
硫酸第一鉄・七水和物のラットを用いる経口投与による
反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

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

表 題：硫酸第一鉄・七水和物のラットを用いる経口投与による反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

試験番号：100520

被験物質名：硫酸第一鉄・七水和物(CAS No.7782-63-0)

試験系：Sprague-Dawley 系雌雄ラット[Crj:CD(SD)IGS, SPF]

試験委託者：厚生労働省 医薬局審査管理課 化学物質安全対策室
東京都千代田区霞が関1丁目2番2号

試験施設：株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所
岐阜県羽島市福寿町間島6丁目104番地

試験目的：硫酸第一鉄・七水和物が継続的に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 Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Testに従って硫酸第一鉄・七水和物を雌雄ラットに経口投与した反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を行い、雌雄動物に対する毒性影響を検討するとともに、性腺機能、交尾行動、受胎および分娩などの生殖行動に及ぼす影響について検討した。なお、当試験は、「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第4条に規定する試験施設について」(昭和59年3月31日環保業第39号環境庁企画調整局長，薬発第229号厚生省薬務局長，59基局第85号通商産業省基礎産業局長連名通知) およびその改正ならびにOECD PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE(OECD化学物質の安全性試験の実施に関する基準)に従って実施した。

試験開始日：2001年7月26日

試験終了日：2002年6月13日

試験実施日：雄動物入手日	2001年 8月 1日
雌動物入手日	2001年 8月 1日
雄の投与開始日	2001年 8月13日
雌の投与開始日	2001年 8月13日
交配開始日	2001年 8月27日
母動物および新生児の剖検開始日	2001年 9月25日
雄の投与終了日	2001年 9月30日
雄の剖検日	2001年10月 1日
雌の投与終了日	2001年 9月28日
母動物の剖検終了日	2001年 9月29日
臨床検査終了日	2001年10月24日
病理組織学検査終了日	2002年 5月16日

資料，標本および被験物質の保管場所：

当試験の実施により得られたすべての資料，標本および保管すべき被験物質は，最終報告書提出後10年間は株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所の資料保管室，標本保管室および被験物質保管室に保存する．その後は，試験委託者と協議の上で決定する．

試験計画書に従わなかったこと：

当初入手したロット(Lot No. ■■■■■)の被験物質のみでは不足するため，別ロット(Lot No. ■■■■■)を追加入手し，使用した．被験物質の安定性については，追加入手したロット(Lot No. ■■■■■)について実施しているが，試験成績に影響を及ぼすことはないと判断された．

その他には，試験計画書に従わなかったことはなかった．

予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態：

当試験の実施期間中に，予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態は認められなかった．

目次

要約	12
緒言	14
方法	
1.被験物質および媒体	14
2.投与検体および濃度確認	14
3.使用動物および飼育条件	15
4.投与経路, 投与方法, 群構成, 投与量および投与期間	16
5.観察および検査項目	17
6.統計解析	21
結果	
I. 反復投与毒性	22
1.一般状態	22
2.体重	22
3.摂餌量	23
4.尿検査	23
5.血液学検査	23
6.血液生化学検査	24
7.剖検	24
8.器官重量	24
9.病理組織学検査	25
II. 生殖発生毒性	28
1.親動物の生殖発生	28
2.児動物(F ₁)	29
考察	29
文献	32

Attachment, Table, Fig.およびAppendixの目次

Attachment 1	Stability of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate in dosing preparations	 33
Attachment 2	Concentrations of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate in dosing preparations	 34
Attachment 3	Concentrations of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate in dosing preparations	 35
Table 1-1 ~ 1-4	General signs of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 36~ 39
Table 2-1 ~ 2-2	General signs of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 40~ 41
Table 3-1 ~ 3-2	General signs of dams during pregnancy in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 42~ 43
Table 4	General signs of dams during lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 44
Table 5	Body weights of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 45
Table 6	Body weights of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 46
Table 7	Body weights of dams during pregnancy in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 47
Table 8	Body weights of dams during lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 48

Table 9	Food consumption of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 49
Table 10	Food consumption of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 50
Table 11	Food consumption of dams during pregnancy in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 51
Table 12	Food consumption of dams during lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 52
Table 13-1 ~13-2	Urinary examination of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 53~ 54
Table 14-1 ~14-2	Urinary examination of dams in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 55~ 56
Table 15	Hematological examination of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 57
Table 16	Hematological examination of dams in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 58
Table 17	Blood chemical examination of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 59
Table 18	Blood chemical examination of dams in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 60
Table 19-1	Necropsy findings of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 61

Table 19-2	Necropsy findings of dead male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 62
Table 20-1	Necropsy findings of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 63
Table 20-2	Necropsy findings of dead female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 64
Table 21	Organ weights of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 65
Table 22	Organ weights of dams in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 66
Table 23-1 ~23-2	Histopathological findings of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 67~ 68
Table 23-3	Histopathological findings of dead male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 69
Table 24-1	Histopathological findings of dams in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 70
Table 24-2	Histopathological findings of dead dams in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 71
Table 25	Reproductive performance of male rats and female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 72
Table 26	Observation of pups (F ₁) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 73

Table 27	Body weights of pups (F ₁) on days 0 and 4 of lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 74
Table 28	Necropsy findings of pups (F ₁) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 75
Fig. 1	Chemical structure of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate	 76
Fig. 2	Body weights of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 77
Fig. 3	Body weights of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 78
Fig. 4	Body weights of dams during pregnancy and lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 79
Fig. 5	Food consumption of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 80
Fig. 6	Food consumption of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 81
Fig. 7	Food consumption of dams during pregnancy and lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 82
Fig. 8	Body weights of pups (F ₁) on days 0 and 4 of lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration	 83

Appendix 1-1~ 1-5	Individual general signs of male rats	 84~103
Appendix 2-1~ 2-5	Individual general signs of female rats	104~113
Appendix 3-1~ 3-5	Individual general signs of dams during pregnancy	114~123
Appendix 4-1~ 4-5	Individual general signs of dams during lactation	124~128
Appendix 5-1~ 5-5	Individual body weights (g) of male rats	129~133
Appendix 6-1~ 6-5	Individual body weights (g) of female rats	134~138
Appendix 7-1~ 7-5	Individual body weights (g) of dams during pregnancy	139~143
Appendix 8-1~ 8-5	Individual body weights (g) of dams during lactation	144~148
Appendix 9-1~ 9-5	Individual food consumption (g/day) of male rats	149~153
Appendix 10-1~10-5	Individual food consumption (g/day) of female rats	154~158
Appendix 11-1~11-5	Individual food consumption (g/day) of dams during pregnancy	159~163
Appendix 12-1~12-5	Individual food consumption (g/day) of dams during lactation	164~168
Appendix 13-1~13-5	Individual urinary examination of male rats	169~178
Appendix 14-1~14-5	Individual urinary examination of dams	179~188
Appendix 15-1~15-5	Individual hematological examination of male rats	189~198
Appendix 16-1~16-5	Individual hematological examination of dams	199~208
Appendix 17-1~17-5	Individual blood chemical examination of male rats	209~228
Appendix 18-1~18-5	Individual blood chemical examination of dams	229~248
Appendix 19-1~19-5	Individual necropsy findings of male rats	249~253
Appendix 20-1~20-5	Individual necropsy findings of female rats	254~258
Appendix 21-1~21-5	Individual organ weights of male rats	259~263
Appendix 22-1~22-5	Individual organ weights of dams	264~268
Appendix 23-1~23-5	Individual histopathological findings of male rats	269~275
Appendix 23-6	Individual histopathological findings of dead male rats	276
Appendix 24-1~24-5	Individual histopathological findings of dams	277~281
Appendix 24-6	Individual histopathological findings of dead dams	282
Appendix 25-1~25-5	Individual reproductive performance of male rats and female rats	283~287

Appendix 26-1~26-5	Observation of pups (F_1) from individual dams	288~297
Appendix 27-1~27-5	Body weights (g, per dam) of pups (F_1) on days 0 and 4 of lactation from individual dams	298~302
Appendix 28-1~28-5	Individual necropsy findings of pups (F_1)	303~307
Photo 1~3		308

要約

硫酸第一鉄・七水和物のラットを用いる経口投与による反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を行い、雌雄動物に対する毒性影響を検討するとともに、性腺機能、交尾行動、受胎および分娩などの生殖行動に及ぼす影響について検討した。投与量は、1000 mg/kg を最高用量とし、以下公比約 3 により 300, 100 および 30 mg/kg とした。対照として媒体(注射用水)投与群を設けた。なお、各群の使用動物数は雌雄各 12 例とした。

I. 反復投与毒性

1. 一般状態および死亡状況

死亡例は、1000 mg/kg 群で雌雄各 1 例にみられた。

一般状態観察では、投与直後に一過性の流涎が 300 mg/kg 以上の群で雌雄にみられたが、毒性症状とはみなさなかった。

2. 体重および摂餌量

体重は、1000 mg/kg 群の雄で低値、雌で妊娠後期に低値傾向がみられた。

摂餌量は、1000 mg/kg 群の雌雄で一過性の低値がみられた。

3. 尿検査、血液学検査および血液生化学検査

尿検査において、1000 mg/kg 群の雄で尿量の高値および比重の低値がみられたが、雌では投与に起因する変化は認められなかった。

血液学検査において、1000 mg/kg 群の雄で赤血球数および APTT の低値、MCV, MCH および網状赤血球の高値がみられたが、雌では投与に起因する変化は認められなかった。

血液生化学検査において、300 mg/kg 群の雌で無機リンの高値、1000 mg/kg 群の雄で総蛋白、アルブミンおよび Ca の低値ならびに ALT, γ -GTP および A/G の高値、1000 mg/kg 群の雌で γ -GTP および無機リンの高値がみられた。

4. 剖検所見および器官重量

剖検において、1000 mg/kg 群の雄で腺胃粘膜の暗赤色斑および潰瘍がみられたが、雌では投与に起因する変化は認められなかった。

器官重量において、1000 mg/kg 群の雄で副腎の絶対重量および相対重量の高値、肝臓の相対重量の高値、1000 mg/kg 群の雌で肝臓の絶対重量および相対重量の高値がみられた。

5. 病理組織学検査

胸腺において、1000 mg/kg 群の雄で萎縮が 2 例にみられた。胃において、1000 mg/kg 群の雄で腺胃に潰瘍および糜爛が各 1 例、腺胃粘膜下組織に炎症性細胞浸潤が 2 例および出血が 1 例、前胃上皮に空胞化が 1 例にみられた。肝臓において、1000 mg/kg 群の雄で門脈周囲性の肝細胞に黄褐色色素沈着が 6 例全例、門脈周囲性のクッパー細胞に黄褐色色素沈着が 3 例、1000 mg/kg

群の雌で門脈周囲性の肝細胞に黄褐色色素沈着が6例全例にみられた。脾臓において、300 mg/kg 群の雄で髄外造血が5例、1000 mg/kg 群の雄で髄外造血が4例、赤脾髄に黄褐色色素沈着が6例全例、1000 mg/kg 群の雌で赤脾髄に黄褐色色素沈着が6例全例にみられ、これらの程度は対照群に比べて強かった。腎臓において、1000 mg/kg 群の雄で尿細管上皮に好塩基性変化が4例にみられた。骨髄において、1000 mg/kg 群の雄で大腿骨に造血亢進が1例にみられた。

II. 生殖発生毒性

1. 親動物の生殖発生に及ぼす影響

精巣、精巣上体、精嚢、前立腺、卵巣、子宮、膣および乳腺の病理組織学検査成績には、投与に起因する変化はみられなかった。

発情回数、交尾率および交尾所要日数には、投与に起因する変化はみられなかった。

受胎雌数、妊娠期間、分娩状態および哺育状態には、投与に起因する変化はみられなかった。

受胎率には、投与に起因する変化はみられなかった。

妊娠黄体数、着床数および着床率には、投与に起因する変化はみられなかった。

出産率には、投与に起因する変化はみられなかった。

2. 児動物(F₁)に及ぼす影響

総出産児数、死産児数、哺育0日の新生児数、哺育0日の性比、分娩率、児の産出率、出生率には、投与に起因する変化はみられなかった。

一般状態には、投与に起因する変化はみられなかった。

哺育4日の生存児数、哺育4日の性比および哺育4日の生存率には、投与に起因する変化はみられなかった。

外表観察において、投与に起因する変化はみられなかった。

体重には、投与に起因する変化はみられなかった。

剖検において、投与に起因する変化はみられなかった。

以上のように、硫酸第一鉄・七水和物の一般毒性学的無影響量は、雄では300 mg/kg 投与により脾臓に髄外造血の増強が認められ、雌では300 mg/kg 投与により無機リンの高値が認められたことから雌雄とも100 mg/kg/dayと考えられる。また、生殖発生毒性学的な無影響量は、雌雄とも1000 mg/kg 投与しても交尾能、受胎能などに影響が認められなかったことから1000 mg/kg/dayと考えられる。児動物では、1000 mg/kg 投与しても生存性および体重などに影響が認められなかったことから1000 mg/kg/dayと考えられる。

緒言

硫酸第一鉄・七水和物が継続的に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 Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test に従って硫酸第一鉄・七水和物を雄ラットに 1 日 1 回, 49 日間および雌ラットに 1 日 1 回, 42~47 日間経口投与した反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を行い, 雌雄動物に対する毒性影響を検討するとともに, 性腺機能, 交尾行動, 受胎および分娩などの生殖行動に及ぼす影響について検討した。

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 7 月 5 日および 9 月 6 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: 91.1 wt%, ただし, 不純物として Mg を 0.30%, Mn を 0.19%, Zn を 75 ppm 含む)および Lot No. ██████████ (純度: 90.6 wt%, ただし, 不純物として Mg を 0.28%, Mn を 0.16%, Zn を 84 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, アルゴンガス封入条件下で保存した。なお, 使用後に当試験施設での保存分を除いた残余被験物質は ██████████ に返却し, その一部について分析した結果, Lot No. ██████████ の純度は 90.6 wt%であり, 使用期間中の安定性が確認された。

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。60, 20 および 6 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。

雄投与開始日および雄投与終了日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 99.9~108.0%であり, 濃度に問題はなかった(Attachment 2 および 3)。

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 8 月 1 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 8 週齢の雌雄各 73 匹を入手した。入手後 1 日の体重範囲は、雄が 258~301 g, 雌が 181~225 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 7 日間の馴化期間を設けた。この間に、体重測定を 3 回と一般状態の観察を毎日行い、さらに雌は馴化期間中に性周期観察を 7 日間行った。一般状態および体重推移に異常がみられず、また性周期観察で異常が認められなかった動物(発情期が認められ、4 日あるいは 5 日周期と考えられた動物)を群分けした。

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開始日に行った。群分け後の残余動物のうち、検疫・馴化動物番号の若い順に雄 2 例を選び、飼育期間終了時に微生物モニタリング検査に用いた。その他の残余雄および残余雌は、投与開始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、動物番号、交尾成立日(雌のみ)および分娩日(雌のみ)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 °C(実測値: 21~24 °C)、湿度 40~70%(実測値: 49~62%)、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)で飼育した。

検疫・馴化期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。ただし、交配はステンレス製懸垂式ケージ内で行った。母動物は、妊娠 18 日以降オートクレーブ処理した床敷(サンフレーク, 日本チャールス・リバー株式会社)を入れたプラスチック製ケージ(W: 310×D: 360×H: 175 mm)で個別飼育し、自然分娩および哺育させた。ケージの受け皿、給水瓶およびプラスチック製ケージの交換は 1 週間に 2 回以上、ステンレス製懸垂式ケージ、ステンレス製五連ケージおよび給餌器の交換は 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。

飼育期間終了時に採血したモニタリング動物の血清検査において、感染を示唆するような異常はみられなかった。

床敷の微量金属および汚染物質の分析結果は、ほぼ6ヵ月ごとに財団法人日本食品分析センターで実施した成績を日本チャールス・リバー株式会社から入手した。その分析結果は、試験施設で定めた基準値の範囲内であった。

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、雌雄とも、投与終了日の夕刻(午後4時)から剖検時まで絶食した。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から入手した。

飲料水は、水道水を給水瓶を用いて自由に摂取させた。飲料水の水質検査結果は、ほぼ6ヵ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, 投与量および投与期間

4.1 投与経路および投与方法

硫酸第一鉄・七水和物は、継続して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、雄では投与日あるいは投与日には最も近い測定日の体重を基準とし、5 mL/kg で算出した。雌では、交配前および交配期間中には投与日あるいは投与日に最も近い測定日の体重を、妊娠期間中には妊娠0, 7, 14 および21日の体重を、授乳期間中には哺育0日の体重を基準とし、5 mL/kg で算出した。投与時刻は午前9時24分～11時59分の間で、投与回数は1日1回とした。

投与開始日の週齢は雌雄とも10週齢であり、体重範囲は雄が341～383 g, 雌が222～255 gであった。

4.2 群構成および投与量

群構成は、以下に示した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。各群の動物数は、雌雄各12例とした。

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)	12(M01101～M01112)	12(F01151～F01162)
第2群	硫酸第一鉄・ 七水和物	30 mg/kg (6 mg/mL)	12(M02201～M02212)	12(F02251～F02262)
第3群	硫酸第一鉄・ 七水和物	100 mg/kg (20 mg/mL)	12(M03301～M03312)	12(F03351～F03362)
第4群	硫酸第一鉄・ 七水和物	300 mg/kg (60 mg/mL)	12(M04401～M04412)	12(F04451～F04462)
第5群	硫酸第一鉄・ 七水和物	1000 mg/kg (200 mg/mL)	12(M05501～M05512)	12(F05551～F05562)

投与量は、雄ラットを用いた2週間経口投与による予備試験²⁾(投与段階: 0, 125, 250, 500 および 1000 mg/kg)の結果により決定した。すなわち、250 mg/kg 以上の群で腺胃粘膜の暗赤色化、500 mg/kg 以上の群で流涎および腺胃粘膜の肥厚、1000 mg/kg 群で摂餌量の低値および体重の低値傾向がみられた。そこで、当試験の投与量は、1000 mg/kg を最高用量とし、以下公比約3により300, 100 および 30 mg/kg とした。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。

4.3 投与期間

投与期間は、OECD Guideline for Testing of Chemicals for Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test に従って、雄では交配前14日間とその後35日間の合計49日間とし、雌では交配前14日間、交配期間中(最長5日間)、妊娠期間中および哺育5日までの合計42～47日間とした。なお、投与開始日を投与1日とした。

