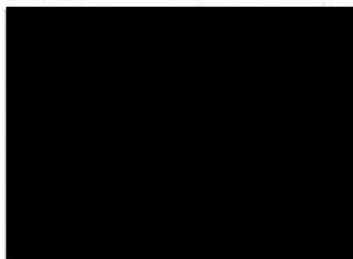
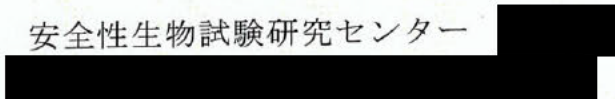


令和元年度 既存添加物の安全性に関する試験

ラットを用いたヘム鉄の90日間反復経口投与毒性試験  
(最終報告書)



国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター



## 【概要】

既存添加物として指定されているヘム鉄の安全性評価のため、ラットを用いた90日間反復経口投与毒性試験を実施した。

6週齢の雌雄 CrI:CD(SD)ラットにヘム鉄を0%、0.8%、2%、5%の濃度で90日間混餌投与し、一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、尿検査、血液学的検査、血清生化学的検査、臓器重量測定、肉眼病理学的検査及び病理組織学的検査を実施した。

その結果、いずれの検査項目においても被験物質投与による毒性影響は認められなかった。

以上の結果から、本試験におけるヘム鉄の無毒性量は雌雄ともに5%（雄：2.89 g/kg BW/day、雌：3.84 g/kg BW/day）と判断された。



## 2 被験物質

名称	: ヘム鉄 (商品名: ██████████)
供給源	: ██████████
CAS No.	: なし
性状	: 褐色～黒褐色の粉末で、わずかに特異なおいがある。
ロット番号	: ██████████
含量	: 100%
保管条件	: 冷暗所に密栓して保管する。
取り扱い上の注意	: 使用時には手袋、マスク及び保護メガネ等の適切な保護具を着用し、肌及び目への接触を避ける。

## 3 試験系

### 3.1 動物

動物種	: ラット
系統	: CrI:CD (SD) (SPF 動物)
性	: 雌雄
入荷時週齢	: 5 週齢
投与開始時週齢	: 6 週齢
購入 (使用) 匹数	: 雌雄各 42 匹 (40 匹)
供給源	: 日本チャールス・リバー株式会社
所在地	: 〒243-0214 神奈川県厚木市下古沢 795
検疫・馴化期間	: 8 日間
群分け後の余剰動物の処置	: 主試験群の剖検日の翌日に同様に安楽殺した。

### 3.2 試験系選択理由

「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」に基づいて齧歯類の 1 つとしてラットを選択した。本系統は、微生物学的に統御され、遺伝的に安定であることから決定した。

### 3.3 飼育条件

適切な生物学的防御がなされた環境の部屋で動物を飼育する。

飼育室	: ██████████
温度	: 23±1°C
相対湿度	: 50±5%
照明時間	: 12 時間 / 日 (7:00~19:00)
換気回数	: 20 回 / 時間
飼育匹数	: 2 匹 / ケージ

ケージ交換頻度 : 2回以上/週  
給水瓶交換頻度 : 2回以上/週

### 3.4 収容ケージ及び床敷

ケージ : プラスチック製ケージ (W258×D418×H186 mm)  
ケージ蓋 : ステンレス製  
床敷 : ソフトチップ (三協ラボサービス株式会社)

### 3.5 飼料及び給餌方法

飼料 : オリエンタル酵母工業株式会社製粉末飼料 (CRF-1)  
給餌方法 : ケージ内に飼料を入れた粉餌給餌器を設置し、自由摂取

### 3.6 飲料水及び給水方法

飲料水 : 調製水  
給水方法 : 透明な給水瓶を用いて自由摂取

### 3.7 群分け方法

群分け方法 : 群分け実施日の体重に基づき無作為に実施  
群分け実施日 : 実験開始前日

### 3.8 個体識別法

ケージラベルに試験番号、性別、群名、ケージ番号、被験物質名及び投与濃度、動物番号、試験開始日、剖検日、試験主担当者名を明記する。動物の個体識別は、上記内容とピクリン酸による背部皮膚へのマーキング及び油性インクによる尾部へのマーキングを用いて行った。

## 4 試験方法

### 4.1 投与期間及び投与方法

被験物質の投与期間は90日以上（雌雄共に91日）とし、被験物質と十分に混和した4.5項に記載の粉末飼料を自由摂取させて投与した。対照群には被験物質を含まない粉末飼料を自由摂取させた。

### 4.2 投与量及び群構成

被験物質の投与濃度並びに1群当たりの匹数及び動物番号は、下表の通りである。

性別	投与濃度 (%)	匹数	動物番号
雄	0	10	101~110
	0.8	10	111~120

	2	10	121~130
	5	10	131~140
雌	0	10	201~210
	0.8	10	211~220
	2	10	221~230
	5	10	231~240

#### 4.3 被験物質投与量の設定理由

28日間反復投与用量設定予備試験<sup>1</sup>において、5%群の雌雄で被験物質投与による毒性影響がみられなかったことから、本試験における被験物質の投与濃度は、最高用量を5%に設定し、以下公比2.5で除した2%及び0.8%に設定した。

#### 4.4 投与経路及び投与方法の選択理由

投与経路は、ヒトが被験物質に曝露される可能性の最も大きい経路である経口投与とした。

#### 4.5 飼料の調製方法及び調製頻度

被験物質を電子天秤を用いて秤量し、乳鉢で少量の粉末飼料と十分に混合させた。秤量時、電子天秤は水平に保った。厚手ポリエチレン袋に、所定の濃度となるように残りの粉末飼料と共に加えてよく攪拌して混合し、投与飼料とした。投与飼料は1週間に1回調製した。

#### 4.6 観察及び測定項目

投与開始日を投与1日（Day 1）と起算し、投与1~7日を投与1週、剖検日は投与91日の翌日（Day 92）とした。

##### 4.6.1 一般状態

被験物質投与期間中に1日1回以上、全ての動物について一般状態、生死などについて観察し、月～金曜日においては観察結果を個体別に記録した。

##### 4.6.2 体重

投与1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85及び91日に測定した。また、剖検日に各動物の1晩（約16時間）絶食後の体重（剖検日体重）を測定した。各時点において全ての動物を電子天秤に乗せ、個体別に体重を測定した。測定時、電子天秤は水平に保った。

