

は4,174 ppmと計算された。

今回の試験でCAA感作動物はCHMAAに対しても陽性反応を示したことから、交差反応性が確認された。また、CHMAA自体にもGPMTで皮膚感作性が認められ [37]、CHMAAに感作が成立したモルモットはCAAに対しても陽性反応を示すことが報告 [35] されていることから、CAAとCHMAAはお互いに交差反応性を有することが確認された。しかし、もう一つのCAAの類似構造物質であるTCAAに関しては交差反応性は認められなかった。なお、TCAA自体の皮膚感作性に関する知見はない。これらの結果からCAAとCHMAAの共通構造部分、2-chloroacetamide構造あるいは2-chloroethane構造部分が皮膚感作性に重要な役割を果たしているものと推察された。

CAAは、皮内投与による第1次感作を行わず、第2次感作の25%ワセリン軟膏閉塞貼付処置のみで軽度ではあるが感作が成立した (Table 1) ことから、CAAが高濃度に皮膚に接触した時には比較的容易に感作が成立すると推察された。これまでに我々が試験した化学物質の内、第2次感作のみで感作が成立する化学物質としてN-(1-methylheptyl)-N'-phenyl-p-phenylenediamine [9]、2-(thiocyanomethylthio) benzothiazole [9] 等があるが、これらの最低感作濃度は5あるいは10 ppmと低かった。今回試験したCAAの最低感作濃度は500 ppmでありそれほど低いものではなかったが、CAAは第2次感作のみで感作を成立させることが出来ることから、たとえ短期間であっても高濃度のCAAに暴露された場合には感作される危険性があるので注意を要する化学物質と考えられる。

2. BNPДの皮膚感作性

モルモットを用いたBNPDの皮膚感作性に関する報告では、Optimization法では3%ワセリン軟膏で惹起したときには陽性反応は認められず、0.1%水溶液の皮内注射による惹起では18/20に陽性反応が認められている [25]。Maximization法では惹起方法として0.4%水溶液を閉塞貼付したときには陽性反応は認められないが、この惹起処置を数回繰り返すと2/10に陽性反応が見られており [19]、いずれも惹起方法の改良により陽性反応を得ている。BNPDは化学構造式から計算したオクタノール-水分配係数が-0.64と低いことから、皮膚透過性が低いと推察され、このことが惹起方法によって結果が異なる原因の一つと考えられた。そこで、今回の試験では惹起の最高濃度を軽度の皮膚刺激性を有すると予想され

る25,000 ppmとした。皮膚刺激性を有する濃度のBNPDで惹起することにより、BNPDの皮膚透過性が亢進され、感作の成立した群の皮膚反応と対照群の皮膚反応との間に明確な差が出ることを期待された。しかし、惹起48時間後の観察では、対照群の陽性反応率が20%、平均評価点が0.2であるのに対して最高感作群 (5,000 ppm) の陽性反応率が50%、平均評価点が0.8と両群の間に顕著な差は見られず、統計的にも有意差はなかった。そこで、BNPDの皮膚透過性をさらに亢進させるために、すり傷を付けた皮膚を用いて惹起を行ったが、対照群と5,000 ppm感作群の陽性反応率と平均評価点には顕著な差は認められなかった。しかし、皮膚反応を個々に観察すると、5,000 ppm感作群の1例は皮膚に対して刺激性のない濃度である5,000 ppmの惹起によって無傷の皮膚で陽性反応 (一様の軽度な紅斑) が認められ、すり傷を付けて惹起すると強い紅斑と浮腫が観察されたことからこのモルモットはBNPDに感作された可能性が高いと考えられた。BNPDは皮膚透過性が低いことに加えて感作誘導能が低く (最低感作濃度が5,000 ppm)、その上今回感作に用いた濃度の10倍の50,000 ppmを皮内注射 (第1次感作) すると投与部位に壊死が生じるので皮膚感作性試験にこの濃度を使用することができないことが、モルモットにおける皮膚感作性試験でわずか1例にしか感作性陽性例が得られなかった原因と考えられた。以上のように5,000 ppm BNPД感作群で陽性反応が認められたのは10例中わずかに1例であるので、BNPDがGPMTにおいて皮膚感作性が認められたと直ちに結論することは出来なかった。今後、例数を増やしてBNPDの感作性の有無を確認する必要がある。

