

2005年12月21日

塩基性炭酸ニッケル(II)のラットを用いる
反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

厚生労働省医薬食品局審査管理課
化学物質安全対策室 委託

財団法人食品薬品安全センター
秦 野 研 究 所

【目 次】

要 約	1
1. 反復投与毒性および回復性	1
2. 生殖発生毒性	1
3. 無作用量	2
試験目的	3
方 法	4
1. 被験物質	4
2. 使用動物および飼育方法	4
3. 投与検体の調製	5
4. 投与量の設定および投与方法	7
5. 観察および検査	8
6. データ解析法	13
結 果	15
I. 反復投与毒性および回復性試験	15
1. 一般状態	15
2. 詳細な症状観察	15
3. 機能検査	15
4. 体重	15
5. 摂餌量	15
6. 血液学検査	16
7. 血液生化学検査	16
8. 病理学検査	16
II. 生殖発生毒性	18
1. 性周期および交配成績	18
2. 分娩および哺育所見	19
3. 黄体数および着床数	19

4. 出生児所見	19
考 察	20
1. 反復投与毒性および回復性	20
2. 生殖発生毒性	21
3. 無作用量	22
文 献	23

Figures 1~4

Tables 1~33

【要 約】

塩基性炭酸ニッケル(II) (以下、NCB と略記) の、雌雄動物に対する反復投与による影響とその回復性、親動物の生殖・発生および新生児の発育に及ぼす影響を検討するために、0 (溶媒対照、0.5% CMC Na 水溶液)、0.4、2 および 10 mg/kg の NCB を雌雄の Sprague-Dawley 系ラット (各 12 匹/群) に反復経口投与した。投与 2 週間目に 2 週間を限度として交配させ、雄は交配期間終了 2 週間目に剖検した。雌は交配後、自然分娩させて母動物は哺育 5 日に、出生児は哺育 4 日に剖検した。また、0 および 10 mg/kg 投与群の各雄 5 匹および雌のサテライト群 (0 および 10 mg/kg) は 42 日間投与した後、14 日間休薬させて剖検した。その結果を以下に要約した。

1. 反復投与毒性および回復性

10 mg/kg 投与群の雌の 1 例においては、40 回投与後の妊娠 23 日の朝、出産中の死亡が発見され、剖検の結果、外陰部周囲の被毛の汚れ、脾臓ならびに胸腺の小型化が認められた。この動物では組織検査の結果、肺に鬱血および水腫がみられ、肺胞内に限局性の泡沫細胞の集簇が観察されたほか、脾臓では白脾髄領域の減少、胸腺では萎縮が認められた。病理組織所見はいずれも直接の死因とは考えられなかったものの、被験物質投与の影響を否定し得なかった。詳細な症状観察では、投与期間末期の観察において、雄ではケージからの取り出し時や動物の取り扱い時において、抵抗を示す動物が若干増加する傾向が認められたが被験物質の投与による影響であると断定できなかった。

その他、機能検査結果、体重推移ならびに摂餌量の測定結果、血液学検査、血液生化学検査および病理学検査の結果に、被験物質投与による影響は認められなかった。

2. 生殖発生毒性

交配前の投与期間中、異常な性周期を示す動物は認められず、いずれの群においても全例の交尾が成立し受胎した。また、妊娠動物の全例が生児を出産し、妊娠期間は対照群と投与群との間に有意差は認められなかった。分娩/哺育状態が不良であると判断された動物は認められなかった。分娩翌日以降の哺育状態の異常は認められず、出産した全出生児が死亡した例もなかった。

出生児の一般状態には異常が認められず、児の生存性にも、被験物質投与の影響は認められ

なかった。また、対照群と投与群との間で、哺育児体重に差は認められなかった。生存産児および哺育 4 日の剖検時の形態観察では、被験物質投与に起因したと考えられる異常は認められなかった。死亡児では、いずれの動物にも形態異常は観察されなかった。

3. 無作用量

以上の結果より、本試験条件下での NCB の無作用量は以下の通りと推定された。

反復投与毒性に関しては、10 mg/kg 投与群の雌の 1 例で死亡が認められ、剖検所見ならびに病理組織検査の結果から、被験物質の影響を否定できないことから雌については 2 mg/kg/day と推定される。雄については、詳細な症状観察でケージからの取り出し時や動物の取り扱い時において、抵抗を示す動物が若干増加する傾向が認められたことから 2 mg/kg/day と推定される。

一方、雌雄の生殖発生毒性ならびに出生児に関しては、10 mg/kg 投与群においても NCB 投与に起因した影響が認められなかったことから、10 mg/kg/day 以上と判断された。

【試 験 目 的】

塩基性炭酸ニッケル(II)は、主としてメッキに用いられる化学物質である。今回、OECD 既存化学物質安全性点検等に係る毒性調査の一環として、塩基性炭酸ニッケル(II)の安全性確認の資料を得るために、ラットを用いる反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を行い、親動物に対する反復投与の影響およびその回復性、ならびに新生児の生存性、発育および形態を含む生殖発生に及ぼす影響について検討したので報告する。

本試験は、「OECD 化学物質試験法ガイドライン／反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験法」(1996 年 3 月 22 日)に準拠し、「化学物質 GLP」(平成 12 年 3 月 1 日改正、環保安第 41 号、生衛発第 268 号、平成 12・02・14 基局第 1 号)、「動物の愛護および管理に関する法律」(平成 11 年 12 月 22 日改正、法律第 221 号)および「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」(昭和 55 年 3 月 27 日、平成 14 年 5 月 28 日一部改正、総理府告示第 6 号)を遵守して実施した。

【方 法】

1. 被験物質

被験物質として用いた塩基性炭酸ニッケル(II) (以下、NCB と略記) の性状は以下の通りである。

化学名	塩基性炭酸ニッケル (II)
英名	Nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate
CAS No.	39430-27-8
分子式	$\text{CH}_4\text{Ni}_3\text{O}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
分子量	376.18
物理化学的性質	性 状 : うすい緑色の粉末 分解温度 : 230℃
構造式	approx. $\text{NiCO}_3 \cdot 2\text{Ni}(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

本試験には、 から購入した NCB [ロット番号 、含量 94.7% (Ni 含量の測定結果 44.3%より算出)、Appendix A] を用いた。被験物質は受領後 (被験物質受領日 : 2003 年 11 月 21 日) 使用時まで、被験物質受領保管室において密閉して室温で保管した。また、本試験の投与終了後に残余被験物質を被験物質購入先に送付し、購入先にて再度品質試験を実施し、試験期間中、安定であったことを確認した (Appendix B)。

2. 使用動物および飼育方法

8 週齢の Sprague-Dawley (SD) 系 [Crj:CD (SD) IGS、SPF] の雌雄ラットを、日本チャールス・リバー株式会社厚木飼育センターから購入し、飼育環境への馴化と検疫を兼ねて入荷日を含めて 14 日間予備飼育した。検疫・馴化期間中、毎日一般状態を観察し、入荷日および検疫終了日に体重を測定した。また、雌全例の性周期を入荷翌日から毎日観察したほか、検疫期間中に雌雄全例の詳細な症状観察を実施した。その結果、検疫・馴化期間中、雄の 1 匹 (入荷動物番号 : 雄 32) で部分的な脱毛が、雌の 1 匹 (入荷動物番号 : 雌 34) で眼周囲の被毛の汚染が認められ、検疫終了日の詳細な症状観察の結果、雄の 1 例では流涎がみられたため (入荷動物番号 : 雄 44)、すべて本試験から除外した。さらに雌の 21 匹 (入荷動物番号 : 雌 4, 5, 13, 15, 17, 23, 28, 33, 34, 38, 41, 50, 52, 59, 63, 64, 74, 80, 82, 86, 87) は 4 日周期以外の性周期を示したため、全て群分けの対象から除外した。群分けは以上の動物全てを除いたほか、検疫終了時

(投与開始前日)の測定体重をもとに体重の上位および下位を除いた動物を体重別層化無作為抽出法により群分けした。投与時の週齢は雌雄とも10週齢であった。なお、群分けによって試験系から除外された動物(雄9匹、雌35匹)のうち、雌32匹は手技検討用に転用し、雄9匹、雌3匹は微生物モニタリングに供した。

動物入荷日:2004年4月28日

入荷匹数:雄57匹、雌93匹

入荷時体重:雄264.9~288.8 g(平均276.1 g)、雌171.2~193.0 g(平均182.4 g)

投与開始日:2004年5月12日

投与時体重:雄356.7~416.9 g(平均384.4 g)、雌211.1~250.3 g(平均231.8 g)

個体識別は各動物の尾にフェルトペンで入荷動物番号を付し、検疫期間中は各飼育ケージに試験計画番号および入荷動物番号を記入した動物カードを掛け、群分け後は群ごとに色の異なる動物カードに試験計画番号、動物番号および入荷動物番号を記入した動物カードを掛けた。なお、出生児の個体識別は行わなかった。

全飼育期間を通じ、動物を金属製金網床ケージ(220 w×270 d×190 h mm)に1匹ずつ(交配時は2匹/ケージ)収容し、許容温度21.0~25.0℃、許容湿度40.0~75.0%、換気回数約15回/時間、照明12時間(7時~19時点灯)に制御された飼育室(4号室)で、固型飼料(CE-2、日本クレア株式会社)および水道水(秦野市水道局給水)を自由に摂取させて飼育した。妊娠18日(陰栓あるいは精子発見日=妊娠0日)以降の母動物は、ラット用プラスチック製繁殖ケージ(350 w×400 d×180 h mm)に収容し、哺育4日(哺育0日=分娩日)まで紙パルプ製チップ(ペパークリーン、日本エスエルシー株式会社)を床敷として供給して飼育した。なお、飼育期間中、飼育室の温湿度の実測値は、それぞれ22.5~24.5℃、48.0~68.0%であった。また、供給した飼料、水および床敷には試験に支障を来す可能性のある混入物は認められなかった。

3. 投与検体の調製

まず、0.5% CMC Na 溶液に被験物質を均一に懸濁させ、無水物として0.2(w/v)%の懸濁液を調製した。試験に使用する四水和物としての調製濃度は、無水物の分子量が304.11、四水和物の分子量が376.18であることをもとに、さらに含量94.7%から換算によって求め、換算比率1.306を乗じた。0.2(w/v)%液は安定性試験の結果に基づき、冷蔵条件下に連続的に攪拌して保管し、調製後8日以内に使用した。一方、0.04および0.008(w/v)%液は、投与直前に0.2(w/v)%液を媒体で段階希釈して調製した。投与量と被験物質濃度は以下の通りである。

投与量 (mg/kg)	濃度 (無水物、w/v%)	濃度 (四水和物、w/v%)
0.4	0.008	0.01
2	0.04	0.05
10	0.2	0.26

投与に先立ち、被験物質の 0.008 および 0.2(w/v)%液について、冷蔵条件下における 10 日間の安定性を確認した (Appendix C)。その結果、0.2(w/v)%液については、10 日間の安定性が認められたが、0.008(w/v)%液においてはみられなかった。そのため本試験においては高用量群の検体を冷蔵保管し、中ならびに低用量群の検体は投与当日、投与の直前に調製することとした。この結果に先立ち以下の検討を行い、保存する 0.2(w/v)%液は攪拌し続けることとした。まず冷蔵条件下に静置した状態での 0.008 および 0.2(w/v)%液についての 10 日間の安定性を求めたが、検体中の被験物質含量は調製時に比較して変化がなかったものの、0.008(w/v)%液、0.2(w/v)%液とも均一性が認められなかったことから、冷蔵、静置した状態では安定性はないものと判断した。次に、0.008 および 0.2(w/v)%液について室温 3 日間の安定性を求めたが、冷蔵条件下に静置した場合と同様に保管後の均一性は確認できなかった。このため冷蔵条件下に、連続的に検体を攪拌した状態における安定性についての検討を行い、前述の結果を得た。

一方、2004 年 5 月 12 日に調製した各濃度の調製検体について、含量および均一性を測定し、平均含量については調製指示濃度の 100～111%で規定範囲内にあったことを確認した (Appendix E)。ただし、各濃度の 3 回の測定値の均一性はそれぞれの平均測定濃度の 89.2～112%の範囲となり、均一性の基準としている 90.0～110%を逸脱していた。しかし、その差はわずかであること、ならびに含量の平均値は調製指示濃度に近似していることから、投与を反復して実施する本試験においては、各群の各動物には、ほぼ均一の量の被験物質が曝露されており、試験に与える影響は少ないものと判断した。

調製検体中の被験物質濃度の測定は、各調製検体を 1 mL ずつ採取し、105℃で 3 時間乾燥後、硝酸 0.2 mL を加えた。室温で原則として一晩放置後、高圧分解るつぼを用いて、90℃で 2 時間、ついで 145℃で 3 時間加熱分解した。放冷後、分解液に水を加えて 50 mL とし、さらに薄めた硝酸 (1→250) で適宜希釈して試料溶液 (ニッケルとして約 0.5 μ g/mL) を調製した。試料溶液のニッケル濃度を原子吸光光度法 (標準添加法) により測定し、これらの測定値から調製検体中の被験物質濃度を算出した。

ラ ン プ : ニッケル中空陰極ランプ
 波 長 : 232.1 nm
 使 用 ガ ス : アセチレン (可燃性ガス)
 空気 (支燃性ガス)

4. 投与量の設定および投与方法

秦野研究所にて実施した本被験物質の反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合予備試験（試験計画番号：R-03-004）においては、開始時の情報検索の結果、本被験物質の単回投与時の 50% 致死量が 840 mg/kg であるとするデータが認められた。このことから、予備試験の投与量を、単回投与時の 50%致死量の 10 分の 1 量である 100 mg/kg を中心に公比約 3 で 300 ならびに 30 mg/kg に設定し、妊娠母動物に対して妊娠中期以降、分娩直後まで反復投与した。その結果、100 mg/kg 以上の投与量では投与した全母動物の、30 mg/kg の投与量では 3 例中 1 例の母動物の死亡が、いずれも分娩前後に認められ、本試験スケジュールにおける最大耐量を凌駕する投与量であると推定された。そこで、本試験における高用量を本予備試験における死亡発現量である 30 mg/kg の 3 分の 1 量である 10 mg/kg に設定し、中用量以下を公比 5 で除して 2 ならびに 0.4 mg/kg とした。なお、死亡例の剖検結果では、脾臓の著しい小型化ならびに腸管内の餌の貯留の減少以外の所見は認められず、死亡原因に結びつくと考えられる所見は得られなかった。

動物への投与は、雄では交配前 2 週間から最長 2 週間の交配期間を経て剖検前日に至るまでの連続 42 日間、雌は交配前 2 週間、交尾までの交配期間、妊娠期間および哺育 4 日まで、回復試験用サテライト群の雌は連続 42 日間、それぞれ毎日 1 回、11 時～12 時 5 分にラット用胃管を用いて強制的に経口投与した。

各群の投与物質、投与量、濃度、投与容量および動物番号は以下の通りである。

群	投与物質	投与量 ¹⁾		濃度 四水和物 (w/v%)	投与容量 ²⁾ (mL/kg)	動物番号	
		無水物 (mg/kg)	四水和物 (mg/kg)			雄	雌
1	媒体 ³⁾	0	0	0	5	MX01001～012	FB01001～012
2	NCB	0.4	0.49	0.010	5	MX02001～012	FB02001～012
3	NCB	2	2.47	0.05	5	MX03001～012	FB03001～012
4	NCB	10	12.4	0.26	5	MX04001～012	FB04001～012
5 ⁴⁾	媒体 ³⁾	0	0	0	5	—	FB05001～005
6 ⁴⁾	NCB	10	12.4	0.26	5	—	FB06001～005

- 1) 無水物として用量を設定した。本試験に使用する四水和物としての投与量は、無水物の分子量が 304.11、四水和物の分子量が 376.18 であることをもとに換算によって求め、四水和物としての濃度はさらに含量 (94.7%) を考慮して換算した。
- 2) 雌雄とも最近時の体重をもとに個体別の投与液量を算出した。
- 3) 0.5%CMC Na 水溶液
- 4) 回復試験動物として、雄は対照群および高用量群のうち動物番号の大きい各 5 例 (MX01008~MX01012、MX04008~MX04012)、雌はサテライト群の全例を最終投与翌日 (回復 1 日) から 14 日間休薬した。

