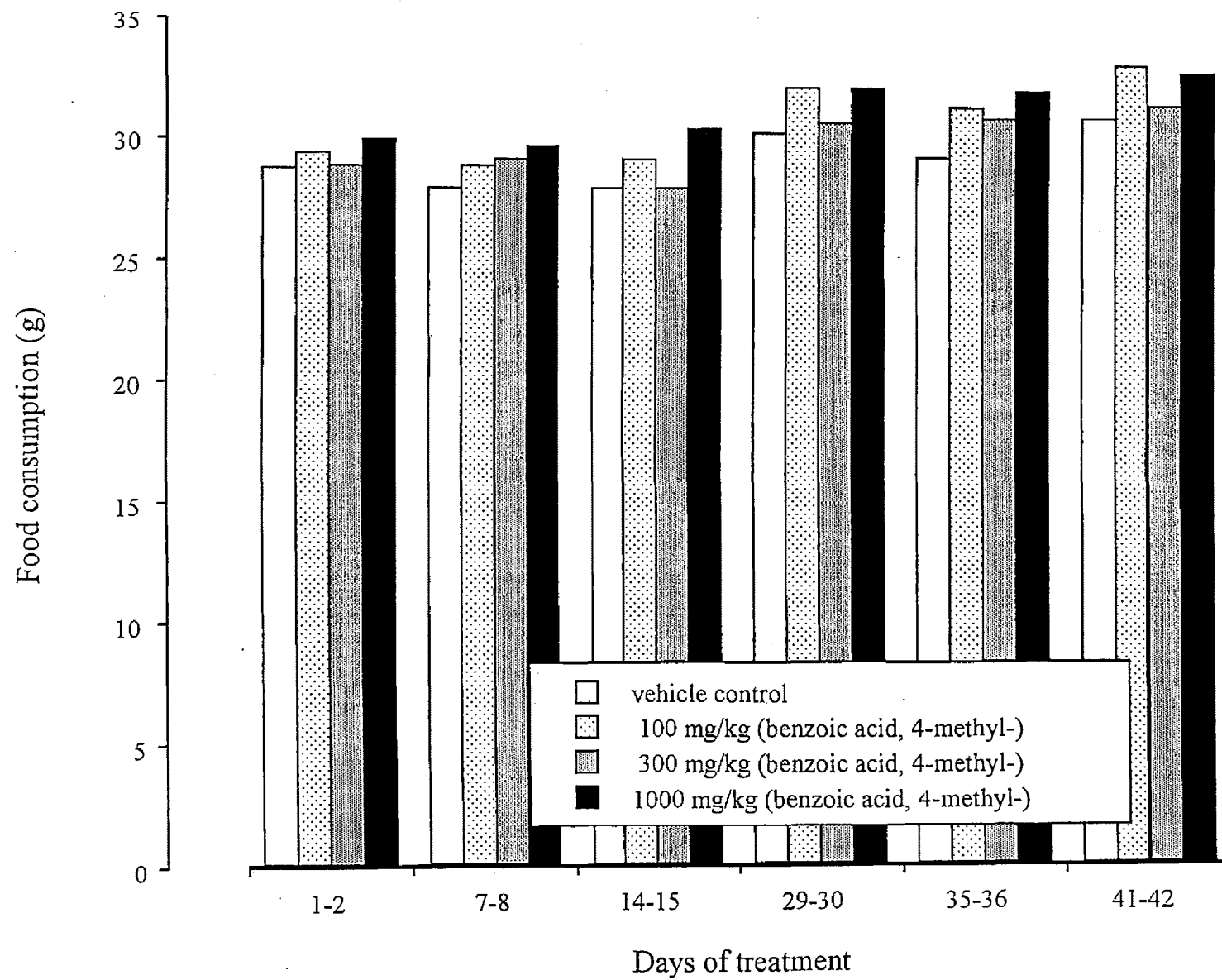


Fig. 3 Food consumption of males

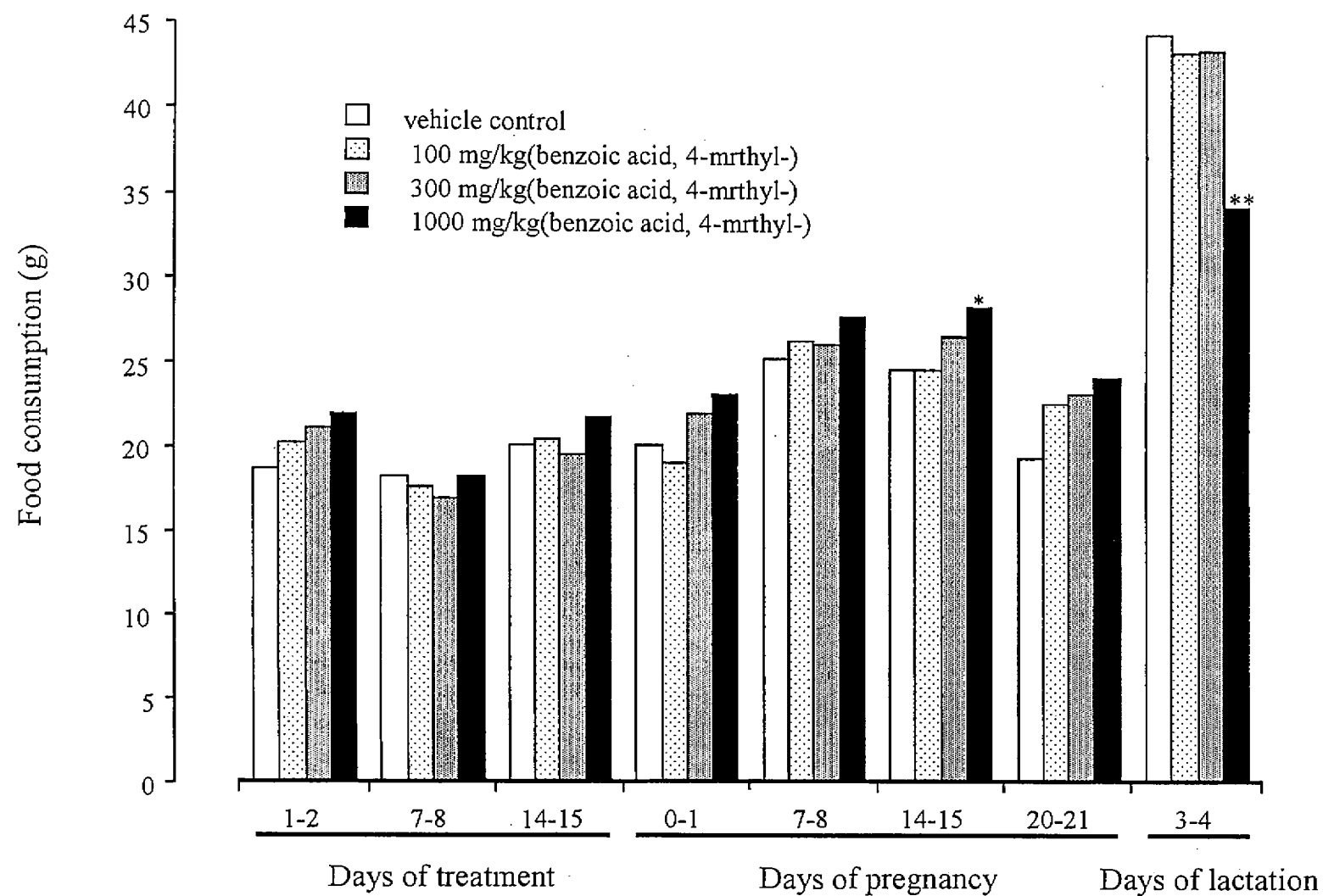


Fig. 4 Food consumption of females

\*, significant difference from control,  $p < 0.05$   
 \*\*, significant difference from control,  $p < 0.01$

