硫酸第一鉄・七水和物のラットを用いる単回経口投与毒性試験

最　終　報　告　書

作成日　２００２年６月１３日

株式会社日本バイオリサーチセンター
羽島研究所

目次

要約 …… 7
緒言 …… 8
方法
1.被験物質および媒体 …… 8
2.投与検体および濃度確認 …… 8
3.使用動物および飼育条件 …… 9
4.投与経路，投与方法，群構成および投与量 …… 10
5.観察および検査項目 …… 11
6.統計解析 …… 11
結果および考察
1.死亡状況および一般状態 …… 11
2.体重 …… 11
3.剖検 …… 12
文献 …… 12

Attachment, Table, Fig. および Appendix の目次

Table 1	Mortality and LD_{50} value of rats in single dose oral toxicity test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate	····· 15
Table 2	General signs of male rats in single dose oral toxicity test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate	····· 16
Table 3	General signs of female rats in single dose oral toxicity test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate	····· 17
Table 4	Body weights of male rats in single dose oral toxicity test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate	····· 18
Table 5	Body weights of female rats in single dose oral toxicity test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate	····· 19
Table 6	Necropsy findings of male rats in single dose oral toxicity test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate	····· 20
Table 7	Necropsy findings of female rats in single dose oral toxicity test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate	····· 21
Fig.1	Chemical structure of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate	····· 22
Fig.2	Body weights of male rats in single dose oral toxicity test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate	····· 23
Fig.3	Body weights of female rats in single dose oral toxicity test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate	····· 24

要約

硫酸第一鉄・七水和物を雌雄ラット各群5例に1回経口投与し，その毒性について検討した．投与量は，2000 mg/kg を最高用量とし，以下公比2により1000，500および250 mg/kg とした．対照として媒体(注射用水)投与群を設けた．

1．死亡状況および一般状態

死亡例は，いずれの群の雌雄にも認められなかった．

一般状態の観察において，2000 mg/kg 群の雄で流涎および自発運動の低下，雌で自発運動の低下がみられた．

2．体重

2000 mg/kg 群の雌雄で一過性の体重の低値がみられた．

3．剖検

いずれの群の雌雄にも異常はみられなかった．

以上の結果から，硫酸第一鉄・七水和物の LD_{50} 値は，雌雄とも2000 mg/kg を上回ると推定される．

緒言

硫酸第一鉄・七水和物(CAS No.7782-63-0)が人に摂取された場合の健康への影響を推定するために，OECD Guideline for Testing of Chemicals for Acute Oral Toxicity Test(401)に従って，硫酸第一鉄・七水和物を雌雄ラットに1回経口投与して，その毒性について検討した．

方法

1.被験物質および媒体

被験物質の硫酸第一鉄・七水和物(CAS No.7782-63-0)は，Fig.1 に示す化学構造を有し，分子量：278.01，融点：64 ℃であり，水に可溶の青緑色の結晶性の粉末である．当試験には，2001年2月9日に厚生労働省　医薬局審査管理課　化学物質安全対策室から提供されたものを用いた[製造元：　　，Lot No.　　純度：91.6 wt%，ただし，不純物として Mg を 0.22%，Mn を 0.20%，Zn を 87 ppm 含む]．入手後は，試験施設の被験物質保管室の保管庫に室温条件下で保管した．投与終了後に残余被験物質は　　に返却した．なお，被験物質の安定性については，反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験で用いた他 Lot で確認した．

媒体として，注射用水(Lot No.0H93N，株式会社大塚製薬工場，使用期限：2005 年 8 月)を用いた．

2.投与検体および濃度確認

硫酸第一鉄・七水和物は，注射用水で 200 mg/mL となるように，溶解して調製した．100，50 および 25 mg/mL 溶液は，200 mg/mL 溶液を注射用水で段階希釈して調製した．なお，被験物質の調製に際して，純度による換算を実施した．

2～200 mg/mL の調製液は，室温・遮光条件下で 6 時間保存しても安定性に問題のないことが確認されている[1)] (Attachment 1)．各濃度の調製液は，用時調製とし，調製後 6 時間以内に使用した．投与後の残余投与検体は廃棄した．

投与に使用した各投与検体中の被験物質濃度を試験施設内で滴定法により測定した．その結果，被験物質濃度は表示濃度の 96.4～104.2%であり，濃度に問題はなかった(Attachment 2)．