5. 観察および検査項目

5.1 一般状態

一般状態および死亡の有無は、投与前・後の1日2回(ただし、剖検日は剖検前1回)観察した。

死亡例は、発見後速やかに剖検し、心臓、肺、気管、肝臓、脾臓、唾液腺(舌下腺・顎下腺)、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、胸腺、脾臓、リンパ節(下顎・腸間膜)、腎臓、膀胱、精巣、精巣上体、精囊、前立腺、卵巣、子宮、腔、下垂体、副腎、甲状腺、上皮小体、脳(大脳・小脳・延髄)、脊髄、坐骨神経、眼球、ハーダー腺、骨髓(胸骨・大腿骨)、骨(胸骨・大腿骨)および乳腺(雌のみ)を20%中性緩衝ホルマリンで固定した。ただし、精巣および精

巢上体はブアン液で 2~3 時間固定後 90%アルコールに再固定し、眼球はグルタルアルデヒド・ホルマリンで 1 晩固定後 20%中性緩衝ホルマリンに再固定した。

5.2 体重測定

雄の体重は、1 週間に 2 回測定した(測定日：投与 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25, 29, 32, 36, 39, 43, 46, 49 日および剖検日)。

雌の体重は、交配開始前 14 日間および交配期間中は 1 週間に 2 回(測定日：投与 1, 4, 8, 11, 15 および 18 日)、妊娠期間中は妊娠 0, 7, 14 および 21 日に、哺育期間中は哺育 0 および 4 日にそれぞれ測定した。

5.3 摂餌量測定

雄の摂餌量は、交配開始前 14 日間および交配期間終了後から 1 週間に 2 回測定した(残量測定日：投与 3, 6, 10, 13, 24, 27, 31, 34, 38, 41, 45 および 48 日)。

雌の摂餌量は、交配開始前 14 日間までは 1 週間に 2 回測定した(残量測定日：投与 3, 6, 10 および 13 日)。また、妊娠期間中は妊娠 2, 9, 16 および 21 日に、哺育期間中は哺育 4 日に測定した。

5.4 尿検査

各群雌雄各 6 例(動物番号の若い順、雌は分娩動物)について、投与期間終了前に採尿ケージを用いて絶食・給水下で新鮮尿を採取した。その後、引き続いて給餌・給水下で 24 時間尿を採取した。採取した尿について、以下の検査を実施した。なお、検査後の尿は廃棄した。

新鮮尿：色調は、外観判定とした。pH, 蛋白質, ブドウ糖, ケトン体, ビリルビン, 潜血, ウロビリノーゲンは、尿検査試験紙(ウロペーパー II 栄研 7, 栄研化学株式会社)に尿を滴下後に尿自動分析装置(US-2100, 栄研化学株式会社)を用いて検査した。尿沈渣は、沈渣を尿沈渣染色液(Sternheimer 変法, 和光純薬工業株式会社)で染色後に顕微鏡下で観察した。なお、採尿は、当日の検体投与前に行った。

24 時間尿：尿量(UV)は、比重と重量から算出した。比重(S.G.)は、屈折率により屈折型尿比重計(ユリベット-IID, 株式会社ニコン)を用いて測定した。

5.5 血液学検査

尿検査を実施した各群雌雄各 6 例について、最終投与の翌日(雄は投与 50 日、雌は哺育 6 日)にベントバルビタールナトリウムの腹腔内投与(40 mg/kg)による麻酔下で腹大動脈からカニュレーションにより血液を採取し、以下の血液学検査を実施した。なお、測定後の残余血液は廃棄した。

赤血球数(RBC)、ヘモグロビン量(HGB)、ヘマトクリット値(HCT)、血小板数(PLT)および白血球数(WBC)は、EDTA-2K 処理した血液について、多項目自動血球計数装置(Sysmex K-4500, シスメックス株式会社)を用いて測定した。さらに、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)および平均赤血球血色素濃度(MCHC)を算出した。

網状赤血球比率(RET)は、EDTA-2K 処理した血液を Brecher 法により超生体染色してスライドガラスに塗抹後、Giemsa 染色標本を作製して顕微鏡下で赤血球 1000 個中の網状赤血球数を計数し、算出した。

白血球百分率は、EDTA-2K 処理した血液をスライドガラスに塗抹し、May-Giemsa 染色標本を作製して顕微鏡下で白血球 100 個を分類計数した。

プロトロンビン時間(PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)およびフィブリノーゲン(FIB)は、3.13%クエン酸ナトリウムで処理後、遠心分離(約 4℃, 3000 rpm, 15 分間)して得た血漿について、散乱光検出方式により血液凝固分析装置(コアグマスター II, 三共株式会社)を用いて測定した。

5.6 血液生化学検査

血液学検査を実施した各群雌雄各 6 例について、血液学検査用の血液と同時期に腹大動脈から採取した血液から遠心分離(約 4℃, 3000 rpm, 15 分間)して得た血清を用いて以下の血液生化学検査を実施した。測定用の血清は測定時までは冷凍庫(-80℃)内に保存し、保存用血清は最終報告書提出時まで冷凍庫(-80℃)内に保存した。

AST は MDH-UV 法, ALT は LDH-UV 法, ALP は p-ニトロフェニルリン酸基質法, γ -GTP は L- γ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法, 総蛋白(TP)は Biuret 法, 総ビリルビン(T-Bil)は安定化ジアゾニウム塩法, 尿素窒素(UN)はウレアーゼ・G1DH 法, クレアチニン(CRE)はクレアチナーゼ・F-DAOS 法, ブドウ糖(Glu)はヘキソキナーゼ・G-6-PDH 法, 総コレステロール(T-Cho)は COD-HDAOS 法, トリグリセライド(TG)は GPO-HDAOS 法, Ca は o-CPC 法, 無機リン(IP)は PNP・XDH 法 Fe はバソフェナントロリン直接法, Na, K および Cl はイオン選択電極法により, いずれも生化学自動分析装置(AU 400, オリンパス光学工業株式会社)を用いて測定した。

アルブミン量(ALB)は総蛋白値および蛋白分画値[電気泳動法, 自動電気泳動装置(AES 310, オリンパス光学工業株式会社)]から, A/G(アルブミン/グロブリン)は蛋白分画値から算出した。

5.7 剖検および器官重量測定

上記の血液学検査および血液生化学検査の項で採血した各群雌雄各 6 例ならびに血液学検査および血液生化学検査に用いなかった各群雌雄各 6 例は, 最終投与の翌日(雄は投与 50 日, 雌は哺育 6 日)にペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与(40 mg/kg)による麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検した。脳(大脳, 小脳, 延髄), 下垂体, 甲状腺, 胸腺, 心臓, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 副腎, 精巣, 精巣上体, 卵巣および子宮は重量を測定した。なお, 各器官重量を最終体重で除して相対重量も算出した。ただし, 下垂体および甲状腺重量は, 20%中性緩衝ホルマリンで 1 晩固定後測定した。これらの器官は, 肺, 気管, 膵臓, 唾液腺(舌下腺・顎下腺), 食道, 胃, 十二指腸, 空腸, 回腸, 盲腸, 結腸, 直腸, リンパ節(下顎・腸間膜), 膀胱, 精囊, 前立腺, 睪, 上皮小体, 脊髄, 坐骨神経, 眼球, ハーダー腺, 骨髓(胸骨・大腿骨), 骨(胸骨・大腿骨)および乳腺(雌のみ)とともに 20%中性緩衝ホルマリンで固定した。ただし, 精巣および精巣上体はブアン液で 2~3 時間固定後 90%アルコールに再固定し, 眼球はグルタールアルデヒ

ド・ホルマリンで1晩固定後20%中性緩衝ホルマリンに再固定した。

分娩しなかった雌は、交尾後25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剖検し、妊娠黄体数および着床数を数えた。脳(大腦、小脳、延髄)、下垂体、甲状腺、胸腺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、卵巢、肺、気管、膵臓、唾液腺(舌下腺・顎下腺)、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、リンパ節(下顎・腸間膜)、膀胱、子宮、腔、上皮小体、脊髓、坐骨神経、眼球、ハーダー腺、骨髓(胸骨・大腿骨)、骨(胸骨・大腿骨)および乳腺は20%中性緩衝ホルマリンで固定した。ただし、眼球はグルタルアルデヒド・ホルマリンで1晩固定後20%中性緩衝ホルマリンに再固定した。

5.8 病理組織学検査

上記の血液学検査および血液生化学検査の項で採血した動物の以下の器官・組織について、常法に従ってパラフィン包埋標本を作製した。

対照群および1000 mg/kg 群(死亡例を含む)について、心臓、肺、気管、肝臓、膵臓、唾液腺(舌下腺・顎下腺)、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、胸腺、脾臓、リンパ節(下顎・腸間膜)、腎臓、膀胱、精巣、精巣上体、精囊、前立腺、卵巢、子宮、腔、下垂体、副腎、甲状腺、上皮小体(検査可能な動物のみ)、脳(大腦・小脳・延髄)、脊髓、坐骨神経、眼球、ハーダー腺、骨髓(胸骨・大腿骨)、骨(胸骨・大腿骨)および乳腺のHE染色組織標本を作製し、病理組織学検査を実施した。

1000 mg/kg 群の検査において対照群と比べて異常を示す動物数に差があると考えられた組織(雄の胃および胸腺、雌雄の肝臓、脾臓、腎臓および骨髓)については、30、100 および 300 mg/kg 群の組織についても同様に検査した。剖検時に異常が認められた1000 mg/kg 群の1例(No.M05512)の精巣および精巣上体についても、同様に検査した。

1000 mg/kg 群の雌雄の病理組織学検査において、肝臓に認められた黄褐色色素を特定するために肝臓組織標本の胆汁染色、鉄染色および消耗性色素染色を実施した。

なお、対照群および1000 mg/kg 群の精巣については、PAS-ヘマトキシリン染色組織標本も作製したが、これらの標本について鏡検の必要を認めなかったため、検査に供しなかった。

5.9 親動物の生殖発生

5.9.1 性周期

雌の性周期は、投与開始日から交尾確認日まで毎日1回観察した。なお、発情期が連続2日間にわたって観察された場合は1回と計数した。

5.9.2 交配

14日間投与した雌雄を同一群内で1対1に組み合わせて同居交配した。交配期間は14日を限度として、交尾を確認するまでの連続同居交配とした。

交尾確認は毎朝ほぼ一定時刻に行い、腔垢内に精子または腔栓を確認した雌を交尾成立動物として、その日を妊娠0日として起算した。

5.9.3 分娩状態の観察

交尾雌は自然分娩させ、分娩状態の異常の有無、分娩終了の確認を妊娠 21 日から妊娠 25 日の午前 10 時まで毎日行った。午前 10 時に分娩が終了していた場合、その日を哺育 0 日とした。

5.9.4 哺育状態の観察

母動物は、哺育状態を哺育 4 日まで毎日観察した。

5.10 児動物(F₁)

5.10.1 出産時の観察

出産時に総出産児数と性、死産児数、新生児数および外表異常の有無を観察した。死産児は、20%中性緩衝ホルマリンで固定し、10%中性緩衝ホルマリンに保存した。

5.10.2 児動物の観察

児動物は、一般状態および死亡の有無を毎日 1 回観察した。死亡児は、剖検後 20%中性緩衝ホルマリンで固定し、10%中性緩衝ホルマリンに保存した。

5.10.3 体重測定

体重は、哺育 0 日(出生日)および 4 日に測定した。

5.10.4 剖検

生存児は、哺育 4 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剖検した。

6.統計解析

有意差検定は以下に示したように、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。児動物の体重は一腹の平均値と合計値も算出した。不受胎雌の交尾後の一般状態、体重および摂餌量は集計から除外した。また、妊娠期間中に死亡した 1000 mg/kg 群の 1 例(No. F05556)は、出産率の集計には用いなかった。

〈検定方法〉

体重(親動物、児動物)、摂餌量、尿量、尿比重、血液学検査、血液生化学検査、器官の絶対重量および相対重量、発情回数、交尾所要日数、妊娠期間[分娩日(哺育 0 日)－交尾確認日]、妊娠黄体数、着床数、着床率[(着床数/妊娠黄体数)× 100]、総出産児数(新生児数＋死産児数)、新生児数、死産児数、分娩率[(総出産児数/着床数)× 100]、児の産出率[(哺育 0 日の新生児数/着床数)× 100]、出生率[(哺育 0 日の新生児数/総出産児数)× 100]、哺育 4 日の生存児数、哺育 4 日の生存率[(哺育 4 日の生存児数/哺育 0 日の新生児数)× 100]、外表異常の出現率[(外表異常児数/新生児数)× 100] および性比(雄/雌)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 法により行った。一方、等分散と認められなかった場合は、順位を利用した Dunnett 型の検定法により行った。

交尾率 [(交尾成立動物数/同居動物数) × 100] , 受胎率 [(受胎雌数/交尾成立動物数) × 100] および出産率 [(新生児出産雌数/受胎雌数) × 100] は, χ^2 検定により行った。

なお, 病理組織学検査において, 1000 mg/kg 群の雌雄で毒性学的影響が示唆され他の用量群についても検査を実施した雄の胃, 雌雄の肝臓, 脾臓および腎臓の所見については, 対照群との群間比較を上記の順位を利用した Dunnett 型の検定法を用いて行った。

結果

I. 反復投与毒性

1. 一般状態

1.1 雄(Table 1-1~1-4, Appendix 1-1~1-5)

死亡および瀕死例は, 対照群, 30, 100 および 300 mg/kg 群では認められなかった。1000 mg/kg 群では, 1 例(No.M05507)が投与 27 日に死亡した。

一般状態において, 対照群, 30 および 100 mg/kg 群では異常はみられなかった。300 mg/kg 群では, 投与 5 日以降の投与直後に一過性の流涎が 12 例全例にみられた。1000 mg/kg 群の死亡例では, 投与直後に一過性の流涎がみられたのみであった。1000 mg/kg 群の生存例では, 投与直後に一過性の流涎が 11 例全例および肛門周囲の汚れおよび軟便が 1 例にみられた。

1.2 雌(Table 2-1 および 2-2, 3-1 および 3-2, 4, Appendix 2-1~2-5, 3-1~3-5 および 4-1~4-5)

死亡および瀕死例は, 対照群, 30, 100 および 300 mg/kg 群では認められなかった。1000 mg/kg 群では, 1 例(No. F05556)が妊娠 19 日に死亡した。

一般状態において, 対照群, 30 および 100 mg/kg 群では異常はみられなかった。300 mg/kg 群では, 投与 11 日以降の投与直後に一過性の流涎が 12 例全例にみられた。1000 mg/kg 群の死亡例では, 投与直後に一過性の流涎がみられたのみであった。1000 mg/kg 群の生存例では, 投与直後に一過性の流涎が 11 例全例にみられた。

2. 体重

2.1 雄(Table 5, Fig.2, Appendix 5-1~5-5)

30, 100 および 300 mg/kg 群では, 対照群と比べて各測定日の体重に有意差はみられなかった。1000 mg/kg 群では, 対照群と比べて投与 11~49 日に体重の有意な低値がみられた。

2.2 雌(Table 6~8, Fig.3 および 4, Appendix 6-1~6-5, 7-1~7-5 および 8-1~8-5)

交配開始前および交配期間中には, 各投与群とも対照群と比べて各測定日の体重に有意差はみられなかった。

妊娠期間中には, 30, 100 および 300 mg/kg 群では対照群と比べて各測定日の体重に有意差はみられなかった。1000 mg/kg 群では, 対照群と比べて有意差はないものの妊娠 21 日に体重

の低値傾向がみられた。

哺育期間中には、各投与群とも対照群と比べて各測定日の体重に有意差はみられなかった。

3. 摂餌量

3.1 雄(Table 9, Fig.5, Appendix 9-1~9-5)

30, 100 および 300 mg/kg 群では、対照群と比べて各測定日の摂餌量に有意差はみられなかった。1000 mg/kg 群では、対照群と比べて投与 3 日に摂餌量の有意な低値がみられた。

3.2 雌(Table 10~12, Fig.6 および 7, Appendix 10-1~10-5, 11-1~11-5 および 12-1~12-5)

交配開始前には、30, 100 および 300 mg/kg 群では対照群と比べて各測定日の摂餌量に有意差はみられなかった。1000 mg/kg 群では、対照群と比べて投与 3 日に摂餌量の有意な低値がみられた。

妊娠期間中および哺育期間中には、各投与群とも対照群と比べて各測定日の摂餌量に有意差はみられなかった。

4. 尿検査

4.1 雄(Table 13-1 および 13-2, Appendix 13-1~13-5)

30, 100 および 300 mg/kg 群では、対照群と比べて尿量および比重に有意差はみられなかった。1000 mg/kg 群では、対照群と比べて尿量の有意な高値および比重の有意な低値がみられた。

色調, pH, 蛋白質, ブドウ糖, ケトン体, ビリルビン, 潜血, ウロビリノーゲンおよび沈渣は、各投与群とも対照群とほぼ同程度であった。

4.2 雌(Table 14-1 および 14-2, Appendix 14-1~14-5)

各投与群とも、対照群と比べて尿量および比重に有意差はみられなかった。

色調, pH, 蛋白質, ブドウ糖, ケトン体, ビリルビン, 潜血, ウロビリノーゲンおよび沈渣は、各投与群とも対照群とほぼ同程度であった。

5. 血液学検査

5.1 雄(Table 15, Appendix 15-1~15-5)

30 および 100 mg/kg 群では、対照群と比べて各測定項目に有意差はみられなかった。1000 mg/kg 群では、対照群と比べて赤血球数および APTT の有意な低値, MCV, MCH および網状赤血球の有意な高値がみられた。

その他、300 mg/kg 群では対照群と比べて MCH の有意な高値がみられたが、これは対照群と比べて軽度な差であること、赤血球数に差が認められないことから、毒性学的影響とは考えられない。

5.2 雌(Table 16, Appendix 16-1~16-5)

100 および 300 mg/kg 群では、対照群と比べて各測定項目に有意差はみられなかった。1000

mg/kg 群では、対照群と比べてヘモグロビンの有意な高値がみられた。また、30 および 1000 mg/kg 群では対照群と比べて MCV および MCH の有意な高値がみられた。しかし、これらの変化は対照群と比べて軽度な差であること、赤血球数に差が認められないことから、毒性学的影響とは考えられない。

6. 血液生化学検査

6.1 雄(Table 17, Appendix 17-1~17-5)