Table 1

Preliminary reproduction toxicity screening test of benzoic acid, 4-methyl- by oral administration in rats

Summary of clinical signs in males

| Clinical signs | Dose<br>(mg/kg) | Initial number<br>of<br>animals | Number of animals with clinical signs |        |         |         |         |         | Total |
|----------------|-----------------|---------------------------------|---------------------------------------|--------|---------|---------|---------|---------|-------|
|                |                 |                                 | Days of treatment                     |        |         |         |         |         |       |
|                |                 |                                 | 1 - 7                                 | 8 - 14 | 15 - 21 | 22 - 28 | 29 - 35 | 36 - 43 |       |
| Salivation     | 0 <sup>a)</sup> | 13                              | 0                                     | 0      | 0       | 0       | 0       | 0       | 0     |
|                | 100             | 13                              | 0                                     | 0      | 0       | 0       | 0       | 0       | 0     |
|                | 300             | 13                              | 0                                     | 0      | 0       | 0       | 0       | 0       | 0     |
|                | 1000            | 13                              | 0                                     | 0      | 0       | 0       | 2       | 1       | 2     |

a), vehicle control (0.5% CMC Na solution, 5mL/kg)

Table 2

Preliminary reproduction toxicity screening test of benzoic acid, 4-methyl- by oral administration in rats

Summary of clinical signs in females

| Clinical signs | Dose<br>(mg/kg) | Initial number<br>of<br>animals | Number of animals with clinical signs<br>Days of treatment |        |         |         |         |         |         |      | Total |
|----------------|-----------------|---------------------------------|------------------------------------------------------------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|------|-------|
|                |                 |                                 | 1 - 7                                                      | 8 - 14 | 15 - 21 | 22 - 28 | 29 - 35 | 36 - 42 | 43 - 49 | 50 - |       |
| Loss of fur    | 0 <sup>a)</sup> | 13                              | 0                                                          | 0      | 0       | 0       | 1       | 1       | 0       | 0    | 1     |
|                | 100             | 13                              | 0                                                          | 0      | 0       | 0       | 0       | 0       | 0       | -    | 0     |
|                | 300             | 13                              | 0                                                          | 0      | 0       | 0       | 0       | 0       | 0       | 0    | 0     |
|                | 1000            | 13                              | 0                                                          | 0      | 0       | 0       | 0       | 1       | 0       | 0    | 1     |
| Salivation     | 0 <sup>a)</sup> | 13                              | 0                                                          | 0      | 0       | 0       | 0       | 0       | 0       | 0    | 0     |
|                | 100             | 13                              | 0                                                          | 0      | 0       | 0       | 0       | 0       | 0       | -    | 0     |
|                | 300             | 13                              | 0                                                          | 0      | 0       | 0       | 0       | 0       | 0       | 0    | 0     |
|                | 1000            | 13                              | 0                                                          | 0      | 0       | 2       | 4       | 0       | 0       | 0    | 5     |

a), vehicle control (0.5% CMC Na solution, 5mL/kg)

Table 3

Preliminary reproduction toxicity screening test of benzoic acid, 4-methyl- by oral administration in rats

Body weight of males (g); mean  $\pm$  S.D. (N)

| Compound          |         | Benzoic acid, 4-methyl- |                       |                       |                       |  |  |  |  |
|-------------------|---------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--|--|--|--|
| Groups            | (mg/kg) | 0 <sup>a)</sup>         | 100                   | 300                   | 1000                  |  |  |  |  |
| Days of treatment |         |                         |                       |                       |                       |  |  |  |  |
| 1                 |         | 398.4 $\pm$ 16.6 (13)   | 400.9 $\pm$ 16.8 (13) | 400.0 $\pm$ 16.7 (13) | 398.8 $\pm$ 18.1 (13) |  |  |  |  |
| 7                 |         | 421.0 $\pm$ 21.1 (13)   | 422.5 $\pm$ 21.4 (13) | 416.1 $\pm$ 19.0 (13) | 419.4 $\pm$ 18.9 (13) |  |  |  |  |
| 14                |         | 448.7 $\pm$ 27.4 (13)   | 453.6 $\pm$ 28.5 (13) | 445.1 $\pm$ 19.6 (13) | 453.9 $\pm$ 25.5 (13) |  |  |  |  |
| 21                |         | 468.6 $\pm$ 27.9 (13)   | 476.1 $\pm$ 33.0 (13) | 465.5 $\pm$ 21.1 (13) | 468.1 $\pm$ 26.2 (13) |  |  |  |  |
| 28                |         | 492.6 $\pm$ 32.1 (13)   | 505.8 $\pm$ 35.9 (13) | 495.4 $\pm$ 22.8 (13) | 498.7 $\pm$ 31.8 (13) |  |  |  |  |
| 35                |         | 513.3 $\pm$ 36.9 (13)   | 528.7 $\pm$ 42.7 (13) | 519.1 $\pm$ 24.8 (13) | 522.5 $\pm$ 32.1 (13) |  |  |  |  |
| 42                |         | 529.2 $\pm$ 39.2 (13)   | 546.9 $\pm$ 42.4 (13) | 536.2 $\pm$ 26.6 (13) | 537.3 $\pm$ 29.9 (13) |  |  |  |  |

a), vehicle control (0.5% CMC Na solution, 5 mL/kg)



Table 4

Preliminary reproduction toxicity screening test of benzoic acid, 4-methyl- by oral administration in rats