##### 4.6.3 摂餌量

投与1-2, 8-9, 15-16, 22-23, 29-30, 36-37, 43-44, 50-51, 57-58, 64-65, 71-72, 78-79及び85-86日の各ケージの餌重量を電子天秤にて測定し、測定日間の重量差を日数



(TG)、総蛋白 (TP)、アルブミン (ALB)、A/G 比 (A/G)、無機リン (IP)、カルシウム (Ca)、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、塩素 (Cl)、鉄 (Fe)

#### 4.6.7 病理学的検査

投与期間終了時に、第 5.6.6 項において採血し、放血致死させた動物について、下記の病理学的検査を行った。

##### 4.6.7.1 肉眼的病理学検査

全生存動物について、全身の諸器官・組織の肉眼的病理学検査を実施し、下記の器官・組織を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液にて保存した。固定液に浸した臓器は振盪器にて一晚以上振盪した後、可能な限り速やかに切り出しを行った。ただし、眼球はダビッドソン固定液にて固定・保存し、3~5 日以内に切り出しを実施し、残臓器は 10%中性緩衝ホルマリン液に保存した。また、精巣はブアン液にて固定した翌日から 70%エタノールで保存し、切り出し後の残臓器は 10%中性緩衝ホルマリン液に保存した。鼻腔を含む頭蓋、胸骨、大腿骨及び脊椎（頸部、胸部及び腰部横断）は、10%ギ酸及び 10%中性緩衝ホルマリン混合液等で脱灰処理を行った。

心臓、脾臓、リンパ節（頸部、縦隔、腸間膜）、胸腺、下垂体、甲状腺（上皮小体を含む）、副腎、頭蓋（鼻腔を含む）、気管、肺（気管支を含む）、舌、唾液腺（顎下腺、舌下腺）、食道、胃（前胃、腺胃）、小腸（十二指腸、空腸、回腸）、大腸（盲腸、結腸、直腸）、肝臓、膵臓、腎臓、膀胱、精巣、精巣上部、前立腺、精嚢、卵巣、卵管、子宮、乳腺、膣、脳（大脳、小脳）、脊髄（頸部、胸部及び腰部）、三叉神経、坐骨神経、大動脈（胸部）、眼球、ハーダー腺、皮膚、胸骨及び大腿骨（骨髄を含む）、大腿部骨格筋、ジンバル腺、その他肉眼病変部

##### 4.6.7.2 器官重量

全生存動物について、下記の器官の重量について電子天秤を用いて測定し、剖検日体重を用いて器官重量体重比を算出した。測定時、電子天秤は水平に保った。腎臓、副腎、精巣、及び卵巣は左右別に測定した。

脳、下垂体\*、心臓、肺（気管支を含む）\*\*、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、前立腺\*、精嚢\*、卵巣（卵管を含まない）、唾液腺（顎下腺及び舌下腺）\*、胸腺、甲状腺（上皮小体を含む）\*。

\*：固定後測定した。\*\*：測定後 10%中性緩衝ホルマリン液を注入した。

##### 4.6.7.3 病理組織学的検査

雌雄の対照群及び最高用量群の全てについては、採取した器官・組織（4.6.7.1 項参照）について常法に従い、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色標本作製し、鏡検した。

#### 4.7 統計処理

試験期間中の体重、摂餌量、血液学的・血清生化学的検査結果及び器官重量については各群の分散を Bartlett の方法で検定し、多重比較を Dunnett 等の方法により対照群と各被験物質投与群との間で有意差検定を行った。病理所見については、発生頻度を Fisher の正確確率検定、グレーディングを Mann-Whitney の U 検定により有意差検定を行った。 $P < 0.05$  の場合を統計学的に有意と判定した。

#### 5 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および試験計画書に従わなかったこと

- 1) 第 4.6.1 項の一般状態観察において、土及び日曜日は記録を行わなかったが、XXXXXXXXXXに観察を依頼し、異常も報告されなかったため、試験結果に影響はないと判断した。
- 2) 第 4.6.4 項の尿検査において、時間内に採尿できなかった個体は、別日に改めて採尿を行った。また、採尿サンプルが 5 匹に満たない群は、同じ群の別の個体で採尿を行った。同じ群間内の尿サンプルであるため、試験結果には影響しないと判断した。
- 3) 第 4.6.4 項の尿検査において、試験計画書では採尿ラックに移動させた後にも飼料の給餌を行う予定だったが、予備試験においてラットが給餌器から餌をこぼす行動が雌雄ともに散見されたため、畜尿時に採尿チューブに飼料が混入することを避けるため給餌は行わなかった。給餌停止時間は 4 時間と短時間であるため試験結果に影響はないと判断した。
- 4) 第 4.6.5 項の血液学的検査において、白血球分画の好中球(%)が低値を示した個体（雄の 2%群の 1 例、雌の対照群の 1 例、雌の 0.8%群の 1 例、雌の 2%群の 2 例）について、採血管の転倒混和が不十分であった可能性を考え、再測定を行った。しかしながら、いずれの個体においても 1 回目の測定値と再測定値が同程度であったことから、1 回目の測定値を採用したため、試験結果には影響しないと判断した。
- 5) 第 4.6.7.1 項および第 4.6.7.2 項の器官・組織の採材および重量測定において、雌の 0.8%群の 1 例の左側甲状腺については、切り出し時の臓器の紛失により臓器重量測定が実施できなかった。また、雌の 5%群の 1 例の下垂体については、切り出し時に臓器の一部が欠損していることが確認されたため、臓器重量測定が行えなかった。しかしながら、いずれも各群の他の個体で評価できていることから、試験結果には影響しないと判断した。
- 6) 第 4.6.7.3 項の病理組織学的検査における欠損臓器を Appendix 1 に示す。雄の対照群の 1 例の上皮小体及び 2 例のジンバル腺、雄の 5%群の 2 例の乳腺及び 1 例の縦隔リンパ節、雌の対照群の 5 例の縦隔リンパ節、1 例の気管及び 1 例の食道、雌の 5%群の 3 例の縦隔リンパ節については、解剖中あるいは