300 mg/kg 群では、対照群と比べて各測定項目に有意差はみられなかった。1000 mg/kg 群では、対照群と比べて総蛋白、アルブミンおよび Ca の有意な低値、ALT、 γ -GTP および A/G の有意な高値がみられた。

その他、30 および 100 mg/kg 群では、対照群と比べて総ビリルビンの有意な高値がみられたが、300 および 1000 mg/kg 群で有意差が認められないことから、投与に基づく変化ではないと判断される。

6.2 雌(Table 18, Appendix 18-1~18-5)

300 mg/kg 群では、対照群と比べて無機リンの有意な高値がみられた。1000 mg/kg 群では、対照群と比べて γ -GTP および無機リンの有意な高値がみられた。

その他、30、100 および 300 mg/kg 群では、対照群と比べて ALP の有意な低値がみられたが、1000 mg/kg 群で有意差が認められないことから、投与に基づく変化ではないと判断される。

7. 剖検

7.1 雄(Table 19-1 および 19-2, Appendix 19-1~19-5)

対照群、30 および 300 mg/kg 群では、異常はみられなかった。1000 mg/kg 群では、腺胃粘膜暗赤色斑が 1 例と腺胃粘膜潰瘍が 2 例にみられた。

その他、100 mg/kg 群では脾臓の癒着が 1 例(No.M03304)、1000 mg/kg 群では精巣(右)および精巣上体(右)萎縮が 1 例(No.M05512)みられたが、通常認められるものであり、偶発例と判断される。

死亡例(1000 mg/kg 群:No.M05507)では、副腎の大型化がみられた。

7.2 雌(Table 20-1 および 20-2, Appendix 20-1~20-5)

いずれの群とも、異常はみられなかった。

死亡例(1000 mg/kg 群:No.F05556)では、下垂体腫瘍、胸腺萎縮、肺暗赤色化および副腎の大型化がみられた。

8. 器官重量

8.1 雄(Table 21, Appendix 21-1~21-5)

剖検日の体重において、30、100 および 300 mg/kg 群では対照群と比べて有意差はみられなかった。1000 mg/kg 群では、対照群と比べて体重の有意な低値がみられた。

器官重量において、30 および 100 mg/kg 群では対照群と比べて各器官の絶対重量および相対重量に有意差はみられなかった。1000 mg/kg 群では、対照群と比べて副腎の絶対重量の有意な高値、肝臓および副腎の相対重量の有意な高値がみられた。

その他、300 mg/kg 群では対照群と比べて精巣の絶対重量の有意な高値がみられたが、1000 mg/kg 群では有意差が認められないことから、投与に基づく変化ではないと判断される。また、1000 mg/kg 群では、対照群と比べて下垂体および心臓の絶対重量の有意な低値、脳および精巣の相対重量の有意な高値がみられたが、これらは対照群との体重差に基づく変化と考えられることから、投与に基づくものではないと判断される。

8.2 雌(Table 22, Appendix 22-1~22-5)

剖検日の体重において、いずれの群とも対照群と比べて有意差はみられなかった。

器官重量において、30, 100 および 300 mg/kg 群では対照群と比べて各器官の絶対重量および相対重量に有意差はみられなかった。1000 mg/kg 群では、対照群と比べて肝臓の絶対重量および相対重量の有意な高値がみられた。

その他、1000 mg/kg 群では対照群と比べて子宮の相対重量の有意な高値がみられたが、これは対照群との体重差に基づく変化と考えられることから、投与に基づくものではないと判断される。

9. 病理組織学検査

9.1 雄生存例(Table 23-1 および 23-2, Appendix 23-1~23-5)

胸腺：萎縮が 1000 mg/kg 群で 2 例にみられ、それらの程度はごく軽度であった。

胃：1000 mg/kg 群では、腺胃に潰瘍および糜爛が各 1 例、腺胃粘膜下織に炎症性細胞浸潤が 2 例および出血が 1 例、前胃上皮に空胞化が 1 例にみられた。それらの程度は、潰瘍が中等度、糜爛がごく軽度、炎症性細胞浸潤が軽度あるいは中等度、出血が軽度、空胞化がごく軽度であった。

肝臓(Photo 1)：1000 mg/kg 群では、門脈周囲性の肝細胞に黄褐色色素沈着が 6 例全例、門脈周囲性のクッパー細胞に黄褐色色素沈着が 3 例にみられた。それらの程度は、門脈周囲性の肝細胞における黄褐色色素沈着およびクッパー細胞における黄褐色色素沈着ともごく軽度あるいは軽度であった。なお、門脈周囲性の肝細胞における黄褐色色素沈着は、1000 mg/kg 群で対照群と比べて有意差が認められた。この黄褐色色素は、1000 mg/kg 群の肝臓の特殊染色において、胆汁染色で染まらず、鉄染色では門脈周囲性に軽度あるいは中等度に染まり、消耗性色素染色では門脈周囲性にごく軽度あるいは軽度に染まった。したがって、この黄褐色色素沈着はほとんどが鉄であり、ごく一部に消耗性色素が混在していると考えられる。

脾臓(Photo 2)：対照群では、髄外造血が 2 例および赤脾髄に黄褐色色素沈着が 6 例全例にみられた。30 mg/kg 群では、髄外造血が 1 例および赤脾髄に黄褐色色素沈着が 6 例全例にみられた。100 mg/kg 群では、髄外造血が 2 例および赤脾髄に黄褐色色素沈着が 6 例全例にみられた。300 mg/kg 群では、髄外造血が 5 例および赤脾髄に黄褐色色素沈着が 6 例全例にみられた。1000 mg/kg 群では、髄外造血が 4 例、赤脾髄に黄褐色色素沈着が 6 例全例にみられた。それらの程

度は、髄外造血が対照群、30 および 100 mg/kg 群でごく軽度、300 mg/kg 群でごく軽度あるいは軽度、1000 mg/kg 群でごく軽度～中等度、赤脾髄における黄褐色色素沈着が 30 mg/kg 群でごく軽度、対照群、100 および 300 mg/kg 群でごく軽度あるいは軽度、1000 mg/kg 群で軽度あるいは中等度であった。なお、赤脾髄における黄褐色色素沈着は、1000 mg/kg 群で対照群と比べて有意差が認められた。また、髄外造血は、300 および 1000 mg/kg 群で対照群と比べて例数および程度に差があると考えられる。

腎臓(Photo 3) : 30 mg/kg 群では、尿細管上皮に好塩基性変化が 2 例にみられ、その程度はごく軽度であった。100 mg/kg 群では、尿細管上皮に好塩基性変化が 1 例にみられ、その程度はごく軽度であった。1000 mg/kg 群では、尿細管上皮に好塩基性変化が 4 例にみられ、その程度はごく軽度であった。なお、尿細管上皮に好塩基性変化は、1000 mg/kg 群で対照群と比べて有意差が認められた。

骨髓 : 1000 mg/kg 群では、大腿骨において造血亢進が 1 例にみられ、その程度は軽度であった。

その他の変化として以下に示した所見が得られた。

眼球 : 網膜に異形成が 1000 mg/kg 群で 1 例にみられた。

心臓 : 限局性の組織球浸潤が対照群で 2 例と 1000 mg/kg 群で 1 例にみられた。

肺 : 限局性の泡沫細胞集簇が 1000 mg/kg 群で 2 例にみられた。

肝臓 : 限局性の肝細胞壊死が対照群で 1 例、微小肉芽腫が対照群で 2 例、30 mg/kg 群で 1 例、100 mg/kg 群で 3 例と 1000 mg/kg 群で 3 例、胆管増生が対照群で 3 例、30 mg/kg 群で 2 例、100 mg/kg 群で 1 例、300 mg/kg 群で 4 例と 1000 mg/kg 群で 5 例、リンパ様細胞浸潤が対照群で 4 例、30 mg/kg 群で 5 例、100 mg/kg 群で 2 例、300 mg/kg 群で 4 例と 1000 mg/kg 群で 1 例、小葉中心性のクッパー細胞に黄褐色色素沈着が 100 mg/kg 群で 1 例にみられた。

脾臓 : 小葉萎縮が対照群で 1 例にみられた。

脾臓 : 癒着性の炎症による皮膜における線維化が 100 mg/kg 群で 1 例にみられた。

膀胱 : 上皮出血が対照群で 1 例と 1000 mg/kg 群で 1 例にみられた。

精巣 : 精細管萎縮が 1000 mg/kg 群で 1 例、ライディッヒ細胞の過形成が 1000 mg/kg 群で 1 例、精細管変性が対照群で 1 例と 1000 mg/kg 群で 1 例、精細管に剥離円形精子細胞が対照群で 1 例と 1000 mg/kg 群で 1 例にみられた。

精巣上体 : 管内容の空虚が 1000 mg/kg 群で 1 例にみられた。

前立腺 : リンパ様細胞浸潤が対照群で 3 例と 1000 mg/kg 群で 3 例にみられた。

なお、これらの変化は、対照群でも通常観察される変化であり、また、投与群の変化は対照群の出現頻度と比べて差がないことから、偶発的变化と判断される。

その他には、対照群および 1000 mg/kg 群とも、気管、舌下腺、顎下腺、食道、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、精囊、下垂体、副腎、甲状腺、上皮小体、大脳、小脳、延髄、脊髄、坐骨神経、ハーダー腺および骨に異常はみられなかった。

9.2 雄死亡例(Table 23-3, Appendix 23-6)

1000 mg/kg 群の 1 例(No.M05507)では、各組織に死後変化が中等度に認められたが、その他

に以下の組織学所見が得られた。

心臓：鉍物質沈着がみられ、その程度は軽度であった。

肺：鬱血がみられ、その程度は軽度であった。

肝臓：門脈周囲性の肝細胞に黄褐色色素沈着がみられ、その程度はごく軽度であった。

なお、剖検時に異常が認められた副腎は、死後変化のため所見が得られなかった。

9.3 雌生存例 (Table 24-1, Appendix 24-1～24-5)

肝臓：1000 mg/kg 群では、門脈周囲性の肝細胞に黄褐色色素沈着が6例全例にみられ、その程度はごく軽度であった。なお、門脈周囲性の肝細胞における黄褐色色素沈着は、1000 mg/kg 群で対照群と比べて有意差が認められた。この黄褐色色素は、1000 mg/kg 群の肝臓の特殊染色において、雄と同様に胆汁染色で染まらず、鉄染色では門脈周囲性に軽度あるいは中等度に染まり、消耗性色素染色では門脈周囲性にごく軽度あるいは軽度に染まった。したがって、雄と同様にこの黄褐色色素沈着はほとんどが鉄であり、ごく一部に消耗性色素が混在していると考えられる。

脾臓：対照群では、髓外造血および赤脾髄に黄褐色色素沈着が各6例全例にみられた。30 mg/kg 群では、髓外造血が6例および赤脾髄に黄褐色色素沈着が5例にみられた。100 mg/kg 群では、髓外造血および赤脾髄に黄褐色色素沈着が各6例全例にみられた。300 mg/kg 群では、髓外造血および赤脾髄に黄褐色色素沈着が各6例全例にみられた。1000 mg/kg 群では、髓外造血および赤脾髄に黄褐色色素沈着が各6例全例にみられた。赤脾髄における黄褐色色素沈着の程度は、対照群で軽度、30 mg/kg 群でごく軽度、100 および 300 mg/kg 群でごく軽度あるいは軽度、1000 mg/kg 群で中等度であり、1000 mg/kg 群で対照群と比べて程度に差があると考えられる。しかし、髓外造血の程度は、対照群、100、300 および 1000 mg/kg 群でごく軽度～中等度、30 mg/kg 群で軽度あるいは中等度であり、各投与群とも対照群と比べて程度に差はないと考えられる。

その他の変化として以下に示した所見が得られた。

心臓：限局性の組織球浸潤が対照群で2例にみられた。

肺：限局性の泡沫細胞集簇が対照群で1例と1000 mg/kg 群で1例にみられた。

肝臓：微小肉芽腫が30 mg/kg 群で1例、300 mg/kg 群で1例と1000 mg/kg 群で1例、リンパ様細胞浸潤が対照群で3例、30 mg/kg 群で2例、300 mg/kg 群で1例と1000 mg/kg 群で2例、胆管増生が対照群で3例、30 mg/kg 群で2例、100 mg/kg 群で3例、300 mg/kg 群で3例と1000 mg/kg 群で2例、門脈周囲性の肝細胞空胞化が対照群で1例にみられた。

腎臓：尿管上皮に好塩基性変化が30、300 および 1000 mg/kg 群で各1例、リンパ様細胞浸潤が対照群、100 および 300 mg/kg 群で各1例にみられた。

膀胱：潰瘍が1000 mg/kg 群で1例にみられた。

下垂体：前葉に嚢胞が対照群で1例にみられた。

なお、これらの変化は、対照群でも通常観察される変化であり、また、投与群の変化は対照群の出現頻度と比べて差がないことから、偶発的变化と判断される。

その他には、対照群および1000 mg/kg 群とも、気管、脾臓、舌下腺、顎下腺、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、胸腺、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、卵巣、子宮、

腔、副腎、甲状腺、上皮小体、大脳、小脳、延髄、脊髄、坐骨神経、ハーダー腺、骨、骨髓および乳腺に異常はみられなかった。

9.4 雌死亡例(Table 24-2, Appendix 24-6)

1000 mg/kg 群の 1 例(No.M05556)では、各組織に死後変化が高度に認められたが、その他に以下の組織学所見が得られた。

肺：鬱血および水腫がみられ、それらの程度はいずれも軽度であった。

肝臓：鉍物質沈着がみられ、その程度はごく軽度であった。

なお、剖検時に異常が認められた下垂体、胸腺および副腎は、死後変化のため所見が得られなかった。

II. 生殖発生毒性

1. 親動物の生殖発生

1.1 発情回数(Table 25, Appendix 25-1~25-5)

交配開始前の投与期間(14 日間)の発情回数は、各投与群とも対照群と比べて有意差はみられなかった。

1.2 交尾所要日数、交尾率、受胎雌数および受胎率(Table 25, Appendix 25-1~25-5)

未交尾の組み合わせは、いずれの群にもみられなかった。したがって、交尾率はいずれの群とも 100%であった。交尾所要日数は、各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった。

不受胎雌は、100 mg/kg 群で 2 例にみられた。受胎率は、各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった。

1.3 妊娠期間および分娩状態(Table 26, Appendix 26-1~26-5)

妊娠期間は、各投与群とも対照群と比べて有意差はみられなかった。

分娩状態において、いずれの群とも母動物に異常はみられなかった。

1.4 妊娠黄体数、着床数および着床率(Table 26, Appendix 26-1~26-5)

30 および 300 mg/kg 群では、対照群と比べて妊娠黄体数、着床数および着床率に有意差はみられなかった。100 および 1000 mg/kg 群では、対照群と比べて着床数の有意な低値がみられたが、妊娠黄体数および着床率に有意差は認められなかった。なお、100 および 1000 mg/kg 群の着床数は、当試験施設の背景データ(妊娠雌数:159, 妊娠黄体数:14.7-16.7, 着床数:13.3-15.4, 着床率:88.9-97.5%)の範囲内にあることから、投与に基づくものではないと判断される。

1.5 出産率および哺育状態(Table 26, Appendix 26-1~26-5)

出産率は、いずれの群とも 100%であった。なお、1000 mg/kg 群の 1 母動物(No.F05556)は、妊娠後期に死亡したため出産率の集計から除外した。

哺育状態において、いずれの群とも異常はみられなかった。

2. 児動物(F₁)

2.1 総出産児数, 死産児数, 哺育0日の新生児数, 哺育0日の性比, 分娩率, 児の産出率および出生率(Table 26, Appendix 26-1~26-5)

各投与群とも, 対照群と比べて総出産児数, 死産児数, 哺育0日の新生児数, 哺育0日の性比, 分娩率, 児の産出率および出生率に有意差はみられなかった。

2.2 児動物の一般状態, 哺育4日の生存児数, 哺育4日の性比, 哺育4日の生存率および外表異常(Table 26, Appendix 26-1~26-5)

各投与群とも, 対照群と比べて哺育4日の生存児数, 哺育4日の性比および哺育4日の生存率に有意差はみられなかった。

新生児の外表観察においては, いずれの群とも異常はみられなかった。

児動物の一般状態において, いずれの群とも異常はみられなかった。

2.3 児動物の体重(Table 27, Fig.8, Appendix 27-1~27-5)

各投与群とも, 対照群と比べて哺育0および4日の雌雄平均体重, 哺育0および4日の腹平均体重, 哺育0および4日の腹合計体重に有意差はみられなかった。

2.4 生存児の剖検(Table 28, Appendix 28-1~28-5)

いずれの群とも, 異常はみられなかった。

2.5 死亡児の剖検

いずれの群とも, 異常はみられなかった。

考察

硫酸第一鉄・七水和物のラットを用いる経口投与による反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を行い, 雌雄動物に対する毒性影響を検討するとともに, 性腺機能, 交尾行動, 受胎および分娩などの生殖行動に及ぼす影響について検討した。投与量は, 1000 mg/kg を最高用量とし, 以下公比約3により 300, 100 および 30 mg/kg とした。対照として媒体(注射用水)投与群を設けた。

死亡例は, 1000 mg/kg 群で雌雄各1例にみられた。死亡例では, 一般状態観察において流涎, 剖検において雄で副腎の大型化, 雌で下垂体腫瘍, 胸腺萎縮, 肺暗赤色化および副腎の大型化, 病理組織学的には雄で心臓に鉍物質沈着, 肺に鬱血, 肝臓に門脈周囲性の肝細胞に黄褐色色素沈着, 雌で肺に鬱血および水腫, 肝臓に鉍物質沈着がみられた。したがって, 呼吸器障害あるいは全身状態の悪化による衰弱が死因の一因と考えられるものの主因は明らかではなかった。

一般状態観察では, 流涎が 300 mg/kg 以上の群で雌雄にみられたが, いずれも投与直後に一過性にみられたのみであり, 痙攣などの神経症状あるいは唾液腺の形態学的変化は認められな

いことから、被験物質の刺激性に基づく変化と判断され、毒性症状とはみなさなかった。

体重は、1000 mg/kg 群の雄でほぼ投与期間を通して低値、雌で妊娠後期に低値傾向がみられた。

摂餌量は、1000 mg/kg 群の雌雄で一過性の低値がみられた。

尿検査において、1000 mg/kg 群の雄で尿量の高値および比重の低値がみられたが、雌では投与に起因する変化は認められなかった。

血液学検査において、1000 mg/kg 群の雄で赤血球数および APTT の低値、MCV、MCH および網状赤血球の高値がみられたが、雌では投与に起因する変化は認められなかった。