正常人を用いた皮膚感作性試験では、5%ワセリン軟膏で感作処置後、2.5%ワセリン軟膏パッチで惹起したとき陽性反応が見られたとの報告が2例 (陽性反応率: 11/93および10/10) あるが、いずれも使用された惹起濃度がヒトで皮膚刺激を誘発する可能性のある濃度であるので明確な結論は得られていない [19]。一方、皮膚炎患者にBNPDをパッチしたとき、およそ0.1~3%の患者がBNPD (皮膚刺激性のない0.25%で惹起) に対して陽性反応を示し、これらの患者がBNPDに感作されている可能性が示唆された [19]。BNPDに反応性を示す皮膚炎患者がこのように低頻度である原因は、BNPDの皮膚感作能が低いいためか、化粧品や薬品にBNPDが使用される頻度がパラベンやイソチアゾリン類と比べて低いいためかは

今後の検討が必要であるが、今回のGPMTでの結果からBNPDの皮膚感作能の低さがその一因と考えられた。

BNPD分解物のひとつに皮膚感作性物質として知られるformaldehydeがある。BNPDとformaldehydeとの交差反応性については、BNPDに感作した患者がformaldehydeにも反応性を示すとの報告 [20, 22] がある一方で、反応しないとする報告 [21, 23] もあり、一定の結論は得られていない。そこで今回の試験においてもformaldehydeをBNPDによる惹起と同時に塗布したが、陽性反応は全く認められなかった。また、BNPDに反応性を示す患者がformaldehydeにも反応性を示す場合は1/3程度であり、これらの患者がすでにformaldehydeに感作されていた可能性を否定できない。これらのことから、BNPDの皮膚感作性はその分解物であるformaldehydeに原因を求めるよりもBNPD自体が皮膚感作性を有すると考える方が妥当かもしれない。しかし、この結果からヒトにおけるBNPDとformaldehydeとの間の交差反応性を完全に否定できるものではない。逆に、formaldehydeに感作されたヒトがBNPD含有製品を使用する時にはBNPD分解物であるformaldehydeに反応する危険性があるので注意を要する。

3. ZPTの皮膚感作性

予備試験および本試験で合計20例の動物でZPTの皮膚感作性試験（第1次感作濃度：5,000 ppm、第2次感作濃度：25%、最高惹起濃度：50,000 ppm）を実施したが、いずれにも陽性反応は認められなかった。ZPTはその化学構造式から計算するとオクタノール-水分配係数が-0.48と極性が高いと推察されるが、実際の水溶解度は21℃で1 mg/ml以下 [38] と低い。サルではZPTの皮膚透過率が無傷の皮膚では0.02%と非常に低いのに対して、すり傷を付けた皮膚ではZPTの皮膚透過性が約10倍増加すると報告されている [36]。また、ウサギ、モルモット、マウスの3種の動物でのZPTの皮膚刺激性に関する種差についての報告では、20%ZPTを開放塗布したところ、ウサギで50%、マウスで25%に皮膚刺激性が見られたが、モルモットでは皮膚刺激性が見られていない [26]。このことから、今回の試験に使用した動物種であるモルモットに対するZPTの皮膚透過性は非常に低いことが推察される。そこで、ZPTの皮膚透過性を促進するために、皮膚にすり傷を付けてZPT（5,000および50,000 ppm）を塗布して皮膚反応を観察したが、陽性反

応は認められなかった。なお、データには示していないが、同一ロットのモルモットを用いて陽性対照であるDNCBの皮膚感作性試験をZPTの感作性試験と平行して実施したところ、強い皮膚感作性が認められたことから、今回用いたロットの動物は皮膚感作性物質に対して良好な反応を示すことが確認された。