Body weight gain of males (g); mean  $\pm$  S.D. (N)

| Compound          |         | Benzoic acid, 4-methyl- |      |                |      |                |      |                 |      |
|-------------------|---------|-------------------------|------|----------------|------|----------------|------|-----------------|------|
| Groups            | (mg/kg) | 0 <sup>a)</sup>         |      | 100            |      | 300            |      | 1000            |      |
| Days of treatment |         |                         |      |                |      |                |      |                 |      |
| 1 - 7             |         | 22.6 $\pm$ 8.0          | (13) | 21.6 $\pm$ 7.9 | (13) | 16.2 $\pm$ 4.8 | (13) | 20.6 $\pm$ 4.8  | (13) |
| 7 - 14            |         | 27.7 $\pm$ 8.9          | (13) | 31.1 $\pm$ 8.0 | (13) | 29.0 $\pm$ 4.2 | (13) | 34.5 $\pm$ 10.1 | (13) |
| 14 - 21           |         | 19.9 $\pm$ 4.8          | (13) | 22.5 $\pm$ 6.5 | (13) | 20.4 $\pm$ 8.9 | (13) | 14.2 $\pm$ 7.8  | (13) |
| 21 - 28           |         | 23.9 $\pm$ 8.2          | (13) | 29.8 $\pm$ 4.2 | (13) | 29.8 $\pm$ 7.1 | (13) | 30.6 $\pm$ 10.3 | (13) |
| 28 - 35           |         | 20.8 $\pm$ 6.6          | (13) | 22.9 $\pm$ 8.1 | (13) | 23.7 $\pm$ 5.1 | (13) | 23.9 $\pm$ 6.5  | (13) |
| 35 - 42           |         | 15.9 $\pm$ 6.3          | (13) | 18.2 $\pm$ 6.7 | (13) | 17.1 $\pm$ 2.8 | (13) | 14.8 $\pm$ 6.4  | (13) |

a), vehicle control (0.5% CMC Na solution, 5 mL/kg)

Table 5

Preliminary reproduction toxicity screening test of benzoic acid, 4-methyl- by oral administration in rats

Cumulative body weight gain of males (g); mean  $\pm$  S.D. (N)

| Compound          |         | Benzoic acid, 4-methyl- |                       |                       |                       |  |  |  |  |
|-------------------|---------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--|--|--|--|
| Groups            | (mg/kg) | 0 <sup>a)</sup>         | 100                   | 300                   | 1000                  |  |  |  |  |
| Days of treatment |         |                         |                       |                       |                       |  |  |  |  |
| 1 - 7             |         | 22.6 $\pm$ 8.0 (13)     | 21.6 $\pm$ 7.9 (13)   | 16.2 $\pm$ 4.8 (13)   | 20.6 $\pm$ 4.8 (13)   |  |  |  |  |
| 1 - 14            |         | 50.3 $\pm$ 15.5 (13)    | 52.7 $\pm$ 14.3 (13)  | 45.2 $\pm$ 7.6 (13)   | 55.1 $\pm$ 12.1 (13)  |  |  |  |  |
| 1 - 21            |         | 70.2 $\pm$ 16.0 (13)    | 75.2 $\pm$ 19.2 (13)  | 65.6 $\pm$ 12.0 (13)  | 69.3 $\pm$ 14.2 (13)  |  |  |  |  |
| 1 - 28            |         | 94.2 $\pm$ 21.5 (13)    | 105.0 $\pm$ 22.4 (13) | 95.4 $\pm$ 16.1 (13)  | 99.9 $\pm$ 21.4 (13)  |  |  |  |  |
| 1 - 35            |         | 114.9 $\pm$ 26.1 (13)   | 127.9 $\pm$ 29.4 (13) | 119.1 $\pm$ 17.4 (13) | 123.7 $\pm$ 21.4 (13) |  |  |  |  |
| 1 - 42            |         | 130.8 $\pm$ 28.9 (13)   | 146.0 $\pm$ 29.7 (13) | 136.3 $\pm$ 18.9 (13) | 138.5 $\pm$ 18.2 (13) |  |  |  |  |

a), vehicle control (0.5% CMC Na solution, 5 mL/kg)

Table 6

Preliminary reproduction toxicity screening test of benzoic acid, 4-methyl- by oral administration in rats

Body weight of females (g); mean  $\pm$  S.D. (N)

| Compound          | Benzoic acid, 4-methyl- |        |      |       |        |      |       |         |      |       |         |      |
|-------------------|-------------------------|--------|------|-------|--------|------|-------|---------|------|-------|---------|------|
| Groups (mg/kg)    | 0 <sup>a)</sup>         |        | 100  |       | 300    |      | 1000  |         |      |       |         |      |
| Days of treatment |                         |        |      |       |        |      |       |         |      |       |         |      |
| 1                 | 236.5                   | ± 14.1 | (13) | 241.0 | ± 13.1 | (13) | 239.7 | ± 12.6  | (13) | 237.8 | ± 13.0  | (13) |
| 7                 | 247.8                   | ± 13.8 | (13) | 250.1 | ± 17.6 | (13) | 248.7 | ± 17.5  | (13) | 251.3 | ± 18.2  | (13) |
| 14                | 258.9                   | ± 16.3 | (13) | 261.5 | ± 17.5 | (13) | 263.3 | ± 17.1  | (13) | 267.0 | ± 21.0  | (13) |
| Days of pregnancy |                         |        |      |       |        |      |       |         |      |       |         |      |
| 0                 | 267.3                   | ± 21.0 | (13) | 267.4 | ± 17.3 | (13) | 270.5 | ± 17.5  | (11) | 276.7 | ± 17.7  | ( 9) |
| 7                 | 304.1                   | ± 26.1 | (13) | 303.5 | ± 19.9 | (13) | 312.1 | ± 22.9  | (11) | 313.7 | ± 24.4  | ( 9) |
| 14                | 339.5                   | ± 29.8 | (13) | 340.5 | ± 24.4 | (13) | 349.7 | ± 24.6  | (11) | 353.0 | ± 21.5  | ( 9) |
| 20                | 416.8                   | ± 34.8 | (13) | 413.3 | ± 32.4 | (13) | 413.2 | ± 33.0  | (11) | 410.1 | ± 27.5  | ( 9) |
| Days of lactation |                         |        |      |       |        |      |       |         |      |       |         |      |
| 0                 | 298.3                   | ± 30.2 | (13) | 304.7 | ± 34.2 | (13) | 334.4 | ± 28.5* | (11) | 336.4 | ± 20.1* | ( 9) |
| 4                 | 327.0                   | ± 31.2 | (13) | 335.8 | ± 25.8 | (13) | 349.6 | ± 24.7  | (11) | 341.6 | ± 20.8  | ( 9) |

a), vehicle control (0.5% CMC Na solution, 5 mL/kg)

\*, significant difference from control,  $p < 0.05$

Table 7

Preliminary reproduction toxicity screening test of benzoic acid, 4-methyl- by oral administration in rats