血液生化学検査において、300 mg/kg 群の雌で無機リンの高値、1000 mg/kg 群の雄で総蛋白、アルブミンおよび Ca の低値ならびに ALT、 γ -GTP および A/G の高値、1000 mg/kg 群の雌で γ -GTP および無機リンの高値がみられた。なお、Ca の低値は、低蛋白に伴う蛋白結合性 Ca の減少に起因する変化と考えられる³⁾。

剖検において、1000 mg/kg 群の雄で腺胃粘膜の暗赤色斑および潰瘍がみられたが、雌では投与に起因する変化は認められなかった。

器官重量において、1000 mg/kg 群の雄で副腎の絶対重量および相対重量の高値、肝臓の相対重量の高値、1000 mg/kg 群の雌で肝臓の絶対重量および相対重量の高値がみられた。

病理組織学検査では、胸腺において 1000 mg/kg 群の雄で萎縮が 2 例にみられた。胃において、1000 mg/kg 群の雄で腺胃に潰瘍および糜爛が各 1 例、腺胃粘膜下織に炎症性細胞浸潤が 2 例および出血が 1 例、前胃上皮に空胞化が 1 例にみられた。肝臓において、1000 mg/kg 群の雄で門脈周囲性の肝細胞に黄褐色色素沈着が 6 例全例、門脈周囲性のクーパー細胞に黄褐色色素沈着が 3 例、1000 mg/kg 群の雌で門脈周囲性の肝細胞に黄褐色色素沈着が 6 例全例にみられた。脾臓において、300 mg/kg 群の雄で髓外造血が 5 例、1000 mg/kg 群の雄で髓外造血が 4 例と赤脾髄に黄褐色色素沈着が 6 例全例、1000 mg/kg 群の雌で赤脾髄に黄褐色色素沈着が 6 例にみられ、これらの程度は対照群に比べて強かった。腎臓において、1000 mg/kg 群の雄で尿細管上皮に好塩基性変化が 4 例にみられた。骨髓において、1000 mg/kg 群の雄で大腿骨に造血亢進が 1 例にみられた。

鉄の長期投与により、鉄吸収の亢進ならびに骨髓機能の亢進が生じるとされている。また、鉄の吸収については、過剰な鉄は消化管での吸収を受けず体外へ排出されるとされており、ある一定濃度までは生体に影響を与えないと考えられる⁴⁾。しかし、極めて多量の鉄を長期間投与した場合には、鉄吸収の調節機構に変化が生じ、消化管粘膜から鉄吸収の亢進が生じることが予想され、その結果、体内鉄量の増加を来し、肝障害および腎障害などを招来する可能性がある⁵⁾。これらのことから、当試験における肝臓の変化は鉄の増加を反映したものと考えられる。血液生化学検査において、雌では明らかではないが、雄では肝臓に関するパラメータ(ALT、 γ -GTP、総蛋白、A/G)の変動とも関連していると考えられる。また、雄で認められた腎臓における尿細管上皮の好塩基性変化は、過剰な鉄の関与を示唆している可能性がある。佐藤ら⁶⁾は、塩化第二鉄の亜慢性毒性試験において、鉄染色により示された鉄の沈着はヘモジデリンおよび貯蔵鉄の増加を示すものであり、多血状態から来る血球破壊の亢進についても考慮する必要があると報告している。今回、1000 mg/kg 群の雄で個体差があるものの、貧血

が示唆され、網状赤血球が増加していることから、脾臓における鉄沈着および骨髄における造血亢進はこれに関連する変化と考えられる。

胃の変化については、鉄の急性中毒では消化管潰瘍がみられ、その機序としては粘膜細胞損傷で始まるとの報告がある¹⁾。したがって、今回みられた胃の変化も粘膜に対する鉄の直接的な作用に基づくと考えられる。また、雄において認められた胸腺の萎縮は、その作用機序については不明である。

以上のように、硫酸第一鉄・七水和物の一般毒性学的影響としては肝臓、脾臓、胃、腎臓および骨髄への影響が顕著であった。器官重量で認められた 1000 mg/kg 群の雄の副腎の絶対重量および相対重量の高値は、病理組織学影響がみられなかったことから、軽微な変化と考えられる。血液生化学検査において 300 mg/kg 以上の群の雌で認められた無機リンの高値は、作用機序は明らかではないものの、投与量に関連していることから、硫酸第一鉄・七水和物の投与に起因した変化と考えられる。

親動物の生殖発生に対しては、前述したように 1000 mg/kg 群でも精巣、精巣上体、精囊、前立腺、卵巣、子宮、膈および乳腺に病理組織学変化は認められなかった。また、発情回数、交尾率、交尾所要日数、受胎率、出産率、分娩状態、哺育状態、妊娠黄体数、着床数、着床率および妊娠期間にも、投与に起因する変化はみられなかった。

したがって、当試験条件下における硫酸第一鉄・七水和物の生殖発生毒性学的な無影響量は、雌雄親動物とも 1000 mg/kg/day と考えられる。

児動物に対しては、総出産児数、死産児数、哺育 0 日の新生児数、哺育 0 日の性比、分娩率、児の産出率、出生率には、投与に起因する変化はみられなかった。一般状態には、投与に起因する変化はみられなかった。哺育 4 日の生存児数、哺育 4 日の性比および哺育 4 日の生存率には、投与に起因する変化はみられなかった。外表観察において、投与に起因する変化はみられなかった。体重には、投与に起因する変化はみられなかった。剖検において、投与に起因する変化はみられなかった。

以上のように、硫酸第一鉄・七水和物の一般毒性学的無影響量は、雄では 300 mg/kg 投与により脾臓に髄外造血の増強が認められ、雌では 300 mg/kg 投与により無機リンの高値が認められたことから雌雄とも 100 mg/kg/day と考えられる。また、生殖発生毒性学的な無影響量は、雌雄とも 1000 mg/kg 投与しても交尾能、受胎能などに影響が認められなかったことから 1000 mg/kg/day と考えられる。児動物では、1000 mg/kg 投与しても生存性および体重などに影響が認められなかったことから 1000 mg/kg/day と考えられる。

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) 古橋忠和ほか：硫酸第一鉄・七水和物のラットを用いる経口投与による反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験の予備試験(試験番号：100520P)(株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所)
- 3) 河合忠，玄番昭夫，屋形稔 編. Laboratory Medicine. 異常値の出るメカニズム. 第2版. 4. 血液化学検査，血清カルシウム. pp. 116-119. 医学書院. 1990.
- 4) 福田英臣，内山充，佐藤哲男 監訳. トキシコロジー I，II. 第3版. 第19章，鉄. pp. 634-636. 同文書院. 1988.
- 5) 島本輝明. 薬理学. p.668. 医学書院. 1964.
- 6) 佐藤秀隆ほか：F344 ラットにおける塩化第二鉄の癌原性試験実施にあたっての予備試験(亜慢性毒性)の成果について. 衛生試験所報告，103:21-28，1985.

Stability of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate in dosing preparations

Test article: Sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate (Lot No. 010205)
 Vehicle: Distilled water for injection
 Date of preparation: April 26, 2001
 Method: Titration
 Date of analysis: April 26, 2001, April 27, 2001
 Storage condition: Stored at room temperature and light-shielded conditions for 6 hours and 24 hours
 Testing facility: Hashima Laboratory, Nihon Bioresearch Inc.

Results

Concentration of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate (mg/mL)	Storage period	Measured concentrations (mg/mL)				Recovery rate (%)	Residual rate to the value immediately after preparation (%)
		1st	2nd	3rd	Mean		
2 (0.2 w/v%)	Immediately after preparation	2.085	2.085	2.085	2.085	104.3	—
	At 6 hours after preparation	2.085	2.085	2.224	2.131	106.6	100.0
	At 24 hours after preparation	2.224	2.224	2.224	2.224	111.2	106.7
20 (2 w/v%)	Immediately after preparation	20.71	20.71	20.71	20.71	103.6	—
	At 6 hours after preparation	20.85	20.85	20.71	20.80	104.0	100.4
	At 24 hours after preparation	20.57	20.43	20.30	20.43	102.2	98.6
200 (20 w/v%)	Immediately after preparation	203.6	205.0	204.3	204.3	102.2	—
	At 6 hours after preparation	204.3	204.3	204.3	204.3	102.2	100.0
	At 24 hours after preparation	203.0	203.0	201.6	202.5	101.3	99.1

The concentration of 2 mg/mL preparation at 24 hours after preparation was without the acceptable range ($100 \pm 10\%$), but those of other preparations were within the acceptable range ($100 \pm 10\%$).

The stability of each preparation was in conformity with the regulation [Residual rate (%) to the value immediately after preparation was 90% or higher].

Deviation from the protocol:

This analysis was conducted according to the protocol and there were no deviations from the protocol during the analysis.

GLP:

This study was conducted in compliance with the OECD Guidelines for Safety Studies on Chemicals (OECD GLP Standards) and the Law Concerning the Examination and Regulation of Manufacture etc. of Chemical Substances.

Concentrations of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate
in dosing preparations

Test article: Sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate (Lot No. 010628)
Vehicle: Distilled water for injection
Date of preparation: August 13, 2001
Method: Titration
Date of analysis: August 13, 2001
Testing facility: Hashima Laboratory, Nihon Bioresearch Inc.

Results

Concentration of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate (mg/mL)	Measured concentrations (mg/mL)				Recovery rate (%)
	1st	2nd	3rd	Mean	
6	6.53	6.39	6.26	6.39	106.5
20	20.16	20.16	20.30	20.21	101.1
60	61.72	60.05	61.16	60.98	101.6
200	199.5	200.2	199.5	199.7	99.9

The concentration of each preparation was within the acceptable range ($100 \pm 10\%$).

Deviation from the protocol:

This analysis was conducted according to the protocol and there were no deviations from the protocol during the analysis.

GLP:

This study was conducted in compliance with the OECD Guidelines for Safety Studies on Chemicals (OECD GLP Standards) and the Law Concerning the Examination and Regulation of Manufacture etc. of Chemical Substances.

Concentrations of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate
in dosing preparations

Test article: Sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate (Lot No. 010903)
Vehicle: Distilled water for injection
Date of preparation: September 30, 2001
Method: Titration
Date of analysis: September 30, 2001
Testing facility: Hashima Laboratory, Nihon Bioresearch Inc.

Results

Concentration of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate (mg/mL)	Measured concentrations (mg/mL)				Recovery rate (%)
	1st	2nd	3rd	Mean	
6	6.53	6.53	6.39	6.48	108.0
20	20.16	20.16	20.43	20.25	101.3
60	62.83	62.28	62.83	62.65	104.4
200	202.3	199.5	203.6	201.8	100.9

The concentration of each preparation was within the acceptable range ($100 \pm 10\%$).

Deviation from the protocol:

This analysis was conducted according to the protocol and there were no deviations from the protocol during the analysis.

GLP:

This study was conducted in compliance with the OECD Guidelines for Safety Studies on Chemicals (OECD GLP Standards) and the Law Concerning the Examination and Regulation of Manufacture etc. of Chemical Substances.

Table 1-1 General signs of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group	mg/kg	Number of males and general signs	Days of administration																									
			1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13	
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Control	0	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate	30	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	100	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	300	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			12	12	12	12	12	12	12	12	11	12	9	12	11	12	11	12	9	12	9	12	8	12	5	12	6	6
	300	Salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	0	1	0	1	0	3	0	3	0	4	0	7	0	6	6
		Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	1000	Number of males Normal	12	12	12	12	12	10	12	8	12	4	12	6	12	6	12	5	12	3	12	3	12	2	12	2	12	2
		Salivation	0	0	0	0	0	2	0	4	0	8	0	6	0	6	0	7	0	9	0	9	0	10	0	10	0	10
		Perianal soil	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Loose stool	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Death	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Pre: Before administration, Post: after administration.

Table 1-2 General signs of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group	mg/kg	Number of males and general signs	Days of administration																									
			14		15		16		17		18		19		20		21		22		23		24		25		26	
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Control	0	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate	30	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12		
	100	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	300	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
		Normal	12	9	12	6	12	7	12	7	12	9	12	7	12	8	12	11	12	12	6	12	7	12	7	12	3	
		Salivation	0	3	0	6	0	5	0	5	0	3	0	5	0	4	0	1	0	0	0	6	0	5	0	5	0	9
	1000	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
		Normal	12	5	12	3	12	3	12	2	12	4	12	2	12	2	12	1	12	1	12	1	12	1	12	1	0	
		Salivation	0	7	0	9	0	9	0	10	0	8	0	10	0	10	0	11	0	11	0	11	0	11	0	11	0	12
		Perianal soil	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Loose stool	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Death	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Pre: Before administration, Post: after administration.

Table 1-3 General signs of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group	mg/kg	Number of males and general signs	Days of administration																											
			27		28		29		30		31		32		33		34		35		36		37		38		39			
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post		
Control	0	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12		
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
sulfuric acid, iron(2+) salt (1:1), heptahydrate	30	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12		
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12		
	100	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12		
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12		
	300	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12		
			12	3	12	7	12	5	12	4	12	4	12	6	12	5	12	1	12	5	12	6	12	5	12	2	12	4		
		Salivation	0	9	0	5	0	7	0	8	0	8	0	6	0	7	0	11	0	7	0	6	0	7	0	10	0	8		
	1000	Number of males Normal	12	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11		
			11	0	11	1	11	0	11	0	11	0	11	1	11	0	10	0	10	0	10	1	10	2	10	0	11	0		
		Salivation	0	11	0	10	0	11	0	11	0	11	0	10	0	11	0	11	0	11	0	10	0	9	0	11	0	11		
		Perianal soil	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0		
		Loose stool	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0		
	Death	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			

Pre: Before administration, Post: after administration.

Table 1-4 General signs of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group	mg/kg	Number of males and general signs	Days of administration																				50
			40		41		42		43		44		45		46		47		48		49		
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	
Control	0	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate	30	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	100	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	300	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
		Normal	12	6	12	8	12	6	12	2	12	2	12	6	12	5	12	5	12	4	12	4	12
		Salivation	0	6	0	4	0	6	0	10	0	10	0	6	0	7	0	7	0	8	0	8	0
	1000	Number of males	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
		Normal	11	2	11	1	11	0	11	1	11	1	11	2	11	2	11	0	11	0	11	0	11
		Salivation	0	9	0	10	0	11	0	10	0	10	0	9	0	9	0	11	0	11	0	11	0
		Perianal soil	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Loose stool	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Death	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Pre: Before administration, Post: after administration.

Table 2-1 General signs of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group	mg/kg	Number of females and general signs	Days of administration																											
			1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13		14	
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Control	0	Number of females Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrat e	30	Number of females Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	100	Number of females Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	300	Number of females Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
		Salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	2
	1000	Number of females Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
			12	12	12	12	12	12	12	9	12	7	12	7	12	6	12	8	12	6	12	6	12	6	12	3	12	3	12	7
		Salivation	0	0	0	0	0	0	0	3	0	5	0	5	0	6	0	4	0	6	0	6	0	6	0	9	0	9	0	5

Pre: Before administration, Post: after administration.

Table 2-2 General signs of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group	mg/kg	Number of females and general signs	Days of administration									
			15*		16		17		18		19	
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Control	0	Number of females	12	12	9	9	5	5	2	2	0	0
		Normal	12	12	9	9	5	5	2	2	-	-
sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate	30	Number of females	12	12	9	9	6	6	4	4	0	0
		Normal	12	12	9	9	6	6	4	4	-	-
	100	Number of females	12	12	10	10	5	5	4	4	0	0
		Normal	12	12	10	10	5	5	4	4	-	-
	300	Number of females	12	12	11	11	6	6	1	1	0	0
		Normal	12	10	11	10	6	5	1	1	-	-
		Salivation	0	2	0	1	0	1	0	0	-	-
	1000	Number of females	12	12	12	12	8	8	4	4	1	1
		Normal	12	5	12	4	8	2	4	1	1	0
		Salivation	0	7	0	8	0	6	0	3	0	1

Pre: Before administration, Post: after administration.

*: Commencement of pairing.

Table 3-1 General signs of dams during pregnancy in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group	mg/kg	Number of dams and general signs	Days of pregnancy																											
			0		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13	
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Control	0	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate	30	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	100	Number of dams	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		Normal	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	300	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
		Normal	12	7	12	9	12	10	12	8	12	10	12	11	12	10	12	11	12	7	12	8	12	9	12	9	12	8	12	7
		Salivation	0	5	0	3	0	2	0	4	0	2	0	1	0	2	0	1	0	5	0	4	0	3	0	3	0	4	0	5
	1000	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
		Normal	12	2	12	2	12	3	12	2	12	3	12	6	12	3	12	4	12	1	12	1	12	1	12	3	12	1	12	1
		Salivation	0	10	0	10	0	9	0	10	0	9	0	6	0	9	0	8	0	11	0	11	0	11	0	9	0	11	0	11
		Death	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Pre: Before administration, Post: after administration.

Table 3-2 General signs of dams during pregnancy in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group	mg/kg	Number of dams and general signs	Days of pregnancy																							
			14		15		16		17		18		19		20		21		22		23		24		25	
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Control	0	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	2	2	0	0	0	0	0	0
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	2	2	-	-	-	-	-	-
sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate	30	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	3	3	0	0	0	0	0	0
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	3	3	-	-	-	-	-	-
	100	Number of dams	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	3	3	0	0	0	0	0	0
		Normal	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	3	3	-	-	-	-	-	-
	300	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	4	4	1	1	0	0	0	0
		Normal	12	4	12	5	12	8	12	7	12	11	12	9	12	8	12	7	4	3	1	0	-	-	-	-
		Salivation	0	8	0	7	0	4	0	5	0	1	0	3	0	4	0	5	0	1	0	1	-	-	-	-
	1000	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	11	11	11	11	11	4	4	0	0	0	0	0	0
		Normal	12	1	12	3	12	1	12	1	12	3	11	3	11	6	11	1	4	3	-	-	-	-	-	-
		Salivation	0	11	0	9	0	11	0	11	0	9	0	8	0	5	0	10	0	1	-	-	-	-	-	-
		Death	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-

Pre: Before administration, Post: after administration.