実験動物を用いたZPTの皮膚感作性に関する知見は未だない。本報においてGPMTによるZPTの皮膚感作性試験を実施したが、皮膚感作性陽性の確認には至らなかった。一方、ヒトにおけるZPTの皮膚感作性に関しては、ヨーロッパで総計7782人にZPTのパッチテストを実施したところ、ZPTに対するアレルギーと判定されたヒトは6人（0.08%）、擬陽性（皮膚刺激性の可能性もある）と判定されたヒトは7人（0.09%）と非常に少数であった [32]。ZPTによるヒトの感作症例では、ZPT含有薬用シャンプーなどで感作された患者 [27-31] の中に、膿疱性乾癬状発疹、浮腫を伴う湿疹などがみられ、さらに1例では発症後に光過敏症を併発しているなど比較的重篤な症例が報告 [29, 31] されていることから注意を要する。

V. まとめ

今回、GPMTによって皮膚感作性を試験した3種の抗菌剤2-chloroacetamide (CAA)、2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol (BNPD) およびzinc bis(2-pyridylthio-1-oxide) (ZPT) は化学構造式から推定したオクタノール-水分配係数 (estimated log Pow) がマイナスの値を有するものである。CAAは通常のGPMT法で十分に感作が成立し、最低感作誘導濃度は500 ppm、最低惹起濃度は1,600 ppmであった。また、CAAは同じく抗菌剤として使用されている2-chloro-N-(hydroxymethyl)acetamide (CHMAA) と交差反応性を示した。BNPDは5,000 ppm感作群を5,000 ppmで惹起した時、わずかに1例の陽性動物が確認されたに過ぎず、感作性陽性と明確に結論付けることは出来なかった。また、BNPD感作動物はBNPDの分解物の一つであるformaldehydeに対して皮膚反応性を示さなかった。ZPTについては使用できる最高濃度（感作濃度5,000 ppm、惹起濃度50,000 ppm）を用いても皮膚感作性陽性とは確認出来なかった。CAAおよびBNPDはestimated log Powの値から予想した通り水溶性であったが、ZPTは水にも油にも難溶であった。このような物質についてはGPMTにおける感作誘導および惹起方法についてさらに検討が必要と考えられる。