3.使用動物および飼育条件

3.1 動物種および系統

試験には，毒性試験に一般的に用いられている動物種で，その系統維持が明らかであるSprague-Dawley系雌雄ラット[Crj：CD(SD)IGS, SPF]を用いた．動物は，2001年5月16日に日本チャールス・リバー株式会社(日野飼育センター)から4週齢で雌雄各31匹を入手した．入手後1日の体重範囲は，雄が76～87 g，雌が68～80 gであった．

3.2 検疫および馴化，群分け法ならびに個体識別法

入手した動物は，5日間の検疫期間およびその後2日間の馴化期間を設けた．この間に，体重測定を4回と一般状態の観察を毎日行って検疫・馴化とし，一般状態および体重推移に異常の認められなかった動物を群分けして試験に用いた．

群分けは，コンピュータを用いて体重を層別に分けた後に，無作為抽出法により各群の平均体重および分散がほぼ等しくなるように投与日に行った．また，個々の動物の体重が平均体重の±20％を越えていないことを確認した．群分け後の残余動物は，投与翌日にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に廃棄処分した．

動物の個体識別は，検疫・馴化期間中は入手日に油性インクによる記入法および色素塗布法を，群分け後は油性インクによる色素塗布法および耳パンチ法を併用して行った．さらに，検疫・馴化期間中の各ケージには試験番号，入手年月日および検疫・馴化動物番号を記入したラベルを，群分け後の各ケージには試験番号，投与量および動物番号を記入し，群ごとに色分けしたラベルを取り付けた．

3.3 環境条件および飼育管理

動物は，室温20～26 ℃(実測値：20～23 ℃)，湿度40～70%(実測値：36～65%)，明暗各12時間(照明：午前6時～午後6時)，換気回数12回／時(フィルターにより除菌した新鮮空気)に維持されている飼育室(E棟9号室，ただし，検疫期間はE棟2号室)で飼育した．なお，飼育室の湿度が2001年5月17日に設定範囲(40～70%)を逸脱して，最低36%となった．しかし，逸脱幅はわずかであることから，試験成績に影響を及ぼすことはないと判断された．

検疫・馴化期間中および群分け前の絶食時間中は，ステンレス製懸垂式ケージ(W：240×D：380×H：200 mm)を用いて1ケージ当たり5匹までの雌雄別群飼育とし，群分け後はステンレス製五連ケージ(W：755×D：210×H：170 mm)を用いて個別飼育した．ケージの受け皿および給水瓶の交換は1週間に2回以上，ステンレス製五連ケージならびに給餌器の交換は2週間に1回以上行った．なお，動物飼育室の清掃（床の掃き掃除）および0.02%次亜塩素酸ナトリウム水溶液での床のモップ拭きによる消毒は毎日行った．

3.4 飼料および飲料水

飼料は，製造後5ヵ月以内の固型飼料（CRF-1，オリエンタル酵母工業株式会社）を給餌器に入れ，自由に摂取させた．ただし，投与前日の夕刻(午後3時40分)から投与までの約18時間と投与後約6時間まで絶食させ，その後に飼料を与えた．使用した同一ロットの飼料の分析結

果は，財団法人日本食品分析センターおよびオリエンタル酵母工業株式会社で実施した成績を入手した．

飲料水は，水道水を給水瓶を用いて自由に摂取させた．ただし，群分け時から投与後約6時間までは絶水させ，その後に飲料水を与えた．飲料水の水質検査結果は，ほぼ6カ月ごとに財団法人岐阜県公衆衛生検査センターで実施した成績を入手した．

飼料および飲料水の分析結果は，いずれも試験施設で定めた基準値の範囲内であった．

4.投与経路，投与方法，群構成および投与量

4.1 投与経路および投与方法

硫酸第一鉄・七水和物は，経口的に人に摂取される可能性が考えられるため，投与経路として経口投与を選択した．

投与に際しては，金属製経口胃ゾンデを取り付けたポリプロピレン製ディスポーザブル注射筒(テルモ株式会社)を用いて，強制経口投与した．投与液量は，投与直前に測定した体重を基準として10 mL/kgで算出した．投与時刻は午前9時47分～10時26分の間で，投与回数は1回とした．