Table 4 General signs of dams during lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group	mg/kg	Number of dams and general signs	Days after delivery													
			0		1		2		3		4		5		6	
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Control	0	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate	30	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	100	Number of dams	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Normal	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	300	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	9	12	11	12	12	12	11	12	12	12	6	12	
		Salivation	0	3	0	1	0	0	0	1	0	0	0	6	0	
	1000	Number of dams	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
		Normal	11	4	11	1	11	3	11	5	11	1	11	5	11	
		Salivation	0	7	0	10	0	8	0	6	0	10	0	6	0	

Pre: Before administration, Post: after administration.

Table 5 Body weights of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group	Control	sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate			
mg/kg	0	30	100	300	1000
Number of males	12	12	12	12	12
Days of administration					
1	363 ± 12	363 ± 12	364 ± 11	364 ± 11	364 ± 11
4	377 ± 18	377 ± 14	377 ± 13	378 ± 14	364 ± 15
8	395 ± 21	393 ± 17	390 ± 15	391 ± 18	378 ± 22
11	405 ± 26	403 ± 21	396 ± 17	397 ± 21	382 ± 22 *
15	417 ± 29	413 ± 25	406 ± 20	408 ± 22	387 ± 24 *
18	427 ± 30	423 ± 25	415 ± 26	417 ± 24	392 ± 26 **
22	443 ± 33	440 ± 28	431 ± 23	433 ± 24	402 ± 30 **
25	450 ± 33	445 ± 29	437 ± 26	440 ± 25	402 ± 32 **
29	461 ± 32	457 ± 29	446 ± 27	450 ± 28	411 ± 34 ** (11)
32	465 ± 32	464 ± 30	451 ± 26	455 ± 29	415 ± 38 ** (11)
36	476 ± 33	476 ± 32	466 ± 28	468 ± 30	422 ± 43 ** (11)
39	484 ± 33	482 ± 34	474 ± 30	474 ± 32	424 ± 45 ** (11)
43	495 ± 33	494 ± 37	483 ± 33	484 ± 33	435 ± 48 ** (11)
46	501 ± 33	502 ± 38	492 ± 34	492 ± 31	439 ± 52 ** (11)
49	509 ± 32	509 ± 38	501 ± 34	503 ± 34	447 ± 50 ** (11)

Each value shows mean (g) ± S.D.

Figures in parentheses indicate number of males.

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

Table 6 Body weights of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group	Control		sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate				
mg/kg	0		30	100	300	1000	
Number of females	12		12	12	12	12	
Days of administration							
1	239 ±	9	240 ± 9	239 ± 10	239 ± 9	239 ± 8	
4	240 ±	9	242 ± 12	242 ± 7	241 ± 7	240 ± 7	
8	248 ±	11	248 ± 14	249 ± 10	249 ± 7	248 ± 11	
11	257 ±	12	254 ± 13	254 ± 9	253 ± 11	251 ± 10	
15	264 ±	16	260 ± 12	261 ± 11	259 ± 12	256 ± 12	
18	268	(2)	276 ± 13 (4)	275 ± 10 (4)	273 (1)	274 ± 8 (4)	

Each value shows mean (g) ± S.D.

Figures in parentheses indicate number of females.

Table 7 Body weights of dams during pregnancy in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group	Control	sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate				
mg/kg	0	30	100	300	1000	
Number of dams	12	12	10	12	12	
Days of pregnancy						
0	266 ± 14	270 ± 15	266 ± 15	266 ± 12	264 ± 10	
7	305 ± 19	304 ± 14	301 ± 12	299 ± 16	298 ± 14	
14	338 ± 21	339 ± 16	334 ± 14	334 ± 19	332 ± 16	
21	431 ± 23	436 ± 23	425 ± 21	415 ± 28	403 ± 34	(11)

Each value shows mean (g) ± S.D.

Figures in parentheses indicate number of dams.

Table 8 Body weights of dams during lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group	Control	sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate			
mg/kg	0	30	100	300	1000
Number of dams	12	12	10	12	11
Days after delivery					
0	311 ± 21	317 ± 19	311 ± 23	316 ± 22	308 ± 22
4	342 ± 20	346 ± 21	343 ± 15	340 ± 20	327 ± 14

Each value shows mean (g) ± S.D.

Table 9 Food consumption of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group	Control		sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate							
mg/kg	0		30		100		300		1000	
Number of males	12		12		12		12		12	
Days of administration										
3	25 ±	5	24 ±	2	25 ±	3	24 ±	2	20 ±	5 *
6	27 ±	3	26 ±	2	27 ±	2	27 ±	3	25 ±	3
10	25 ±	2	25 ±	3	25 ±	3	25 ±	2	25 ±	3
13	24 ±	2	25 ±	3	24 ±	3	25 ±	2	24 ±	3
24	25 ±	2	25 ±	2	25 ±	3	25 ±	3	23 ±	4
27	25 ±	2	26 ±	2	24 ±	2	25 ±	3	24 ±	3 (11)
31	25 ±	2	26 ±	2	26 ±	2	25 ±	3	25 ±	3 (11)
34	24 ±	2	25 ±	2	25 ±	2	25 ±	2	22 ±	7 (11)
38	24 ±	2	25 ±	3	26 ±	2	24 ±	2	23 ±	4 (11)
41	24 ±	2	25 ±	3	25 ±	3	24 ±	2	26 ±	2 (11)
45	26 ±	2	27 ±	3	27 ±	3	27 ±	3	28 ±	3 (11)
48	26 ±	2	26 ±	2	26 ±	3	27 ±	2	26 ±	5 (11)

Each value shows mean (g/day) ± S.D.

Figures in parentheses indicate number of males.

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

Table 10 Food consumption of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group	Control	sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate			
mg/kg	0	30	100	300	1000
Number of females	12	12	12	12	12
Days of administration					
3	16 ± 1	16 ± 2	15 ± 2	16 ± 2	13 ± 3 *
6	17 ± 2	18 ± 2	17 ± 2	17 ± 1	18 ± 2
10	18 ± 3	18 ± 1	18 ± 2	17 ± 1	18 ± 2
13	18 ± 3	18 ± 2	18 ± 2	18 ± 2	19 ± 2

Each value shows mean (g/day) ± S.D.

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

Table 11 Food consumption of dams during pregnancy in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group	Control		sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate						
mg/kg	0		30	100		300		1000	
Number of dams	12		12	10		12		12	
Days of pregnancy									
2	21 ±	2	22 ±	2	20 ±	2	21 ±	2	23 ± 3
9	24 ±	2	25 ±	2	23 ±	2	23 ±	2	24 ± 3
16	24 ±	2	25 ±	2	23 ±	2	23 ±	2	23 ± 4
21	21 ±	2	22 ±	3	22 ±	3	21 ±	3	20 ± 3 (11)

Each value shows mean (g/day) ± S.D.

Figures in parentheses indicate number of dams.

Table 12 Food consumption of dams during lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group	Control	sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate			
mg/kg	0	30	100	300	1000
Number of dams	12	12	10	12	11
Days after delivery	4	4	5	5	4
	35 ± 4	35 ± 4	35 ± 5	33 ± 5	33 ± 4

Each value shows mean (g/day) ± S.D.

Table 13-1 Urinary examination of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group	Control		sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate			
mg/kg	0		30	100	300	1000
Number of males	6		6	6	6	6
Volume (mL): Mean $\pm$ S.D.	13.4 $\pm$ 3.7		13.2 $\pm$ 3.4	14.6 $\pm$ 2.6	17.6 $\pm$ 6.7	28.7 $\pm$ 8.0 **
Specific gravity: Mean $\pm$ S.D.	1.055 $\pm$ 0.013		1.056 $\pm$ 0.012	1.052 $\pm$ 0.007	1.051 $\pm$ 0.014	1.027 $\pm$ 0.004 **
Color						
Light yellow	6		6	4	5	6
Yellow	0		0	2	1	0
pH						
7.0	0		0	0	1	0
7.5	0		0	0	0	1
8.0	0		0	1	0	1
8.5	2		1	0	0	3
9.0	4		5	5	5	1
Protein						
Negative	0		0	0	0	1
10~20 mg/dL	0		1	1	2	4
30 mg/dL	3		0	4	2	1
100 mg/dL	3		5	1	2	0
Glucose						
Negative	6		6	6	6	6
Ketone body						
Negative	6		6	6	5	6
Slight	0		0	0	1	0
Bilirubin						
Negative	6		6	6	6	6
Occult blood						
Negative	5		4	5	6	4
Trace	1		2	1	0	2
Urobilinogen						
Normal	6		6	6	6	6

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

Table 13-2 Urinary examination of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test
of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group	Control	sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate			
mg/kg	0	30	100	300	1000
Number of males	6	6	6	6	6
Urinary sediments					
Epithelial cells					
0~20 cells/100 fields	5	6	4	6	6
21~100 cells/100 fields	1	0	2	0	0
Erythrocytes					
0~20 cells/100 fields	6	6	6	6	6
Leukocytes					
0~20 cells/100 fields	6	6	6	6	6
Casts					
Not observed	6	6	6	6	6
Crystals					
Not observed	1	3	1	2	2
Observed	5	3	5	4	4

Table 14-1 Urinary examination of dams in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group	Control		sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate							
mg/kg	0		30		100		300		1000	
Number of dams	6		6		6		6		6	
Volume (mL): Mean $\pm$ S.D.	19.2 $\pm$	5.6	20.3 $\pm$	7.4	22.5 $\pm$	4.7	15.3 $\pm$	6.2	16.6 $\pm$	3.6
Specific gravity: Mean $\pm$ S.D.	1.058 $\pm$	0.016	1.054 $\pm$	0.011	1.044 $\pm$	0.015	1.069 $\pm$	0.019	1.068 $\pm$	0.015
Color										
Light yellow	6		4		6		3		4	
Yellow	0		2		0		3		1	
Yellow brown	0		0		0		0		1	
pH										
6.5	0		1		0		0		0	
8.5	1		0		0		0		2	
9.0	5		5		6		6		4	
Protein										
Negative	1		1		2		1		2	
10~20 mg/dL	1		0		2		1		1	
30 mg/dL	2		5		2		1		1	
100 mg/dL	2		0		0		3		2	
Glucose										
Negative	6		6		6		6		6	
Ketone body										
Negative	3		3		5		1		4	
Slight	3		3		1		5		2	
Bilirubin										
Negative	6		6		6		6		6	
Occult blood										
Negative	6		5		6		6		5	
Trace	0		1		0		0		0	
Marked	0		0		0		0		1	
Urobilinogen										
Normal	5		5		6		6		6	
1 mg/dL	1		1		0		0		0	

Table 14-2 Urinary examination of dams in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group	Control	sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate			
mg/kg	0	30	100	300	1000
Number of dams	6	6	6	6	6
Urinary sediments					
Epithelial cells					
0~20 cells/100 fields	5	6	5	5	6
21~100 cells/100 fields	1	0	1	1	0
Erythrocytes					
0~20 cells/100 fields	6	6	6	6	5
≥501 cells/100fields	0	0	0	0	1
Leukocytes					
0~20 cells/100 fields	6	6	6	6	5
21~100 cells/100fields	0	0	0	0	1
Casts					
Not observed	6	6	6	6	6
Crystals					
Not observed	3	3	4	3	5
Observed	3	3	2	3	1

Table 15 Hematological examination of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group		Control		sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate									
mg/kg		0		30		100		300		1000			
Number of males		6		6		6		6		6			
RBC	(10 ¹ /μ L)	839 ±	25	826 ±	29	807 ±	47	798 ±	38	689 ±	113 **		
HGB	(g/dL)	15.3 ±	0.6	15.7 ±	0.5	15.2 ±	0.8	15.4 ±	0.5	14.0 ±	1.7		
HCT	(%)	45.2 ±	1.5	46.3 ±	1.2	44.6 ±	2.5	44.9 ±	1.0	40.8 ±	4.0		
MCV	(fL)	53.9 ±	1.4	56.1 ±	1.7	55.3 ±	0.5	56.3 ±	1.8	60.0 ±	5.5 **		
MCH	(pg)	18.3 ±	0.3	19.1 ±	0.5	18.8 ±	0.3	19.3 ±	0.5 *	20.5 ±	1.4 **		
MCHC	(g/dL)	33.9 ±	0.6	34.0 ±	0.4	34.0 ±	0.7	34.2 ±	0.5	34.3 ±	1.1		
PLT	(10 ⁴ /μ L)	100.3 ±	4.8	102.2 ±	12.6	100.7 ±	8.9	101.1 ±	12.0	119.3 ±	23.7		
RET	(‰)	26 ±	4	28 ±	5	27 ±	3	29 ±	4	65 ±	68 *		
PT	(sec.)	16.8 ±	2.2	17.3 ±	1.6	15.0 ±	1.0	16.8 ±	2.8	14.5 ±	0.8		
APTT	(sec.)	31.6 ±	1.9	32.5 ±	2.0	30.7 ±	2.0	30.2 ±	3.8	25.6 ±	2.3 **		
FIB	(mg/dL)	240 ±	14	232 ±	12	230 ±	6	239 ±	25	240 ±	36		
WBC	(10 ² /μ L)	62 ±	22	60 ±	23	55 ±	11	55 ±	10	90 ±	55		
Differential leukocyte (%)													
Lymphocyte		89.3 ±	3.9	89.5 ±	4.7	91.5 ±	2.3	89.3 ±	1.4	78.3 ±	12.7		
Neutrophil		10.0 ±	3.6	9.7 ±	5.1	7.0 ±	3.2	9.7 ±	2.0	19.8 ±	11.2		
Eosinophil		0.2 ±	0.4	0.2 ±	0.4	0.7 ±	0.8	0.8 ±	0.4	1.2 ±	1.2		
Basophil		0.0 ±	0.0	0.0 ±	0.0	0.0 ±	0.0	0.0 ±	0.0	0.0 ±	0.0		
Monocyte		0.5 ±	0.5	0.7 ±	0.5	0.8 ±	0.4	0.2 ±	0.4	0.7 ±	0.8		

Each value shows mean ± S. D.

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

Table 16 Hematological examination of dams in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group	Control		sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate									
mg/kg	0		30		100		300		1000			
Number of dams	6		6		6		6		6			
RBC	(10 ¹ /μ L)	718 ± 37	692 ± 40	718 ± 29	707 ± 27	710 ± 32						
HGB	(g/dL)	14.1 ± 0.5	14.4 ± 0.4	14.4 ± 0.4	14.3 ± 0.6	14.9 ± 0.6 *						
HCT	(%)	41.7 ± 1.6	42.2 ± 1.2	41.9 ± 1.2	41.3 ± 1.7	42.9 ± 2.1						
MCV	(fL)	58.1 ± 1.7	61.0 ± 2.0 **	58.4 ± 1.3	58.4 ± 1.1	60.4 ± 0.5 *						
MCH	(pg)	19.7 ± 0.7	20.9 ± 0.8 **	20.0 ± 0.5	20.2 ± 0.4	21.0 ± 0.3 **						
MCHC	(g/dL)	33.9 ± 1.0	34.2 ± 0.5	34.3 ± 0.4	34.6 ± 0.4	34.7 ± 0.5						
PLT	(10 ¹ /μ L)	103.2 ± 9.8	91.4 ± 15.0	104.4 ± 6.2	100.0 ± 6.7	100.7 ± 5.7						
RET	(‰)	63 ± 17	65 ± 20	61 ± 12	58 ± 10	66 ± 7						
PT	(sec.)	15.6 ± 0.5	15.9 ± 0.8	15.7 ± 0.3	15.9 ± 0.7	15.3 ± 0.5						
APTT	(sec.)	24.3 ± 1.7	24.1 ± 1.4	23.2 ± 0.7	23.6 ± 1.9	22.6 ± 1.9						
FIB	(mg/dL)	261 ± 37	264 ± 25	297 ± 41	277 ± 53	267 ± 49						
WBC	(10 ² /μ L)	65 ± 28	59 ± 11	60 ± 16	65 ± 20	65 ± 19						
Differential leukocyte (%)												
Lymphocyte		82.3 ± 16.9	86.7 ± 4.1	86.8 ± 4.6	83.3 ± 8.4	87.5 ± 5.2						
Neutrophil		16.2 ± 16.7	12.2 ± 4.2	11.5 ± 3.9	15.2 ± 8.2	10.7 ± 4.8						
Eosinophil		0.5 ± 0.8	0.5 ± 0.5	0.8 ± 0.4	0.7 ± 0.5	1.0 ± 0.9						
Basophil		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0						
Monocyte		1.0 ± 0.9	0.7 ± 0.8	0.8 ± 0.8	0.8 ± 0.4	0.8 ± 0.8						

Each value shows mean ± S.D.

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

Table 17 Blood chemical examination of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group		Control		sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate							
mg/kg		0		30		100		300		1000	
Number of males		6		6		6		6		6	
AST	(IU/L)	90.5 ±	9.6	96.0 ±	14.7	103.9 ±	13.1	96.4 ±	18.6	116.8 ±	30.8
ALT	(IU/L)	30.4 ±	4.7	34.2 ±	7.9	33.9 ±	7.8	29.8 ±	4.3	57.0 ±	27.0 *
ALP	(IU/L)	339.8 ±	60.3	333.4 ±	55.6	370.5 ±	56.9	338.3 ±	62.0	245.5 ±	86.7
γ -GTP	(IU/L)	0.42 ±	0.14	0.49 ±	0.14	0.40 ±	0.16	0.36 ±	0.07	0.71 ±	0.29 *
TP	(g/dL)	5.6 ±	0.3	5.5 ±	0.2	5.5 ±	0.2	5.6 ±	0.2	4.5 ±	0.3 **
Alb	(g/dL)	2.78 ±	0.08	2.75 ±	0.16	2.81 ±	0.15	2.78 ±	0.12	2.35 ±	0.17 **
A/G		0.99 ±	0.06	0.99 ±	0.05	1.03 ±	0.07	1.00 ±	0.05	1.10 ±	0.08 *
T-Bil	(mg/dL)	0.14 ±	0.01	0.18 ±	0.02 *	0.18 ±	0.04 *	0.16 ±	0.02	0.16 ±	0.02
UN	(mg/dL)	17.5 ±	2.3	18.2 ±	2.1	18.5 ±	1.4	18.5 ±	3.8	17.3 ±	3.9
CRE	(mg/dL)	0.31 ±	0.03	0.28 ±	0.03	0.28 ±	0.02	0.29 ±	0.04	0.27 ±	0.03
Glu	(mg/dL)	115.0 ±	6.3	114.0 ±	12.5	106.1 ±	10.1	111.4 ±	5.7	106.8 ±	9.8
T-Cho	(mg/dL)	55.6 ±	13.2	49.2 ±	9.0	67.2 ±	14.2	66.3 ±	19.8	65.4 ±	7.2
TG	(mg/dL)	48.3 ±	10.6	30.1 ±	11.9	37.2 ±	5.7	66.8 ±	16.1	66.4 ±	21.0
Na	(mEq/L)	147.3 ±	3.0	147.0 ±	2.4	146.5 ±	1.7	147.8 ±	1.3	146.8 ±	1.7
K	(mEq/L)	4.49 ±	0.19	4.47 ±	0.18	4.58 ±	0.26	4.57 ±	0.19	4.52 ±	0.28
Cl	(mEq/L)	108.4 ±	2.7	107.5 ±	2.6	107.7 ±	0.8	107.5 ±	1.8	108.1 ±	2.0
Ca	(mg/dL)	9.4 ±	0.4	9.0 ±	0.3	9.2 ±	0.3	9.3 ±	0.4	8.9 ±	0.2 *
IP	(mg/dL)	6.5 ±	0.8	6.9 ±	0.6	7.2 ±	0.8	7.3 ±	1.1	6.4 ±	0.6
Fe	(μ g/dL)	115.7 ±	31.6	125.5 ±	31.1	136.2 ±	10.0	128.8 ±	19.6	139.2 ±	89.0

Each value shows mean ± S.D.