は標本作成過程における臓器の紛失により病理組織学的検査が実施できなかった。しかしながら、各群の他の個体で評価できていることから、試験の結果には影響しないと判断した。また、雄の 0.8%群の 1 例の片側眼球の水晶体及び雌の 2%群の 1 例の大腿骨については、切り出し時に臓器の紛失が確認されたが、低及び中用量の群であり病理組織学的検査は行わなかったため、試験結果には影響しないと判断した。雌の 5%群の 1 例では、切り出し時に左側甲状腺を紛失したが、右側甲状腺で病理組織学的検査を実施したため、試験の結果には影響しないと判断した。また、雌の 5%群の 1 例では下垂体の一部が欠損していることが切り出し時に確認されたが、残存する組織で病理組織学的検査を実施したため、試験の結果には影響しないと判断した。

## 6 試験結果

### 6.1 生存率及び一般状態

試験期間中、雌雄すべての群において死亡はみられず、一般状態観察においても雌雄の投与群において被験物質投与に関連する変化は観察されなかった。

### 6.2 体重

体重測定の結果を Fig. 1 に示す。試験期間中、雌雄ともに被験物質投与に関連する変化は認められなかった。

### 6.3 摂餌量

試験期間中の各群における 1 匹の 1 日あたりの平均摂餌量及びヘム鉄摂取量を Table 1 に、13 週間の平均摂餌量の推移の結果を Fig. 2 (雄) および 3 (雌) に示す。試験期間中、給餌器から餌をこぼす行動が雌雄の対照群および被験物質投与群において試験期間を通して散見されたが、雌雄ともに摂餌量に被験物質投与の明らかな影響は認められなかった。

### 6.4 尿検査

13 週目の尿検査試験紙による尿検査結果を Table 2 に示す。雄の 2%群に 1 例、雄の 5%群に 3 例、雌の 0.8%群に 1 例、潜血 (±: 溶血、非溶血) が認められた。雄の 0.8%群に 1 例、雄の 2%群に 2 例、雄の 5%群に 1 例、尿中蛋白 (1+) が認められた。雄の対照群に 1 例、雄の 0.8%群に 3 例、雄の 2%群に 1 例、雄の 5%群に 3 例、ケトン体 (1+) が認められた。

### 6.5 血液学的検査

血液学的検査結果を Table 3 に示す。雌雄ともに被験物質投与に関連する変化はみられなかった。

## 6.6 血清生化学的検査

血清生化学的検査結果を Table 4 に示す。雄では被験物質投与に関連する変化は認められなかった。雌の 5%群において、K の有意な減少および IP の有意な増加が認められた。また、雌の 2%群で Fe の有意な減少が認められた。

## 6.7 病理学的検査

### 6.7.1 器官重量

最終体重及び臓器重量を Table 5 に示す。最終体重について、雌雄ともに被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。臓器重量測定では、雄の 5%群において甲状腺の絶対及び相対重量の有意な増加が認められた。精巣において、0.8%群の絶対及び相対重量、2%群の絶対重量の増加が認められた。

### 6.7.2 病理組織学的検査

剖検時に実施した肉眼的検査において、雌雄ともに被験物質投与に関連する変化は認められなかった。

病理組織学的検索結果を Table 6 に示す。自然発生性変化が対照群及び 5%群で散見されたものの、被験物質投与の影響はみられなかった。

## 7 考察及び結論

摂餌量測定において、雌では測定日よりばらつきが大きくみられたものの、その変動に用量依存性がみられないことから、被験物質投与の明らかな影響はないと判断した。

尿検査において、雄の 2%群及び 5%群、雌の 0.8%群に潜血（±：溶血、非溶血）が認められたが、溶血であったのは雄の 2%群・5%群に各 1 例ずつ、雌の 0.8%群の 1 例のみで、病理組織学的検査において腎臓に変化はみられていないことから、毒性学的意義は乏しいと判断された。尿中蛋白において、雄の投与群において尿中蛋白（1+）の判定の個体が認められたが、血清生化学的検査及び病理組織学的検査において腎機能障害に関連する変化を欠き、また用量依存性も認められないことから、毒性学的意義は乏しいと判断された。雄の全ての群においてケトン体（1+）の判定の個体が認められたが、用量依存性を欠くことから、毒性学的意義は乏しいと判断された。

血清生化学的検査では、雌の 5%群において K の減少および IP の増加が認められたが、BUN 及び CRE に変動はみられず、病理組織学的検査においても腎臓に変化はみられていないことから、毒性学的意義は乏しいと判断された。雌の 2%群において Fe の減少が認められたが、中用量群のみの変化であるため偶発所見と考えられた。

臓器重量の検索では、雄の5%群において甲状腺の絶対及び相対重量の有意な増加が認められたが、病理組織学的変化はみられていないことから、毒性学的意義は乏しいと判断された。精巣の絶対及び相対重量の増加が雄の0.8%群に、絶対重量の増加が雄の2%群にみられたが、用量依存性を欠くため被験物質投与の影響ではないと判断された。

以上のとおり、雌雄のCrI:CD(SD)ラットに0%、0.8%、2%、5%の用量でヘム鉄を90日間混餌投与した本試験において、全ての検査項目で被験物質投与による毒性影響は認められなかった。したがって、本試験の条件下におけるヘム鉄の無毒性量は、雌雄ともに5%（雄：2.89 g/kg BW/day、雌：3.84 g/kg BW/day）と判断された。

## 8 参考文献

1. 指定添加物の安全性に関する試験 ラットを用いたヘム鉄の28日間反復経口投与毒性試験：用量設定のための予備試験（XXXXXXXXXX、試験番号：XXXXXXXXXX）

**Table 1. Food consumption and intake of heme iron for 13weeks.**

Dose of Heme iron (%)	No. of animals examined	Food consumption (g/rat/day)	Mean daily intake of Heme iron (g/kg BW/day)	Total intake of Heme iron (g/kg BW)
<b><i>Males</i></b>				
0	10	25.1(55.9) <sup>a</sup>	0.00	0.0
0.8	10	23.6(54.1)	0.43	39.4
2	10	24.3(54.5)	1.09	99.1
5	10	25.8(57.8)	2.89	263.1
<b><i>Females</i></b>				
0	10	18.7(78.1) <sup>a</sup>	0.00	0.0
0.8	10	20.1(83.4)	0.67	60.7
2	10	18.3(75.0)	1.50	136.6
5	10	18.3(76.7)	3.84	349.2

<sup>a</sup>:Values in parentheses are for food consumption calculated as g/kg BW/day.