5. 観察および検査

1) 一般状態の観察

全例について、飼育期間中および回復期間中は毎日 1 回、投与期間中は投与前後の毎日 2 回観察した。

2) 詳細な症状観察

雄の詳細な症状観察は、検疫終了日 (全入荷動物対象)、投与 7、14、21、28、35 および 42 日に行い、さらに回復試験動物は回復 7 および 14 日に行った。雌の詳細な症状観察は、検疫終了日 (全入荷動物対象)、投与 7、14、21、28、35 および 42 日に行い、観察日が分娩中であった例は哺育 0 日に、その他の分娩例は哺育 0 日から 4 日の間に 1 回観察し、さらに、サテライト群は回復 7 および 14 日に行った。詳細な症状観察は 11 時~15 時の間にスコアリング法により実施した。まずケージ越しでの観察 (姿勢・体位、自発運動、発声、振戦、痙攣) を行った後、ケージから取り出す際に外表を観察し (取り出し易さ、扱い易さ、心拍動、体温、被毛、皮膚色、可視粘膜、流涙、眼球突出、瞳孔径、流涎)、作業台上での行動の正常性を観察 (姿勢・体位、探索行動、身づくろい、発声、挙尾反応、歩行、常同行動、奇妙な行動、振戦、痙攣、立毛、眼裂) した。

3) 機能検査

雄では、投与 42 日の詳細な症状観察に引き続き、各群の動物番号の若い 5 例および回復観察に供する対照群および高用量群の各 5 例を、また、回復 14 日の詳細な症状観察後に、全例につ

いて機能検査を実施した。雌では、分娩例は哺育4日に投与期間が近接した各群の動物番号が若い5匹を検査した。サテライト群では、投与42日および回復14日のそれぞれ詳細な症状観察に引き続き、全例の機能検査を実施した。機能検査はプライエル反応、瞳孔反射、視覚定位、驚愕反応、後肢引込み反射、眼瞼（瞬目）反射、正向反射の有無を観察した。

4) 体重測定

雄およびサテライト群は全例について、投与1（投与開始日）、7、14、21、28、35および42日、回復1、7および14日、解剖日（最終投与翌日および回復15日）に体重を測定した。交尾が確認されるまでの雌は、投与1、7、14および21日、交尾確認後は妊娠0（交尾確認日）、7、14および20日、分娩後は哺育0（分娩日）および4日ならびに解剖日に体重を測定した。

5) 摂餌量測定

雄および雌のサテライト群は全例について、投与1～2、7～8、14～15、29～30、35～36および41～42日、回復6～7および13～14日に測定した。交尾が確認されるまでの雌は、投与1～2、7～8および14～15日、交尾確認後の雌は妊娠0～1、7～8、14～15および20～21日、分娩後は哺育3～4日にそれぞれ摂餌量を測定した。

6) 性周期

サテライト群を除く雌全例について、群分け前日までの性周期観察に引き続いて、投与開始以降、膣スメア標本を毎日作製し、各動物の同居後交尾が確認されるまで性周期を観察した。性周期は発情期、発情前期および発情休止期に分類した。これらの分類に基づき性周期の型を4日あるいは5日間隔で発情を回帰するものをそれぞれの周期に、それ以外を不正周期に分類した。

7) 交配

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

交配結果から、雌雄同居開始日から交尾確認日までの日数およびその間に回帰した発情期の

回数、各群の交尾率〔(交尾動物数/交配動物数)×100、%〕および子宮に着床痕が確認された動物を妊娠動物として受胎率〔(妊娠動物数/交尾動物数)×100、%〕を算出した。

8) 分娩・哺育状態の観察

各群とも交尾した雌は全例を自然分娩させて哺育させた。分娩の確認は、妊娠 21 日から分娩が確認されるまで毎日行い、午前 11 時までに分娩が完了した例について、その日を哺育 0 日とした。分娩状態を直接観察できた例は異常の有無を断続的に観察し、直接観察できなかった例は分娩前後の一般状態および産児の状態から異常の有無を判断した。

分娩した全例の妊娠期間(妊娠 0 日から分娩日までの日数)を求め、各群の出産率〔(生児出産雌数/妊娠動物数)×100、%〕を算出した。また、哺育 1 日から毎日、哺育状態を観察し、哺育 5 日の剖検時に観察した着床数および妊娠黄体数から着床率〔(着床数/妊娠黄体数)×100、%〕を算出した。

9) F₁ 出生児の観察

哺育 0 日に生存児数および死亡児数を雌雄別に数えて性別および外表奇形の有無を観察し、分娩率〔(産児数/着床痕数)×100、%〕、生児出産率〔(出產生児数/着床痕数)×100、%〕および出生率〔(出產生児数/産児数)×100、%〕を算出した。哺育 1～4 日まで毎日、一般状態を観察し、生児数と死亡児数を雌雄別に数え、新生児生存率〔(哺育 4 日の生児数/哺育 0 日の生児数)×100、%〕を算出した。生存児については、哺育 0 および 4 日に個別の体重を測定し、各腹ごとに雌雄別の平均値を算出するとともに、哺育 0 および 4 日における性比〔雄生児数/総生児数)×100、%〕を算出した。

10) 剖検および採血

雄の投与終了時剖検例は投与 42 日の翌日に、回復観察例は回復 15 日に解剖した。また、雌の分娩例は哺育 4 日の翌日に、サテライト群は回復 15 日に解剖した。全例いずれも解剖前 18～24 時間絶食させた後、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血致死あるいは採血後に放血致死させて解剖し、血液学検査、血液生化学検査および病理学検査を実施した。なお、採血は、腹部後大静脈から以下の手順で行い、雄の投与終了時剖検では各群の動物番号が若い 5 例、回復 15 日における剖検では全例で採血を行い、また、雌の投与終了時剖検では、分娩例について哺育 4 日に投与期間が近接した各群の動物番号が若い 5 例、サテライト群は全例で採血を行った。

①血液学検査用採血（抗凝固剤：クエン酸ナトリウム）

②血液学検査用採血（抗凝固剤：EDTA-2K）

③血液生化学検査用採血（抗凝固剤：ヘパリン）

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

11) 血液学検査

抗凝固剤としてクエン酸ナトリウムを用いて採取した血液から血漿を分離して、プロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間を測定し、その他の項目は抗凝固剤として EDTA-2K を用いて採取した血液で測定した。なお、採血時に検査の補助として静脈血塗抹標本（Wright-Giemsa 染色）を作製したが、観察の必要がなかったため使用しなかった。また、網状赤血球比率についても標本は作製したが、赤血球系の検査において被験物質の影響が示唆されなかったことから、観察は実施しなかった。

項目	測定法	使用機器
赤血球数（RBC）	電気抵抗法	血液自動分析装置 CELL-DYN3500（ダイボット）
白血球数（WBC）	フローサイトメトリー・ レーザー光散乱法/電気抵抗法	同上
白血球分類	同上	同上
血色素量（Hb）	吸光度法	同上
平均赤血球容積（MCV）	電気抵抗法	同上
血小板数	同上	同上
ヘマトクリット値（Ht）	計算（ $RBC \times MCV \times 0.001$ ）	
平均赤血球血色素量 （MCH）	計算（ $Hb \times 1000 / RBC$ ）	
平均赤血球血色素濃度 （MCHC）	計算（ $Hb \times 100 / Ht$ ）	
プロトロンビン時間（PT）	光散乱検出法	全自動血液凝固測定装置 CA-1000 （東亜医用電子）
活性部分トロンボプラスチン時 間（APTT）	同上	同上

12) 血液生化学検査

前述の血液学検査のための採血に引き続き、抗凝固剤としてヘパリンを用いて採取した血液から血漿を分離して、以下の項目について検査した。

項目	測定法	使用機器
総蛋白濃度	ビュレット法	遠心方式生化学自動分析装置 COBAS MIRA plus (ロシュ・ダイアグノスティックス)
アルブミン濃度	BCG 法	同上
総コレステロール濃度	コレステロールオキシダーゼ・HDAOS 法	同上
グルコース濃度	ヘキソキナーゼ・G-6-PDH 法	同上
尿素窒素濃度	ウレアーゼ・G1DH 法	同上
クレアチニン濃度	Jaffé 法	同上
アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性	GSCC 法	同上
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 活性	IFCC 法	同上
アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 活性	同上	同上
γ-グルタミルトランスアミドラーゼ (γ-GTP) 活性	同上	同上
トリグリセリド濃度	GPO・HDAOS (グリセリン消去) 法	同上
無機リン濃度	モリブデン酸直接法	同上
総ビリルビン濃度	酵素法	同上
カルシウム濃度	OCPC 法	同上
A/G 比	計算	
ナトリウムイオン濃度	イオン電極法	全自動電解質分析装置 EA05 (エイント・ディー)
カリウムイオン濃度	同上	同上
塩素イオン濃度	同上	同上

前頁の測定項目のうち、再測定を実施した測定値については appendix 中に記載した。

13) 病理学検査

(1) 肉眼的観察

全例を剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行った。雌雄ともに血液学検査および血液生化学検査を実施した動物の脳、心臓、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣および精巣上体の重量（実重量）を測定し、比体重値（相対重量）を算出した。また、全例の脳、下垂体、脊髄、心臓、気管、肺（気管支を含む）、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、副腎、甲状腺、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、精巣、精巣上体、前立腺腹葉、凝固腺を含む精嚢、卵巣、子宮、膣、膀胱、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、坐骨神経、大腿骨および骨髄、眼球、顎下腺および舌下腺、骨格筋、病変部を採取し、保存した。肺は 0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液で注入固定してから採取した。子宮は着床数を数え、分娩例の卵巣は実体顕微鏡下で妊娠黄体数を数えた。採取した器官・組織のうち、精巣ならびに精巣上体はブアン液（長期保存は 0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液を使用）に固定し、その他は 0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液に固定した。

(2) 病理組織学検査

卵巣、精巣および精巣上体は全例について、肉眼的観察で変化がみられた病変部は該当動物のみについて、これ以外の器官・組織は、雄の投与終了時剖検および雌の分娩例では対照群と高用量群のうち、血液学検査および血液生化学検査を実施した各 5 例について病理組織学検査を実施した。これらの器官・組織はパラフィン包埋して薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、光学顕微鏡を用いて検査した。なお、大腿骨は大腿骨髄の組織検査を目的に採材したものであることから、試験計画通り、骨組織は病理組織学検査の対象から除外した。

6. データ解析法

機能検査結果、性周期の変化した動物の頻度、交尾率、受胎率ならびに出生児の形態異常の出現頻度については Fisher の直接確率検定を行った（有意水準：5%）。

被験物質投与群の病理組織学検査所見のうち、グレード分けしたデータは Mann-Whitney の U 検定（有意水準：5%）により、陽性グレードの合計値は Fisher の直接確率の片側検定（有意水準：5%）により対照群との間で有意差検定を行った。

その他のデータは、個体ごとに得られた値あるいは litter ごとの平均値を 1 標本とし、サテライト群内あるいはその他の群内で比較した。その際、解析の対象が 2 群の場合には、まず F 検定を行い、有意差が認められなければ Student's-t 検定を行った。F 検定において有意差が認められた場合は、Aspin-Welch 検定を行った。解析の対象が 3 群以上の場合には、先ず、Bartlett の方法により各群の分散の一樣性について検定（有意水準：5%）を行った。分散が一樣である場合には、一元配置型の分散分析（有意水準：5%）を行い、群間に有意性が認められた場合は、Dunnett 法により多重比較を行った（有意水準：5%）。一方、いずれかの群で分散が 0 となる場合および分散が一樣でなかった場合には、Kruskal-Wallis の順位検定（有意水準：5%）を行い、群間に有意性が認められた場合には、Dunnett 型の検定法により多重比較を行った（有意水準：5%）。

【結 果】

I. 反復投与毒性および回復性試験

1. 一般状態 (Table 1～2、Appendix 1～2)

10 mg/kg 投与群の雌の 1 例 (動物番号: FB04004) においては、40 回投与後の妊娠 23 日の朝、出産中の死亡が発見されたが、前日には一般状態の異常は観察されなかった。この動物以外の死亡ならびに瀕死の動物はいずれの群でも認められず、一般状態の異常は投与期間中、回復期間中とも雌雄いずれの動物においても認められなかった。

2. 詳細な症状観察 (Table 3～4、Appendix 3～4)

投与期間末期の観察において、雄ではケージからの取り出し時や動物の取り扱い時において、抵抗を示す動物が若干増加する傾向が認められた。雄の他の項目、雌の各項目においては投与期間、回復期間中ともにいずれの群においても特記すべき変化は認められず、神経毒性を示唆する所見は観察されなかった。

3. 機能検査 (Table 5～6、Appendix 5～6)

投与期間終了時および回復期間終了時ともに、いずれの群においても異常は認められなかった。

4. 体重 (Fig. 1～2、Table 7～12、Appendix 7～12)

2 mg/kg 投与群の雄では投与第 14～21 日の体重増加量が、雌の 10 mg/kg 投与のサテライト群では投与第 7～14 日の体重増加量が、それぞれ有意に増加したが、体重増加量の累積値や実体重には変化がなく、一過性の変化でそれぞれ翌週以降には変化が認められないことから、いずれも偶発的な有意差と判断した。一方、雌の 10 mg/kg 投与のサテライト群では回復第 7～14 日の体重増加量が有意に低下したが、体重増加量の累積値や実体重には変化がないことから被験物質投与による影響ではないと判断した。

以上の他には体重の変化は認められなかった。

5. 摂餌量 (Fig. 3～4、Table 13～14、Appendix 13～14)

10 mg/kg 投与群の雄の摂餌量は、投与 29～30 日に、雌の 0.4 ならびに 2.0 mg/kg 摂餌量では投与 14～15 日に、いずれも対照群に比較して有意な増加を示したが、一過性で翌週には有意

差はみられず、体重にも該当する時期に意味のある変化が認められなかったことから、被験物質投与による影響とは考えられなかった。

回復期間中には、雌雄いずれの投与群の摂餌量においても対照群との間に有意差は認められなかった。

6. 血液学検査 (Table 15～16、Appendix 15～16)

投与期間終了時、回復期間終了時のいずれも、雌雄とも血液学検査の各検査項目に、いずれの投与群においても対照群との間に有意差は認められなかった。

7. 血液生化学検査 (Table 17～18、Appendix 17～18)

投与期間終了時の検査では、雌雄とも血液生化学検査の各検査項目に、いずれの投与群においても対照群との間に有意差は認められなかった。

回復期間終了時の検査では、10 mg/kg 投与群の雄でアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性ならびにアラニンアミノトランスフェラーゼ活性に有意差がみられたが、いずれも活性の低下であり、他の血液生化学検査項目に変化はなかった。雌においてはいずれの投与群においても対照群との間に有意差は認められなかった。

8. 病理学検査

1) 器官重量 (Table 19～20、Appendix 19～20)

投与期間終了時および回復期間終了時における、雌雄各投与群の器官絶対重量および相対重量に、対照群と比較して有意差はなかった。

2) 剖検所見

(1) 死亡動物

10 mg/kg 投与群の雌の1例の死亡例では、剖検の結果、外陰部周囲の被毛に汚れが観察された他、脾臓ならびに胸腺の小型化が認められた。

(2) 投与期間終了時 (Table 21～22、Appendix 21～22)

0.4 mg/kg 投与群の雌の1例では下腹部皮下に腫瘍がみられた。雄では剖検所見に異常は認められなかった。

(3) 回復試験期間終了時の雄ならびにサテライト群の雌 (Table 23～24、Appendix 23～24)