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

Table 18 Blood chemical examination of dams in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group		Control		sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate							
mg/kg		0		30		100		300		1000	
Number of dams		6		6		6		6		6	
AST	(IU/L)	87.6 ±	9.0	98.7 ±	17.7	103.9 ±	21.2	89.9 ±	16.7	92.9 ±	6.3
ALT	(IU/L)	29.5 ±	9.4	30.8 ±	3.4	29.7 ±	8.4	28.0 ±	3.2	34.3 ±	12.6
ALP	(IU/L)	260.5 ±	73.9	181.1 ±	18.2 *	171.1 ±	35.8 **	168.0 ±	37.8 **	195.8 ±	33.5
γ -GTP	(IU/L)	0.57 ±	0.17	0.70 ±	0.16	0.60 ±	0.12	0.70 ±	0.18	1.31 ±	0.85 *
TP	(g/dL)	6.5 ±	0.3	6.4 ±	0.3	6.5 ±	0.2	6.0 ±	0.3	6.1 ±	0.3
Alb	(g/dL)	3.33 ±	0.21	3.25 ±	0.23	3.20 ±	0.22	3.03 ±	0.16	3.14 ±	0.28
A/G		1.06 ±	0.04	1.05 ±	0.10	0.98 ±	0.08	1.01 ±	0.03	1.05 ±	0.12
T-Bil	(mg/dL)	0.13 ±	0.01	0.12 ±	0.02	0.14 ±	0.01	0.12 ±	0.03	0.13 ±	0.03
UN	(mg/dL)	25.8 ±	4.1	27.3 ±	2.7	26.3 ±	2.4	27.4 ±	2.7	25.7 ±	3.7
CRE	(mg/dL)	0.35 ±	0.07	0.34 ±	0.03	0.36 ±	0.03	0.33 ±	0.03	0.32 ±	0.04
Glu	(mg/dL)	117.9 ±	10.8	111.0 ±	8.0	115.8 ±	6.3	122.1 ±	11.7	117.6 ±	10.8
T-Cho	(mg/dL)	79.1 ±	6.7	72.0 ±	10.0	76.3 ±	19.1	70.8 ±	8.1	89.8 ±	11.3
TG	(mg/dL)	34.5 ±	14.8	51.8 ±	21.7	42.5 ±	27.0	36.6 ±	13.3	48.3 ±	6.9
Na	(mEq/L)	143.7 ±	1.2	143.2 ±	2.8	143.9 ±	1.8	143.0 ±	1.1	144.6 ±	2.0
K	(mEq/L)	4.44 ±	0.31	4.29 ±	0.15	4.51 ±	0.31	4.51 ±	0.17	4.35 ±	0.19
Cl	(mEq/L)	104.8 ±	1.5	104.5 ±	2.0	104.5 ±	0.9	103.4 ±	1.3	104.3 ±	1.3
Ca	(mg/dL)	10.7 ±	0.5	10.6 ±	0.5	10.8 ±	0.5	10.5 ±	0.4	10.1 ±	0.2
IP	(mg/dL)	8.9 ±	0.9	9.0 ±	0.7	9.1 ±	0.8	10.1 ±	0.4 *	10.3 ±	0.4 **
Fe	(μ g/dL)	161.8 ±	51.2	163.2 ±	22.2	142.2 ±	46.3	162.8 ±	61.0	162.5 ±	19.8

Each value shows mean ± S.D.

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

Table 19-1 Necropsy findings of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group	Control	sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate			
mg/kg	0	30	100	300	1000
Number of males	12	12	12	12	11
Findings					
Normal	12	12	11	12	7
Stomach					
Dark red spot, glandular mucosa	0	0	0	0	1
Ulcer, glandular mucosa	0	0	0	0	2
Spleen					
Adhesion	0	0	1	0	0
Testis					
Atrophy, right	0	0	0	0	1
Epididymis					
Atrophy, right	0	0	0	0	1

Table 19-2 Necropsy findings of dead male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group	Control	sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate			
mg/kg	0	30	100	300	1000
Number of dead males	0	0	0	0	1
Findings					
Adrenal					
Large in size	-	-	-	-	1

Table 20-1 Necropsy findings of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group	Control	sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate			
mg/kg	0	30	100	300	1000
Number of females	12	12	12	12	11
Findings					
Normal	12	12	12	12	11

Table 20-2 Necropsy findings of dead female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group	Control	sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate			
mg/kg	0	30	100	300	1000
Number of dead females	0	0	0	0	1
Findings					
Pituitary					
Tumor	-	-	-	-	1
Thymus					
Atrophy	-	-	-	-	1
Lung					
Dark red in color	-	-	-	-	1
Adrenal					
Large in size	-	-	-	-	1

Table 21 Organ weights of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group		sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate				
mg/kg		Control				
		0	30	100	300	1000
Number of males		12	12	12	12	11
Body weight	(g)	485 ± 32	483 ± 38	474 ± 31	478 ± 32	426 ± 47 **
Brain	(g)	2.12 ± 0.11	2.07 ± 0.06	2.06 ± 0.05	2.09 ± 0.11	2.09 ± 0.05
	(g%)	0.44 ± 0.03	0.43 ± 0.03	0.44 ± 0.02	0.44 ± 0.03	0.50 ± 0.05 **
Pituitary	(mg)	14.9 ± 1.7	16.4 ± 2.1	15.2 ± 1.7	14.0 ± 1.6	13.0 ± 1.6 *
	(mg%)	3.1 ± 0.4	3.4 ± 0.4	3.2 ± 0.3	3.0 ± 0.3	3.1 ± 0.4
Thyroids	(mg)	21.6 ± 3.7	21.4 ± 3.0	21.9 ± 3.5	19.5 ± 3.0	18.6 ± 3.8
	(mg%)	4.5 ± 0.9	4.5 ± 0.6	4.6 ± 0.8	4.1 ± 0.6	4.4 ± 0.6
Thymus	(mg)	262.6 ± 51.9	313.6 ± 86.2	296.4 ± 68.8	298.4 ± 43.9	220.3 ± 82.8
	(mg%)	54.4 ± 11.3	65.1 ± 17.2	62.4 ± 13.3	62.9 ± 10.8	51.0 ± 17.1
Heart	(g)	1.40 ± 0.12	1.41 ± 0.12	1.46 ± 0.08	1.41 ± 0.12	1.27 ± 0.14 *
	(g%)	0.29 ± 0.02	0.29 ± 0.03	0.31 ± 0.02	0.30 ± 0.03	0.30 ± 0.02
Liver	(g)	12.28 ± 1.09	11.93 ± 1.49	12.16 ± 1.64	12.66 ± 1.25	12.51 ± 1.29
	(g%)	2.53 ± 0.12	2.47 ± 0.19	2.56 ± 0.21	2.65 ± 0.16	2.96 ± 0.33 **
Spleen	(g)	0.81 ± 0.12	0.80 ± 0.11	0.86 ± 0.25	0.81 ± 0.09	0.74 ± 0.15
	(g%)	0.17 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.18 ± 0.05	0.17 ± 0.02	0.17 ± 0.04
Kidneys	(g)	3.11 ± 0.23	3.11 ± 0.63	3.17 ± 0.19	3.05 ± 0.24	2.96 ± 0.34
	(g%)	0.64 ± 0.07	0.64 ± 0.11	0.67 ± 0.04	0.64 ± 0.05	0.70 ± 0.03
Adrenals	(mg)	53.3 ± 7.0	57.3 ± 9.0	53.4 ± 7.0	55.4 ± 6.5	66.6 ± 9.3 **
	(mg%)	11.0 ± 1.5	11.9 ± 2.0	11.3 ± 1.6	11.6 ± 1.6	15.9 ± 3.3 **
Testes	(g)	3.16 ± 0.17	3.30 ± 0.35	3.30 ± 0.18	3.45 ± 0.26 *	3.26 ± 0.41
	(g%)	0.65 ± 0.05	0.69 ± 0.07	0.70 ± 0.05	0.72 ± 0.06	0.77 ± 0.12 **
Epididymides	(g)	1.28 ± 0.07	1.29 ± 0.14	1.25 ± 0.10	1.30 ± 0.08	1.21 ± 0.14
	(g%)	0.26 ± 0.02	0.27 ± 0.04	0.27 ± 0.03	0.27 ± 0.03	0.29 ± 0.04

Each value shows mean ± S.D.

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

Table 22 Organ weights of dams in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group		Control	sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate			
mg/kg		0	30	100	300	1000
Number of dams		12	12	10	12	11
Body weight	(g)	302 ± 21	306 ± 14	302 ± 17	301 ± 17	293 ± 14
Brain	(g)	1.95 ± 0.06	1.97 ± 0.05	1.95 ± 0.10	1.97 ± 0.10	1.94 ± 0.11
	(g%)	0.65 ± 0.04	0.64 ± 0.04	0.65 ± 0.03	0.66 ± 0.04	0.66 ± 0.05
Pituitary	(mg)	19.0 ± 2.7	18.5 ± 2.8	18.2 ± 2.2	19.3 ± 2.6	17.8 ± 2.7
	(mg%)	6.3 ± 0.9	6.0 ± 0.9	6.1 ± 0.9	6.4 ± 0.8	6.1 ± 1.1
Thyroids	(mg)	15.9 ± 2.1	18.5 ± 2.8	17.7 ± 4.8	17.4 ± 2.2	17.6 ± 3.6
	(mg%)	5.3 ± 0.7	6.0 ± 0.8	5.9 ± 1.4	5.8 ± 0.9	6.0 ± 1.2
Thymus	(mg)	250.5 ± 63.0	290.1 ± 86.2	252.9 ± 64.2	246.6 ± 79.9	226.6 ± 54.0
	(mg%)	83.4 ± 21.6	95.0 ± 28.7	83.4 ± 18.7	81.9 ± 27.2	77.0 ± 16.4
Heart	(g)	1.03 ± 0.07	1.06 ± 0.06	1.01 ± 0.08	1.04 ± 0.08	1.02 ± 0.06
	(g%)	0.34 ± 0.03	0.35 ± 0.02	0.34 ± 0.02	0.34 ± 0.03	0.35 ± 0.02
Liver	(g)	10.62 ± 1.14	10.76 ± 0.65	10.76 ± 1.23	10.63 ± 0.83	11.89 ± 1.20 *
	(g%)	3.52 ± 0.21	3.52 ± 0.19	3.56 ± 0.29	3.54 ± 0.23	4.06 ± 0.37 **
Spleen	(g)	0.72 ± 0.11	0.74 ± 0.10	0.71 ± 0.11	0.77 ± 0.10	0.71 ± 0.07
	(g%)	0.24 ± 0.03	0.24 ± 0.03	0.23 ± 0.03	0.26 ± 0.04	0.24 ± 0.02
Kidneys	(g)	2.19 ± 0.22	2.20 ± 0.18	2.13 ± 0.17	2.17 ± 0.16	2.18 ± 0.15
	(g%)	0.73 ± 0.06	0.72 ± 0.05	0.71 ± 0.05	0.72 ± 0.04	0.75 ± 0.07
Adrenals	(mg)	77.7 ± 9.9	76.6 ± 10.0	72.5 ± 9.6	74.3 ± 9.1	78.5 ± 10.9
	(mg%)	25.7 ± 2.6	25.0 ± 2.7	24.0 ± 2.1	24.8 ± 3.5	26.9 ± 4.1
Ovaries	(mg)	104.3 ± 12.1	99.1 ± 11.6	95.4 ± 10.5	98.7 ± 18.4	104.5 ± 13.2
	(mg%)	34.6 ± 3.7	32.4 ± 3.8	31.6 ± 3.1	32.8 ± 6.0	35.8 ± 5.4
Uterus	(g)	0.57 ± 0.05	0.61 ± 0.08	0.55 ± 0.08	0.59 ± 0.09	0.64 ± 0.11
	(g%)	0.19 ± 0.02	0.20 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.20 ± 0.03	0.22 ± 0.04 *

Each value shows mean ± S.D.

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

Table 23-1 Histopathological findings of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group	Control						sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate																								
mg/kg	0						30						100						300						1000						
Grade	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+	
Findings																															
Eyeball	[6]	c)																							[6]						
Dysplasia, retina	6	0																							5	1	0	1	0	0	
Thymus	[6]						[6]						[6]						[6]						[6]						
Atrophy	6	0					6	0					6	0					6	0					4	2	2	0	0	0	
Heart	[6]																								[6]						
Cellular infiltration, histiocyte, focal	4	2	2	0	0	0																			5	1	1	0	0	0	
Lung	[6]																								[6]						
Accumulation, foam cell, focal	6	0																							1	2	1	1	0	0	
Stomach	[6]						[6]						[6]						[6]						[6]						
Ulcer, glandular stomach	6	0					6	0					6	0					6	0					5	1	0	0	1	0	
Erosion, glandular stomach	6	0					6	0					6	0					6	0					5	1	1	0	0	0	
Cellular infiltration, inflammatory cell, glandular submucosa	6	0					6	0					6	0					6	0					4	2	0	1	1	0	
Hemorrhage, glandular submucosa	6	0					6	0					6	0					6	0					5	1	0	1	0	0	
Vacuolization, epithelium, forestomach	6	0					6	0					6	0					6	0					5	1	1	0	0	0	
Liver	[6]						[6]						[6]						[6]						[6]						
Necrosis, hepatocyte, focal	5	1	1	0	0	0	6	0					6	0					6	0					6	0					
Microgranuloma	4	2	2	0	0	0	5	1	1	0	0	0	3	3	2	1	0	0	6	0					3	3	3	0	0	0	
Proliferation, bile duct	3	3	3	0	0	0	4	2	2	0	0	0	5	1	1	0	0	0	2	4	4	0	0	0	1	5	5	0	0	0	
Cellular infiltration, lymphoid cell	2	4	3	1	0	0	1	5	4	1	0	0	4	2	2	0	0	0	2	4	3	1	0	0	5	1	1	0	0	0	
Deposit of yellow-brown pigment, hepatocyte, periportal	6	0					6	0					6	0					6	0					0	6	3	3	0	0	**
Deposit of yellow-brown pigment, Kupffer cell, periportal	6	0					6	0					6	0					6	0					3	3	2	1	0	0	
Deposit of yellow-brown pigment, Kupffer cell, centrilobular	6	0					6	0					5	1	1	0	0	0	6	0					6	0					
Pancreas	[6]																								[6]						
Atrophy, lobular	5	1	1	0	0	0																			6	0					
Spleen	[6]						[6]						[6]						[6]						[6]						
Hematopoiesis, extramedullary	4	2	2	0	0	0	5	1	1	0	0	0	4	2	2	0	0	0	1	5	3	2	0	0	2	4	2	1	1	0	
Deposit, yellow-brown pigment, red pulp	0	6	3	3	0	0	0	6	6	0	0	0	0	6	5	1	0	0	0	6	2	1	0	0	0	6	0	1	5	0	*
Fibrosis, adhesive inflammation, capsule	6	0					6	0					5	1	0	1	0	0	6	0					6	0					

Grade of histopathological findings, ±: slight, +: mild, 2+: moderate, 3+: marked.

a) No abnormality detected.

b) Abnormality detected.

c) Number of males examined.

Examined only for the thymus, stomach, liver, spleen, kidney and bone marrow in the 30, 100, and 300 mg/kg groups.

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

Table 23-2 Histopathological findings of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group mg/kg	Control						sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate																							
	0						30						100						300						1000					
Grade	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+
Findings	[6] ^{c)}						[6]						[6]						[6]						[6]					
Kidney	6 0						4 2 2 0 0 0						5 1 1 0 0 0						6 0						2 4 4 0 0 0 *					
Basophilic change, tubular epithelium	6 0																													
Urinary bladder	[6]																								[6]					
Hemorrhage, subepithelial	5 1 1 0 0 0																								5 1 0 1 0 0					
Testis	[6]																								[7]					
Atrophy, seminiferous tubule	6 0																								6 1 0 0 1 0					
Hyperplasia, Leydig's cell	6 0																								6 1 1 0 0 0					
Degeneration, seminiferous tubule	5 1 1 0 0 0																								6 1 1 0 0 0					
Exfoliated round spermatids, seminiferous tubule	5 1 0 1 0 0																								6 1 0 1 0 0					
Epididymis	[6]																								[7]					
Emptiness, duct	6 0																								6 1 0 0 0 1					
Prostate	[6]																								[6]					
Cellular infiltration, lymphoid cell	3 3 3 0 0 0																								3 3 0 3 0 0					
Bone marrow	[6]						[6]						[6]						[6]						[6]					
Hematopoiesis, increased, femur	6 0						6 0						6 0						6 0						5 1 0 1 0 0					

Grade of histopathological findings, ±: slight, +: mild, 2+: moderate, 3+: marked.

a) No abnormality detected.

b) Abnormality detected.

c) Number of males examined.

No remarkable changes were seen in trachea, sublingual gland, submandibular gland, esophagus, duodenum, jejunum, ileum, cecum, colon, rectum, submandibular lymph node, mesenteric lymph node, seminal vesicle, pituitary, adrenal, thyroid, parathyroid (missing: M05506), cerebrum, cerebellum, medulla oblongata, spinal cord, sciatic nerve, Harderian gland or bone (femur or sternum).