Abbreviations: BW;body weight.

**Table 2. Urinalysis data at week 13 in SD rats treated with heme iron.**

		Heme iron			
		0%	0.8%	2%	5%
No. of animals examined		5	5	5	5
<b>Males</b>					
Protein	-	1	1	1	2
	±	4	3	2	2
	1+	0	1	2	1
Glucose	-	5	5	5	5
	1+	0	0	0	0
	2+	0	0	0	0
Occult blood	-	5	5	4	2
	±(非溶血)	0	0	0	2
	±(溶血)	0	0	1	1
Ketone body	-	2	0	1	1
	±	2	2	3	1
	1+	1	3	1	3
Urobilinogen	0.1	5	5	5	5
	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
Bilirubin	-	2	4	4	5
	1+	3	1	1	0
	2+	0	0	0	0
pH	6.5	0	0	0	0
	7.0	0	0	0	0
	7.5	0	0	0	0
	8.0	3	1	0	2
	8.5	2	4	5	3
<b>Females</b>					
Protein	-	4	5	2	2
	±	1	0	3	2
	1+	0	0	0	1
Glucose	-	5	5	5	5
	1+	0	0	0	0
	2+	0	0	0	0
Occult blood	-	5	4	5	5
	±(非溶血)	0	0	0	0
	±(溶血)	0	1	0	0
Ketone body	-	5	5	4	5
	±	0	0	1	0
	1+	0	0	0	0
Urobilinogen	0.1	5	5	5	5
	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
Bilirubin	-	3	5	2	3
	1+	2	0	3	2
	2+	0	0	0	0
pH	6.5	0	0	0	0
	7.0	0	0	0	0
	7.5	1	1	1	1
	8.0	2	2	1	1
	8.5	2	2	3	3

**Table 3. Hematology data for SD rats treated with heme iron for 13 weeks.**

		Heme iron			
		0%	0.8%	2%	5%
No. of animals examined		10	10	10	10
<b>Males</b>					
WBC	( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	5.15 $\pm$ 1.96	5.03 $\pm$ 1.47	5.75 $\pm$ 1.41	4.67 $\pm$ 0.59
RBC	( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	8.8 $\pm$ 0.3	8.9 $\pm$ 0.4	8.8 $\pm$ 0.3	8.8 $\pm$ 0.4
Hb	(g/dl)	15.5 $\pm$ 0.6	15.5 $\pm$ 0.5	15.4 $\pm$ 0.6	15.4 $\pm$ 0.5
HCT	(%)	46.0 $\pm$ 1.7	46.0 $\pm$ 1.4	45.6 $\pm$ 2.3	46.1 $\pm$ 1.7
MCV	(fl)	52.2 $\pm$ 1.9	51.8 $\pm$ 1.8	51.8 $\pm$ 2.7	52.5 $\pm$ 2.4
MCH	(pg)	17.6 $\pm$ 0.7	17.5 $\pm$ 0.9	17.5 $\pm$ 0.7	17.6 $\pm$ 0.7
MCHC	(g/dl)	33.7 $\pm$ 0.8	33.7 $\pm$ 1.0	33.7 $\pm$ 1.0	33.5 $\pm$ 0.7
Plt	( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	999.6 $\pm$ 140.5	1028.6 $\pm$ 115.1	1017.1 $\pm$ 148.9	1014.0 $\pm$ 119.2
Reticulocytes	(%)	2.2 $\pm$ 0.3	2.2 $\pm$ 0.4	2.2 $\pm$ 0.3	2.2 $\pm$ 0.4
	( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	189.8 $\pm$ 28.1	191.0 $\pm$ 35.0	197.6 $\pm$ 26.2	196.7 $\pm$ 37.6
Differential leukocyte counts					
Neutrophils	(%)	16.8 $\pm$ 4.6	15.1 $\pm$ 3.7	15.8 $\pm$ 6.1	17.6 $\pm$ 4.6
	( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	0.86 $\pm$ 0.36	0.76 $\pm$ 0.34	0.90 $\pm$ 0.40	0.84 $\pm$ 0.34
Eosinophils	(%)	2.2 $\pm$ 0.9	1.9 $\pm$ 0.6	2.0 $\pm$ 0.8	1.9 $\pm$ 0.6
	( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	0.10 $\pm$ 0.03	0.09 $\pm$ 0.04	0.11 $\pm$ 0.04	0.09 $\pm$ 0.02
Basophils	(%)	0.2 $\pm$ 0.3	0.2 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.3	0.2 $\pm$ 0.2
	( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	0.01 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.02	0.01 $\pm$ 0.01
Lymphocytes	(%)	75.0 $\pm$ 5.9	78.1 $\pm$ 4.2	76.7 $\pm$ 5.7	74.8 $\pm$ 5.1
	( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	3.87 $\pm$ 1.50	3.93 $\pm$ 1.19	4.42 $\pm$ 1.13	3.48 $\pm$ 0.32
Monocytes	(%)	5.8 $\pm$ 1.9	4.8 $\pm$ 1.2	5.4 $\pm$ 1.6	5.4 $\pm$ 1.5
	( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	0.31 $\pm$ 0.20	0.23 $\pm$ 0.04	0.31 $\pm$ 0.12	0.26 $\pm$ 0.08
<b>Females</b>					
WBC	( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	3.13 $\pm$ 0.82	3.60 $\pm$ 1.32	3.45 $\pm$ 0.97	3.66 $\pm$ 1.13
RBC	( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	8.3 $\pm$ 0.4	8.2 $\pm$ 0.4	8.0 $\pm$ 0.2	8.2 $\pm$ 0.3
Hb	(g/dl)	14.9 $\pm$ 0.4	15.1 $\pm$ 0.7	14.8 $\pm$ 0.3	15.1 $\pm$ 0.6
HCT	(%)	44.7 $\pm$ 1.7	45.5 $\pm$ 2.4	44.5 $\pm$ 1.0	45.4 $\pm$ 2.0
MCV	(fl)	54.1 $\pm$ 2.0	55.8 $\pm$ 1.4	55.4 $\pm$ 1.8	55.8 $\pm$ 2.1
MCH	(pg)	18.0 $\pm$ 0.5	18.5 $\pm$ 0.5	18.4 $\pm$ 0.5	18.5 $\pm$ 0.5
MCHC	(g/dl)	33.2 $\pm$ 0.5	33.3 $\pm$ 0.6	33.2 $\pm$ 0.3	33.2 $\pm$ 0.6
Plt	( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	986.3 $\pm$ 107.9	900.9 $\pm$ 137.3	986.1 $\pm$ 85.8	941.1 $\pm$ 134.6
Reticulocytes	(%)	2.1 $\pm$ 0.5	2.5 $\pm$ 0.6	2.3 $\pm$ 0.5	2.4 $\pm$ 0.7
	( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	176.0 $\pm$ 42.6	206.2 $\pm$ 53.2	181.9 $\pm$ 39.1	198.9 $\pm$ 53.3
Differential leukocyte counts					
Neutrophils	(%)	12.9 $\pm$ 5.9	13.6 $\pm$ 4.9	12.5 $\pm$ 8.0	13.1 $\pm$ 5.9
	( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	0.40 $\pm$ 0.23	0.48 $\pm$ 0.23	0.43 $\pm$ 0.30	0.46 $\pm$ 0.20
Eosinophils	(%)	2.7 $\pm$ 0.7	2.3 $\pm$ 1.0	2.2 $\pm$ 1.0	2.2 $\pm$ 0.9
	( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	0.08 $\pm$ 0.02	0.09 $\pm$ 0.05	0.07 $\pm$ 0.03	0.08 $\pm$ 0.04
Basophils	(%)	0.4 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.3
	( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	0.01 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.01
Lymphocytes	(%)	79.5 $\pm$ 7.0	79.0 $\pm$ 5.3	79.2 $\pm$ 8.5	78.9 $\pm$ 8.0
	( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	2.50 $\pm$ 0.75	2.85 $\pm$ 1.09	2.75 $\pm$ 0.88	2.94 $\pm$ 1.06
Monocytes	(%)	4.5 $\pm$ 1.5	4.9 $\pm$ 1.5	5.9 $\pm$ 4.1	5.5 $\pm$ 3.9
	( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	0.14 $\pm$ 0.04	0.17 $\pm$ 0.07	0.19 $\pm$ 0.11	0.18 $\pm$ 0.07