投与日の週齢は5週齢であり，体重範囲は雄が99～113 g，雌が90～101 gであった．

4.2 群構成および投与量

群構成は，下記のように被験物質投与群として4群を設定し，その他に対照群を設けた．1群の動物数は，雌雄それぞれ5匹とした．

群	試験群	投与量 (濃度)	動物数(動物番号)	
			雄	雌
第1群	対照(注射用水)	0 mg/kg (0 mg/mL)	5(M01101～M01105)	5(F01151～F01155)
第2群	硫酸第一鉄・七水和物	250 mg/kg (25 mg/mL)	5(M02201～M02205)	5(F02251～F02255)
第3群	硫酸第一鉄・七水和物	500 mg/kg (50 mg/mL)	5(M03301～M03305)	5(F03351～F03355)
第4群	硫酸第一鉄・七水和物	1000 mg/kg (100 mg/mL)	5(M04401～M04405)	5(F04451～F04455)
第5群	硫酸第一鉄・七水和物	2000 mg/kg (200 mg/mL)	5(M05501～M05505)	5(F05551～F05555)

硫酸第一鉄・七水和物のラット経口投与によるLDL_0値は1389 mg/kgとの報告がある[1]．そこで，当試験では，OECD Guideline for Testing of Chemicals for Acute Oral Toxicity Test(401)で限界用量とされている2000 mg/kgを最高用量とし，以下公比2により1000，500および250 mg/kg群を設定した．また，対照として媒体(注射用水)のみを同容量投与する群を設けた．

5.観察および検査項目

5.1 観察期間

投与後 14 日間とした.

5.2 一般状態

投与日は投与前および投与後 6 時間(投与直後～投与後 30 分, 投与後 2, 4 および 6 時間)まで, 投与翌日からの観察期間中は 1 日 1 回, 一般状態および死亡の有無を観察した.

5.3 体重測定

投与日(投与直前)および投与後 1, 3, 7, 10 ならびに 14 日に測定した.

5.4 剖検

動物は, 観察期間終了時にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検した.

6.統計解析

いずれの群の雌雄とも, 死亡例が認められなかったため, LD_{50}値は推定した.

有意差検定は下記のように, 対照群と各投与群の間で行い, 危険率を 5%とし, 5%未満($p<0.05$)と 1%未満($p<0.01$)とに分けて表示した.

〈検定方法〉

体重は, 各群で平均値および標準偏差を算出した. その後, Bartlett 法による等分散性の検定を行い, 等分散の場合には Dunnett 法により, 等分散と認められなかった場合には順位を利用した Dunnett 型の検定法により行った.

結果および考察

1.死亡状況および一般状態(Table 1～3, Appendix 1-1～1-5 および 2-1～2-5)

いずれの群の雌雄とも, 死亡例は認められなかった. 硫酸第一鉄・七水和物の LD_{50}値は, 雌雄とも 2000 mg/kg を上回ると推定される.

一般状態の観察において, 対照群, 250, 500 および 1000 mg/kg 群では雌雄とも異常はみられなかった. 2000 mg/kg 群では, 雄で流涎が投与後 0.5 時間に 5 例, 自発運動の低下が投与後 4 および 6 時間に各 5 例, 雌で自発運動の低下が投与後 6 時間に 4 例にみられたが, 投与後 1 日以降に異常は認められなかった.

2.体重(Table 4 および 5, Fig.2 および 3, Appendix 3-1～3-5 および 4-1～4-5)

250 および 500 mg/kg 群の雌雄ならびに 1000 mg/kg 群の雄では, 対照群と比べて体重に有意差はみられなかった. 1000 mg/kg 群では, 雌において対照群と比べて投与後 14 日に体重の有意な低値がみられたが, 2000 mg/kg 群の雌で投与後 14 日に有意差が認められないことから,

投与に基づくものではないと考えられる．2000 mg/kg 群では，雌雄とも対照群と比べて投与後1日に体重の有意な低値がみられた．

3.剖検(Table 6 および 7, Appendix 5-1～5-5 および 6-1～6-5)
いずれの群の雌雄とも，異常はみられなかった．

以上のように，硫酸第一鉄・七水和物の雌雄ラットへの1回経口投与により，雌雄とも 2000 mg/kg 投与しても死亡例は認められなかったが，2000 mg/kg 群の雄で流涎、自発運動の低下および体重増加抑制，雌で自発運動の低下および体重増加抑制が認められた．硫酸第一鉄・七水和物の LD_{50} 値は，雌雄とも 2000 mg/kg を上回ると推定される．