雌雄とも剖検所見に異常は認められなかった。

3) 病理組織学所見

(1) 死亡動物

死亡動物では肝臓に水腫がみられ、肺胞内に限局性の泡沫細胞の集簇が観察されたほか、脾臓では白脾髄領域の減少、胸腺では萎縮が認められた。この動物ではこの所見の他に、門脈周囲性の肝細胞の脂肪化ならびに脾臓における髄外造血および褐色色素の沈着が観察された。

(2) 投与期間終了時の雄 (Table 25、Appendix 25)

精巣では、0.4 mg/kg 投与群の 5 例、10 ならびに 2 mg/kg 投与群および対照群の各 1 例に限局性の精細管萎縮が認められ、このうち対照群の 1 例、0.4 mg/kg 投与群の 2 例、2 mg/kg 投与群の 1 例ならびに 10 mg/kg 投与群の 1 例の精巣上部では管腔内に細胞残屑が観察されたが、発現頻度には有意差が認められなかった。

肝臓では 10 mg/kg 投与群および対照群の検査対象動物の全例に門脈周囲性の肝細胞の脂肪化および小肉芽腫がみられたが、両群間に程度および頻度の差は認められなかった。

腎臓では 10 mg/kg 投与群および対照群の皮質で好塩基性尿細管あるいは鉍質沈着がみられたが、いずれの所見も両群間に程度および頻度の有意な差は認められなかった。その他、対照群の 1 例の皮質の近位尿細管に好酸性小体が観察された。

脾臓では、10 mg/kg 投与群および対照群の検査対象動物の全例に髄外造血および褐色色素の沈着がみられたが、両群間に程度および頻度の差は認められなかった。

前立腺では、10 mg/kg 投与群および対照群の検査対象動物のほとんどの例で、間質や上皮に好中球およびリンパ球の浸潤がみられたが、両群間に程度および頻度の有意な差は認められなかった。

肺では、10 mg/kg 投与群および対照群の肺胞に限局性の泡沫細胞の集簇あるいは動脈壁に鉍質沈着がみられたが、いずれの所見も両群間に程度および頻度の差は認められなかった。

膀胱では、対照群の 1 例の粘膜固有層にリンパ球の浸潤が観察された。

他の病理組織学検査実施器官に、異常所見は認められなかった。

(3) 投与期間終了時の雌 (Table 26、Appendix 26)

卵巣では、異常所見は認められなかった。

肝臓では、10 mg/kg 投与群および対照群の検査対象動物の全例に門脈周囲性の肝細胞の脂肪

化、ほとんどの例に小肉芽腫がみられたが、いずれの所見も両群間に程度および頻度の差は認められなかった。その他、両群の各 1 例でごく軽度な髄外造血が観察されたが、発現頻度に差は認められなかった。

腎臓では、10 mg/kg 投与群および対照群の各 3 例の皮質で好塩基性尿細管がみられたが、両群間に程度の差はみられなかった。また、対照群の 1 例の皮質に近位尿細管上皮の空胞化が観察された。

脾臓では、10 mg/kg 投与群および対照群の検査対象動物の全例に髄外造血および褐色色素の沈着がみられたが、両群間に所見の程度の差は認められなかった。

肺では、10 mg/kg 投与群および対照群の肺胞に限局性の泡沫細胞の集簇がみられたが、両群間に程度および頻度の差は認められなかった。

剖検時、腫瘍が観察された例の下腹部皮下には、類円形の核を有し、淡明な細胞質を持つ大型の細胞と円形～楕円形でクロマチンに富む核を有し細胞質に乏しい小型の細胞が腺管構造を呈して増殖していた。これらの細胞増殖部位では、細胞分裂像および多層化した腺管構造部も多くみられ、線維性結合組織も豊富であることから、悪性の乳腺腫瘍と診断された。しかし、この所見は 1 例のみに認められた変化であり、用量相関性も認められないことから、偶発所見と判断した。

(4) 回復試験期間終了時の雌雄 (Table 27～28、Appendix 27～28)

雄の精巣には、10 mg/kg 投与群で 1 例、対照群で 2 例の限局性の精細管萎縮が認められ、このうち両群の各 1 例の精巣上体には、管腔内に細胞残屑が観察されたが、いずれの所見も発現頻度に有意差は認められなかった。

雌の卵巣には、異常はみられなかった。

II. 生殖発生毒性

1. 性周期および交配成績 (Table 29～30、Appendix 29～30)

交配前の投与期間中、異常な性周期を示す動物は認められず、いずれの投与群においても投与による性周期への影響は認められなかったと判断した。

いずれの群においても全例の交尾が成立し、受胎した。また、0.4 mg/kg 投与群の 1 例を除き、いずれも交尾は初回の発情期に行われた。

2. 分娩および哺育所見 (Table 31、Appendix 31)

妊娠動物の全例が生児を出産し、妊娠期間是对照群と投与群との間に有意差は認められなかった。分娩/哺育状態が不良であると判断された動物は認められなかった。分娩翌日以降の哺育状態の異常は認められず、出産した全出生児が死亡した腹もなかった。

3. 黄体数および着床数 (Table 31、Appendix 31)

黄体数および着床数ともに、対照群と投与群との間に有意差は認められなかった。

4. 出生児所見

1) 一般状態および生存性 (Table 31、Appendix 31)

出生児の一般状態には異常が認められず、児の生存性にも、被験物質投与の影響は認められなかった。

2) 体重 (Table 32、Appendix 32)

対照群と投与群との間で、哺育児体重に差は認められなかった。

3) 形態観察所見 (Table 33)

生存産児および哺育4日の剖検時の形態観察では、2 mg/kg 投与群の1例(母動物番号FB03004)の雄生存産児1例が矮小であったが、同腹の他の生存産児には形態異常は認められず、内臓を観察した結果、異常はみられなかったことから、被験物質投与の影響ではないと判断した。死亡児では、いずれの動物にも形態異常は観察されなかった。

【考 察】

1. 反復投与毒性および回復性

10 mg/kg 投与群の雌の 1 例では、出産中の死亡が発見され、剖検の結果、外陰部周囲の被毛に汚れが観察された他、脾臓ならびに胸腺の小型化が認められた。この動物では組織検査の結果、肺に鬱血および水腫がみられ、肺胞内に限局性の泡沫細胞の集簇が観察されたほか、脾臓では白脾髄領域の減少、胸腺では萎縮が認められた。本試験の投与量設定のための予備試験においては、妊娠中期以降の母動物に NCB の 300、100 ならびに 30 mg/kg を反復投与した結果、300 ならびに 100 mg/kg 投与群においてはなおの 3 例全例の、10 mg/kg 投与群においては 3 例中 1 例の動物で、妊娠 20 日から出産翌日にかけて死亡が認められ、死亡例では全例で脾臓の小型化が観察された。また、その程度は用量相関的に増強した。30 mg/kg 投与群の生存例の 1 例においても脾臓の小型化がみられ、さらに、100 mg/kg 投与群では腸内容物の減少がみられた。本試験の 10 mg/kg 投与群の死亡例においても、胸腺の小型化とならんで、脾臓の小型化が認められ、剖検所見が予備試験での死亡例と同様であることから、死亡の原因は被験物質投与による可能性が高い。この死亡例では組織学検査の結果、白脾髄領域の減少が認められたが、脾臓の小型化が死因に直接結びつく可能性はないと考えられた。また、門脈周囲性の肝細胞の脂肪化ならびに脾臓における髄外造血および褐色色素の沈着が観察されたが、他の投与期間終了時屠殺例にも認められる所見であり、被験物質投与による変化とは考えられなかった。

一方、生存例においては投与期間終了時剖検、回復期間終了時剖検のいずれにおいても、雌雄ともいずれの器官の絶対重量、相対重量とも対照群との間に有意差を認めず、被験物質投与によると考えられる剖検時の肉眼的異常もみられなかった。また、病理組織学的検査の結果、雌雄ともいずれの器官にも被験物質投与によると考えられる異常は認められなかった。その他、投与期間終了時および回復期間終了時ともに、いずれの群においても機能検査の結果に異常はみられず、体重の推移ならびに摂餌量の測定結果には被験物質投与によると考えられる変化は認められなかった。また、投与期間終了時、回復期間終了時のいずれも、雌雄とも血液学検査の各検査項目に、いずれの投与群においても対照群と比較して有意差は認められず、血液生化学検査の結果にも、被験物質投与によると考えられる異常はみられなかった。ニッケルは経口投与で呼吸器、循環器、消化器、血液系、筋骨格系、肝臓、腎臓、皮膚および体重に影響があるとされ、また、ヒトがニッケルに曝露されると、中枢神経系および肺組織への直接的な毒性に基づく肺への副作用が最も多く発生するとされている¹⁾。本試験においては脾臓以外に標的

と考えられる器官はなく、死亡原因に直接結びつく可能性のある標的器官は特定できなかった。

一方、詳細な症状観察の結果、雄では投与期間末期の観察においてケージからの取り出し時や動物の取り扱い時において、抵抗を示す動物が若干増加する傾向が認められた。これらの所見は雌では認められない変化であり、通常的一般状態に異常がみられないことから偶発的な差である可能性も考えられるが、動物の一般状態の悪化に伴いヒトとの接触を忌避する行動である可能性が示唆されること、雌においては妊娠している等、動物の状態の変化に伴い、感覚や行動が通常の状態とは異なり異常が検出されなかった可能性が推定されることから、被験物質の投与による影響である可能性を否定できなかった。

血液生化学検査において、回復期間終了時に 10 mg/kg 投与群の雄でアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性ならびにアラニンアミノトランスフェラーゼ活性に有意差がみられたが、いずれも活性の低下であり、他の血液生化学検査項目に変化はなく、肝臓や腎臓の病理学検査所見にも著明な変化は認められないことから、偶発的な有意差と判断した。

2. 生殖発生毒性

いずれの投与群においても投与による性周期への影響は認められず、交配の結果、全例の交尾が成立し受胎した。また、妊娠動物の全例が生児を出産し、妊娠期間には対照群と投与群との間で有意差を認めなかった。分娩/哺育状態ならびに分娩翌日以降の哺育の状態に異常は認められなかった。また、病理組織学検査の結果、投与終了時、回復試験期間終了時とも、雄の精巣ならびに雌の卵巣に、被験物質投与によると考えられる異常は認められなかった。

出生した児の一般状態には異常が認められず、児の生存性ならびに体重推移にも、被験物質投与の影響はみられなかった。生存児および死亡児の形態観察結果に、被験物質投与の影響は認められなかった。

以上の結果、雌雄の生殖発生毒性ならびに出生児に関しては、本試験においては NCB 投与に起因した毒性学的影響は認められないものと判断した。

投与経路は異なるが、Benson らによれば硫酸ニッケルをニッケル量として 1.6 mg/m³ の割合で 1 日 6 時間、12 日間にわたってラットに吸入曝露させた時、精巣の精上皮細胞に変性が認められるとする報告があり²⁾、同様の変化は二硫化三ニッケルをニッケル量として 1.8 mg/m³、吸入で曝露させた時にも生じるとも報告されている³⁾。また、3 世代繁殖試験において、新生児死亡率の増加が認められたとする報告もある⁴⁾。しかし、本試験においては雌雄とも生殖発生毒性学的影響は観察されなかった。

3. 無作用量

以上の結果より、反復投与毒性に関し雌では、10 mg/kg 投与群の1例で死亡が認められ、剖検所見ならびに病理組織検査の結果から被験物質の影響を否定できない一方で、2 mg/kg 以下の投与群ではなんらの毒性学的変化がみられないことから、本試験条件下でのNCBの雌の無作用量は2 mg/kg/dayと推定される。一方、雄については、詳細な症状観察で10 mg/kg 投与群においてケージからの取り出し時や動物の取り扱い時において、抵抗性を示す動物が若干増加する傾向が認められ、2 mg/kg 以下の投与群ではなんらの毒性学的変化がみられないことから、本試験条件下での雄の無作用量も2 mg/kg/dayと推定される。塩化ニッケルをニッケル量として35 mg/kg、92日間にわたり強制経口投与されたラットにおいては死亡が認められ、硫酸ニッケルの50 mg/kgを混餌投与された雌ラットでは体重低下がみられ、いずれもNOAELは5 mg Ni/kg/dayであるとされている⁴⁾。IARCはニッケル化合物の健康影響評価を化学的分類に従い、グループ化して記載しているが、最終的な安全性の観点において、ニッケルの化学形態が多様であり、生体内の代謝によってニッケル化合物の化学形態が移行する可能性があることから、全てのニッケル化合物を一つのグループとして扱っている⁵⁾。本試験での塩基性炭酸ニッケルのNOAELを塩化ニッケルの成績と比較すると、本試験における無作用量は塩基性炭酸ニッケルとして2 mg/kgであることから、ニッケル量に換算すると約1.2 mg/kgとなり、本試験の投与群を考えると、既報の結果と大きな隔たりは認められなかった。

一方、雌雄の生殖発生毒性ならびに出生児に対する毒性に関しては、10 mg/kg 投与群においてもNCB投与に起因した影響が認められなかったことから、10 mg/kg/day以上と判断された。

【文 献】

- 1) Klassen, C., ed. : Casarett & Doull' s Toxicology, The Basic Science of Poisons McGraw-Hill, New York (2001) p. 457
- 2) Benson, J.M., Carpenter, R.L., Hahn, F.F., et al. : Comparative Inhalation Toxicity of Nickel Subsulfide to F344/N Rats and B6C3F1 Mice Exposed for 12 Days. Fundamental and Applied Toxicology. 9 : 251-265 (1987)
- 3) Benson, J.M., Burt, D.G., Carpenter, R.L., et al. : Comparative Inhalation Toxicity of Nickel Subsulfide to F344/N Rats and B6C3F1 Mice Exposed for Twelve Days. Fundamental and Applied Toxicology. 10 : 164-178 (1988)
- 4) Haber, L.T., Allen, B.C., Kimmel, C.A. : Non-Cancer Risk Assessment for Nickel Compounds: Issues Associated with Dose Response Modeling of Inhalation and Oral Exposures. Toxicological Sciences. 43 : 213-229 (1998)
- 5) International Agency for Research on Cancer : "IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans" Vol. 49 Chromium, Nickel and Welding. World Health Organization, Lyon (1989)