Values are means  $\pm$  SDs.

Table 4. Serum biochemistry data for SD rats treated with heme iron for 13 weeks.

	Heme iron			
	0%	0.8%	2%	5%
No. of animals examined	10	10	10	10
<b>Males</b>				
TP (g/dL)	6.31 ± 0.23	6.27 ± 0.32	6.31 ± 0.19	6.44 ± 0.22
A/G ratio	2.17 ± 0.22	2.01 ± 0.28	2.03 ± 0.13	1.84 ± 0.24
Alb (g/dL)	4.30 ± 0.18	4.16 ± 0.13	4.22 ± 0.13	4.16 ± 0.16
Total Bil (mg/dL)	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.01
GLU (mg/dL)	110.6 ± 15.1	114.6 ± 15.6	114.0 ± 20.4	121.0 ± 18.8
TG (mg/dL)	57.9 ± 20.7	57.6 ± 20.4	64.5 ± 41.9	71.1 ± 34.4
T-CHO (mg/dL)	64.2 ± 12.0	57.4 ± 9.5	60.1 ± 14.9	66.2 ± 7.7
BUN (mg/dL)	14.3 ± 2.4	14.6 ± 1.9	14.0 ± 1.9	14.3 ± 1.4
CRE (mg/dL)	0.34 ± 0.04	0.32 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.32 ± 0.02
Na (mEQ/L)	145.7 ± 0.9	146.1 ± 0.7	145.5 ± 1.6	145.3 ± 0.8
Cl (mEQ/L)	105.4 ± 1.0	105.8 ± 1.2	105.0 ± 1.2	105.1 ± 0.7
K (mEQ/L)	4.67 ± 0.16	4.64 ± 0.15	4.61 ± 0.19	4.62 ± 0.19
Ca (mg/dL)	9.84 ± 0.25	9.78 ± 0.29	9.78 ± 0.17	9.89 ± 0.27
IP (mg/dL)	6.02 ± 0.34	5.87 ± 0.60	6.14 ± 0.61	5.85 ± 0.74
Fe (μg/dL)	146.2 ± 22.2	151.6 ± 29.8	147.5 ± 28.3	127.9 ± 19.8
AST (IU/L)	137.8 ± 30.5	127.3 ± 29.0	117.7 ± 16.2	119.6 ± 19.4
ALT (IU/L)	33.1 ± 4.3	30.5 ± 3.2	30.4 ± 4.8	34.1 ± 5.6
ALP (IU/L)	272.8 ± 35.0	315.2 ± 44.3	313.0 ± 88.5	297.8 ± 46.6
γ-GTP (IU/L)	<3	<3	<3	<3
<b>Females</b>				
TP (g/dL)	7.04 ± 0.55	6.89 ± 0.46	7.12 ± 0.57	6.94 ± 0.31
A/G ratio	2.98 ± 0.35	3.00 ± 0.28	2.75 ± 0.24	2.74 ± 0.33
Alb (g/dL)	5.26 ± 0.50	5.16 ± 0.38	5.22 ± 0.46	5.08 ± 0.32
Total Bil (mg/dL)	0.10 ± 0.03	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.03	0.10 ± 0.02
GLU (mg/dL)	108.7 ± 12.0	106.7 ± 17.9	111.7 ± 13.9	115.1 ± 16.8
TG (mg/dL)	61.3 ± 44.4	48.7 ± 19.8	75.7 ± 61.5	35.1 ± 18.5
T-CHO (mg/dL)	81.9 ± 27.6	80.5 ± 14.0	81.9 ± 12.1	71.7 ± 12.9
BUN (mg/dL)	14.1 ± 2.4	14.9 ± 2.1	14.1 ± 1.7	14.6 ± 2.2
CRE (mg/dL)	0.38 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.38 ± 0.04
Na (mEQ/L)	143.6 ± 1.3	144.1 ± 1.2	143.0 ± 1.2	143.8 ± 0.8
Cl (mEQ/L)	105.6 ± 1.9	106.3 ± 1.3	105.0 ± 1.7	105.3 ± 1.2
K (mEQ/L)	4.41 ± 0.21	4.23 ± 0.27	4.33 ± 0.19	4.15 ± 0.14*
Ca (mg/dL)	10.24 ± 0.41	10.11 ± 0.37	10.22 ± 0.27	10.19 ± 0.26
IP (mg/dL)	4.55 ± 0.91	4.74 ± 0.46	5.05 ± 0.44	5.21 ± 0.47*
Fe (μg/dL)	367.5 ± 85.2	298.2 ± 62.3	287.4 ± 50.4*	313.0 ± 68.5
AST (IU/L)	112.5 ± 29.1	104.3 ± 17.1	120.7 ± 33.7	103.4 ± 27.4
ALT (IU/L)	24.2 ± 4.3	25.0 ± 4.9	27.2 ± 9.1	26.5 ± 15.2
ALP (IU/L)	158.7 ± 81.0	114.4 ± 26.6	134.9 ± 36.6	158.8 ± 52.0
γ-GTP (IU/L)	<3	<3	<3	<3