参 考 文 献

- 1) 山野哲夫, 清水 充, 野田 勉, 森田 茂. 家庭用品に使用される化学物質の感作性試験 (I) Tinuvin PおよびTinuvin 326のモルモットによる感作性. 大阪市環境科学研報告 1993; 55: 47-52.
- 2) 清水 充, 野田 勉, 山野哲夫, 森田 茂. 家庭用品に使用される2-メルカプトベンズイミダゾール、2-ベンズイミダゾールカルバミン酸メチル及びエチレンチオ尿素のモルモットにおける感作性並びに交差反応性. 衛生化学 1994; 40: 558-566.
- 3) 山野哲夫, 野田 勉, 森田 茂. 家庭用品に使用される化学物質の感作性試験 (II) *p-t*-ブチルフェニルサリチル酸 (PTBPS) およびオクタクロロジプロピルエーテル (OCDPE) のモルモットにおける感作性. 大阪市環境科学研報告 1995; 57: 15-20.
- 4) 野田 勉, 山野哲夫, 清水 充. 家庭用品に使用される化学物質の感作性試験 (III) 2,4,5,6-tetrachloroisophthalonitrile (TPN)、1,2-benzisothiazolin-3-one (BIT)、2-hydroxy-4-isopropyl-2,4,6-cycloheptatrien-1-one (HICHO) および2,5-di-*tert*-amylhydroquinone (DAHQ) のモルモットにおける皮膚感作性. 大阪市環境科学研報告 1998; 60: 24-34.
- 5) 野田 勉, 清水 充. 抗菌剤ヒバ油の安全性試験 1. 皮膚感作試験. 生活衛生 2000; 44: 13-19.
- 6) 清水 充, 山野哲夫, 野田 勉. 家庭用品に使用される化学物質の感作性試験 (IV) 3種のハロゲン系抗菌剤、3-iodo-2-propynyl butylcarbamate (IPBC)、*p*-chlorophenyl-3-iodopropargylformyl (CPIP) および1-bromo-3-ethoxycarbonyloxy-1,2-diiodo-1-propene (BECDIP) のモルモットにおける皮膚感作性. 生活衛生 2000; 44: 129-138.
- 7) Yamano T, Shimizu M, Noda T. Relative elicitation potencies of seven chemical allergens in the guinea pig maximization test. *J Health Sci* 2001; 47: 123-128.
- 8) 野田 勉, 山野哲夫, 清水 充. 抗菌剤N-*n*-butyl-1,2-benzisothiazolin-3-oneの安全性試験 1. 皮膚感作性. 生活衛生 2001; 45: 137-142.
- 9) Yamano T, Shimizu M, Noda T. Allergenicity evaluation of N-(1-methylheptyl)-N'-phenyl-*p*-phenylenediamine and 2-(thiocyanomethylthio)benzothiazole by the guinea pig maximization test. *J Health Sci* 2001; 47: 331-338.
- 10) 清水 充, 山野哲夫, 野田 勉. 家庭用品に使用される抗菌剤の感作性試験 (V) 4,4'-(tetramethylenediacarbonyldiamino) bis(1-decylpyridinium bromide) およびN,N'-hexamethylene bis(4-carbamoyl-1-decylpyridinium bromide) のモルモットにおける感作性試験. 大阪市環境科学研報告 2002; 64: 1-5.
- 11) 清水 充, 山野哲夫, 野田 勉. 10,10'-oxybis-10H-phenoxarsineを含む抗菌剤のモルモットにおける感作性試験. 大阪市環境科学研報告 2002; 64: 54-57.
- 12) Yamano T, Shimizu M, Noda T. Allergenicity evaluation of *p*-chloro-*m*-cresol and *p*-chloro-*m*-xylenol by non-radioactive murine local lymph-node assay and multiple-dose guinea pig maximization test. *Toxicology* 2003; 190: 259-266.
- 13) Lama L, Vanni D, Barone M, Patrone P, Antonelli C. Occupational dermatitis to chloroacetamide. *Cont Dermat* 1986; 15: 243.
- 14) Assier-Bonnet H, Revuz J. Chloroacetamide as a cause of contact dermatitis in hairdressing. *Cont Dermat* 1999; 40: 284-285.
- 15) Finkbeiner H, Kleinhans D. Airborne allergic contact dermatitis caused by preservatives in home-decorating paints. *Cont Dermat* 1994; 31: 275-276.
- 16) Bogenrieder T, Landthaler M, Stolz W. Airborne contact dermatitis due to chloroacetamide in wall paint. *Cont Dermat* 2001; 45: 55.
- 17) Anonymous. Final report on the safety assessment of chloroacetamide. *J Am Coll Toxicol* 1991; 10: 21-32.
- 18) Anonymous. Chloroacetamid. *Toxikologische Bewertung. Heidelberg, Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie* 32p IP:VI:8 (2000) [cited in TOXLINE data base]
- 19) Deutsche Forschungsgemeinschaft. 2-Bromo-2-nitro-1,3-propanediol. In: *Occupational Toxicants. vol. 2, Germany: VCH; 1991. 249-270.*
- 20) Frosch PJ, Weickel R. Kontaktallergie auf das konservierungsmittel Bronopol. *Hautarzt* 1987; 38: 267-270.
- 21) Grattan CEH, Harman RRM, Tan RSH. Milk recorder dermatitis. *Cont Dermat* 1986; 14: 217-220.