Body weight gain of females (g); mean  $\pm$  S.D. (N)

| Compound          | Benzoic acid, 4-methyl- |        |      |      |        |      |      |         |      |      |               |
|-------------------|-------------------------|--------|------|------|--------|------|------|---------|------|------|---------------|
| Groups (mg/kg)    | 0 <sup>a)</sup>         |        | 100  |      | 300    |      | 1000 |         |      |      |               |
| Days of treatment |                         |        |      |      |        |      |      |         |      |      |               |
| 1 - 7             | 11.3                    | ± 3.6  | (13) | 9.1  | ± 6.5  | (13) | 9.1  | ± 9.7   | (13) | 13.4 | ± 9.7 (13)    |
| 7 - 14            | 11.1                    | ± 6.4  | (13) | 11.5 | ± 3.2  | (13) | 14.5 | ± 6.3   | (13) | 15.7 | ± 4.9 (13)    |
| Days of pregnancy |                         |        |      |      |        |      |      |         |      |      |               |
| 0 - 7             | 36.8                    | ± 10.1 | (13) | 36.1 | ± 6.3  | (13) | 41.6 | ± 8.5   | (11) | 37.1 | ± 9.1 ( 9)    |
| 7 - 14            | 35.4                    | ± 5.5  | (13) | 37.0 | ± 6.9  | (13) | 37.6 | ± 5.6   | (11) | 39.3 | ± 5.9 ( 9)    |
| 14 - 20           | 77.3                    | ± 8.5  | (13) | 72.8 | ± 9.5  | (13) | 63.5 | ± 12.3* | (11) | 57.1 | ± 17.2** ( 9) |
| Days of lactation |                         |        |      |      |        |      |      |         |      |      |               |
| 0 - 4             | 28.7                    | ± 14.9 | (13) | 31.2 | ± 16.3 | (13) | 15.2 | ± 19.8  | (11) | 5.2  | ± 10.5** ( 9) |

a), vehicle control (0.5% CMC Na solution, 5 mL/kg)

\*\*, significant difference from control,  $p < 0.01$ \*, significant difference from control,  $p < 0.05$

Table 8

Preliminary reproduction toxicity screening test of benzoic acid, 4-methyl- by oral administration in rats

Cumulative body weight gain of females (g); mean  $\pm$  S.D. (N)

| Compound          | Benzoic acid, 4-methyl- |                 |       |                 |       |                 |       |                   |
|-------------------|-------------------------|-----------------|-------|-----------------|-------|-----------------|-------|-------------------|
|                   | 0 <sup>a)</sup>         |                 | 100   |                 | 300   |                 | 1000  |                   |
| Groups (mg/kg)    |                         |                 |       |                 |       |                 |       |                   |
| Days of treatment |                         |                 |       |                 |       |                 |       |                   |
| 1 - 7             | 11.3                    | $\pm$ 3.6 (13)  | 9.1   | $\pm$ 6.5 (13)  | 9.1   | $\pm$ 9.7 (13)  | 13.4  | $\pm$ 9.7 (13)    |
| 1 - 14            | 22.4                    | $\pm$ 5.8 (13)  | 20.5  | $\pm$ 6.2 (13)  | 23.6  | $\pm$ 10.7 (13) | 29.2  | $\pm$ 12.5 (13)   |
| Days of pregnancy |                         |                 |       |                 |       |                 |       |                   |
| 0 - 7             | 36.8                    | $\pm$ 10.1 (13) | 36.1  | $\pm$ 6.3 (13)  | 41.6  | $\pm$ 8.5 (11)  | 37.1  | $\pm$ 9.1 ( 9)    |
| 0 - 14            | 72.2                    | $\pm$ 13.6 (13) | 73.2  | $\pm$ 12.3 (13) | 79.2  | $\pm$ 12.0 (11) | 76.4  | $\pm$ 6.7 ( 9)    |
| 0 - 20            | 149.5                   | $\pm$ 19.8 (13) | 146.0 | $\pm$ 19.7 (13) | 142.6 | $\pm$ 22.1 (11) | 133.4 | $\pm$ 18.4 ( 9)   |
| Days of lactation |                         |                 |       |                 |       |                 |       |                   |
| 0 - 4             | 28.7                    | $\pm$ 14.9 (13) | 31.2  | $\pm$ 16.3 (13) | 15.2  | $\pm$ 19.8 (11) | 5.2   | $\pm$ 10.5** ( 9) |

a), vehicle control (0.5% CMC Na solution, 5 mL/kg)

\*\*, significant difference from control,  $p < 0.01$

Table 9

Preliminary reproduction toxicity screening test of benzoic acid, 4-methyl- by oral administration in rats

Food consumption of males (g); mean  $\pm$  S.D. (N)

| Compound          | Benzoic acid, 4-methyl- |      |            |      |            |      |            |      |
|-------------------|-------------------------|------|------------|------|------------|------|------------|------|
| Groups (mg/kg)    | 0 <sup>a)</sup>         |      | 100        |      | 300        |      | 1000       |      |
| Days of treatment |                         |      |            |      |            |      |            |      |
| 1 - 2             | 28.7 ± 2.6              | (13) | 29.4 ± 3.0 | (13) | 28.8 ± 3.0 | (13) | 29.9 ± 2.9 | (13) |
| 7 - 8             | 27.9 ± 3.1              | (13) | 28.8 ± 3.0 | (13) | 29.1 ± 2.8 | (13) | 29.6 ± 2.5 | (13) |
| 14 - 15           | 27.9 ± 2.7              | (13) | 29.1 ± 3.1 | (13) | 27.9 ± 2.0 | (13) | 30.4 ± 3.4 | (13) |
| 29 - 30           | 30.2 ± 2.8              | (13) | 32.1 ± 4.0 | (13) | 30.6 ± 4.2 | (13) | 32.1 ± 3.0 | (13) |
| 35 - 36           | 29.2 ± 2.9              | (13) | 31.3 ± 2.9 | (13) | 30.8 ± 1.8 | (13) | 32.0 ± 2.8 | (13) |
| 41 - 42           | 30.8 ± 3.0              | (13) | 33.0 ± 3.9 | (13) | 31.4 ± 2.7 | (13) | 32.7 ± 2.4 | (13) |

a), vehicle control (0.5% CMC Na solution, 5 mL/kg)

Table 10

Preliminary reproduction toxicity screening test of benzoic acid, 4-methyl- by oral administration in rats

Food consumption of females (g); mean  $\pm$  S.D. (N)

| Compound          | Benzoic acid, 4-methyl- |      |                |      |                |      |                  |      |
|-------------------|-------------------------|------|----------------|------|----------------|------|------------------|------|
|                   | 0 <sup>a)</sup>         |      | 100            |      | 300            |      | 1000             |      |
| Groups (mg/kg)    |                         |      |                |      |                |      |                  |      |
| Days of treatment |                         |      |                |      |                |      |                  |      |
| 1 - 2             | 18.7 $\pm$ 3.4          | (13) | 20.2 $\pm$ 2.9 | (13) | 21.2 $\pm$ 2.5 | (13) | 22.0 $\pm$ 2.8*  | (13) |
| 7 - 8             | 18.3 $\pm$ 2.4          | (13) | 17.7 $\pm$ 3.5 | (13) | 17.0 $\pm$ 2.4 | (13) | 18.2 $\pm$ 3.1   | (13) |
| 14 - 15           | 20.1 $\pm$ 3.1          | (13) | 20.5 $\pm$ 2.5 | (13) | 19.5 $\pm$ 3.9 | (13) | 21.8 $\pm$ 4.0   | (13) |
| Days of pregnancy |                         |      |                |      |                |      |                  |      |
| 0 - 1             | 20.1 $\pm$ 3.4          | (13) | 19.1 $\pm$ 2.8 | (13) | 22.0 $\pm$ 3.6 | (11) | 23.2 $\pm$ 2.5   | ( 9) |
| 7 - 8             | 25.3 $\pm$ 3.6          | (13) | 26.3 $\pm$ 2.7 | (13) | 26.1 $\pm$ 2.8 | (11) | 27.7 $\pm$ 1.7   | ( 9) |
| 14 - 15           | 24.5 $\pm$ 3.8          | (13) | 24.6 $\pm$ 2.9 | (13) | 26.5 $\pm$ 3.0 | (11) | 28.3 $\pm$ 1.8*  | ( 9) |
| 20 - 21           | 19.3 $\pm$ 5.2          | (13) | 22.6 $\pm$ 4.8 | (13) | 23.1 $\pm$ 4.1 | (11) | 24.1 $\pm$ 2.4   | ( 9) |
| Days of lactation |                         |      |                |      |                |      |                  |      |
| 3 - 4             | 44.4 $\pm$ 2.7          | (13) | 43.4 $\pm$ 4.9 | (13) | 43.5 $\pm$ 7.7 | (11) | 34.3 $\pm$ 8.2** | ( 9) |