Examined only for the thymus, stomach, liver, spleen, kidney and bone marrow in the 30, 100, and 300 mg/kg groups.

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

Table 23-3 Histopathological findings of dead male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group	sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate					
mg/kg	1000					
Grade	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+
Findings						
Whole organs and tissues	[1] ^{c)}					
Postmortal change	0	1	0	0	1	0
Heart	[1]					
Mineralization	0	1	0	1	0	0
Lung	[1]					
Congestion	0	1	0	1	0	0
Liver	[1]					
Deposit of yellow-brown pigment, hepatocyte, periportal	0	1	1	0	0	0

Grade of histopathological findings, ±: slight, +: mild, 2+: moderate, 3+: marked.

a) No abnormality detected.

b) Abnormality detected.

c) Number of males examined.

Table 24-1 Histopathological findings of dams in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group	Control						sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate																								
mg/kg	0						30						100						300						1000						
Grade	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+	
Findings																															
Heart	[6] ^{c)}																								[6]						
Cellular infiltration, histiocyte, focal	4	2	2	0	0	0																			6 0						
Lung	[6]																								[6]						
Accumulation, foam cell, focal	5	1	1	0	0	0																			5 1 1 0 0 0						
Liver	[6]						[6]						[6]						[6]						[6]						
Microgranuloma	6	0					5	1	1	0	0	0	6	0					5	1	1	0	0	0	5	1	1	0	0	0	
Cellular infiltration, lymphoid cell	3	3	3	0	0	0	4	2	2	0	0	0	6	0					5	1	1	0	0	0	4	2	2	0	0	0	
Proliferation, bile duct	3	3	3	0	0	0	4	2	2	0	0	0	3	3	3	0	0	0	3	3	3	0	0	0	4	2	2	0	0	0	
Vacuolization, hepatocyte, periportal	5	1	1	0	0	0	6	0					6	0					6	0					6	0					
Deposit of yellow-brown pigment, hepatocyte, periportal	6	0					6	0					6	0					6	0					0	6	6	0	0	0	**
Spleen	[6]						[6]						[6]						[6]						[6]						
Hematopoiesis, extramedullary	0	6	2	3	1	0	0	6	0	5	1	0	0	6	3	3	0	0	0	6	2	4	0	0	0	6	2	3	1	0	
Deposit, yellow-brown pigment, red pulp	0	6	0	6	0	0	1	5	5	0	0	0	0	6	4	2	0	0	0	6	3	3	0	0	0	6	0	0	6	0	
Kidney	[6]						[6]						[6]						[6]						[6]						
Basophilic change, tubular epithelium	6	0					5	1	1	0	0	0	6	0					5	1	1	0	0	0	5	1	0	1	0	0	
Cellular infiltration, lymphoid cell	5	1	1	0	0	0	6	0					5	1	1	0	0	0	5	1	1	0	0	0	6	0					
Urinary bladder	[6]																								[6]						
Ulcer	6	0																							5 1 1 0 0 0						
Pituitary	[6]																								[6]						
Cvst. anterior lobe	5	1	1	0	0	0																			6 0						

Grade of histopathological findings, ±: slight, +: mild, 2+: moderate, 3+: marked.

a) No abnormality detected.

b) Abnormality detected.

c) Number of dams examined.

No remarkable changes were seen in the trachea, pancreas, sublingual gland, submandibular gland, esophagus, stomach, duodenum, jejunum, ileum, cecum, colon, rectum, thymus, submandibular lymph node, mesenteric lymph node, ovary, uterus, vagina, adrenal, thyroid, parathyroid (missing: No.F05555), cerebrum, cerebellum, medulla oblongata, spinal cord, sciatic nerve, eyeball, Harderian gland, bone with bone marrow (femur or sternum) or mammary gland.

Examined only for the liver, spleen, kidney and bone marrow in the 30, 100, and 300 mg/kg groups.

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

Table 24-2 Histopathological findings of dead dams in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group	sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate					
mg/kg	1000					
Grade	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+
Findings						
Whole organs and tissues	{1} ^{c)}					
Postmortal change	0	1	0	0	0	1
Lung	{1}					
Congestion	0	1	0	1	0	0
Edema	0	1	0	1	0	0
Liver	{1}					
Mineralization	0	1	1	0	0	0

Grade of histopathological findings, ±: slight, +: mild, 2+: moderate, 3+: marked.

a) No abnormality detected.

b) Abnormality detected.

c) Number of dams examined.

Table 25 Reproductive performance of male rats and female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group	Control	sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate			
mg/kg	0	30	100	300	1000
Number of females	12	12	12	12	12
Number of estrous cases before mating (14 days)					
Mean $\pm$ S.D.	3.3 $\pm$ 0.9	3.4 $\pm$ 0.5	3.4 $\pm$ 0.7	3.8 $\pm$ 0.5	3.4 $\pm$ 0.8
Number of pairs	12	12	12	12	12
Number of pairs with successful copulation	12	12	12	12	12
Copulation index (%) ^{a)}	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of conceiving days					
Mean $\pm$ S.D.	2.3 $\pm$ 1.1	2.6 $\pm$ 1.2	2.6 $\pm$ 1.2	2.5 $\pm$ 0.8	3.1 $\pm$ 1.0
Conceiving days 1-5	12	12	12	12	12
Conceiving days $\geq$ 6	0	0	0	0	0
Number of pregnant females	12	12	10	12	12
Fertility index (%) ^{b)}	100.0	100.0	83.3	100.0	100.0
Number of dead pregnant females	0	0	0	0	1
Number of pregnant females at delivery	12	12	10	12	11
Number of pregnant females with live pups	12	12	10	12	11

a): (Number of pairs with successful copulation / number of pairs) $\times$ 100.

b): (Number of pregnant females / number of pairs with successful copulation) $\times$ 100.

Table 26 Observation of pups (F_1) in combined repeat dose and reproductive/development toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group	Control	sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate			
mg/kg	0	30	100	300	1000
Number of dams	12	12	10	12	11
Length of gestation (days)	22.2 $\pm$ 0.4	22.3 $\pm$ 0.5	22.3 $\pm$ 0.5	22.4 $\pm$ 0.7	22.4 $\pm$ 0.5
Pregnancy days $\leq$ 21	0	0	0	0	0
Pregnancy days = 22	10	9	7	8	7
Pregnancy days $\geq$ 23	2	3	3	4	4
Corpora lutea	18.0 $\pm$ 0.9	16.6 $\pm$ 1.5	16.8 $\pm$ 1.0	16.7 $\pm$ 2.9	16.6 $\pm$ 2.0
Implantation scars	16.2 $\pm$ 1.5	15.3 $\pm$ 1.3	14.5 $\pm$ 1.0 *	14.4 $\pm$ 2.5	14.4 $\pm$ 1.8 *
Implantation index (%) ^{a)}	89.7 $\pm$ 7.5	92.2 $\pm$ 6.8	86.3 $\pm$ 5.5	86.7 $\pm$ 6.1	86.4 $\pm$ 6.6
Gestation index (%) ^{b)}	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Pups born	14.9 $\pm$ 2.0	14.3 $\pm$ 2.0	13.5 $\pm$ 2.1	12.6 $\pm$ 3.1	13.1 $\pm$ 2.5
Stillbirths	0.4 $\pm$ 0.9	0.5 $\pm$ 0.7	0.3 $\pm$ 0.5	0.1 $\pm$ 0.3	0.2 $\pm$ 0.4
Live pups born	14.5 $\pm$ 2.2	13.8 $\pm$ 2.1	13.2 $\pm$ 1.9	12.5 $\pm$ 3.1	12.9 $\pm$ 2.5
Sex ratio at birth ^{c)}	1.06 $\pm$ 0.83	1.33 $\pm$ 0.57	1.67 $\pm$ 1.43	1.14 $\pm$ 0.53	1.21 $\pm$ 0.60
(Total male/total female)	79/95	90/75	74/58	75/75	74/68
Delivery index (%) ^{d)}	92.4 $\pm$ 10.7	93.3 $\pm$ 7.6	92.8 $\pm$ 11.7	86.3 $\pm$ 15.0	90.9 $\pm$ 10.4
Birth index (%) ^{e)}	89.7 $\pm$ 11.4	89.9 $\pm$ 9.0	90.8 $\pm$ 10.8	85.8 $\pm$ 15.1	89.7 $\pm$ 11.6
Live birth index (%) ^{f)}	97.2 $\pm$ 6.1	96.4 $\pm$ 4.8	98.0 $\pm$ 3.2	99.3 $\pm$ 2.3	98.5 $\pm$ 3.6
Live pups on day 4 of lactation	14.4 $\pm$ 2.3	13.6 $\pm$ 1.9	12.8 $\pm$ 2.2	12.4 $\pm$ 3.2	12.8 $\pm$ 2.5
Sex ratio on day 4 of lactation ^{g)}	1.05 $\pm$ 0.83	1.33 $\pm$ 0.55	1.71 $\pm$ 1.46	1.24 $\pm$ 0.80	1.20 $\pm$ 0.61
(Total male/total female)	78/95	89/74	72/56	75/74	73/68
Viability index (%) ^{h)}	99.4 $\pm$ 2.0	99.0 $\pm$ 2.3	96.6 $\pm$ 4.6	99.2 $\pm$ 2.9	99.4 $\pm$ 2.1
External anomalies (%) ^{h)}	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0

Each value shows mean $\pm$ S.D. per dam.

a): (Number of implantation scars / number of corpora lutea) $\times$ 100.

c): Number of male pups / number of female pups.

e): (Number of live pups born / number of implantation scars) $\times$ 100.

g): (Number of live pups on day 4 / number of live pups born) $\times$ 100.

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

b): (Number of dams with live pups / number of pregnant dams) $\times$ 100.

d): (Number of pups born / number of implantation scars) $\times$ 100.

f): (Number of live pups born / number of pups born) $\times$ 100.

h): (Number of pups with external anomalies / number of live pups) $\times$ 100.

Table 27 Body weights of pups (F₁) on days 0 and 4 of lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group	Control	sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate			
mg/kg	0	30	100	300	1000
Number of dams	12	12	10	12	11
Male weight					
Days of lactation					
0	7.0 ± 0.7	7.1 ± 0.4	7.0 ± 0.5	7.2 ± 0.6	7.2 ± 0.9
4	11.6 ± 1.6	11.8 ± 0.9	11.8 ± 1.1	12.0 ± 1.4	11.7 ± 1.9
Female weight					
Days of lactation					
0	6.5 ± 0.6	6.5 ± 0.3	6.5 ± 0.8	6.7 ± 0.5	6.8 ± 0.8
4	10.8 ± 1.4	11.0 ± 0.7	11.5 ± 1.8	11.3 ± 1.0	11.1 ± 1.7
Mean pups weight					
Days of lactation					
0	6.8 ± 0.6	6.8 ± 0.4	6.8 ± 0.6	7.0 ± 0.6	7.0 ± 0.9
4	11.2 ± 1.5	11.4 ± 0.8	11.7 ± 1.4	11.6 ± 1.2	11.4 ± 1.8
Litter weight					
Days of lactation					
0	97.1 ± 10.1	93.4 ± 13.8	89.0 ± 12.3	86.6 ± 22.2	89.6 ± 15.5
4	158.8 ± 12.5	154.2 ± 17.1	147.2 ± 18.9	142.1 ± 34.0	142.8 ± 16.9

Each value shows mean (g) ± S.D. per dam.

Table 28. Necropsy findings of pups (F₁) in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Group	Control	sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate			
mg/kg	0	30	100	300	1000
Number of dams	12	12	10	12	11
Number of male pups	78	89	72	75	73
Normal	78	89	72	75	73
Abnormal					
Total	0	0	0	0	0
Number of dams	12	12	10	12	11
Number of female pups	95	74	56	74	68
Normal	95	74	56	74	68
Abnormal					
Total	0	0	0	0	0

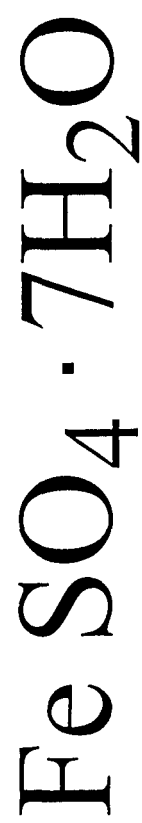


Fig. 1 Chemical structure of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate

Study No. 100520

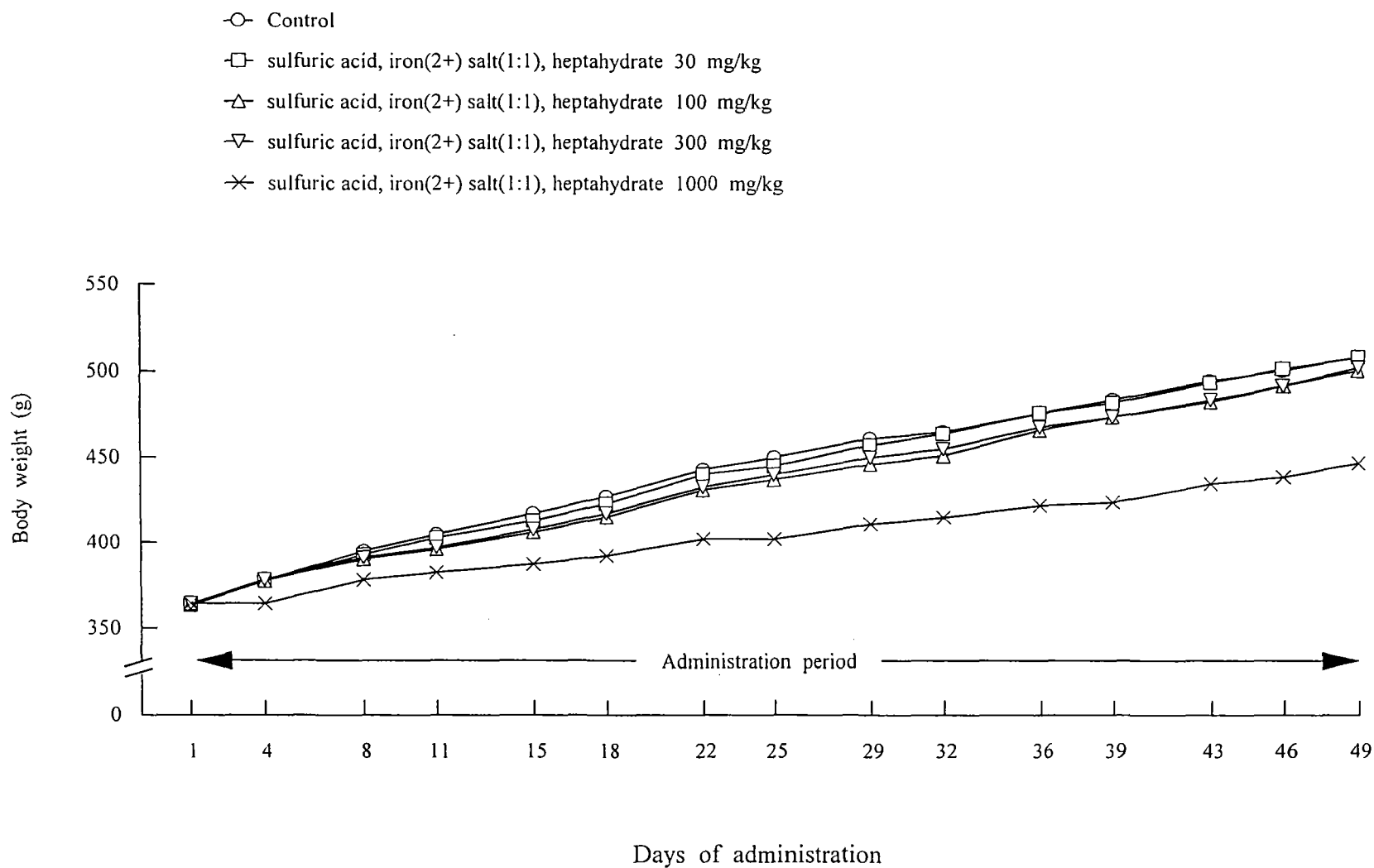


Fig. 2 Body weights of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

- Control
- sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate 30 mg/kg
- △ sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate 100 mg/kg
- ▽ sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate 300 mg/kg
- × sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate 1000 mg/kg

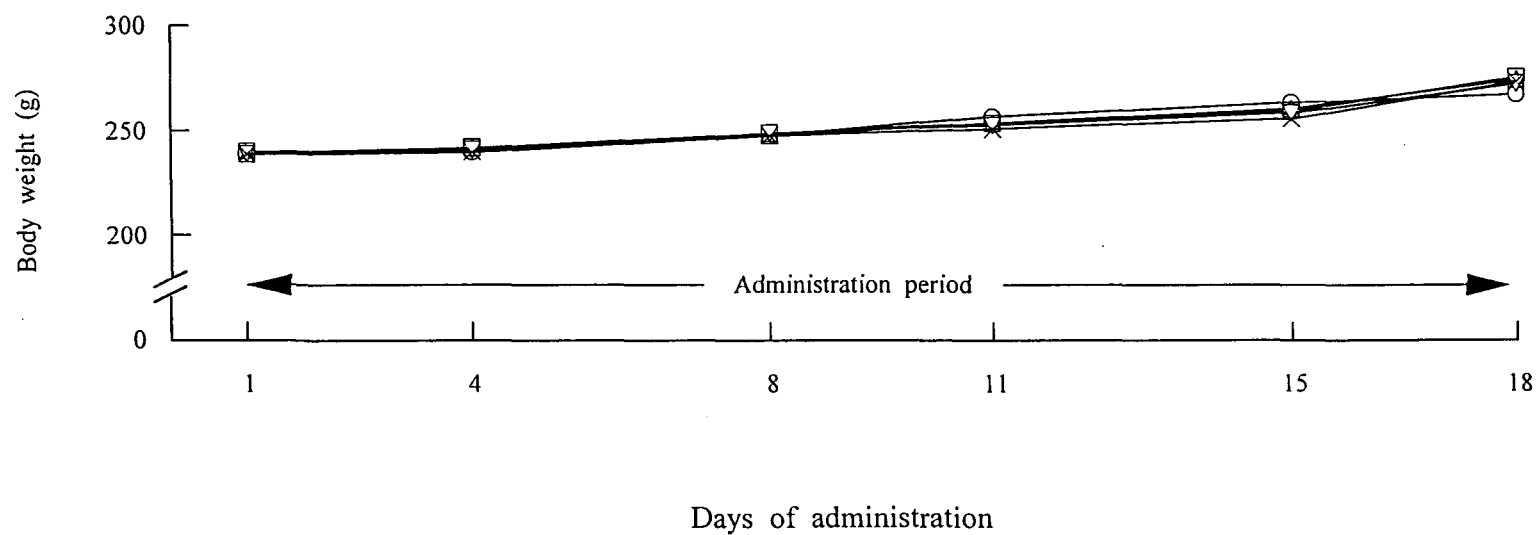


Fig. 3 Body weights of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Study No. 100520