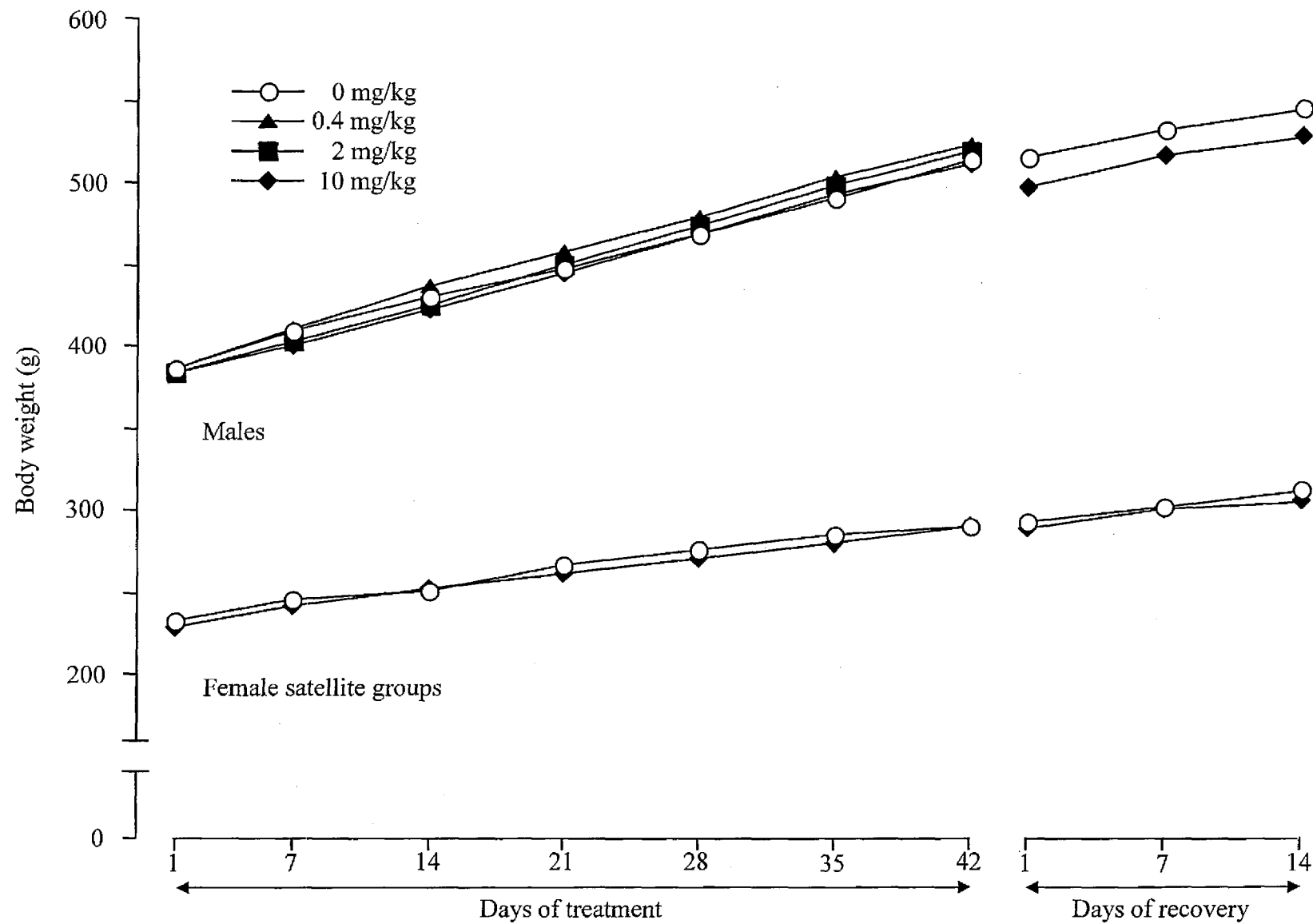


Fig. 1 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats.
Body weight of males and females satellite groups.
 NCB:nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate

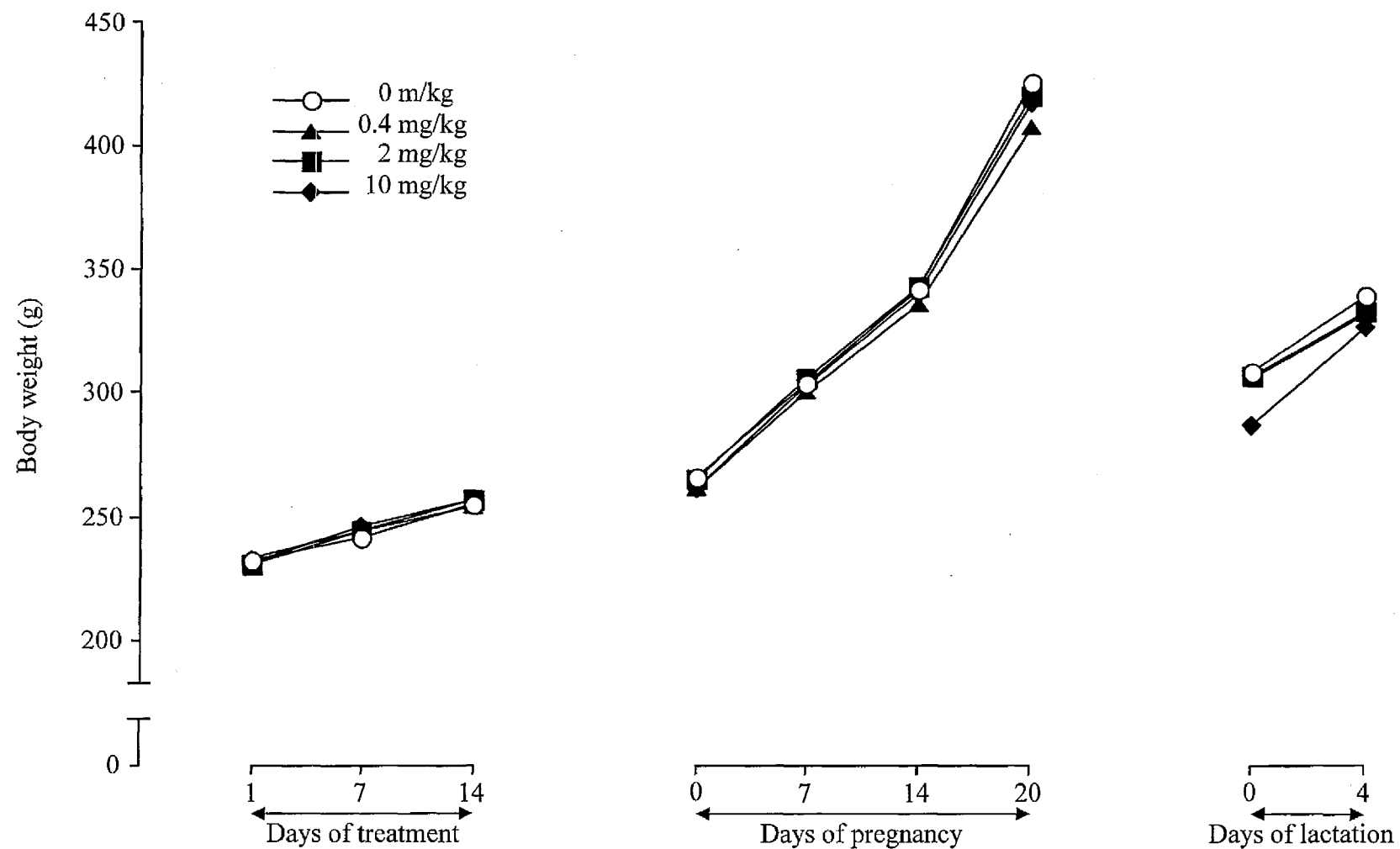


Fig. 2 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats.

Body weight of dams.

NCB: nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate

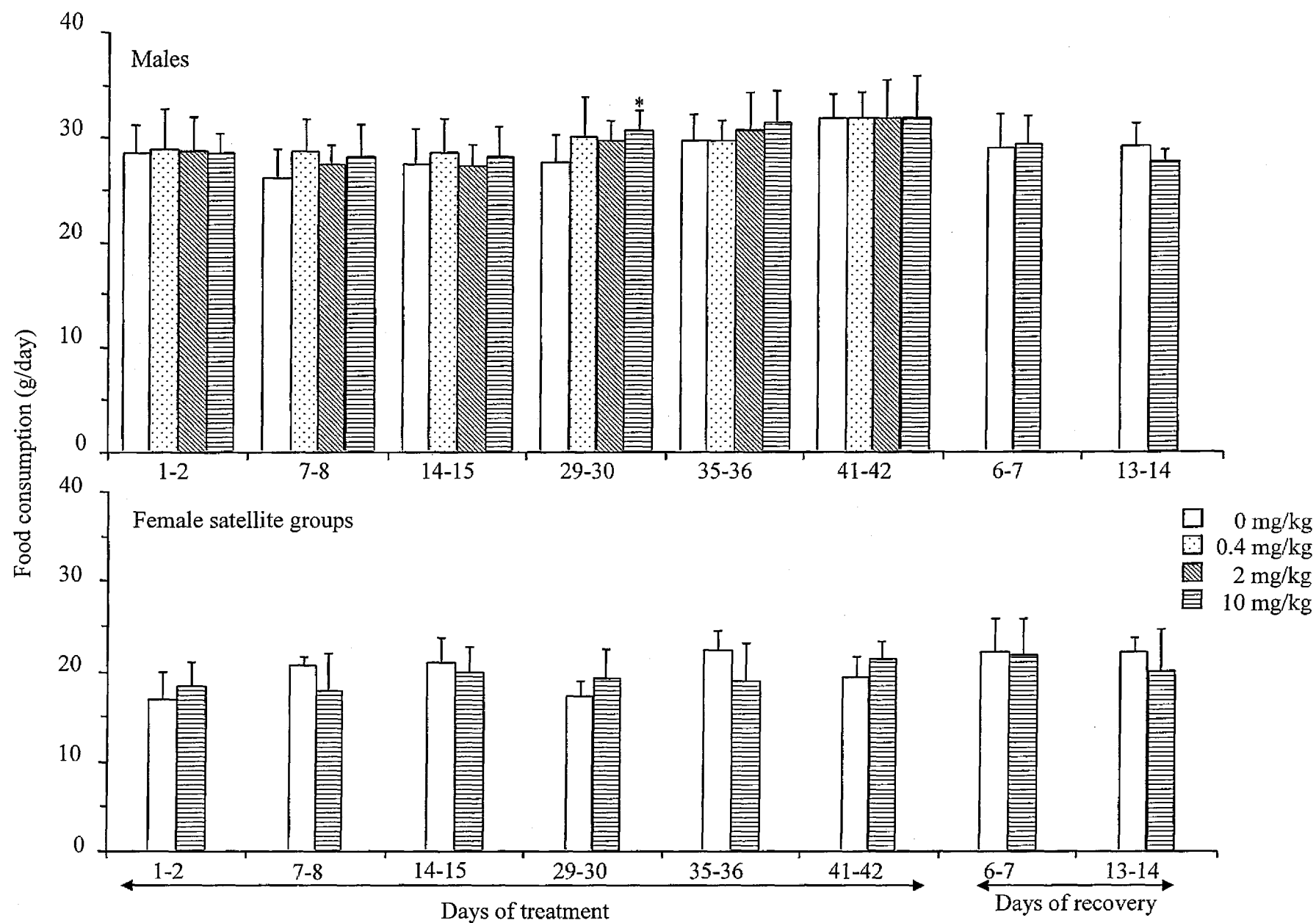


Fig. 3 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats.
Food consumption of males and female satellite groups.
 NCB:nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate

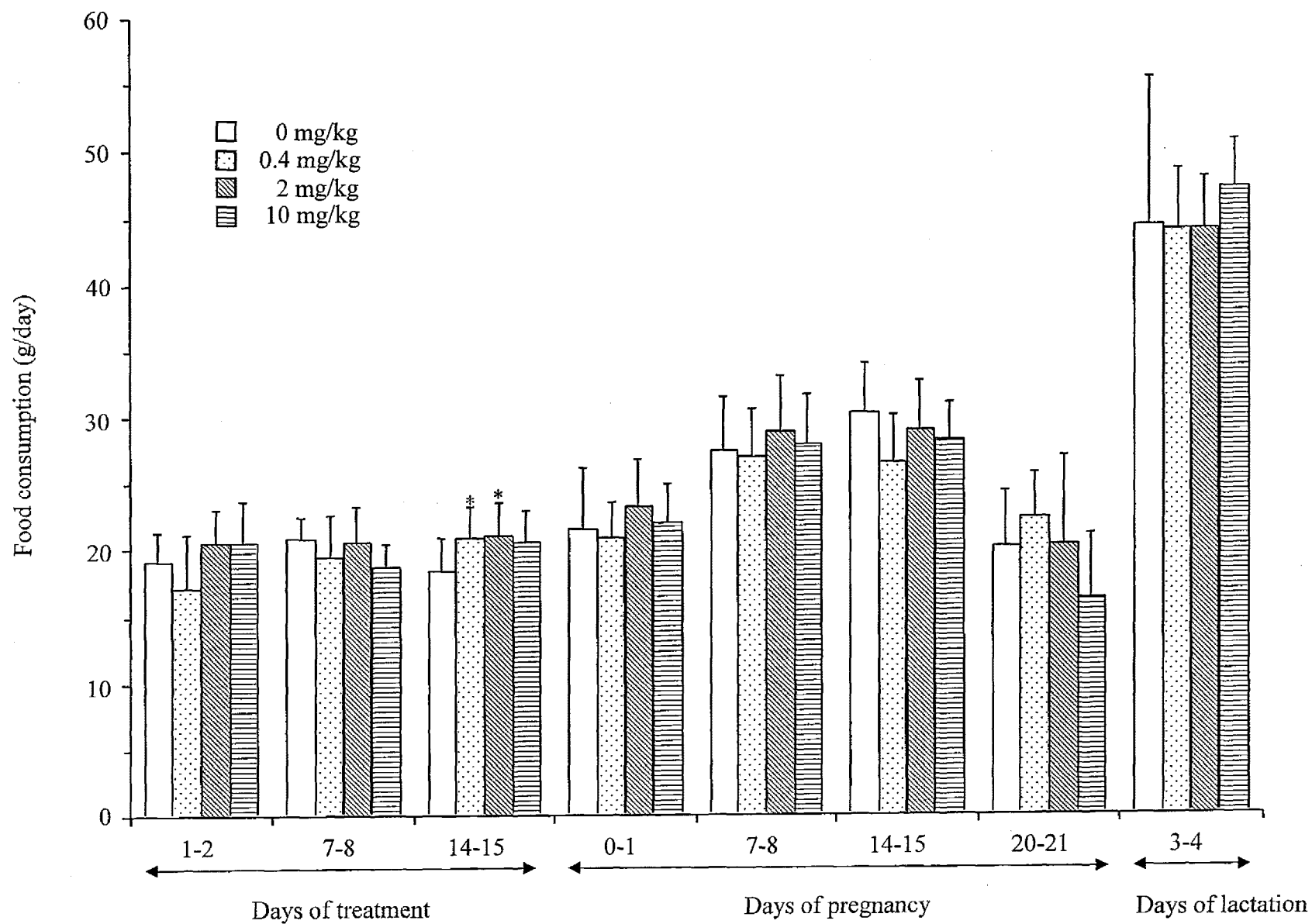


Fig. 4 Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats.

Food consumption of dams.

NCB: nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate

【TABLE INDEX】

Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate by Oral Administration in Rats

Table no.	Appendix no.	Table title
1	1-1~1-4	Clinical signs of males
2-1~2-2	2-1-1~2-2-2	Clinical signs of females
3-1~3-2	3-1-1~3-2-4	Detailed clinical observations of males
4-1~4-4	4-1-1~4-4-2	Detailed clinical observations of females
5	5-1~5-4	Functional findings of males and females at the end of dosing period
6	6-1~6-2	Functional findings of males and females at the end of recovery period
7	7-1~7-4	Body weight of males
8-1~8-2	8-1-1~8-2-2	Body weight of females
9	9-1~9-4	Body weight gain of males
10-1~10-2	10-1-1~10-2-2	Body weight gain of females
11	11-1~11-4	Cumulative body weight gain of males
12-1~12-2	12-1-1~12-2-2	Cumulative body weight gain of females
13	13-1~13-4	Food consumption of males
14-1~14-2	14-1-1~14-2-2	Food consumption of females
15	15-1~15-4	Hematological findings of males and females at the end of dosing period
16	16-1~16-2	Hematological findings of males and females at the end of recovery period
17	17-1~17-4	Biochemical findings of males and females at the end of dosing period
18	18-1~18-2	Biochemical findings of males and females at the end of recovery period
19	19-1~19-4	Absolute and relative organ weight of males and females at the end of dosing period
20	20-1~20-2	Absolute and relative organ weight of males and females at the end of recovery period
21	21	Macroscopic findings of males at the end of dosing period
22	22	Macroscopic findings of females at the end of dosing period
23	23	Macroscopic findings of males at the end of recovery period
24	24	Macroscopic findings of females at the end of recovery period
25	25	Histopathological findings of males at the end of dosing period
26	26	Histopathological findings of females at the end of dosing period
27	27	Histopathological findings of males at the end of recovery period
28	28	Histological findings of females at the end of recovery period
29	29-1~29-4	Estrus cycle of dams
30	30-1~30-4	Reproductive performance of animals
31	31-1~31-4	Development of pups up to day 4 of lactation
32	32-1~32-4	Mean body weight of pups up to day 4 of lactation
33	-	Morphological findings of pups

Table 1

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats

Clinical signs of males

Clinical sings	Dose (mg/kg)	Initial number of animals	Number of animals with clinical signs								Total
			Days of treatment						Days of recovery ^b		
			1-7	8-14	15-21	22-28	29-35	36-42	1-7	8-15	
Abnormality	0 ^a	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.4	12	0	0	0	0	0	0			0
	2	12	0	0	0	0	0	0			0
	10	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0