a), vehicle control (0.5% CMC Na solution, 5 mL/kg)

\*, significant difference from control,  $p < 0.05$ \*\*, significant difference from control,  $p < 0.01$

Table 11

Preliminary reproduction toxicity screening test of benzoic acid, 4-methyl- by oral administration in rats

Summary of estrous cycle

| Compound                                      | Benzoic acid, 4-methyl- |   |     |     |   |     |     |   |     |      |   |     |
|-----------------------------------------------|-------------------------|---|-----|-----|---|-----|-----|---|-----|------|---|-----|
| Groups (mg/kg)                                | 0 <sup>a)</sup>         |   |     | 100 |   |     | 300 |   |     | 1000 |   |     |
| Number of females examined                    | 13                      |   |     | 13  |   |     | 13  |   |     | 13   |   |     |
| Pre-treatment period                          |                         |   |     |     |   |     |     |   |     |      |   |     |
| Number of females showing 4-day cycle         | 13                      |   |     | 13  |   |     | 13  |   |     | 13   |   |     |
| Treatment period                              |                         |   |     |     |   |     |     |   |     |      |   |     |
| Number of females showing 4-day cycle         | 12                      |   |     | 12  |   |     | 13  |   |     | 13   |   |     |
| 4- and 5-day cycle                            | 0                       |   |     | 1   |   |     | 0   |   |     | 0    |   |     |
| irregular                                     | 1                       |   |     | 0   |   |     | 0   |   |     | 0    |   |     |
| Mean length of estrous cycle in days          |                         |   |     |     |   |     |     |   |     |      |   |     |
| Mean ± S.D.                                   | 4.0                     | ± | 0.0 | 4.0 | ± | 0.1 | 4.0 | ± | 0.0 | 4.0  | ± | 0.0 |
| Number of vaginal estrus during mating period |                         |   |     |     |   |     |     |   |     |      |   |     |
| Mean ± S.D.                                   | 1.0                     | ± | 0.0 | 1.0 | ± | 0.0 | 1.0 | ± | 0.0 | 1.1  | ± | 0.3 |

a), vehicle control (0.5% CMC Na solution, 5 mL/kg)



Table 12

Preliminary reproduction toxicity screening test of benzoic acid, 4-methyl- by oral administration in rats

Reproductive performance of animals

| Compound                      | Benzoic acid, 4-methyl- |               |               |               | Fisher's exact test<br><i>P</i> value |
|-------------------------------|-------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------------------------------|
|                               | 0 <sup>a)</sup>         | 100           | 300           | 1000          |                                       |
| Groups (mg/kg)                |                         |               |               |               |                                       |
| Number of pairs examined      | 13                      | 13            | 13            | 13            |                                       |
| Number of pairs copulated     | 13                      | 13            | 12            | 13            | 1.00                                  |
| Copulation index              | 100.0                   | 100.0         | 92.3          | 100.0         |                                       |
| Number of pregnant females    | 13                      | 13            | 11            | 9             | 0.02                                  |
| Fertility index               | 100.0                   | 100.0         | 91.7          | 69.2          |                                       |
| Pairing days until copulation |                         |               |               |               |                                       |
| Mean $\pm$ S.D.               | 3.0 $\pm$ 3.4           | 2.4 $\pm$ 1.3 | 2.4 $\pm$ 1.3 | 3.2 $\pm$ 3.3 |                                       |

a), vehicle control (0.5% CMC Na solution, 5 mL/kg)

Copulation index = (number of pairs copulated / number of pairs examined)  $\times$  100, %Fertility index = (number of pregnant females / number of pairs copulated)  $\times$  100, %

Table 13

Preliminary reproduction toxicity screening test of benzoic acid, 4-methyl- by oral administration in rats

Development of pups up to day 4 of lactation; mean  $\pm$  S.D. (N)

| Compound                                      | Benzoic acid, 4-methyl- |   |      |      |       |   |      |      |       |   |         |      |      |   |        |      |
|-----------------------------------------------|-------------------------|---|------|------|-------|---|------|------|-------|---|---------|------|------|---|--------|------|
| Groups (mg/kg)                                | 0 <sup>a)</sup>         |   |      |      | 100   |   |      |      | 300   |   |         |      | 1000 |   |        |      |
| Number of pregnant females                    | 13                      |   |      |      | 13    |   |      |      | 11    |   |         |      | 9    |   |        |      |
| Number of pregnant females with live newborns | 13                      |   |      |      | 13    |   |      |      | 11    |   |         |      | 9    |   |        |      |
| Gestation index                               | 100                     |   |      |      | 100   |   |      |      | 100   |   |         |      | 100  |   |        |      |
| Gestation length in days                      | 22.3                    | ± | 0.5  | (13) | 22.5  | ± | 0.5  | (13) | 22.3  | ± | 0.5     | (11) | 22.8 | ± | 0.4    | ( 9) |
| Number of corpora lutea                       | 16.2                    | ± | 1.3  | (13) | 15.7  | ± | 1.3  | (13) | 16.2  | ± | 1.5     | (11) | 15.9 | ± | 1.3    | ( 9) |
| Number of implantations                       | 16.0                    | ± | 1.3  | (13) | 15.4  | ± | 1.0  | (13) | 14.0  | ± | 2.4     | (11) | 12.1 | ± | 5.3    | ( 9) |
| Implantation index                            | 99.1                    | ± | 2.2  | (13) | 98.2  | ± | 3.5  | (13) | 86.5  | ± | 12.6 ** | (11) | 75.9 | ± | 32.6 * | ( 9) |
| Day 0 of lactation                            |                         |   |      |      |       |   |      |      |       |   |         |      |      |   |        |      |
| Number of newborns                            | 15.2                    | ± | 1.4  | (13) | 14.1  | ± | 1.8  | (13) | 12.5  | ± | 2.1 **  | (11) | 10.2 | ± | 5.1 ** | ( 9) |
| Delivery index                                | 94.7                    | ± | 5.2  | (13) | 91.4  | ± | 8.5  | (13) | 90.1  | ± | 8.4     | (11) | 82.9 | ± | 19.5   | ( 9) |
| Number of live newborns                       | 14.3                    | ± | 1.7  | (13) | 14.1  | ± | 1.8  | (13) | 12.3  | ± | 2.2     | (11) | 10.0 | ± | 5.0 *  | ( 9) |
| Birth index                                   | 89.7                    | ± | 10.4 | (13) | 91.4  | ± | 8.5  | (13) | 88.0  | ± | 9.1     | (11) | 81.5 | ± | 19.8   | ( 9) |
| Live birth index                              | 94.8                    | ± | 10.5 | (13) | 100.0 | ± | 0.0  | (13) | 97.6  | ± | 4.2     | (11) | 98.2 | ± | 3.7    | ( 9) |
| Sex ratio on day 0                            | 54.1                    | ± | 14.3 | (13) | 51.9  | ± | 12.8 | (13) | 46.6  | ± | 13.8    | (11) | 59.8 | ± | 17.7   | ( 9) |
| Day 4 of lactation                            |                         |   |      |      |       |   |      |      |       |   |         |      |      |   |        |      |
| Number of live pups                           | 14.3                    | ± | 1.7  | (13) | 13.9  | ± | 1.8  | (13) | 12.3  | ± | 2.2     | (11) | 9.7  | ± | 5.3 *  | ( 9) |
| Viability index                               | 100.0                   | ± | 0.0  | (13) | 99.0  | ± | 3.7  | (13) | 100.0 | ± | 0.0     | (11) | 88.1 | ± | 33.1   | ( 9) |
| Sex ratio on day 4                            | 54.1                    | ± | 14.3 | (13) | 52.3  | ± | 12.3 | (13) | 46.6  | ± | 13.8    | (11) | 54.4 | ± | 9.5    | ( 8) |