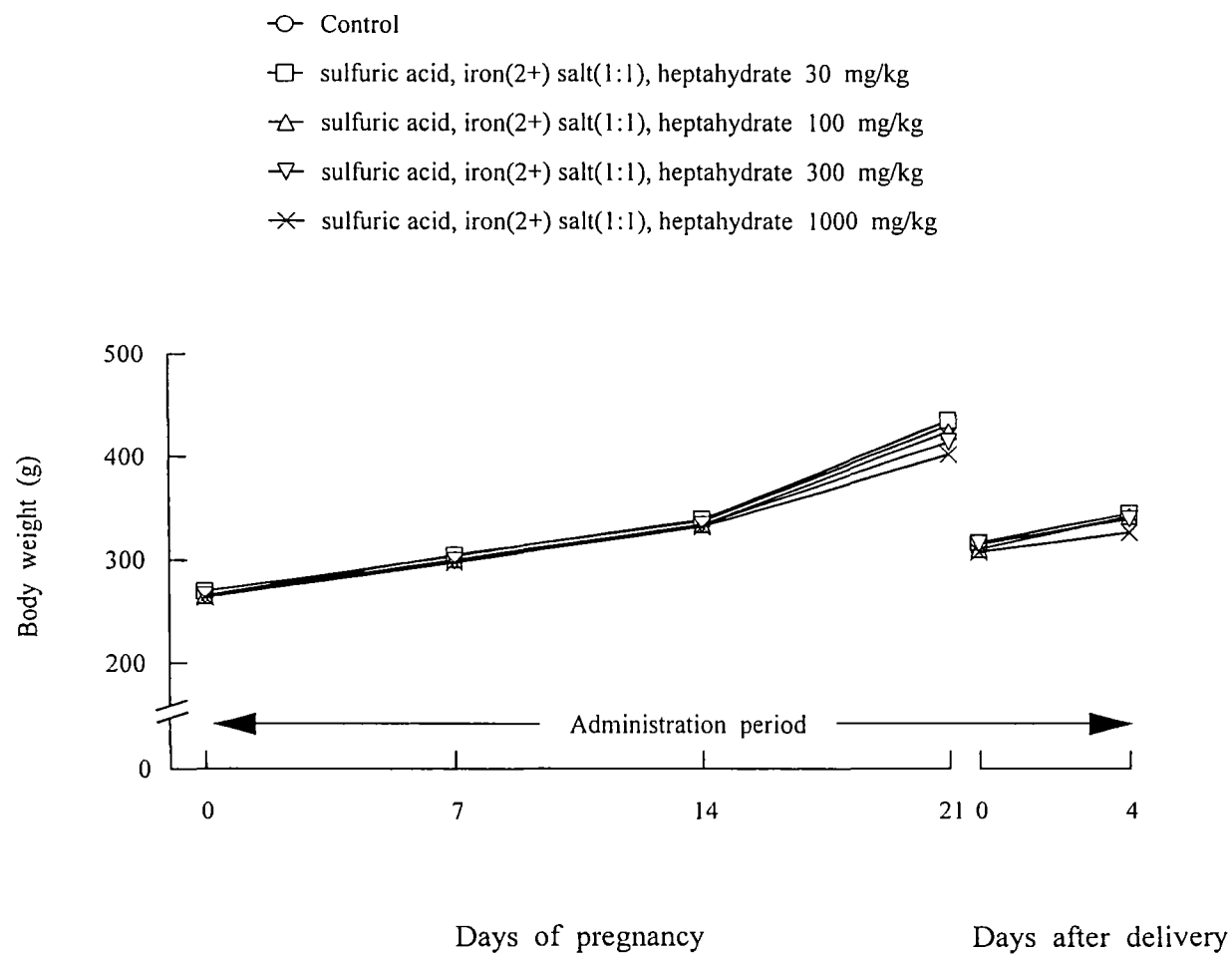


Fig. 4 Body weights of dams during pregnancy and lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Study No. 100520

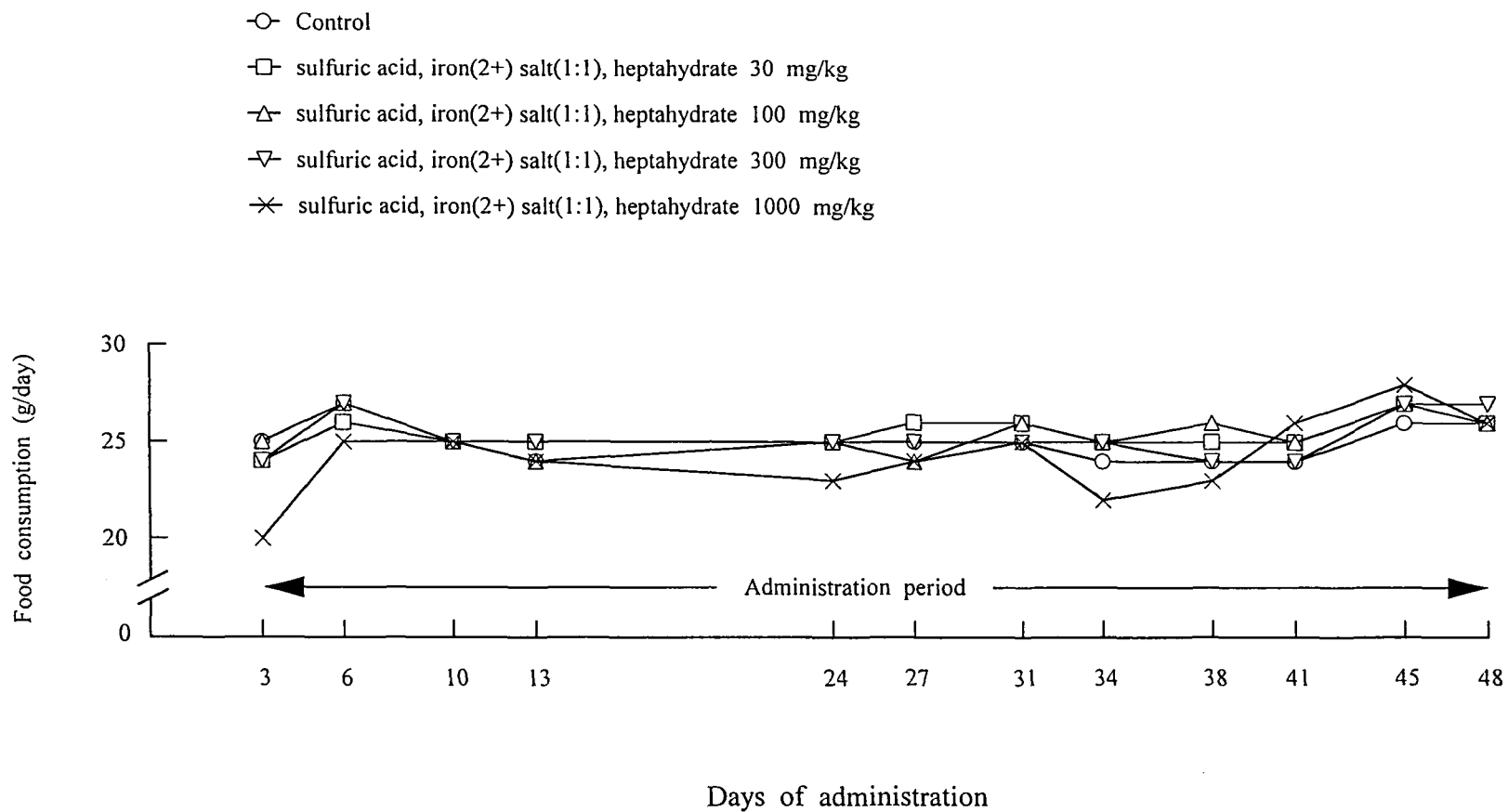


Fig. 5 Food consumption of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Study No. 100520

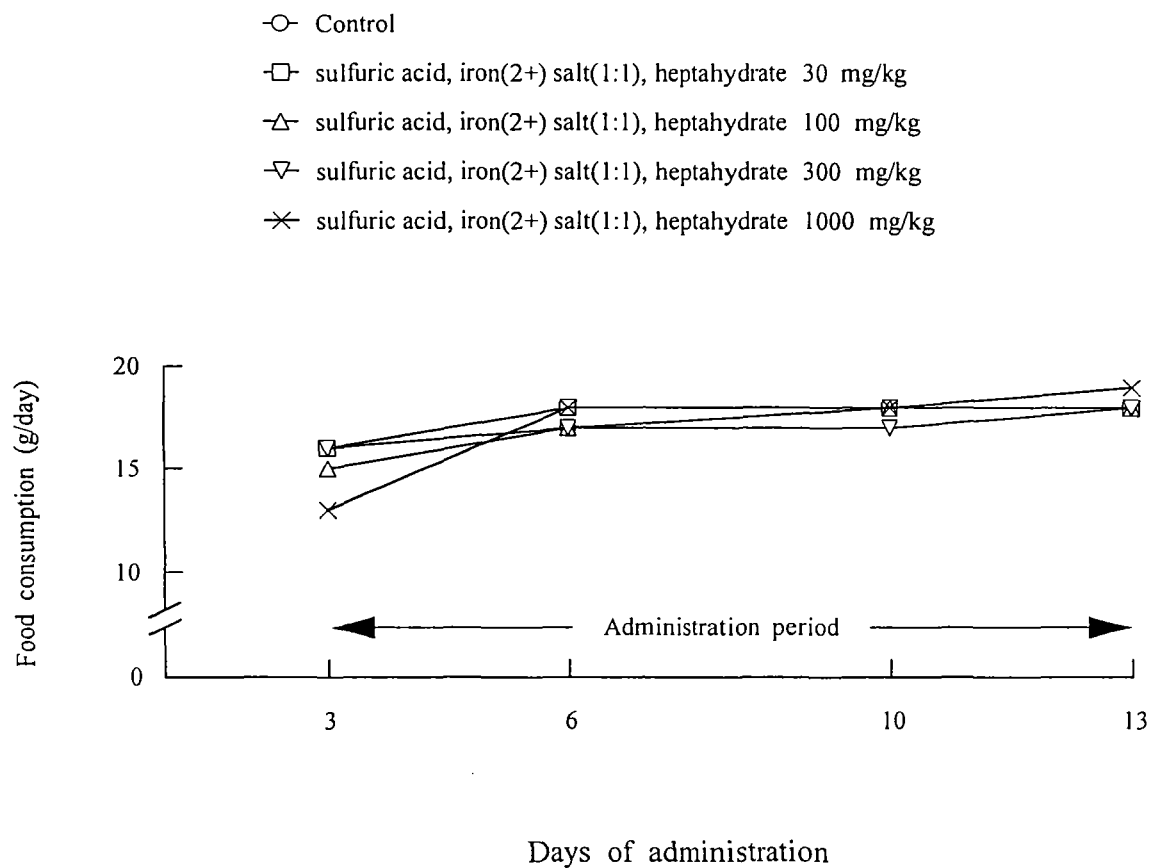


Fig. 6 Food consumption of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration

Study No. 100520

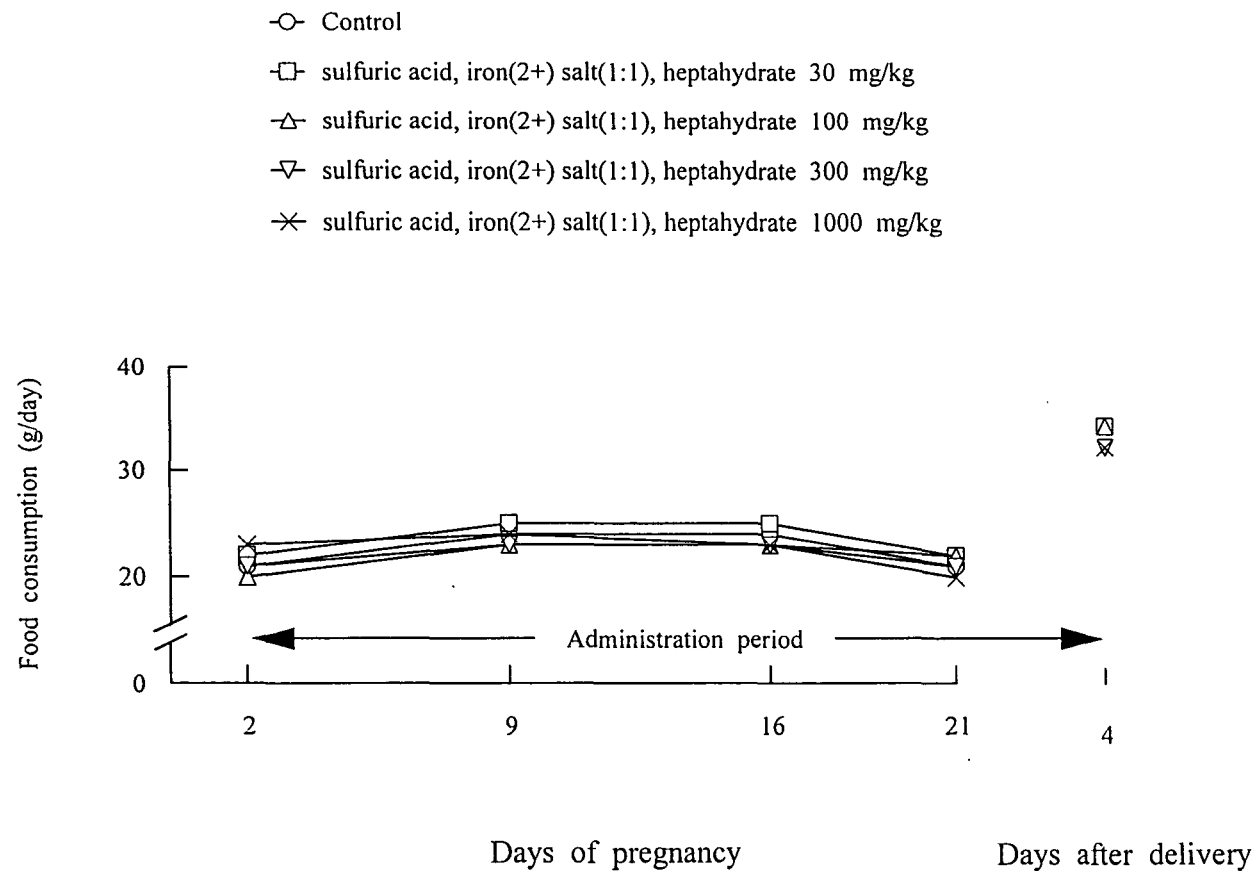


Fig. 7 Food consumption of dams during pregnancy and lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration Study No. 100520

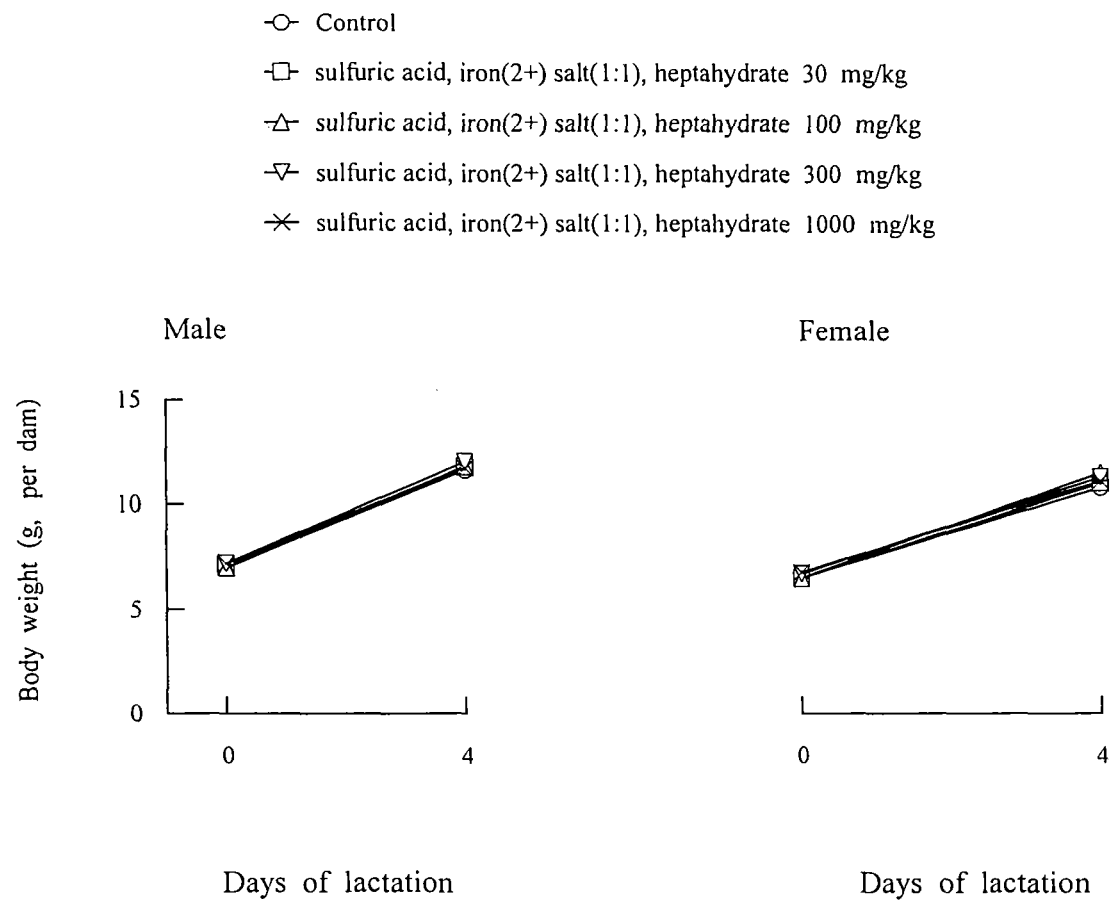


Fig. 8 Body weights of pups (F₁) on days 0 and 4 of lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of sulfuric acid, iron(2+) salt(1:1), heptahydrate by oral administration.

Study No. 100520