^a vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)^b the recovery test was performed in 5 animals for each of the 0 and 10 mg/kg groups

Table 2-1

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats

Clinical signs of females, dams

Clinical sings	Dose (mg/kg)	Initial number of animals	Number of animals with clinical signs							Total
			Days of treatment							
			1-7	8-14	15-21	22-28	29-35	36-42	43-50	
Died	0 ^a	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.4	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	12	0	0	0	0	0	1	0	1

NCB:nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate

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

Table 2-2

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats

Clinical signs of females, satellite groups

Clinical sings	Dose (mg/kg)	Initial number of animals	Number of animals with clinical signs								Total
			Days of treatment						Days of recovery ^b		
			1-7	8-14	15-21	22-28	29-35	36-42	1-7	8-15	
Abnormality	0 ^a	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0

NCB:nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate

^a vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)^b the recovery test was performed in 5 animals for each of the 0 and 10 mg/kg groups

Table 3-1

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats

Detailed clinical observations of males

Findings	Dose (mg/kg)	Initial number of animals	Pre-treatment	Days of treatment						Days of recovery ^b	
				7	14	21	28	35	42	7	14
[Posture in home-cage]	0 ^a	12	3 ^c	0	0	0	0	2	0	0	0
Rearing	0.4	12	3	0	0	2	0	0	0		
	2	12	1	0	0	0	1	1	0		
	10	12	2	0	0	1	0	1	0	0	3
[Home-cage activity]	0	12	0 ^c	3	6	0	0	0	5	3	0
Asleep	0.4	12	1	6	3	2	0	3	8		
	2	12	0	8	2	0	0	0	10		
	10	12	0	6	3	0	0	0	9	4	0
[Ease of removing rat from cage]	0	12	18 ^d	2	4	4	0	0	2	0	2
Very easy (score 0)	0.4	12	8	6	0	2	0	4	2		
Vocalization without resistance (score 2)	2	12	16	0	0	6	0	4	0		
Rat flinched (score 4)	10	12	22	4	4	6	0	6	6	2	4
[Reactivity to being handled]	0	12	26 ^d	2	2	2	0	2	2	0	0
No resistance, rat was easy to handle (score 0)	0.4	12	20	6	0	2	0	4	2		
Vocalization without resistance (score 2)	2	12	20	2	0	2	0	0	0		
Slight resistance to being handled (score 4)	10	12	24	4	2	6	2	2	6	2	4

NCB:nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate

^a vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)^b the recovery test was performed in 5 animals for each of the 0 and 10 mg/kg groups^c Values represent number of animals with the findings.^d Values represent total score of each groups.

Table 3-2

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats

Detailed clinical observations of males

Findings	Dose (mg/kg)	Initial number of animals	Pre-treatment	Days of treatment						Days of recovery ^b	
				7	14	21	28	35	42	7	14
[Exploration]	0 ^a	12	48 ^c	48	48	48	48	48	48	20	20
Normal (score 4)	0.4	12	48	48	48	48	48	48	48		
	2	12	48	48	48	48	48	48	48		
	10	12	48	48	48	48	48	48	48	20	20
[Grooming]	0	12	0 ^c	0	0	0	0	0	0	0	0
Normal (score 0)	0.4	12	0	0	0	0	0	0	0		
	2	12	0	0	0	0	0	0	0		
	10	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
[Vocalization]	0	12	0 ^c	0	0	0	0	0	0	0	0
Normal (score 0)	0.4	12	0	0	0	0	0	0	0		
	2	12	0	0	0	0	0	0	0		
	10	12	0	0	0	0	4	0	0	0	0
[Straub tail]	0	12	0 ^c	0	0	0	0	0	0	0	0
Normal (score 0)	0.4	12	0	0	0	0	4	0	0		
Slight (score 4)	2	12	0	0	0	0	0	0	0		
	10	12	0	4	4	4	0	0	8	4	0

NCB:nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate

^a vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)^b the recovery test was performed in 5 animals for each of the 0 and 10 mg/kg groups^c Values represent total score of each groups.

Table 4-1

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats

Detailed clinical observations of females, dams

Findings	Dose (mg/kg)	Initial number of animals	Pre-treatment	Days of treatment					The lactation period
				7	14	21	28	35	
[Posture in home-cage]	0 ^a	12	0 ^b	1	1	0	1	1	1
Rearing	0.4	12	1	2	0	0	0	0	1
	2	12	2	1	1	0	1	0	1
	10	12	1	1	3	3	2	0	0
[Home-cage activity]	0	12	0 ^b	0	0	1	3	4	0
Asleep	0.4	12	0	0	0	3	4	6	0
	2	12	0	0	0	3	6	6	0
	10	12	0	0	0	2	1	5	0
[Ease of removing rat from cage]	0	12	2 ^c	0	0	0	0	0	0
Very easy (score 0)	0.4	12	4	0	2	0	0	0	0
Vocalization without resistance (score 2)	2	12	6	0	0	0	0	0	0
Rat flinched (score 4)	10	12	2	2	2	0	0	0	0
[Reactivity to being handled]	0	12	2 ^c	0	0	0	0	0	2
No resistance, rat was easy to handle (score 0)	0.4	12	6	0	0	0	0	0	2
Vocalization without resistance (score 2)	2	12	10	0	2	0	0	0	0
Slight resistance to being handled (score 4)	10	12	4	0	0	0	0	0	0

NCB:nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate

^a vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)^b Values represent number of animals with the findings.^c Values represent total score of each groups.

Table 4-2

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats

Detailed clinical observations of females, satellite groups

Findings	Dose (mg/kg)	Initial number of animals	Pre-treatment	Days of treatment						Days of recovery	
				7	14	21	28	35	42	7	14
[Posture in home-cage]	0 ^a	5	1 ^b	1	1	0	1	3	3	1	0
Rearing	10	5	0	0	1	1	0	1	0	1	0
[Home-cage activity]	0	5	0 ^b	0	0	1	2	0	0	0	1
Asleep	10	5	1	0	0	2	1	1	0	0	0
[Ease of removing rat from cage]	0	5	0 ^c	0	2	0	0	0	0	0	0
Very easy (score 0)											
Vocalization without resistance (score 2)											
Rat flinched (score 4)	10	5	2	2	2	4	0	0	0	0	0
[Reactivity to being handled]	0	5	0 ^c	0	0	0	0	0	0	0	0
No resistance, rat was easy to handle (score 0)											
Vocalization without resistance (score 2)											
Slight resistance to being handled (score 4)											
Resistance to being handled (score 6)	10	5	2	2	2	4	0	2	0	0	0

NCB:nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate

^a vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)^b Values represent number of animals with the findings.^c Values represent total score of each groups.

Table 4-3

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats

Detailed clinical observations of females, dams

Findings	Dose (mg/kg)	Initial number of animals	Pre-treatment	Days of treatment					The lactation period
				7	14	21	28	35	
[Exploration]	0 ^a	12	48 ^b	48	48	48	48	48	48
Normal (score 4)	0.4	12	48	48	48	48	48	48	48
	2	12	48	48	48	48	48	48	48
	10	12	48	48	48	48	48	48	44
[Straub tail]	0	12	0 ^b	0	0	0	0	0	0
Normal (score 0)	0.4	12	0	0	0	0	0	0	0
	2	12	0	0	0	0	0	0	0
	10	12	0	0	0	0	0	0	0
[Stereotypy]	0	12	0 ^c	0	0	0	0	0	0
Rearing	0.4	12	0	0	0	0	0	0	0
	2	12	0	0	0	0	0	0	0
	10	12	0	0	0	0	0	0	0

NCB:nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate

^a vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)^b Values represent total score of each groups.^c Values represent number of animals with the findings.

Table 4-4

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats

Detailed clinical observations of females, satellite groups

Findings	Dose (mg/kg)	Initial number of animals	Pre-treatment	Days of treatment						Days of recovery	
				7	14	21	28	35	42	7	14
[Exploration]	0 ^a	5	20 ^b	20	20	20	20	20	20	20	20
Normal (score 4)											
	10	5	20	20	20	20	20	20	20	20	20
[Straub tail]	0	5	0 ^b	0	0	0	0	0	0	0	0
Normal (score 0)											
	10	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
[Stereotypy]	0	5	0 ^c	0	0	0	0	0	0	0	0
Rearing											
	10	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0

NCB: nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate

^a vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)^b Values represent total score of each groups.^c Values represent number of animals with the findings.

Table 5

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB in rats
Functional findings of males and females at the end of dosing period

Compound Dose (mg/kg)	NCB			
	0 ^a	0.4	2	10
<u>Male</u>				
Number of animals	10	5	5	10
Pupillary reflex	100	100	100	100
Eyelid reflex	100	100	100	100
Visual placing	100	100	100	100
Withdrawal reflex	100	100	100	100
Prayer's reaction	100	100	100	100
Startle reaction	100	100	100	100
Righting reflex	100	100	100	100
<u>Female, dam</u>				
Number of animals	5	5	5	5
Pupillary reflex	100	100	100	100
Eyelid reflex	100	100	100	100
Visual placing	100	100	100	100
Withdrawal reflex	100	100	100	100
Prayer's reaction	100	100	100	100
Startle reaction	100	100	100	100
Righting reflex	100	100	100	100
<u>Female, satellite group</u>				
Number of animals	5			5
Pupillary reflex	100			100
Eyelid reflex	100			100
Visual placing	100			100
Withdrawal reflex	100			100
Prayer's reaction	100			100
Startle reaction	100			100
Righting reflex	100			100

NCB: nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate
Values represent % of animals showing normal responses.

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

Table 6

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB in rats

Functional findings of males and females at the end of recovery period

Compound Dose (mg/kg)	NCB	
	0 ^a	10
<u>Male</u>		
Number of animals	5	5
Pupillary reflex	100	100
Eyelid reflex	100	100
Visual placing	100	100
Withdrawal reflex	100	100
Prayer's reaction	100	100
Startle reaction	100	100
Righting reflex	100	100
<u>Female, satellite group</u>		
Number of animals	5	5
Pupillary reflex	100	100
Eyelid reflex	100	100
Visual placing	100	100
Withdrawal reflex	100	100
Prayer's reaction	100	100
Startle reaction	100	100
Righting reflex	100	100

NCB:nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate

Values represent % of animals showing normal responses.

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

Table 7

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats

Body weight of males (g)

Compound	NCB			
	0 ^a	0.4	2	10
<u>Days of treatment</u>				
1 (initial body weight)	385.3 ± 16.6 (12)	385.4 ± 16.3 (12)	383.5 ± 13.0 (12)	383.3 ± 16.8 (12)
7	409.1 ± 19.9 (12)	410.8 ± 23.5 (12)	402.5 ± 19.5 (12)	400.4 ± 19.9 (12)
14	429.7 ± 21.9 (12)	436.0 ± 27.9 (12)	425.2 ± 23.8 (12)	422.4 ± 24.0 (12)
21	446.9 ± 22.0 (12)	457.5 ± 32.2 (12)	449.1 ± 26.2 (12)	443.8 ± 23.0 (12)
28	467.7 ± 25.4 (12)	478.0 ± 34.7 (12)	472.8 ± 27.2 (12)	467.3 ± 25.9 (12)
35	489.2 ± 24.4 (12)	502.5 ± 38.3 (12)	496.9 ± 29.6 (12)	491.8 ± 27.5 (12)
42	513.4 ± 24.9 (12)	522.4 ± 38.4 (12)	518.6 ± 34.5 (12)	510.6 ± 31.8 (12)
<u>Days of recovery</u>				
1	514.5 ± 36.0 (5)			495.9 ± 26.8 (5)
7	531.9 ± 38.6 (5)			515.5 ± 28.5 (5)
14	544.4 ± 36.7 (5)			527.0 ± 28.0 (5)

NCB:nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate

Values represent mean±S.D. (N)

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

Table 8-1

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats

Body weight of females, dams (g)

Compound	NCB															
Dose (mg/kg)	0 ^a				0.4				2				10			
<u>Days of treatment</u>																
1 (initial body weight)	232.5	±	7.1	(12)	233.4	±	10.1	(12)	230.6	±	7.2	(12)	231.9	±	10.3	(12)
7	241.8	±	6.1	(12)	244.4	±	12.5	(12)	244.5	±	10.7	(12)	246.5	±	10.7	(12)
14	255.0	±	9.1	(12)	254.3	±	15.0	(12)	256.9	±	12.6	(12)	257.2	±	12.2	(12)
<u>Days of pregnancy</u>																
0	266.3	±	11.0	(12)	261.2	±	14.1	(12)	264.9	±	13.1	(12)	261.6	±	11.0	(12)
7	304.5	±	15.0	(12)	300.8	±	15.9	(12)	306.0	±	18.0	(12)	303.5	±	14.0	(12)
14	342.4	±	17.4	(12)	335.7	±	19.4	(12)	342.7	±	22.2	(12)	340.3	±	17.9	(12)
20	425.5	±	19.2	(12)	407.6	±	33.8	(12)	419.8	±	32.9	(12)	417.3	±	22.5	(12)
<u>Days of lactation</u>																
0	308.5	±	24.7	(12)	305.9	±	25.1	(12)	306.5	±	27.1	(12)	286.5	±	16.4	(11)
4	339.2	±	17.5	(12)	332.1	±	17.9	(12)	333.0	±	22.1	(12)	326.9	±	14.1	(11)

NCB:nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate

Values represent mean±S.D. (N)

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

Table 8-2

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats

Body weight of females, satellite groups (g)

Compound	NCB					
Dose (mg/kg)	0 ^a			10		
<u>Days of treatment</u>						
1 (initial body weight)	232.1	±	4.4	(5)	228.6	± 10.9 (5)
7	245.5	±	7.8	(5)	241.3	± 9.8 (5)
14	250.2	±	7.6	(5)	252.1	± 9.8 (5)
21	266.4	±	10.7	(5)	260.8	± 16.1 (5)
28	275.3	±	14.1	(5)	270.5	± 19.4 (5)
35	284.3	±	15.1	(5)	279.6	± 19.9 (5)
42	289.8	±	17.1	(5)	290.3	± 22.8 (5)
<u>Days of recovery</u>						
1	291.9	±	20.1	(5)	288.6	± 20.6 (5)
7	300.8	±	20.7	(5)	300.4	± 28.6 (5)
14	312.4	±	20.0	(5)	304.9	± 28.8 (5)

NCB:nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate

Values represent mean±S.D. (N)

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

Table 9

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats

Body weight gain of males (g)

Compound	NCB															
Dose (mg/kg)	0 ^a				0.4				2				10			
<u>Days of treatment</u>																
1 - 7	23.8	±	5.4	(12)	25.4	±	10.9	(12)	19.0	±	9.2	(12)	17.1	±	6.3	(12)
7 -14	20.6	±	6.1	(12)	25.2	±	7.1	(12)	22.7	±	6.4	(12)	22.0	±	7.0	(12)
14 -21	17.3	±	5.7	(12)	21.5	±	6.6	(12)	23.9	±	4.8*	(12)	21.5	±	4.2	(12)
21 -28	20.7	±	6.9	(12)	20.5	±	7.2	(12)	23.7	±	5.1	(12)	23.5	±	6.2	(12)
28 -35	21.5	±	4.9	(12)	24.5	±	5.9	(12)	24.2	±	5.7	(12)	24.5	±	6.9	(12)
35 -42	24.2	±	5.7	(12)	19.9	±	4.0	(12)	21.7	±	7.5	(12)	18.7	±	6.4	(12)
<u>Days of recovery</u>																
1 - 7	17.3	±	8.6	(5)									19.6	±	3.6	(5)
7 -14	12.5	±	3.1	(5)									11.5	±	3.9	(5)

NCB:nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate

Values represent mean±S.D. (N)

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

* significantly different from control, p<0.05

Table 10-1

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats

Body weight gain of females, dams (g)