- 22) Peters MS, Connolly SM, Schroeter AL. Bronopol allergic contact dermatitis. *Cont Dermat* 1983; 9: 397-401.
- 23) Storrs FJ, Bell DE. Allergic contact dermatitis to 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol in a hydrophilic ointment. *J Am Acad Dermat* 1983; 8: 157-170.
- 24) Frosch PJ, White IR, Rycroft RJG, Lahti A, Burrows D, Camarasa JG, et al. Contact allergy to Bronopol. *Cont Dermat* 1990; 22: 24-26.
- 25) Maurer TH, Weirich EG, Hess R. The optimization test in the guinea pig in relation to other predictive sensitization methods. *Toxicology* 1980; 15: 163-171.
- 26) Lansdown ABG. Interspecies variations in response to topical application of selected zinc compounds. *Food Chem Toxicol* 1991; 29: 57-64.
- 27) Calnan C. cited by Fisher, A.A. Highlights of the first international symposium on contact dermatitis. *Cutis* 1976; 18: 645-662.
- 28) Muston HL, Messenger AG, Byrne JPH. Contact dermatitis from zinc pyrithione, an antidandruff agent. *Cont Dermat* 1979; 5: 276-277.
- 29) Yates VM, Finn OA. Contact allergic sensitivity to zinc pyrithione followed by the photosensitivity dermatitis and actinic reticuloid syndrome. *Cont Dermat* 1980; 6: 349-350.
- 30) Goh CL, Lim KB. Allergic contact dermatitis to zinc pyrithione. *Cont Dermat* 1984; 11: 120.
- 31) Nielsen NH, Menné T. Allergic contact dermatitis caused by zinc pyrithione associated with pustular psoriasis. *Am J Cont Dermat* 1997; 8: 170-171.
- 32) Schnuch A, Geier J, Uter W, Frosch PJ. Patch testing with preservatives, antimicrobials and industrial biocides. Results from a multicentre study. *Brit J Dermat* 1998; 138: 467-476.
- 33) Magnusson B, Kligman AM. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J Invest Dermat* 1969; 52: 268-276.
- 34) Nakamura A, Momma J, Sekiguchi H, Noda T, Yamano T, Kaniwa M, et al. A new protocol and criteria for quantitative determination of sensitization potencies of chemicals by guinea pig maximization test. *Cont Dermat* 1994; 31: 72-85.
- 35) Agren S, Dahlquist I, Fregert S, Persson K. Allergic contact dermatitis from the preservative N-methylol-chloroacetamide. *Cont Dermat* 1980; 6: 302-303.
- 36) Gibson WB, Calvin G. Percutaneous absorption of zinc pyridinethione in monkeys. *Toxicol Appl Pharmacol* 1978; 43: 425-437.
- 37) Pereira F, Rafael M, Pereira MA. Occupational allergic contact dermatitis from a glue, containing isothiazolinones and N-methylol-chloroacetamide, in a carpenter. *Cont Dermat* 1999; 40: 283-284.
- 38) Keith LH, Walters DB. Compendium of safety data sheets for research and industrial chemicals. Florida: VCH Publishers; 1985. p1760-1761.

(2003年7月31日受付・2004年1月7日受理)

報 文

抗菌剤methylene-bis(thiocyanate)のモルモットにおける皮膚感作性

野田 勉、山野哲夫、清水 充
大阪市立環境科学研究所

Contact Allergenicity of Methylene-bis(thiocyanate) in the Guinea Pig Maximization Test

Tsutomu NODA, Tetsuo YAMANO and Mitsuru SHIMIZU

Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences: 8-34, Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan

Abstract

Methylene-bis(thiocyanate) (MBTC), an antimicrobial agent used in water-cooling systems, soluble cutting oils, and paper mills, was evaluated for its skin sensitization potency in both the induction and elicitation phases in a modified guinea pig maximization test (GPMT). MBTC showed strong sensitization potential in GPMT, so that a topical application using a patch with a relatively high concentration of MBTC (10,000 ppm) was able to sensitize 100% of guinea pigs alone, without an intradermal injection. At a dose of 5 ppm in both the intradermal injection and the topical application, the compound produced skin sensitization in 60% of animals. The strongest positive skin reaction was elicited not in the group of animals sensitized with 5,000 ppm MBTC, the highest induction dose tested, but in the group treated with 500 ppm MBTC. The lowest elicitation concentration was 50 ppm in groups sensitized with 50 or 500 ppm MBTC. MBTC-sensitized animals cross-reacted to benzyl thiocyanate, chloromethyl thiocyanate, and 2-(thiocyanomethylthio) benzothiazole, but not to calcium thiocyanate, methyl isothiocyanate, or methylene dicyanide. The data showed that the presence of a thiocyanomethyl group in the chemical structure of a compound is essential for cross-reactivity in MBTC-sensitized animals.