文献

1) 渡邊ゆかりほか：硫酸第一鉄・七水和物調製液の安定性確認試験(試験番号：093320)(株式会社日本バイオリサーチセンター　羽島研究所)
2)Environmental Quality & Safety, Supplement 1 P.1 (1975)

Table 1 Mortality and LD_{50} value of rats in single dose oral toxicity test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate

Sex	Group	mg/kg	Number of animals	Number of deaths																		Total number of deaths	LD_{50} (mg/kg)
				Hours after administration				Days after administration															
				0~0.5	2	4	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
Male	Control	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate	250	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		500	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	LD_{50}>2000
		1000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		2000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Female	Control	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate	250	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		500	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	LD_{50}>2000
		1000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		2000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Table 2 General signs of male rats in single dose oral toxicity test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate

Group	mg/kg	Number of males and general signs	Hours after administration				Days after administration													
			0~0.5	2	4	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Control	0	Number of males	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate	250	Number of males	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	500	Number of males	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	1000	Number of males	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	2000	Number of males	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Normal	0	5	0	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Salivation	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Decrease in locomotor activity	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 3 General signs of female rats in single dose oral toxicity test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate

Group	mg/kg	Number of females and general signs	Hours after administration				Days after administration													
			0~0.5	2	4	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Control	0	Number of females	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate	250	Number of females	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	500	Number of females	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	1000	Number of females	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	2000	Number of females	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Normal	5	5	5	1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Decrease in locomotor activity	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 4 Body weights of male rats in single dose oral toxicity test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate

Group	Control	sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate			
mg/kg	0	250	500	1000	2000
Number of males	5	5	5	5	5
Days after administration					
0	105 ± 4	105 ± 3	105 ± 4	106 ± 5	104 ± 4
1	120 ± 7	119 ± 5	120 ± 5	118 ± 9	106 ± 5 **
3	140 ± 5	142 ± 7	142 ± 6	141 ± 10	132 ± 8
7	174 ± 12	174 ± 10	175 ± 9	175 ± 10	168 ± 10
10	198 ± 11	198 ± 11	193 ± 14	199 ± 11	188 ± 14
14	232 ± 13	226 ± 13	225 ± 17	231 ± 12	219 ± 13

Each value shows mean (g) ± S.D.
Significantly different from control group (**: P<0.01).

Table 5. Body weights of female rats in single dose oral toxicity test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate

Group	Control	sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate			
mg/kg	0	250	500	1000	2000
Number of females	5	5	5	5	5
Days after administration					
0	96 ± 3	95 ± 4	96 ± 3	95 ± 4	96 ± 4
1	112 ± 3	109 ± 4	109 ± 2	107 ± 7	99 ± 6 **
3	132 ± 4	131 ± 6	129 ± 6	128 ± 8	125 ± 5
7	155 ± 4	154 ± 6	157 ± 6	148 ± 10	152 ± 5
10	165 ± 6	168 ± 4	168 ± 9	156 ± 12	165 ± 9
14	185 ± 4	183 ± 3	182 ± 11	169 ± 11 *	180 ± 10

Each value shows mean (g) ± S.D.

Significantly different from control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Table 6 Necropsy findings of male rats in single dose oral toxicity test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate

Group	Control	sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate			
mg/kg	0	250	500	1000	2000
Number of males	5	5	5	5	5
Findings					
Normal	5	5	5	5	5

Table 7 Necropsy findings of female rats in single dose oral toxicity test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate

Group	Control	sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate			
mg/kg	0	250	500	1000	2000
Number of females	5	5	5	5	5
Findings					
Normal	5	5	5	5	5

$$FeSO_4 \cdot 7H_2O$$

Fig. 1 Chemical structure of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate

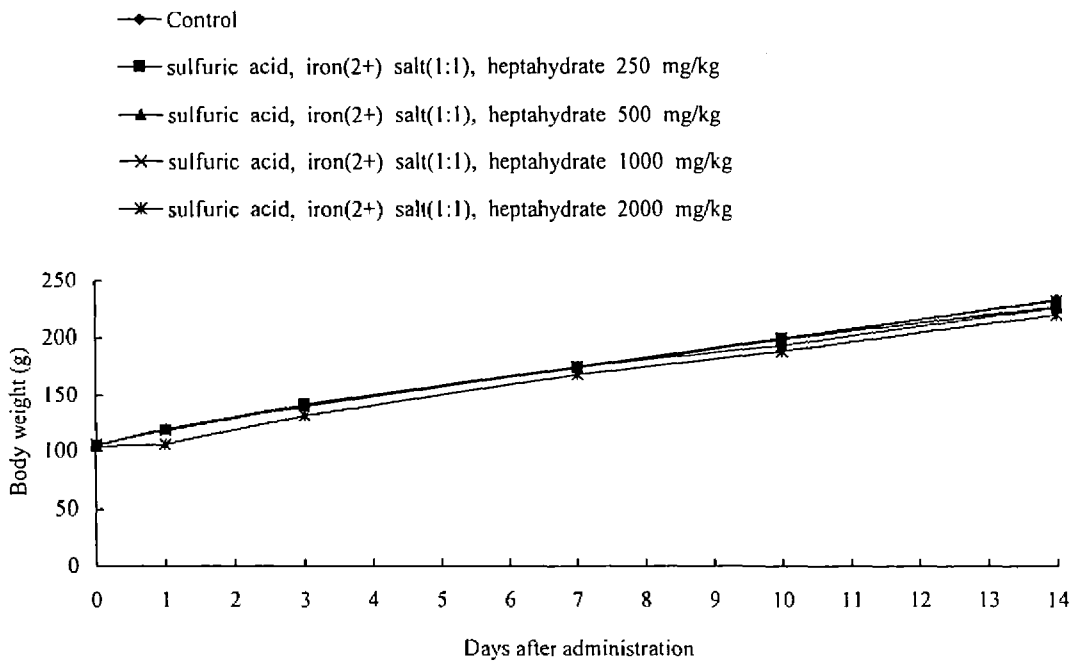

Fig. 2 Body weights of male rats in single dose oral toxicity test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate

Study No. 403620

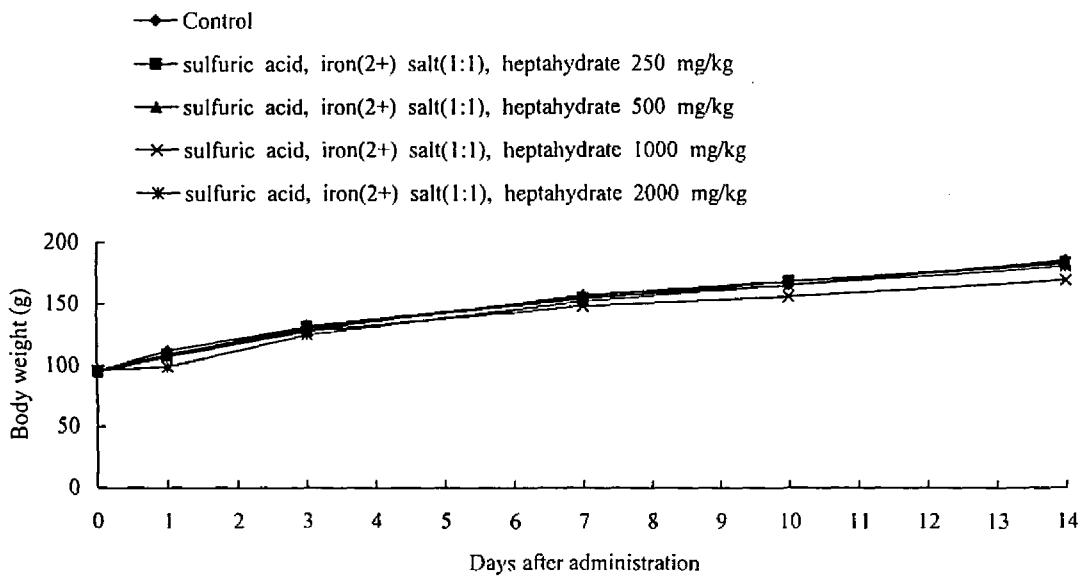

Fig. 3 Body weights of female rats in single dose oral toxicity test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate

Study No. 403620