a), vehicle control (0.5% CMC Na solution, 5 mL/kg)

Gestation index = (number of pregnant females with live newborns/number of pregnant females)  $\times$  100, %Implantation index = (number of implantations/number of corpora lutea)  $\times$  100, %Delivery index = (number of newborns/number of implantations)  $\times$  100, %Birth index = (number of live newborns/number of implantations)  $\times$  100, %Live birth index = (number of live newborns/number of newborns)  $\times$  100, %Sex ratio on day 0 = (number of male live newborns/number of live newborns)  $\times$  100, %Viability index = (number of live pups on day 4 of lactation/number of live newborns)  $\times$  100, %Sex ratio on day 4 = (number of male live pups on day 4 of lactation/number of live pups on day 4 of lactation)  $\times$  100, %\*, significant difference from control,  $p < 0.05$ \*\*, significant difference from control,  $p < 0.01$

Table 14

Preliminary reproduction toxicity screening test of benzoic acid, 4-methyl- by oral administration in rats

Summary of macroscopical findings in males

| Compound<br>Group (mg/kg)<br>Grade            | Benzoic acid, 4-methyl- |   |        |   |        |   |        |   |
|-----------------------------------------------|-------------------------|---|--------|---|--------|---|--------|---|
|                                               | 0 <sup>a)</sup>         |   | 100    |   | 300    |   | 1000   |   |
|                                               | -                       | + | -      | + | -      | + | -      | + |
| (Epididymis)                                  | [ 13 ]                  |   | [ 13 ] |   | [ 13 ] |   | [ 13 ] |   |
| Nodule, yellowish white,<br>cauda, right side | 13                      | 0 | 13     | 0 | 12     | 1 | 13     | 0 |
| Rarefaction, cauda, bilateral                 | 13                      | 0 | 13     | 0 | 13     | 0 | 12     | 1 |

-, negative; +, positive.

[ ], number of animals examined.

a), vehicle control (0.5% CMC Na solution, 5mL/kg)

Table 15

Preliminary reproduction toxicity screening test of benzoic acid, 4-methyl- by oral administration in rats

Summary of macroscopical findings in females

| Compound<br>Group (mg/kg)<br>Grade | Benzoic acid, 4-methyl |   |        |   |        |   |        |   |
|------------------------------------|------------------------|---|--------|---|--------|---|--------|---|
|                                    | 0 <sup>a)</sup>        |   | 100    |   | 300    |   | 1000   |   |
|                                    | -                      | + | -      | + | -      | + | -      | + |
| (Ovary)                            | [ 13 ]                 |   | [ 13 ] |   | [ 13 ] |   | [ 13 ] |   |
| Small                              | 13                     | 0 | 13     | 0 | 12     | 1 | 13     | 0 |
| (Uterus)                           | [ 13 ]                 |   | [ 13 ] |   | [ 13 ] |   | [ 13 ] |   |
| Dilatation, lumen                  | 13                     | 0 | 13     | 0 | 11     | 2 | 13     | 0 |
| Retention, fluid, whitish cloudy   | 13                     | 0 | 13     | 0 | 11     | 2 | 13     | 0 |
| (Spleen)                           | [ 13 ]                 |   | [ 13 ] |   | [ 13 ] |   | [ 13 ] |   |
| Enlargement                        | 13                     | 0 | 13     | 0 | 12     | 1 | 13     | 0 |
| (Mesenteric lymph node)            | [ 13 ]                 |   | [ 13 ] |   | [ 13 ] |   | [ 13 ] |   |
| Enlargement                        | 13                     | 0 | 13     | 0 | 12     | 1 | 13     | 0 |
| (Skin)                             | [ 13 ]                 |   | [ 13 ] |   | [ 13 ] |   | [ 13 ] |   |
| Alopecia, thorax                   | 13                     | 0 | 13     | 0 | 13     | 0 | 12     | 1 |

-, negative; +, positive.

[ ], number of animals examined.

a), vehicle control (0.5% CMC Na solution, 5mL/kg)

Table 16

Preliminary reproduction toxicity screening test of benzoic acid, 4-methyl- by oral administration in rats