Keywords: methylene-bis(thiocyanate), benzyl thiocyanate, chloromethyl thiocyanate,
2-(thiocyanomethylthio)benzothiazole, skin sensitization, guinea pig maximization test

I. 緒言

家庭用品には抗菌剤、可塑剤、加硫促進剤、酸化防止剤など様々な用途に多くの化学物質が使用されていることから、ヒトがこれらの化学物質に直接的に暴露される機会が多くなる。しかしこれらの化学物質の安全性、特に皮膚感作性については十分に検討されているとは言い難い。我々は抗菌剤を中心に家庭用品に使用される化学物質の皮膚感作性を調査してきたが、今回は工業用の殺菌剤として使用されている methylene-bis(thiocyanate) (MBTC) の皮膚感作性試験を実施した。

MBTCは現在は主として水冷却系や製紙工場で藻類やバクテリアなどの繁殖防止のために用いられているが、今後水性塗料等の抗菌剤としても用いられる可能性がある化学物質である。MBTCはヒトでは皮膚に対する刺激性が報告されており、さらに皮膚感作性を有する可能性が指摘されている [1] が、MBTCを10%含有する抗菌剤であるCytox 3522を用いたヒトでのパッチテストでは、明確に皮膚感作性を有するとの結論は出ていない [2-4]。一方、モルモット maximization法 [5] 等の動物実験ではCytox 3522は明確に皮膚感作性物質とされている [6]。しかしMBTCの最低感作濃度および最低惹起濃度などの知見は未だ示されていない。そこで本実験

では試薬であるMBTCを用いてモルモットmaximization法のNakamuraらによる改良法(GPMT) [7]に従って最低感作濃度および最低惹起濃度等を検討した。さらにMBTCと類似の化学構造を有するthiocyanate系化合物およびisothiocyanate系化合物等との交差反応性についても検討した。

II. 実験材料および方法

1. 試験物質 (Fig. 1)

methylene-bis(thiocyanate)

(MBTC : CAS No. 6317-18-6、東京化成工業製)

別名 : methylene dithiocyanate、methylene thiocyanate

純度 : >99.0 %

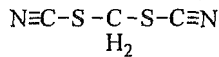


Fig. 1 Chemical structure of methylene-bis(thiocyanate) (MBTC).

2. 交差反応性検討物質 (Fig. 2)

1) benzyl thiocyanate

(BTC : CAS No. 3012-37-1、和光純薬 (株) 製)

2) calcium thiocyanate tetrahydrate

(CTC : CAS No. 2092-16-2、和光純薬 (株) 製)

3) chloromethyl thiocyanate

(CMTC : CAS No. 3268-79-9、和光純薬 (株) 製)

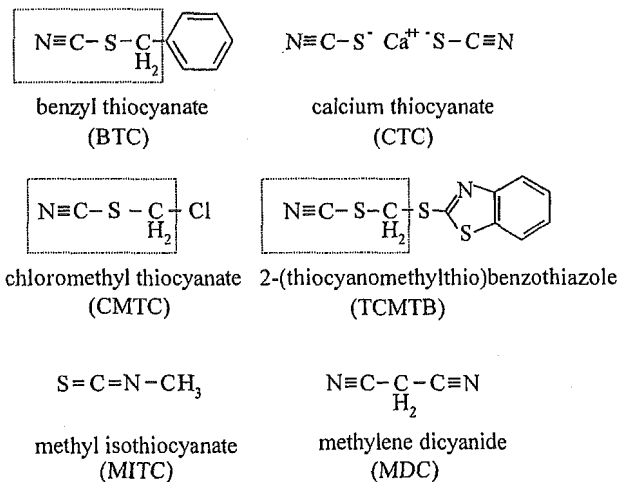


Fig. 2 Chemical structures of compounds tested for cross-reactivity to MBTC.