Compound	NCB															
Dose (mg/kg)	0 ^a				0.4				2				10			
<u>Days of treatment</u>																
1 -7	9.3	±	7.2	(12)	10.9	±	6.1	(12)	13.8	±	7.2	(12)	14.5	±	7.5	(12)
7 -14	13.2	±	7.1	(12)	9.9	±	4.2	(12)	12.5	±	5.3	(12)	10.7	±	7.0	(12)
<u>Days of pregnancy</u>																
0 - 7	38.2	±	7.8	(12)	39.6	±	7.1	(12)	41.1	±	8.9	(12)	42.0	±	10.6	(12)
7 -14	37.9	±	5.1	(12)	34.9	±	6.0	(12)	36.7	±	7.6	(12)	36.8	±	6.0	(12)
14 -20	83.1	±	4.8	(12)	72.0	±	17.1	(12)	77.1	±	15.1	(12)	77.0	±	7.5	(12)
<u>Days of lactation</u>																
0 - 4	30.8	±	24.0	(12)	26.2	±	14.8	(12)	26.4	±	13.3	(12)	40.4	±	13.9	(11)

NCB:nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate

Values represent mean±S.D. (N)

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

Table 10-2

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats

Body weight gain of females, satellite groups (g)

Compound	NCB					
Dose (mg/kg)	0 ^a			10		
<u>Days of treatment</u>						
1 - 7	13.4	±	6.7	(5)	12.7	± 5.9 (5)
7 -14	4.8	±	1.9	(5)	10.8	± 3.9* (5)
14 -21	16.2	±	5.7	(5)	8.7	± 9.0 (5)
21 -28	8.9	±	5.1	(5)	9.8	± 7.1 (5)
28 -35	9.0	±	2.9	(5)	9.1	± 5.1 (5)
35 -42	5.5	±	4.1	(5)	10.7	± 5.2 (5)
<u>Days of recovery</u>						
1 - 7	8.9	±	8.1	(5)	11.8	± 9.0 (5)
7 -14	11.7	±	4.5	(5)	4.5	± 2.7* (5)

NCB:nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate

Values represent mean±S.D. (N)

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

* significantly different from control, p<0.05

Table 11

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats

Cumulative body weight gain of males (g)

Compound	NCB															
Dose (mg/kg)	0 ^a				0.4				2				10			
<u>Days of treatment</u>																
1 - 7	23.8	±	5.4	(12)	25.4	±	10.9	(12)	19.0	±	9.2	(12)	17.1	±	6.3	(12)
1 -14	44.4	±	9.2	(12)	50.6	±	14.7	(12)	41.7	±	13.9	(12)	39.1	±	10.8	(12)
1 -21	61.6	±	10.5	(12)	72.1	±	19.4	(12)	65.6	±	16.0	(12)	60.6	±	11.2	(12)
1 -28	82.4	±	15.3	(12)	92.6	±	22.5	(12)	89.3	±	17.1	(12)	84.0	±	15.6	(12)
1 -35	103.9	±	15.9	(12)	117.0	±	26.2	(12)	113.5	±	18.8	(12)	108.6	±	19.8	(12)
1 -42	128.1	±	16.1	(12)	136.9	±	27.0	(12)	135.1	±	24.2	(12)	127.3	±	23.6	(12)
<u>Days of recovery</u>																
1 - 7	17.3	±	8.6	(5)									19.6	±	3.6	(5)
1 -14	29.8	±	8.7	(5)									31.1	±	6.6	(5)

NCB:nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate

Values represent mean±S.D. (N)

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

Table 12-1

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats

Cumulative body weight gain of females, dams (g)

Compound	NCB															
Dose (mg/kg)	0 ^a				0.4				2				10			
<u>Days of treatment</u>																
1 -7	9.3	±	7.2	(12)	10.9	±	6.1	(12)	13.8	±	7.2	(12)	14.5	±	7.5	(12)
1 -14	22.5	±	6.5	(12)	20.9	±	7.0	(12)	26.3	±	9.8	(12)	25.3	±	7.7	(12)
<u>Days of pregnancy</u>																
0 - 7	38.2	±	7.8	(12)	39.6	±	7.1	(12)	41.1	±	8.9	(12)	42.0	±	10.6	(12)
0 -14	76.1	±	10.0	(12)	74.4	±	11.5	(12)	77.8	±	14.7	(12)	78.7	±	13.3	(12)
0 -20	159.2	±	11.0	(12)	146.4	±	27.1	(12)	155.0	±	24.7	(12)	155.7	±	18.6	(12)
<u>Days of lactation</u>																
0 - 4	30.8	±	24.0	(12)	26.2	±	14.8	(12)	26.4	±	13.3	(12)	40.4	±	13.9	(11)

NCB:nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate

Values represent mean±S.D. (N)

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

Table 12-2

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats

Cumulative body weight gain of females, satellite groups (g)

Compound	NCB					
Dose (mg/kg)	0 ^a			10		
<u>Days of treatment</u>						
1 - 7	13.4	±	6.7	(5)	12.7	± 5.9 (5)
1 -14	18.2	±	6.6	(5)	23.5	± 5.9 (5)
1 -21	34.4	±	7.7	(5)	32.2	± 11.5 (5)
1 -28	43.3	±	11.3	(5)	42.0	± 17.6 (5)
1 -35	52.2	±	12.6	(5)	51.0	± 16.4 (5)
1 -42	57.7	±	15.3	(5)	61.7	± 17.4 (5)
<u>Days of recovery</u>						
1 - 7	8.9	±	8.1	(5)	11.8	± 9.0 (5)
1 -14	20.6	±	6.6	(5)	16.3	± 9.0 (5)

NCB:nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate

Values represent mean±S.D. (N)

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

Table 13

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats

Food consumption of males (g/day)

Compound	NCB															
Dose (mg/kg)	0 ^a				0.4				2				10			
<u>Days of treatment</u>																
1 - 2	28.6	±	2.6	(12)	29.0	±	3.7	(12)	28.8	±	3.1	(12)	28.5	±	2.0	(12)
7 - 8	26.1	±	2.9	(12)	28.7	±	3.1	(12)	27.4	±	1.9	(12)	28.1	±	3.1	(12)
14 -15	27.5	±	3.4	(12)	28.6	±	3.2	(12)	27.2	±	2.1	(12)	28.1	±	2.9	(12)
29 -30	27.7	±	2.6	(12)	30.1	±	3.7	(12)	29.6	±	1.9	(12)	30.6	±	1.9*	(12)
35 -36	29.6	±	2.6	(12)	29.6	±	1.9	(12)	30.7	±	3.4	(12)	31.4	±	2.9	(12)
41 -42	31.8	±	2.2	(12)	31.7	±	2.5	(12)	31.8	±	3.5	(12)	31.8	±	3.9	(12)
<u>Days of recovery</u>																
6 - 7	29.0	±	3.1	(5)									29.3	±	2.7	(5)
13 -14	29.2	±	1.9	(5)									27.9	±	1.1	(5)

NCB:nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate

Values represent mean±S.D. (N)

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

* significantly different from control, p<0.05

Table 14-1

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats

Food consumption of females, dams (g/day)

Compound	NCB															
Dose (mg/kg)	0 ^a				0.4				2				10			
<u>Days of treatment</u>																
1 - 2	19.1	±	2.2	(12)	17.1	±	4.0	(12)	20.5	±	2.5	(12)	20.6	±	3.0	(12)
7 - 8	20.8	±	1.6	(12)	19.5	±	3.1	(12)	20.6	±	2.6	(12)	18.6	±	1.8	(12)
14 -15	18.4	±	2.5	(12)	20.9	±	2.3*	(12)	21.0	±	2.5*	(12)	20.5	±	2.3	(12)
<u>Days of pregnancy</u>																
0 - 1	21.5	±	4.7	(12)	20.8	±	2.7	(12)	23.2	±	3.5	(12)	21.9	±	3.0	(12)
7 - 8	27.3	±	4.1	(12)	26.9	±	3.5	(12)	28.8	±	4.2	(12)	27.9	±	3.6	(12)
14 -15	30.1	±	3.8	(12)	26.5	±	3.5	(12)	28.9	±	3.8	(12)	28.1	±	2.9	(12)
20 -21	20.0	±	4.3	(12)	22.2	±	3.5	(12)	20.2	±	6.7	(12)	16.1	±	4.9	(12)
<u>Days of lactation</u>																
3 - 4	44.1	±	11.1	(12)	43.9	±	4.4	(12)	43.9	±	3.8	(12)	46.9	±	3.7	(11)

NCB:nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate

Values represent mean±S.D. (N)

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

* significantly different from control, p<0.05

Table 14-2

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats

Food consumption of females, satellite groups (g/day)

Compound	NCB					
Dose (mg/kg)	0 ^a			10		
<u>Days of treatment</u>						
1 - 2	17.0	±	2.9	(5)	18.4	± 2.7 (5)
7 - 8	20.6	±	1.1	(5)	17.9	± 4.1 (5)
14 -15	21.0	±	2.6	(5)	19.9	± 2.9 (5)
29 -30	17.3	±	1.7	(5)	19.4	± 3.2 (5)
35 -36	22.4	±	2.0	(5)	18.9	± 4.2 (5)
41 -42	19.4	±	2.3	(5)	21.4	± 1.9 (5)
<u>Days of recovery</u>						
6 - 7	22.1	±	3.7	(5)	21.8	± 3.9 (5)
13 -14	22.1	±	1.6	(5)	20.1	± 4.5 (5)

NCB:nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate

Values represent mean±S.D. (N)

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

Table 15

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats
Hematological findings of males and females at the end of dosing period

Compound	NCB							
Dose (mg/kg)	0 ^a		0.4		2		10	
Male								
Number of animals	5		5		5		5	
RBC (×10 ⁴ /μL)	800 ±	45	784 ±	29	835 ±	44	789 ±	24
Hemoglobin (g/dL)	14.4 ±	0.2	14.4 ±	0.4	15.0 ±	0.5	14.1 ±	0.6
Hematocrit (%)	43.7 ±	0.8	43.7 ±	1.0	45.3 ±	1.4	42.7 ±	1.7
MCV (fL)	54.7 ±	2.5	55.8 ±	1.3	54.3 ±	2.0	54.1 ±	1.2
MCH (pg)	18.1 ±	0.8	18.4 ±	0.4	17.9 ±	0.7	17.9 ±	0.3
MCHC (g/dL)	33.0 ±	0.4	33.0 ±	0.3	33.0 ±	0.1	33.1 ±	0.5
WBC (×100/μL)	72.3 ±	16.9	60.6 ±	14.8	63.8 ±	28.2	63.5 ±	12.4
Differential leukocyte count (%)								
Neutrophil	18 ±	7	25 ±	10	19 ±	5	15 ±	5
Eosinophil	2 ±	1	2 ±	0	2 ±	0	2 ±	1
Basophil	0 ±	0	0 ±	0	0 ±	0	0 ±	0
Monocyte	5 ±	2	6 ±	3	5 ±	2	6 ±	1
Lymphocyte	75 ±	6	67 ±	12	74 ±	7	77 ±	5
Platelet (×10 ⁴ /μL)	104.1 ±	15.7	99.8 ±	16.4	97.6 ±	9.7	96.4 ±	8.5
PT (sec)	16.7 ±	1.3	19.1 ±	1.5	16.2 ±	2.2	15.8 ±	2.2
APTT (sec)	22.1 ±	1.9	22.1 ±	0.6	21.6 ±	1.3	21.7 ±	1.8
Female, dam								
Number of animals	5		5		5		5	
RBC (×10 ⁴ /μL)	666 ±	60	693 ±	30	664 ±	38	667 ±	28
Hemoglobin (g/dL)	13.2 ±	0.8	13.5 ±	0.4	13.1 ±	0.7	12.8 ±	0.6
Hematocrit (%)	39.5 ±	2.9	40.1 ±	1.3	39.2 ±	2.5	38.1 ±	1.7
MCV (fL)	59.4 ±	2.5	57.9 ±	0.9	59.0 ±	2.2	57.2 ±	0.4
MCH (pg)	19.9 ±	0.9	19.5 ±	0.5	19.7 ±	0.5	19.3 ±	0.1
MCHC (g/dL)	33.5 ±	0.5	33.7 ±	0.3	33.3 ±	0.5	33.7 ±	0.4
WBC (×100/μL)	78.3 ±	5.1	73.6 ±	14.3	76.5 ±	14.2	84.2 ±	31.4
Differential leukocyte count (%)								
Neutrophil	19 ±	6	25 ±	2	25 ±	5	28 ±	6
Eosinophil	1 ±	0	1 ±	1	2 ±	1	1 ±	0
Basophil	0 ±	0	0 ±	0	0 ±	0	0 ±	0
Monocyte	8 ±	3	8 ±	1	9 ±	3	8 ±	3
Lymphocyte	73 ±	7	66 ±	3	64 ±	8	63 ±	9
Platelet (×10 ⁴ /μL)	113.1 ±	6.8	110.7 ±	6.7	116.4 ±	17.8	114.9 ±	8.5
PT (sec)	12.8 ±	0.5	12.2 ±	0.3	12.5 ±	0.3	12.7 ±	0.3
APTT (sec)	19.8 ±	1.1	17.9 ±	1.1	18.7 ±	1.6	18.4 ±	1.1

NCB: nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate

Values represent mean ± S.D.

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

Table 16

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats
Hematological findings of males and females at the end of recovery period

Compound Dose (mg/kg)	NCB	
	0 ^a	10
Male		
Number of animals	5	5
RBC ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	833 $\pm$ 35	827 $\pm$ 45
Hemoglobin (g/dL)	14.6 $\pm$ 0.2	14.7 $\pm$ 0.4
Hematocrit (%)	43.9 $\pm$ 1.1	44.3 $\pm$ 1.1
MCV (fL)	52.7 $\pm$ 2.2	53.6 $\pm$ 1.9
MCH (pg)	17.6 $\pm$ 0.8	17.9 $\pm$ 0.6
MCHC (g/dL)	33.4 $\pm$ 0.5	33.3 $\pm$ 0.1
WBC ($\times 100/\mu\text{L}$)	95.3 $\pm$ 29.0	78.5 $\pm$ 12.8
Differential leukocyte count (%)		
Neutrophil	14 $\pm$ 6	15 $\pm$ 4
Eosinophil	1 $\pm$ 0	2 $\pm$ 1
Basophil	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Monocyte	6 $\pm$ 1	6 $\pm$ 1
Lymphocyte	79 $\pm$ 7	78 $\pm$ 5
Platelet ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	102.8 $\pm$ 14.2	97.8 $\pm$ 11.7
PT (sec)	25.5 $\pm$ 3.1	20.5 $\pm$ 4.2
APTT (sec)	25.7 $\pm$ 1.0	25.2 $\pm$ 1.4
Female, satellite group		
Number of animals	5	5
RBC ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	792 $\pm$ 32	781 $\pm$ 22
Hemoglobin (g/dL)	14.5 $\pm$ 0.6	14.4 $\pm$ 0.6
Hematocrit (%)	43.7 $\pm$ 2.1	43.8 $\pm$ 2.1
MCV (fL)	55.2 $\pm$ 2.2	56.1 $\pm$ 2.6
MCH (pg)	18.4 $\pm$ 0.6	18.5 $\pm$ 0.7
MCHC (g/dL)	33.3 $\pm$ 0.3	33.0 $\pm$ 0.6
WBC ($\times 100/\mu\text{L}$)	39.3 $\pm$ 6.9	50.3 $\pm$ 9.9
Differential leukocyte count (%)		
Neutrophil	12 $\pm$ 3	13 $\pm$ 4
Eosinophil	1 $\pm$ 1	2 $\pm$ 0
Basophil	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Monocyte	5 $\pm$ 2	4 $\pm$ 1
Lymphocyte	82 $\pm$ 2	82 $\pm$ 4
Platelet ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	97.5 $\pm$ 12.7	91.6 $\pm$ 5.3
PT (sec)	12.7 $\pm$ 0.7	13.5 $\pm$ 0.9
APTT (sec)	20.4 $\pm$ 1.6	21.0 $\pm$ 1.7

and the difference between the values in two measurements was not more than 10% of the lower value. The first measured value was employed as
Values represent mean $\pm$ S.D.