Summary of histopathological findings in males

| Compound<br>Groups (mg/kg)<br>Grade               | benzoic acid, 4-methyl- |   |   |    |     |      |        |   |   |    |     |      |        |   |   |    |     |      |        |    |   |    |     |                     |
|---------------------------------------------------|-------------------------|---|---|----|-----|------|--------|---|---|----|-----|------|--------|---|---|----|-----|------|--------|----|---|----|-----|---------------------|
|                                                   | 0 <sup>a)</sup>         |   |   |    |     |      | 100    |   |   |    |     |      | 300    |   |   |    |     |      | 1000   |    |   |    |     |                     |
|                                                   | -                       | ± | + | ++ | +++ | Pos. | -      | ± | + | ++ | +++ | Pos. | -      | ± | + | ++ | +++ | Pos. | -      | ±  | + | ++ | +++ | Pos.                |
| (Testis)                                          | [ 13 ]                  |   |   |    |     |      | [ 13 ] |   |   |    |     |      | [ 13 ] |   |   |    |     |      | [ 13 ] |    |   |    |     |                     |
| Atrophy, focal,<br>seminiferous tubule, bilateral | 12                      | 1 | 0 | 0  | 0   | 1    | 12     | 1 | 0 | 0  | 0   | 1    | 13     | 0 | 0 | 0  | 0   | 0    | 13     | 0  | 0 | 0  | 0   | 0                   |
| Multinucleated giant cell,<br>seminiferous tubule | 13                      | 0 | 0 | 0  | 0   | 0    | 13     | 0 | 0 | 0  | 0   | 0    | 13     | 0 | 0 | 0  | 0   | 0    | 12     | 1  | 0 | 0  | 0   | 1                   |
| (Epididymis)                                      | [ 13 ]                  |   |   |    |     |      | [ 13 ] |   |   |    |     |      | [ 13 ] |   |   |    |     |      | [ 13 ] |    |   |    |     |                     |
| A few number of sperm,<br>lumen, cauda, bilateral | 13                      | 0 | 0 | 0  | 0   | 0    | 13     | 0 | 0 | 0  | 0   | 0    | 13     | 0 | 0 | 0  | 0   | 0    | 0      | 11 | 2 | 0  | 0   | ** 13 <sup>##</sup> |
| Cell debris, lumen,<br>cauda, bilateral           | 12                      | 1 | 0 | 0  | 0   | 1    | 13     | 0 | 0 | 0  | 0   | 0    | 13     | 0 | 0 | 0  | 0   | 0    | 8      | 5  | 0 | 0  | 0   | 5                   |
| Spermatic granuloma,<br>cauda, unilateral         | 13                      | 0 | 0 | 0  | 0   | 0    | 13     | 0 | 0 | 0  | 0   | 0    | 12     | 0 | 1 | 0  | 0   | 1    | 13     | 0  | 0 | 0  | 0   | 0                   |

-, negative; ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe; Pos., total of positive grade.

[ ], number of animals examined.

a), vehicle control (0.5% CMC Na solution, 5 mL/kg)

\*\*, significantly different from control  $p < 0.01$  (Two-tailed Mann-Whitney U test)##, significantly different from control  $p < 0.01$  (One-tailed Fisher exact test)

Table 17

Preliminary reproduction toxicity screening test of benzoic acid, 4-methyl- by oral administration in rats

Summary of histopathological findings in females

| Compound<br>Groups (mg/kg)<br>Grade                      | Benzoic acid, 4-methyl- |    |   |    |     |      |       |   |   |    |     |      |       |   |   |    |     |      |        |   |    |    |     |      |   |   |
|----------------------------------------------------------|-------------------------|----|---|----|-----|------|-------|---|---|----|-----|------|-------|---|---|----|-----|------|--------|---|----|----|-----|------|---|---|
|                                                          | 0 <sup>a)</sup>         |    |   |    |     |      | 100   |   |   |    |     |      | 300   |   |   |    |     |      | 1000   |   |    |    |     |      |   |   |
|                                                          | -                       | ±  | + | ++ | +++ | Pos. | -     | ± | + | ++ | +++ | Pos. | -     | ± | + | ++ | +++ | Pos. | -      | ± | +  | ++ | +++ | Pos. |   |   |
| (Ovary)                                                  | [ 13 ]                  |    |   |    |     |      | [ 0 ] |   |   |    |     |      | [ 1 ] |   |   |    |     |      | [ 13 ] |   |    |    |     |      |   |   |
| Increase, atresia, follicle, bilateral                   |                         | 13 | 0 | 0  | 0   | 0    | 0     |   |   |    |     |      |       | 1 | 0 | 0  | 0   | 0    | 0      |   | 12 | 0  | 1   | 0    | 0 | 1 |
| (Uterus)                                                 | [ 0 ]                   |    |   |    |     |      | [ 0 ] |   |   |    |     |      | [ 2 ] |   |   |    |     |      | [ 0 ]  |   |    |    |     |      |   |   |
| Cellular infiltration, neutrophil,<br>epithelium         |                         |    |   |    |     |      |       |   |   |    |     |      |       | 0 | 0 | 1  | 1   | 0    | 2      |   |    |    |     |      |   |   |
| Cellular infiltration, neutrophil,<br>endometrial stroma |                         |    |   |    |     |      |       |   |   |    |     |      |       | 0 | 1 | 0  | 1   | 0    | 2      |   |    |    |     |      |   |   |
| Edema, endometrial stroma                                |                         |    |   |    |     |      |       |   |   |    |     |      |       | 1 | 0 | 1  | 0   | 0    | 1      |   |    |    |     |      |   |   |
| Dilatation, lumen                                        |                         |    |   |    |     |      |       |   |   |    |     |      |       | 0 | 0 | 0  | 2   | 0    | 2      |   |    |    |     |      |   |   |
| (Vagina)                                                 | [ 0 ]                   |    |   |    |     |      | [ 0 ] |   |   |    |     |      | [ 2 ] |   |   |    |     |      | [ 0 ]  |   |    |    |     |      |   |   |
| Cellular infiltration, neutrophil,<br>epithelium         |                         |    |   |    |     |      |       |   |   |    |     |      |       | 0 | 1 | 1  | 0   | 0    | 2      |   |    |    |     |      |   |   |
| Mucification, epithelium                                 |                         |    |   |    |     |      |       |   |   |    |     |      |       | 1 | 0 | 0  | 1   | 0    | 1      |   |    |    |     |      |   |   |
| (Spleen)                                                 | [ 0 ]                   |    |   |    |     |      | [ 0 ] |   |   |    |     |      | [ 1 ] |   |   |    |     |      | [ 0 ]  |   |    |    |     |      |   |   |
| Necrosis, multiple                                       |                         |    |   |    |     |      |       |   |   |    |     |      |       | 0 | 0 | 1  | 0   | 0    | 1      |   |    |    |     |      |   |   |
| Cellular infiltration,<br>neutrophil & macrophage        |                         |    |   |    |     |      |       |   |   |    |     |      |       | 0 | 0 | 1  | 0   | 0    | 1      |   |    |    |     |      |   |   |
| (Mesenteric lymph node)                                  | [ 0 ]                   |    |   |    |     |      | [ 0 ] |   |   |    |     |      | [ 1 ] |   |   |    |     |      | [ 0 ]  |   |    |    |     |      |   |   |
| Necrosis, multiple                                       |                         |    |   |    |     |      |       |   |   |    |     |      |       | 0 | 0 | 0  | 1   | 0    | 1      |   |    |    |     |      |   |   |
| Cellular infiltration,<br>neutrophil & macrophage        |                         |    |   |    |     |      |       |   |   |    |     |      |       | 0 | 0 | 0  | 1   | 0    | 1      |   |    |    |     |      |   |   |
| (Skin)                                                   | [ 0 ]                   |    |   |    |     |      | [ 0 ] |   |   |    |     |      | [ 0 ] |   |   |    |     |      | [ 1 ]  |   |    |    |     |      |   |   |
| Abnormality                                              |                         |    |   |    |     |      |       |   |   |    |     |      |       |   |   |    |     |      |        | 1 | 0  | 0  | 0   | 0    | 0 |   |

-, negative; ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe; Pos., total of positive grade.