Values are means ± SDs.

\* \*\* : Significantly different from the controls at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively (Dunnett's test).

**Table 5. Body and organ weights data for SD rats treated with heme iron for 13 weeks.**

		Heme iron			
		0%	0.8%	2%	5%
No. of animals examined		10	10	10	10
<b>Males</b>					
Body weight	(g)	543.5 ± 51.4	527.3 ± 42.7	548.9 ± 31.2	543.6 ± 46.0
Brain	(g)	2.17 ± 0.09	2.16 ± 0.07	2.15 ± 0.08	2.18 ± 0.07
	(g/100gBW)	0.40 ± 0.03	0.41 ± 0.03	0.39 ± 0.02	0.40 ± 0.03
Thymus	(g)	0.27 ± 0.05	0.28 ± 0.07	0.30 ± 0.06	0.27 ± 0.07
	(g/100gBW)	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01
Heart	(g)	1.52 ± 0.15	1.52 ± 0.17	1.57 ± 0.12	1.52 ± 0.12
	(g/100gBW)	0.28 ± 0.02	0.29 ± 0.03	0.29 ± 0.02	0.28 ± 0.02
Lungs	(g)	1.37 ± 0.13	1.31 ± 0.12	1.40 ± 0.10	1.41 ± 0.07
	(g/100gBW)	0.25 ± 0.03	0.25 ± 0.03	0.26 ± 0.02	0.26 ± 0.02
Spleen	(g)	0.74 ± 0.10	0.73 ± 0.14	0.75 ± 0.11	0.73 ± 0.08
	(g/100gBW)	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.01
Liver	(g)	12.63 ± 2.28	12.00 ± 1.21	13.01 ± 1.56	13.40 ± 2.00
	(g/100gBW)	2.31 ± 0.23	2.27 ± 0.12	2.37 ± 0.21	2.46 ± 0.19
Adrenals	(g)	0.054 ± 0.008	0.049 ± 0.006	0.053 ± 0.006	0.050 ± 0.005
	(mg/100gBW)	10.0 ± 2.0	9.4 ± 1.2	9.7 ± 1.3	9.3 ± 1.0
Kidneys	(g)	3.27 ± 0.43	3.19 ± 0.23	3.37 ± 0.20	3.31 ± 0.29
	(g/100gBW)	0.60 ± 0.06	0.61 ± 0.03	0.61 ± 0.03	0.61 ± 0.03
Testes	(g)	3.34 ± 0.36	3.68 ± 0.18*	3.77 ± 0.25**	3.59 ± 0.40
	(g/100gBW)	0.62 ± 0.10	0.70 ± 0.05*	0.69 ± 0.04	0.66 ± 0.09
Pituitary	(g)	0.014 ± 0.002	0.015 ± 0.002	0.015 ± 0.001	0.014 ± 0.001
	(mg/100gBW)	2.62 ± 0.31	2.92 ± 0.25	2.69 ± 0.20	2.61 ± 0.35
Thyroid	(g)	0.029 ± 0.005	0.027 ± 0.001	0.030 ± 0.004	0.033 ± 0.004*
	(mg/100gBW)	5.29 ± 0.88	5.09 ± 0.46	5.46 ± 0.59	6.14 ± 0.50*
Salivary gland	(g)	0.92 ± 0.10	0.89 ± 0.05	0.87 ± 0.07	0.95 ± 0.09
	(g/100gBW)	0.17 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.18 ± 0.02
Seminal vesicle	(g)	1.92 ± 0.31	1.97 ± 0.29	1.86 ± 0.19	1.96 ± 0.32
	(g/100gBW)	0.36 ± 0.06	0.37 ± 0.05	0.34 ± 0.04	0.36 ± 0.06
Prostate	(g)	1.39 ± 0.27	1.34 ± 0.19	1.35 ± 0.18	1.38 ± 0.21
	(g/100gBW)	0.26 ± 0.05	0.25 ± 0.03	0.25 ± 0.04	0.25 ± 0.03
<b>Females</b>					
Body weight	(g)	274.8 ± 22.0	280.0 ± 22.9	282.5 ± 13.5	272.2 ± 27.2
Brain	(g)	1.92 ± 0.06	1.94 ± 0.06	1.90 ± 0.06	1.93 ± 0.09
	(g/100gBW)	0.70 ± 0.07	0.70 ± 0.06	0.67 ± 0.04	0.71 ± 0.07
Thymus	(g)	0.25 ± 0.04	0.25 ± 0.06	0.24 ± 0.04	0.26 ± 0.09
	(g/100gBW)	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.08 ± 0.02	0.09 ± 0.03
Heart	(g)	0.91 ± 0.09	0.97 ± 0.24	0.88 ± 0.07	0.93 ± 0.09
	(g/100gBW)	0.33 ± 0.02	0.35 ± 0.07	0.31 ± 0.02	0.34 ± 0.04
Lungs	(g)	1.03 ± 0.08	1.07 ± 0.26	0.98 ± 0.11	1.01 ± 0.10
	(g/100gBW)	0.38 ± 0.04	0.38 ± 0.08	0.35 ± 0.03	0.37 ± 0.04
Spleen	(g)	0.45 ± 0.05	0.47 ± 0.06	0.46 ± 0.04	0.50 ± 0.11
	(g/100gBW)	0.16 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.18 ± 0.03
Liver	(g)	6.37 ± 0.95	6.34 ± 0.70	6.32 ± 0.47	6.16 ± 0.65
	(g/100gBW)	2.31 ± 0.22	2.27 ± 0.22	2.24 ± 0.17	2.26 ± 0.15
Adrenals	(g)	0.062 ± 0.008	0.055 ± 0.007	0.056 ± 0.010	0.056 ± 0.007
	(mg/100gBW)	22.5 ± 3.0	19.6 ± 2.5	19.8 ± 3.2	20.5 ± 3.1
Kidneys	(g)	1.69 ± 0.22	1.73 ± 0.11	1.71 ± 0.15	1.69 ± 0.11
	(g/100gBW)	0.61 ± 0.06	0.62 ± 0.05	0.60 ± 0.05	0.62 ± 0.06
Ovaries	(g)	0.067 ± 0.013	0.072 ± 0.012	0.072 ± 0.020	0.069 ± 0.008
	(mg/100gBW)	24.9 ± 6.1	25.6 ± 4.0	25.3 ± 6.4	25.7 ± 3.7
Pituitary	(g)	0.020 ± 0.005	0.018 ± 0.002	0.017 ± 0.003	0.019 ± 0.004 <sup>a</sup>
	(mg/100gBW)	7.34 ± 1.52	6.41 ± 1.19	6.14 ± 1.17	7.10 ± 1.61 <sup>a</sup>
Thyroid	(g)	0.022 ± 0.004	0.022 ± 0.004 <sup>a</sup>	0.023 ± 0.004	0.023 ± 0.004
	(mg/100gBW)	7.89 ± 1.72	7.78 ± 1.29 <sup>a</sup>	8.02 ± 1.19	8.54 ± 1.42
Salivary gland	(g)	0.55 ± 0.04	0.56 ± 0.02	0.53 ± 0.06	0.54 ± 0.07
	(g/100gBW)	0.20 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.20 ± 0.01