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

Table 17

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats
 Biochemical findings of males and females at the end of dosing period

Compound	NCB			
	0 ^a	0.4	2	10
Male				
Number of animals	5	5	5	5
Total protein (g/dL)	5.8 ± 0.2	5.7 ± 0.2	5.7 ± 0.2	5.9 ± 0.2
Albumin (g/dL)	3.7 ± 0.1	3.7 ± 0.2	3.5 ± 0.2	3.6 ± 0.2
A/G	1.78 ± 0.14	1.78 ± 0.22	1.65 ± 0.26	1.54 ± 0.18
Blood urea nitrogen (mg/dL)	20 ± 2	19 ± 3	19 ± 1	17 ± 1
Creatinine (mg/dL)	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.0	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1
Glucose (mg/dL)	161 ± 17	163 ± 4	170 ± 14	162 ± 6
Total cholesterol (mg/dL)	49 ± 9	43 ± 14	37 ± 11	43 ± 7
Triglyceride (mg/dL)	27 ± 15	23 ± 11	20 ± 5	29 ± 10
ALP (U/L)	191 ± 25	176 ± 13	194 ± 39	166 ± 21
ALT (U/L)	36 ± 21	29 ± 3	39 ± 14	32 ± 8
AST (U/L)	79 ± 32	67 ± 7	79 ± 21	69 ± 10
γ-GTP (U/L)	2 ± 1	1 ± 1	2 ± 1	2 ± 2
Total bilirubin (mg/dL)	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.05	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01
Inorganic phosphorus (mg/dL)	7.0 ± 0.4	6.9 ± 0.5	6.4 ± 0.6	6.4 ± 0.9
Calcium (mg/dL)	9.1 ± 0.2	9.1 ± 0.2	9.1 ± 0.2	9.0 ± 0.2
Na (mEq/dL)	143.5 ± 1.1	142.9 ± 0.4	142.6 ± 0.7	143.8 ± 0.8
K (mEq/dL)	4.45 ± 0.19	4.66 ± 0.29	4.42 ± 0.23	4.16 ± 0.24
Cl (mEq/dL)	106.3 ± 1.5	107.0 ± 1.5	106.0 ± 2.1	107.8 ± 1.0
Female, dam				
Number of animals	5	5	5	5
Total protein (g/dL)	5.9 ± 0.1	6.0 ± 0.2	5.7 ± 0.3	5.8 ± 0.3
Albumin (g/dL)	3.8 ± 0.1	3.9 ± 0.3	3.8 ± 0.3	3.8 ± 0.2
A/G	1.77 ± 0.18	1.89 ± 0.28	2.02 ± 0.28	1.90 ± 0.24
Blood urea nitrogen (mg/dL)	20 ± 5	17 ± 2	16 ± 3	18 ± 3
Creatinine (mg/dL)	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.0
Glucose (mg/dL)	134 ± 7	132 ± 4	141 ± 10	133 ± 16
Total cholesterol (mg/dL)	54 ± 9	57 ± 8	59 ± 13	52 ± 9
Triglyceride (mg/dL)	30 ± 6	28 ± 11	28 ± 12	32 ± 12
ALP (U/L)	76 ± 19	76 ± 8	78 ± 21	81 ± 9
ALT (U/L)	33 ± 6	39 ± 5	34 ± 6	36 ± 3
AST (U/L)	64 ± 5	74 ± 12	64 ± 4	72 ± 11
γ-GTP (U/L)	3 ± 1	2 ± 0	2 ± 1	2 ± 1
Total bilirubin (mg/dL)	0.05 ± 0.02	0.05 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.01
Inorganic phosphorus (mg/dL)	7.3 ± 0.6	6.4 ± 0.4	6.8 ± 0.7	7.1 ± 0.5
Calcium (mg/dL)	9.5 ± 0.3	9.2 ± 0.4	9.1 ± 0.3	9.3 ± 0.3
Na (mEq/dL)	141.5 ± 1.6	141.1 ± 1.0	141.1 ± 0.5	141.2 ± 1.1
K (mEq/dL)	3.91 ± 0.16	4.17 ± 0.34	4.08 ± 0.12	3.95 ± 0.28
Cl (mEq/dL)	108.2 ± 1.3	109.0 ± 1.1	109.1 ± 0.8	108.5 ± 2.0

NCB: nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate

Values represent mean ± S.D.

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

Table 18

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats
 Biochemical findings of males and females at the end of recovery period

Compound Dose (mg/kg)	NCB	
	0 ^a	10
<u>Male</u>		
Number of animals	5	5
Total protein (g/dL)	5.9 ± 0.2	5.9 ± 0.1
Albumin (g/dL)	3.7 ± 0.1	3.7 ± 0.1
A/G	1.68 ± 0.13	1.69 ± 0.14
Blood urea nitrogen (mg/dL)	17 ± 1	17 ± 2
Creatinine (mg/dL)	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.0
Glucose (mg/dL)	179 ± 22	168 ± 10
Total cholesterol (mg/dL)	44 ± 7	49 ± 13
Triglyceride (mg/dL)	38 ± 18	32 ± 9
ALP (U/L)	162 ± 30	166 ± 31
ALT (U/L)	37 ± 7	27 ± 3*
AST (U/L)	72 ± 5	59 ± 8*
γ-GTP (U/L)	1 ± 1	1 ± 1
Total bilirubin (mg/dL)	0.07 ± 0.02	0.05 ± 0.01
Inorganic phosphorus (mg/dL)	6.8 ± 0.9	6.2 ± 0.4
Calcium (mg/dL)	9.2 ± 0.4	9.2 ± 0.1
Na (mEq/dL)	143.3 ± 1.0	143.3 ± 0.4
K (mEq/dL)	4.34 ± 0.35	4.30 ± 0.09
Cl (mEq/dL)	106.0 ± 1.1	106.4 ± 0.9
<u>Female, satellite group</u>		
Number of animals	5	5
Total protein (g/dL)	6.4 ± 0.4	6.2 ± 0.5
Albumin (g/dL)	4.3 ± 0.4	4.2 ± 0.3
A/G	2.01 ± 0.35	2.08 ± 0.23
Blood urea nitrogen (mg/dL)	22 ± 3	22 ± 4
Creatinine (mg/dL)	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1
Glucose (mg/dL)	129 ± 11	144 ± 22
Total cholesterol (mg/dL)	66 ± 6	68 ± 16
Triglyceride (mg/dL)	17 ± 6	26 ± 18
ALP (U/L)	94 ± 21	78 ± 13
ALT (U/L)	26 ± 3	29 ± 7
AST (U/L)	66 ± 8	68 ± 9
γ-GTP (U/L)	1 ± 1	1 ± 1
Total bilirubin (mg/dL)	0.09 ± 0.03	0.09 ± 0.03
Inorganic phosphorus (mg/dL)	5.2 ± 2.5	4.6 ± 1.0
Calcium (mg/dL)	9.2 ± 0.3	9.2 ± 0.3
Na (mEq/dL)	143.3 ± 0.2	143.2 ± 0.5
K (mEq/dL)	5.14 ± 2.31	4.07 ± 0.30
Cl (mEq/dL)	107.1 ± 2.1	106.8 ± 1.2

NCB: nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate

Values represent mean ± S.D.

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

* significantly different from control, p < 0.05

Table 19

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats
Absolute and relative organ weight of males and females at the end of dosing period

Compound		NCB							
Dose (mg/kg)		0 ^a		0.4		2		10	
<u>Male</u>									
Number of animals		5		5		5		5	
Terminal body weight (g)		480.7 ± 21.6		495.6 ± 38.9		468.4 ± 30.9		494.0 ± 35.8	
Brain	(g)	2.01 ± 0.07		2.06 ± 0.02		1.97 ± 0.01		2.00 ± 0.11	
	(g%)	0.42 ± 0.03		0.42 ± 0.04		0.42 ± 0.03		0.41 ± 0.04	
Thymus	(mg)	318.1 ± 101.2		244.3 ± 56.1		308.9 ± 102.8		334.3 ± 91.8	
	(mg%)	65.6 ± 18.1		49.2 ± 10.4		65.3 ± 19.0		66.9 ± 14.2	
Heart	(g)	1.37 ± 0.08		1.44 ± 0.08		1.38 ± 0.06		1.44 ± 0.10	
	(g%)	0.29 ± 0.02		0.29 ± 0.02		0.29 ± 0.02		0.29 ± 0.01	
Liver	(g)	13.72 ± 1.16		14.89 ± 2.14		13.27 ± 1.52		14.36 ± 1.34	
	(g%)	2.85 ± 0.12		2.99 ± 0.23		2.83 ± 0.16		2.90 ± 0.08	
Kidneys	(g)	3.58 ± 0.32		3.44 ± 0.19		3.55 ± 0.39		3.46 ± 0.10	
	(g%)	0.75 ± 0.06		0.69 ± 0.03		0.76 ± 0.04		0.70 ± 0.05	
Spleen	(g)	0.74 ± 0.15		0.87 ± 0.18		0.96 ± 0.26		0.80 ± 0.11	
	(g%)	0.15 ± 0.03		0.17 ± 0.04		0.20 ± 0.04		0.16 ± 0.02	
Adrenal glands	(mg)	59.7 ± 5.2		66.0 ± 10.9		56.4 ± 7.3		59.6 ± 7.6	
	(mg%)	12.4 ± 1.4		13.5 ± 3.2		12.0 ± 1.6		12.1 ± 2.0	
Testes	(g)	3.28 ± 0.19		3.39 ± 0.20		3.28 ± 0.25		3.15 ± 0.18	
	(g%)	0.68 ± 0.03		0.69 ± 0.03		0.70 ± 0.08		0.64 ± 0.07	
Epididymides	(g)	1.20 ± 0.09		1.26 ± 0.08		1.25 ± 0.07		1.25 ± 0.09	
	(g%)	0.25 ± 0.02		0.26 ± 0.03		0.27 ± 0.02		0.25 ± 0.03	
<u>Female, dam</u>									
Number of animals		5		5		5		5	
Terminal body weight (g)		291.3 ± 12.9		301.1 ± 17.7		294.8 ± 17.1		291.1 ± 7.6	
Brain	(g)	1.91 ± 0.10		1.90 ± 0.03		1.84 ± 0.04		1.87 ± 0.05	
	(g%)	0.66 ± 0.04		0.63 ± 0.03		0.63 ± 0.03		0.64 ± 0.03	
Thymus	(mg)	191.0 ± 53.8		237.6 ± 91.3		227.4 ± 95.5		137.0 ± 21.5	
	(mg%)	65.1 ± 16.1		78.6 ± 30.1		76.6 ± 29.7		47.1 ± 7.6	
Heart	(g)	1.02 ± 0.17		0.95 ± 0.07		0.99 ± 0.12		0.92 ± 0.12	
	(g%)	0.35 ± 0.05		0.31 ± 0.01		0.34 ± 0.04		0.32 ± 0.04	
Liver	(g)	9.61 ± 0.12		9.96 ± 0.59		10.18 ± 1.13		9.91 ± 1.12	
	(g%)	3.30 ± 0.14		3.31 ± 0.15		3.45 ± 0.28		3.40 ± 0.32	
Kidneys	(g)	2.02 ± 0.05		2.00 ± 0.18		2.19 ± 0.17		2.06 ± 0.17	
	(g%)	0.69 ± 0.02		0.66 ± 0.05		0.74 ± 0.05		0.71 ± 0.06	
Spleen	(g)	0.82 ± 0.20		0.70 ± 0.09		0.73 ± 0.04		0.75 ± 0.10	
	(g%)	0.28 ± 0.06		0.23 ± 0.03		0.25 ± 0.02		0.26 ± 0.03	
Adrenal glands	(mg)	78.4 ± 9.0		77.6 ± 11.6		82.8 ± 7.2		70.7 ± 8.4	
	(mg%)	27.0 ± 3.3		25.7 ± 2.7		28.1 ± 1.6		24.3 ± 2.7	

NCB: nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate

Values represent mean ± S.D.

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

Table 20

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats
Absolute and relative organ weight of males and females at the end of recovery period

Compound		NCB			
Dose (mg/kg)		0 ^a		8	
<u>Male</u>					
Number of animals		5		5	
Terminal body weight	(g)	510.1	± 29.4	494.5	± 28.0
Brain	(g)	2.02	± 0.04	2.02	± 0.04
	(g%)	0.40	± 0.02	0.41	± 0.02
Thymus	(mg)	269.6	± 54.9	259.5	± 62.8
	(mg%)	52.8	± 10.2	52.6	± 13.2
Heart	(g)	1.43	± 0.07	1.35	± 0.09
	(g%)	0.28	± 0.02	0.27	± 0.02
Liver	(g)	13.82	± 0.93	12.92	± 0.84
	(g%)	2.71	± 0.05	2.61	± 0.11
Kidneys	(g)	3.29	± 0.10	3.42	± 0.33
	(g%)	0.65	± 0.04	0.69	± 0.04
Spleen	(g)	0.79	± 0.13	0.76	± 0.06
	(g%)	0.15	± 0.02	0.15	± 0.00
Adrenal glands	(mg)	53.4	± 7.1	57.4	± 13.3
	(mg%)	10.5	± 1.5	11.5	± 2.2
Testes	(g)	3.29	± 0.19	3.48	± 0.24
	(g%)	0.65	± 0.06	0.71	± 0.08
Epididymides	(g)	1.22	± 0.09	1.31	± 0.05
	(g%)	0.24	± 0.02	0.26	± 0.02
<u>Female, satellite group</u>					
Number of animals		5		5	
Terminal body weight	(g)	288.1	± 17.5	282.3	± 26.2
Brain	(g)	1.91	± 0.10	1.85	± 0.06
	(g%)	0.66	± 0.03	0.66	± 0.05
Thymus	(mg)	373.9	± 61.3	301.8	± 35.8
	(mg%)	130.2	± 22.6	107.2	± 11.6
Heart	(g)	0.89	± 0.01	0.89	± 0.07
	(g%)	0.31	± 0.02	0.32	± 0.04
Liver	(g)	7.86	± 0.83	7.47	± 0.55
	(g%)	2.73	± 0.26	2.65	± 0.20
Kidneys	(g)	1.95	± 0.20	1.96	± 0.07
	(g%)	0.68	± 0.06	0.70	± 0.05
Spleen	(g)	0.53	± 0.03	0.56	± 0.08
	(g%)	0.18	± 0.02	0.20	± 0.03
Adrenal glands	(mg)	73.4	± 14.3	67.7	± 5.6
	(mg%)	25.7	± 5.5	24.1	± 3.0

NCB: nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate

Values represent mean ± S.D.

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

Table 21

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats

Macroscopic findings of males at the end of the dosing period

Dose (mg/kg)	0 ^a		0.4		2		10	
Grade	-	+	-	+	-	+	-	+
(All organs)	[7]		[12]		[12]		[7]	
Abnormality	7	0	12	0	12	0	7	0

NCB: nickel(II)carbonate hydroxide tetrahydrate

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

-, Negative; +, Positive

[], Number of animals examined

Table 22

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats

Macroscopic findings of females at the end of the dosing period

Dose (mg/kg)	0 ^a		0.4		2		10	
Grade	-	+	-	+	-	+	-	+
(Subcutis)	[12]		[12]		[12]		[11] ^b	
Mass, perineal	12	0	11	1	12	0	11	0

NCB: nickel(II)carbonate hydroxide tetrahydrate

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

-, Negative; +, Positive

[], Number of animals examined

^b One dead female was observed soiled fur around the vulva and small thymus and spleen.