[ ], number of animals examined.

a), vehicle control (0.5% CMC Na solution, 5 mL/kg)

Table 18

Preliminary reproduction toxicity screening test of benzoic acid, 4-methyl- by oral administration in rats

Organ weights of males; mean  $\pm$  S.D. (N)

| Compound          |     | Benzoic acid, 4-methyl-       |      |                  |      |                  |      |                   |      |
|-------------------|-----|-------------------------------|------|------------------|------|------------------|------|-------------------|------|
| Groups (mg/kg)    |     | 0 <sup>a)</sup>               |      | 100              |      | 300              |      | 1000              |      |
| Final body weight | (g) | 527.9 $\pm$ 37.8              | (13) | 549.9 $\pm$ 42.8 | (13) | 541.6 $\pm$ 26.6 | (13) | 542.4 $\pm$ 30.7  | (13) |
| Testes            | (g) | 3.37 $\pm$ 0.24 <sup>b)</sup> | (13) | 3.29 $\pm$ 0.19  | (13) | 3.29 $\pm$ 0.22  | (13) | 3.31 $\pm$ 0.17   | (13) |
|                   |     | 0.64 $\pm$ 0.07 <sup>c)</sup> | (13) | 0.60 $\pm$ 0.06  | (13) | 0.61 $\pm$ 0.04  | (13) | 0.61 $\pm$ 0.05   | (13) |
| Epididymides      | (g) | 1.28 $\pm$ 0.08               | (13) | 1.27 $\pm$ 0.08  | (13) | 1.24 $\pm$ 0.07  | (13) | 1.13 $\pm$ 0.09** | (13) |
|                   |     | 0.24 $\pm$ 0.03               | (13) | 0.23 $\pm$ 0.02  | (13) | 0.23 $\pm$ 0.01  | (13) | 0.21 $\pm$ 0.02** | (13) |

a), vehicle control (0.5% CMC Na solution, 5 mL/kg)

b), absolute weight

c), relative weight (g per 100 g body weight)

\*\*, significant difference from control,  $p < 0.01$

Table 19

Preliminary reproduction toxicity screening test of benzoic acid, 4-methyl- by oral administration in rats

Body weight of pups up to day 4 of lactation; mean  $\pm$  S.D. (N)

| Compound                        | Benzoic acid, 4-methyl- |       |      |      |       |      |      |       |      |      |            |
|---------------------------------|-------------------------|-------|------|------|-------|------|------|-------|------|------|------------|
| Groups (mg/kg)                  | 0 <sup>a)</sup>         |       | 100  |      | 300   |      | 1000 |       |      |      |            |
| Day 0 of lactation (at birth)   |                         |       |      |      |       |      |      |       |      |      |            |
| Number of live newborns         |                         |       |      |      |       |      |      |       |      |      |            |
| Male                            | 7.7                     | ± 2.1 | (13) | 7.4  | ± 2.2 | (13) | 5.7  | ± 2.1 | (11) | 5.7  | ± 3.0 ( 9) |
| Female                          | 6.6                     | ± 2.3 | (13) | 6.7  | ± 1.7 | (13) | 6.5  | ± 2.1 | (11) | 4.3  | ± 2.5 ( 9) |
| Body weight of live newborn (g) |                         |       |      |      |       |      |      |       |      |      |            |
| Male                            | 6.8                     | ± 0.4 | (13) | 7.0  | ± 0.5 | (13) | 7.0  | ± 0.5 | (11) | 6.7  | ± 0.3 ( 9) |
| Female                          | 6.5                     | ± 0.4 | (13) | 6.7  | ± 0.6 | (13) | 6.6  | ± 0.5 | (11) | 6.4  | ± 0.5 ( 8) |
| Day 4 of lactation              |                         |       |      |      |       |      |      |       |      |      |            |
| Number of live pups             |                         |       |      |      |       |      |      |       |      |      |            |
| Male                            | 7.7                     | ± 2.1 | (13) | 7.4  | ± 2.2 | (13) | 5.7  | ± 2.1 | (11) | 6.0  | ± 2.7 ( 8) |
| Female                          | 6.6                     | ± 2.3 | (13) | 6.5  | ± 1.5 | (13) | 6.5  | ± 2.1 | (11) | 4.9  | ± 2.0 ( 8) |
| Body weight of pup (g)          |                         |       |      |      |       |      |      |       |      |      |            |
| Male                            | 10.7                    | ± 1.0 | (13) | 11.2 | ± 1.1 | (13) | 11.8 | ± 1.2 | (11) | 11.1 | ± 0.9 ( 8) |
| Female                          | 10.3                    | ± 1.0 | (13) | 10.7 | ± 1.1 | (13) | 11.2 | ± 1.3 | (11) | 10.5 | ± 0.9 ( 8) |

a), vehicle control (0.5% CMC Na solution, 5 mL/kg)



Table 20

Preliminary reproduction toxicity screening test of benzoic acid, 4-methyl- by oral administration in rats

Morphological findings of pups

| Compound                         |                                          | Benzoic acid, 4-methyl- |     |     |                 |
|----------------------------------|------------------------------------------|-------------------------|-----|-----|-----------------|
| Groups (mg/kg)                   |                                          | 0 <sup>a)</sup>         | 100 | 300 | 1000            |
| Dead pups                        |                                          |                         |     |     |                 |
|                                  | Number of dead pups examined             | 11                      | 2   | 3   | 2               |
|                                  | External observation                     | 11                      | 2   | 3   | 2               |
|                                  | Visceral observation                     | 7                       | 0   | 2   | 0               |
|                                  | Number of pups with external changes     | 0                       | 0   | 0   | 0               |
|                                  | Number of pups with visceral changes     | 0                       | 0   | 0   | 0               |
| Live pups                        |                                          |                         |     |     |                 |
| At birth (day 0)                 |                                          |                         |     |     |                 |
|                                  | Number of newborns examined              | 186                     | 183 | 135 | 90              |
|                                  | Number of newborns with external changes | 0                       | 0   | 0   | 1               |
|                                  | Types and number                         |                         |     |     |                 |
|                                  | Cyanosis                                 | 0                       | 0   | 0   | 1 <sup>b)</sup> |
| At necropsy (day 4 of lactation) |                                          |                         |     |     |                 |
|                                  | Number of pups examined                  | 186                     | 181 | 135 | 87              |
|                                  | Number of pups with external changes     | 0                       | 0   | 0   | 0               |
|                                  | Number of pups with visceral changes     | 0                       | 0   | 0   | 1               |
|                                  | Types and number                         |                         |     |     |                 |
|                                  | Dilatation of renal pelvis               | 0                       | 0   | 0   | 1 <sup>b)</sup> |

a), vehicle control (0.5% CMC Na solution, 5 mL/kg)

b), male pup under FB04005 (dam no.)