Values are means ± SDs.

\*,\*\*:Significantly different from the controls at p<0.05 and p<0.01, respectively (Dunnett's test).

<sup>a</sup>:Number of effective animals was reduced to nine due to the failure of organ sampling.

Pituitary,Thyroid,Salivary gland,Seminal vesicle,Prostate : to mesure organ weight after formalin fixed.

**Table 6. Histopathological findings in SD rats treated with heme iron for 13 weeks.**

		<b>Male</b>		<b>Female</b>		
		Heme iron (%)	0	5	0	5
		No. of animals examined	10	10	10	10
<b>Organs</b>	<b>Findings</b>					
Liver	Focal necrosis, hepatocytes	±	0	0	1	0
Kidney	Basophilic tubules	±	3	2	1	1
	Cyst	P	0	0	1	1
Heart	Focal necrosis, myocardium	±	2	0	0	0
Pancreas	Lobular atrophy	±	1	2	1	0
Thyroid	Ultimobranchial rest	P	1	0	0	0
Pituitary	Cyst, pars distalis	P	0	0	0	1
Eye	Focal atrophy, retina, unilateral	±	1	0	2	1
	Retinal rosette, unilateral	±	0	0	0	2
Small intestine	Diverticulum	P	1	0	0	0

±: Minimal, P: Present

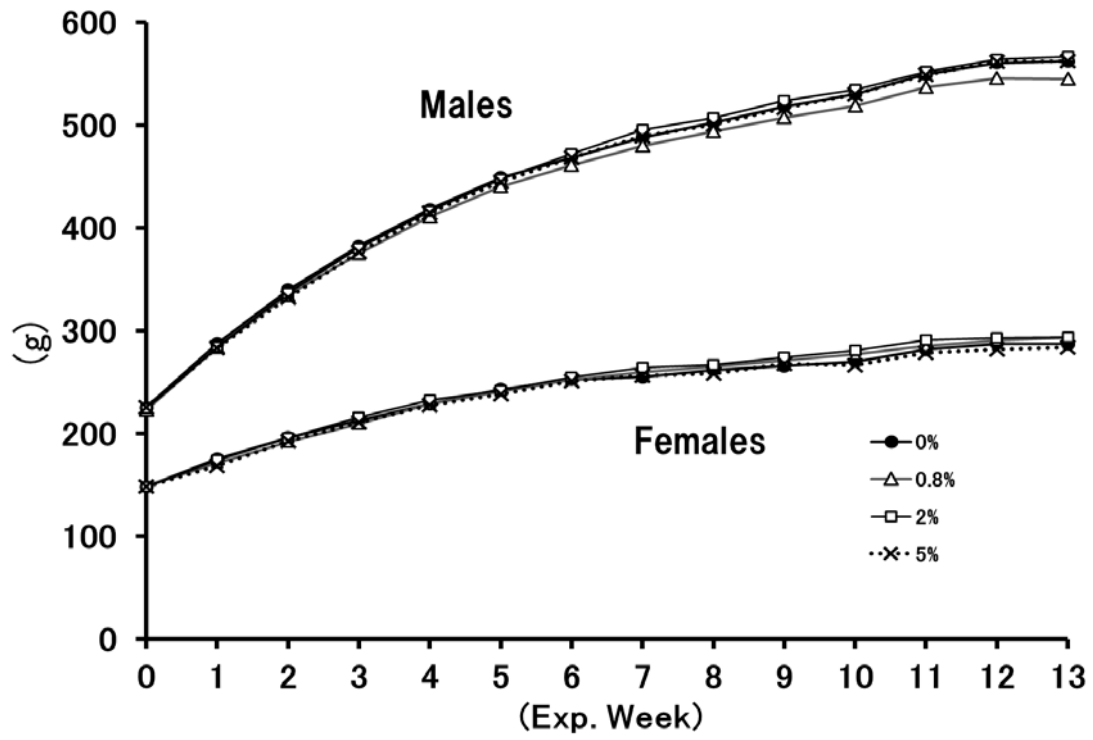


Fig. 1. Body weight curves for male and female SD rats treated with heme iron for 13 weeks.