Table 23

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats

Macroscopic findings of males at the end of the recovery period

Dose (mg/kg)	0 ^a		10	
Grade	-	+	-	+
(All organs)	[5]		[5]	
Abnormality	5	0	5	0

NCB: nickel(II)carbonate hydroxide tetrahydrate

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

-, Negative; +, Positive

[], Number of animals examined

Table 24

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats

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

Dose (mg/kg)	0 ^a		10	
Grade	-	+	-	+
(All organs)	[5]		[5]	
Abnormality	5	0	5	0

NCB: nickel(II)carbonate hydroxide tetrahydrate

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

-, Negative; +, Positive

[], Number of animals examined

Table 25
Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats

Histopathological findings of males at the end of the dosing period

Dose (mg/kg)	0 ^a						Pos.	0.4						Pos.	2						Pos.	10						Pos.
Grade	-	±	+	++	+++			-	±	+	++	+++			-	±	+	++	+++			-	±	+	++	+++		
(Testis)	[7]							[12]							[12]							[7]						
Atrophy, seminiferous tubule, focal	6	1	0	0	0		1	7	4	0	1	0		5	11	1	0	0	0		1	6	1	0	0	0		1
(Epididymis)	[7]							[12]							[12]							[7]						
Cell debris, lumen	6	1	0	0	0		1	10	1	1	0	0		2	11	1	0	0	0		1	6	1	0	0	0		1
(Liver)	[5]							[0]							[0]							[5]						
Fatty change, hepatocyte, periportal	0	3	2	0	0		5															0	2	3	0	0		5
Microgranuloma	0	5	0	0	0		5															0	4	1	0	0		5
(Kidney)	[5]							[0]							[0]							[5]						
Eosinophilic body,																												
proximal tubule, cortex	4	1	0	0	0		1															5	0	0	0	0		0
Basophilic tubule, cortex	3	1	1	0	0		2															3	2	0	0	0		2
Mineralization	1	3	1	0	0		4															3	2	0	0	0		2
(Spleen)	[5]							[0]							[0]							[5]						
Hematopoiesis, extramedullary	0	1	1	3	0		5															0	0	2	3	0		5
Deposit, pigment, brown	0	0	1	4	0		5															0	0	1	4	0		5
(Lung & Bronchus)	[5]							[0]							[0]							[5]						
Accumulation, foam cell,																												
focal, alveolus	2	3	0	0	0		3															3	2	0	0	0		2
Mineralization, arterial wall, lung	4	1	0	0	0		1															4	1	0	0	0		1
(Prostate)	[5]							[0]							[0]							[5]						
Cellular infiltration, lymphocyte &																												
neutrophil, epithelium/interstitium	0	2	2	0	1		5															1	1	2	1	0		4
(Urinary bladder)	[5]							[0]							[0]							[5]						
Cellular infiltration, lymphocyte,																												
lamina propria	4	1	0	0	0		1															5	0	0	0	0		0
(Brain)	[5]							[0]							[0]							[5]						
No remarkable change																												
(Spinal cord)	[5]							[0]							[0]							[5]						
No remarkable change																												
(Pituitary gland)	[5]							[0]							[0]							[5]						
No remarkable change																												
(Trachea)	[5]							[0]							[0]							[5]						
No remarkable change																												
(Thyroid gland)	[5]							[0]							[0]							[5]						
No remarkable change																												
(Thymus)	[5]							[0]							[0]							[5]						
No remarkable change																												

NCB: nickel(II)carbonate hydroxide tetrahydrate

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

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

[], Number of animals examined

Table 25 (Continued)

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats

Histopathological findings of males at the end of the dosing period

Dose (mg/kg) Grade	0 ^a					Pos.	0.4					Pos.	2					Pos.	10					Pos.
	-	±	+	++	+++		-	±	+	++	+++		-	±	+	++	+++		-	±	+	++	+++	
(Heart)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Submandibular gland & Sublingual gland)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Mandibular lymph node)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Stomach)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Duodenum)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Jejunum)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Ileum)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Cecum)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Colon)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Rectum)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Mesenteric lymph node)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Adrenal gland)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Sciatic nerve)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Eye ball)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Seminal vesicle & Coagulating gland)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Skeletal muscle)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Bone marrow of Femur)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								

NCB: nickel(II)carbonate hydroxide tetrahydrate

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

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

[], Number of animals examined

Table 26

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats

Histopathological findings of females at the end of the dosing period

Dose (mg/kg) Grade	0 ^a						Pos.	0.4						Pos.	2						Pos.	10						Pos.
	-	±	+	++	+++			-	±	+	++	+++			-	±	+	++	+++			-	±	+	++	+++		
(Ovary)	[12]							[12]							[12]							[11]						
No remarkable change																												
(Liver)	[5]							[0]							[0]							[5]						
Fatty change, hepatocyte, periportal		0	5	0	0	0	5																0	5	0	0	0	5
Microgranuloma		1	4	0	0	0	4																0	4	1	0	0	5
Hematopoiesis, extramedullary		4	1	0	0	0	1																4	1	0	0	0	1
(Kidney)	[5]							[0]							[0]							[5]						
Basophilic tubule, cortex		2	3	0	0	0	3																2	2	1	0	0	3
Vacuolation, proximal tubular epithelium, cortex		4	1	0	0	0	1																5	0	0	0	0	0
(Spleen)	[5]							[0]							[0]							[5]						
Hematopoiesis, extramedullary		0	0	2	3	0	5																0	0	2	3	0	5
Deposit, pigment, brown		0	0	1	4	0	5																0	0	0	5	0	5
(Lung & Bronchus)	[5]							[0]							[0]							[5]						
Accumulation, foam cell, focal, alveolus		2	3	0	0	0	3																3	2	0	0	0	2
(Brain)	[5]							[0]							[0]							[5]						
No remarkable change																												
(Spinal cord)	[5]							[0]							[0]							[5]						
No remarkable change																												
(Pituitary gland)	[5]							[0]							[0]							[5]						
No remarkable change																												
(Trachea)	[5]							[0]							[0]							[5]						
No remarkable change																												
(Thyroid gland)	[5]							[0]							[0]							[5]						
No remarkable change																												
(Thymus)	[5]							[0]							[0]							[5]						
No remarkable change																												
(Heart)	[5]							[0]							[0]							[5]						
No remarkable change																												
(Submandibular gland & Sublingual gland)	[5]							[0]							[0]							[5]						
No remarkable change																												
(Mandibular lymph node)	[5]							[0]							[0]							[5]						
No remarkable change																												

NCB: nickel(II)carbonate hydroxide tetrahydrate

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

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

[], Number of animals examined

Table 26 (Continued)

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats

Histopathological findings of females at the end of the dosing period

Dose (mg/kg) Grade	0 ^a					Pos.	0.4					Pos.	2					Pos.	10					Pos.
	-	±	+	++	+++		-	±	+	++	+++		-	±	+	++	+++		-	±	+	++	+++	
(Stomach)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Duodenum)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Jejunum)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Ileum)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Cecum)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Colon)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Rectum)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Mesenteric lymph node)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Adrenal gland)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Sciatic nerve)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Eye ball)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Urinary bladder)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Uterus)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Vagina)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Skeletal muscle)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Bone marrow of Femur)	[5]						[0]						[0]						[5]					
No remarkable change																								
(Mammary gland)	[0]						[1]						[0]						[0]					
Adenocarcinoma							tumor = 1																	

NCB: nickel(II)carbonate hydroxide tetrahydrate

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

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

[], Number of animals examined

Table 27

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats

Histopathological findings of males at the end of the recovery period

Dose (Group) Grade	0 ^a						Pos.	10						Pos.
	-	±	+	++	+++			-	±	+	++	+++		
(Testis)	[5]							[5]						
Atrophy, seminiferous tubule, focal	3	1	1	0	0		2	4	1	0	0	0		1
(Epididymis)	[5]							[5]						
Cell debris, lumen	4	0	1	0	0		1	4	1	0	0	0		1

NCB: nickel(II)carbonate hydroxide tetrahydrate

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

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

[], Number of animals examined

Table 28

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats

Histopathological findings of females at the end of the recovery period

Dose (mg/kg)	0 ^a					Pos.	10					Pos.
Grade	-	±	+	++	+++		-	±	+	++	+++	
(Ovary)	[5]						[5]					
No remarkable change												

NCB: nickel(II)carbonate hydroxide tetrahydrate

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

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

[], Number of animals examined

Table 29

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats

Estrus cycle of dams

Compound	NCB			
	0 ^a	0.4	2	10
Dose (mg/kg)				
Number of dams examined	12	12	12	12
<u>Pre-treatment period</u>				
Number of animals showing type of cycle				
4-day cycle	12	12	12	12
<u>Treatment period</u>				
Number of animals showing each type of cycle				
4-day cycle	12	11	10	12
4 and 5-day cycle	0	1	2	0
Frequency of animals of which type of estrus cycle was changed after the treatment	0 / 12	1 / 12	2 / 12	0 / 12
Mean times of vaginal estrus during meating period; mean ± S.D. (N)	1.0 ± 0.0 (12)	1.1 ± 0.3 (12)	1.0 ± 0.0 (12)	1.0 ± 0.0 (12)

NCB:nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate

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

Table 30

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats

Reproductive performance of animals

Compound	NCB			
	0 ^a	0.4	2	10
Dose (mg/kg)				
Number of pairs examined	12	12	12	12
Number of pairs copulated	12	12	12	12
Copulation index	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of pregnant females	12	12	12	12
Fertility index	100.0	100.0	100.0	100.0
Pairing days until copulation; mean ± S.D.	3.2 ± 0.9	2.4 ± 1.7	2.6 ± 1.0	2.2 ± 1.1

NCB:nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate

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

Copulation index = (number of pairs copulated / number of pairs examined) × 100, %

Fertility index = (number of pregnant females / number of pairs copulated) × 100, %

Table 31

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats
Development of pups up to day 4 of lactation

Compound	NCB			
	0 ^a	0.4	2	10
Number of pregnant females	12	12	12	12
Number of pregnant females with live newborns	12	12	12	11
Gestation index	100.0	100.0	100.0	91.7
Gestation length in days	22.3 ± 0.5 (12)	22.4 ± 0.5 (12)	22.3 ± 0.5 (12)	22.7 ± 0.5 (11)
Number of corpora lutea	16.1 ± 2.4 (12)	16.4 ± 1.8 (12)	16.5 ± 1.4 (12)	16.2 ± 1.9 (11)
Number of implantations	15.3 ± 2.4 (12)	15.3 ± 2.3 (12)	15.3 ± 1.6 (12)	15.8 ± 2.0 (11)
Implantation index	95.4 ± 5.4 (12)	93.2 ± 6.6 (12)	92.9 ± 5.0 (12)	97.8 ± 3.1 (11)
<u>Day 0 of lactation (at birth)</u>				
Number of newborns	14.2 ± 2.1 (12)	14.0 ± 1.9 (12)	14.3 ± 1.5 (12)	14.5 ± 2.3 (11)
Delivery index	92.6 ± 4.9 (12)	91.7 ± 6.0 (12)	93.1 ± 6.4 (12)	91.4 ± 8.0 (11)
Number of live newborns	13.8 ± 2.5 (12)	13.8 ± 2.0 (12)	13.5 ± 1.9 (12)	13.7 ± 3.1 (11)
Males	6.7 ± 2.2 (12)	6.7 ± 2.4 (12)	7.1 ± 2.5 (12)	7.5 ± 2.4 (11)
Females	7.1 ± 2.1 (12)	7.2 ± 2.1 (12)	6.4 ± 2.5 (12)	6.2 ± 2.6 (11)
Birth index	89.2 ± 6.9 (12)	90.4 ± 5.7 (12)	88.7 ± 13.3 (12)	87.3 ± 16.6 (11)
Live birth index	96.5 ± 6.6 (12)	98.7 ± 4.4 (12)	95.3 ± 12.5 (12)	95.1 ± 14.0 (11)
Sex ratio on day 0	48.9 ± 13.0 (12)	47.9 ± 15.0 (12)	52.4 ± 17.3 (12)	55.3 ± 14.4 (11)
<u>Day 4 of lactation</u>				
Number of live pups	13.7 ± 2.5 (12)	13.8 ± 2.1 (12)	13.3 ± 2.3 (12)	13.5 ± 2.8 (11)
Males	6.7 ± 2.2 (12)	6.6 ± 2.4 (12)	7.0 ± 2.6 (12)	7.5 ± 2.3 (11)
Females	7.0 ± 2.0 (12)	7.2 ± 2.1 (12)	6.3 ± 2.6 (12)	6.0 ± 2.5 (11)
Viability index	99.4 ± 2.0 (12)	99.4 ± 2.0 (12)	98.2 ± 6.4 (12)	98.3 ± 3.8 (11)
Sex ratio on day 4	49.1 ± 12.9 (12)	47.6 ± 14.9 (12)	52.3 ± 17.4 (12)	55.8 ± 14.3 (11)

NCB: nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate

Values represent mean ± S.D. (N)

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

Gestation index = (number of pregnant females with live newborns / number of pregnant females) × 100, %

Implantation index = (number of implantations / number of corpora lutea) × 100, %

Delivery index = (number of newborns / number of implantations) × 100, %

Birth index = (number of live newborns / number of implantations) × 100, %

Live birth index = (number of live newborns / number of newborns) × 100, %

Sex ratio on day 0 = (number of male live newborns / number of live newborns) × 100, %

Viability index = (number of live pups on day 4 of lactation / number of live newborns) × 100, %

Sex ratio on day 4 = (number of male live pups on day 4 of lactation / number of live pups on day 4 of lactation) × 100, %

Table 32

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats

Mean body weight of pups up to day 4 of lactation

Compound	NCB			
	0 ^a	0.4	2	10
<u>Day 0 of lactation</u>				
Number of live newborns				
Male	6.7 ± 2.2 (12)	6.7 ± 2.4 (12)	7.1 ± 2.5 (12)	7.5 ± 2.4 (11)
Female	7.1 ± 2.1 (12)	7.2 ± 2.1 (12)	6.4 ± 2.5 (12)	6.2 ± 2.6 (11)
Mean body weight (g)				
Male	6.9 ± 0.7 (12)	6.8 ± 0.5 (12)	6.7 ± 0.6 (12)	6.9 ± 0.7 (11)
Female	6.4 ± 0.6 (12)	6.5 ± 0.5 (12)	6.4 ± 0.5 (12)	6.6 ± 0.7 (11)
<u>Day 4 of lactation</u>				
Number of live newborns				
Male	6.7 ± 2.2 (12)	6.6 ± 2.4 (12)	7.0 ± 2.6 (12)	7.5 ± 2.3 (11)
Female	7.0 ± 2.0 (12)	7.2 ± 2.1 (12)	6.3 ± 2.6 (12)	6.0 ± 2.5 (11)
Mean body weight (g)				
Male	11.2 ± 1.7 (12)	10.9 ± 1.3 (12)	11.1 ± 0.9 (12)	11.3 ± 1.5 (11)
Female	10.3 ± 1.1 (12)	10.6 ± 1.2 (12)	10.7 ± 0.8 (12)	10.8 ± 1.4 (11)

NCB:nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate

Values represent mean±S.D. (N)

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

Table 33

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of NCB by oral administration in rats

Morphological findings of pups

Compound Groups (mg/kg)	NCB			
	0 ^a	0.4	2	10
Dead pups				
Number of dead pups ^b	6	3	11	10
Number of missing pups	1	1	1	1
Number of dead pups examined	5 (1) ^c	2	10 (3)	10 (2)
No. of dead pups with external changes	0	0	0	0
No. of dead pups with visceral changes	0	0	0	0
Live pups				
Number of newborns examined (Day 0 of lactation; at birth)	165	166	162	151
No. of newborns with external changes	0	0	1	0
Types and number Dwarf	0	0	1	0
Number of newborns examined (Day 4 of lactation; at necropsy)	164	165	160	148
No. of pups with external changes	0	0	0	0
No. of pups with visceral changes	0	0	0	0

NCB: nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate

^a vehicle control, 0.5% CMC Na solution (5 mL/kg)^b including missing pups^c parenthesis indicates number of dead pups with rotten internal organ