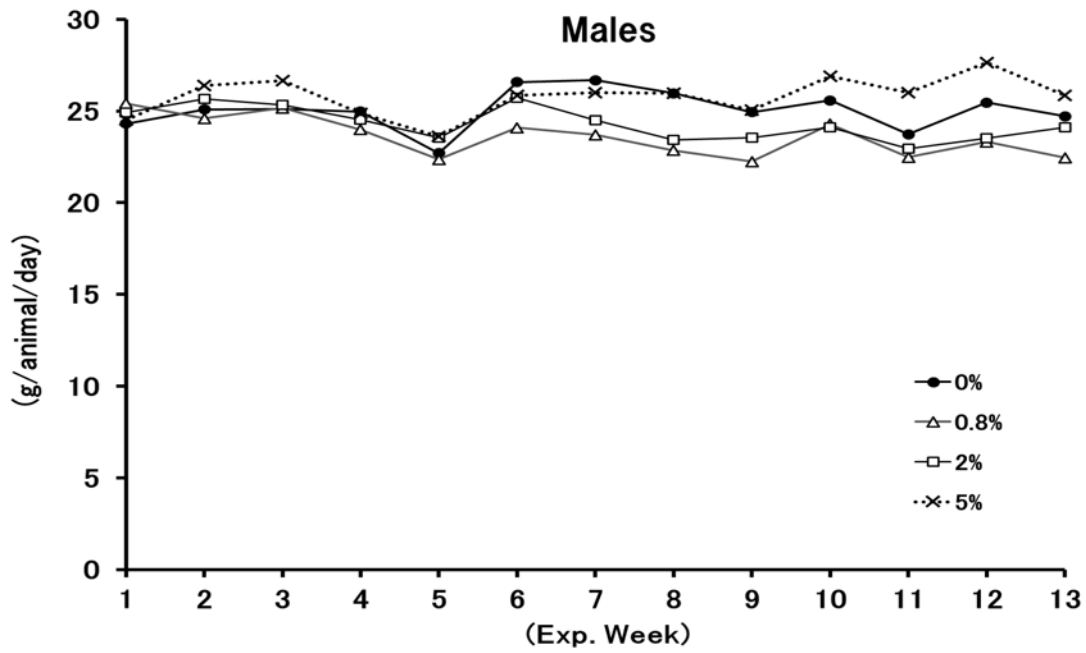


Fig. 2. Daily food intake for male SD rats treated with heme iron for 13 weeks.

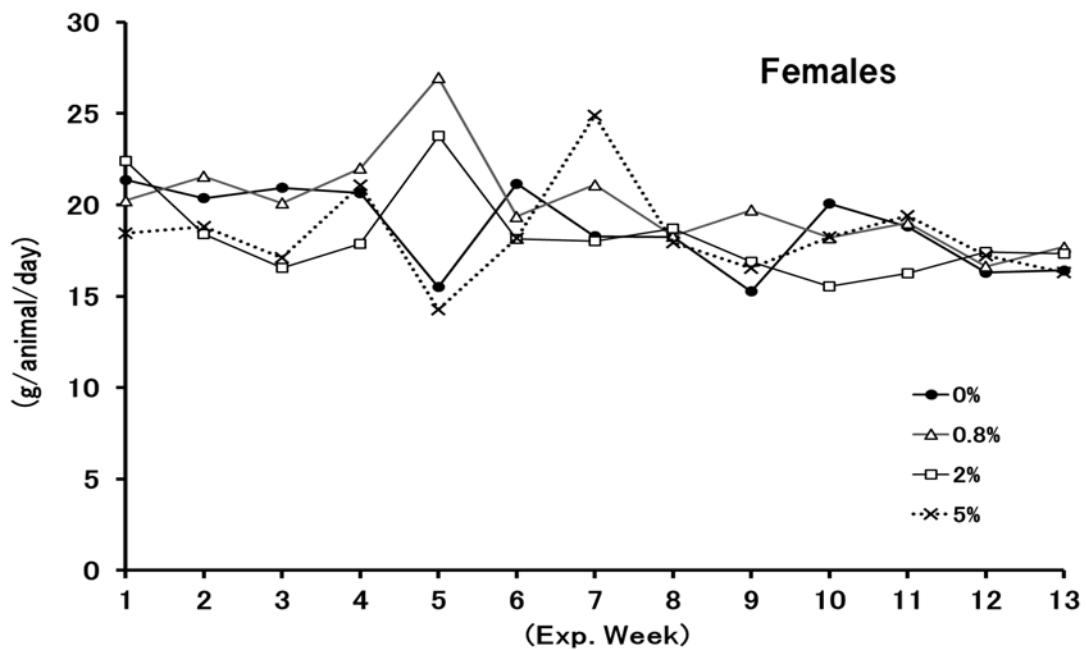


Fig. 3. Daily food intake for female SD rats treated with heme iron for 13 weeks.

**Appendix 1. Defected organs in histopathological examination in SD rats treated with heme iron for 13weeks.**

Heme iron (%)	No. of animals	Male		Female	
		0	5	0	5
Organs		10	10	10	10
Mammary gland		-	2	-	-
Parathyroid		1	-	-	-
Lymph node, mediastinum		-	1	5	3
Trachea		-	-	1	-
Esophagus		-	-	1	-
Zymbal's gland		2	-	-	-