4) 2-(thiocyanomethylthio)benzothiazole

(TCMTB : CAS No. 21564-17-0、バックマンラボラトリーズ製)

5) methyl isothiocyanate

(MITC : CAS No. 556-61-6、和光純薬 (株) 製)

6) methylene dicyanide

(MDC : CAS No. 109-77-3、和光純薬 (株) 製)

別名 : malononitrile

3. その他の試薬

フロインド完全アジュバンド (FCA : ヤトロン製)、白色ワセリン、特級アセトン、局方オリブ油、注射用生理食塩液。

4. 使用動物

4週齢のStd:Hartley系の雌性モルモット (クリーン) を日本SLC (株) から購入し、2週間の馴化飼育の後実験に供した。投与前日に一般状態および投与部位の皮膚に異常のみられない動物を選択し、各群に無作為に振り分けた。動物は馴化期間および実験期間ともに、ステンレス製2連ユニットケージ (W40cm×L26cm×H20cm) に個別に収容し、固型飼料 (オリエンタル酵母 (株) 製RC-4) および水道水を自由に摂取させた。飼育は温度23±2℃、点燈7:00~19:00に調節された動物飼育室で行った。

5. 皮膚感作性試験方法

1) 皮膚感作性の有無および第2次感作処置の効果

MBTCの皮膚刺激性試験 (皮内投与、閉塞貼付、開放塗布) を実施し、その結果を基に以下の4群を設け皮膚感作性の有無を調べるとともに第2次感作処置の効果を検討した。

MBTCの適用できる最高投与量を第1次感作および第2次感作に用いる群 (高用量群 : 5,000 ppmおよび10,000 ppm)、高用量群で用いた第1次感作濃度の1/10,000を第1次および第2次感作に用いる群 (低用量群 : いずれも0.5 ppm)、第2次感作処置単独で皮膚感作が成立するか否かを検討するために第1次感作濃度を0% (溶媒投与) とし、第2次感作濃度を高用量群で用いた第2次感作濃度とする群 (閉塞貼付群 : 0 ppmおよび10,000 ppm)、および対照群を設定した。その他、用いた惹起濃度および使用動物数をTable 1に示した。

Table 1 Preliminary skin sensitization test of MBTC 48 and 72 h after the challenge dose.

Induction		N	Challenge		48 h		72 h	
id injection ¹⁾ ppm	topical ppm		topical ppm	SR ²⁾	MR ³⁾	SR	MR	
0	0	5	0	0	0.0	0	0.0	
			5	0	0.0	0	0.0	
			50	0	0.0	0	0.0	
			500	0	0.0	0	0.0	
			5,000	100	1.0	0	0.0	
0.5	0.5	5	0	0	0.0	0	0.0	
			5	0	0.0	0	0.0	
			50	0	0.0	0	0.0	
			500	0	0.0	0	0.0	
			5,000	100	1.8	20	0.4	
5,000	10,000	5	0	0	0.0	0	0.0	
			5	0	0.0	0	0.0	
			50	40	0.4	0	0.0	
			500	100	3.2	100	3.2	
			5,000	100	5.2	100	4.8	
0	10,000	5	0	0	0.0	0	0.0	
			5	0	0.0	0	0.0	
			50	0	0.0	0	0.0	
			500	100	3.2	80	2.2	
			5,000	100	5.0	100	4.8	

¹⁾ Intradermal injection

²⁾ Sensitization rate (%) = positive number of animals / total number of animals × 100

³⁾ Mean response = summation of numerical scoring / total number of animals

2) 皮膚感作性試験

投与量は第1次および第2次感作濃度を同一濃度として、0.05～5,000 ppmの間に6用量を設定した。MBTCには皮膚刺激性があるので第2次感作に当たって10% sodium lauryl sulfate (SLS) ワセリン軟膏処置は省略した。その他、この試験に用いた投与量、惹起濃度および使用動物数をTable 2に示した。また、溶媒を投与する非感作群を前報 [8] に準じて設けた。

MBTCの調製方法、感作暴露方法および惹起暴露方法は前報 [8] に従って実施した。皮膚反応は紅斑および浮腫形成の程度を佐藤ら [14] の評価基準に従って判定を行い、陽性反応率 (Sensitization Rate: SR) および平均評価点 (Mean Response: MR) を算出した。MRおよびSRは次式によって算出した。

$$SR = \text{陽性動物数} / \text{全動物数}$$

$$MR = \text{評価の合計点} / \text{全動物数}$$

なお、50、500および5,000 ppm感作群の中には塗布部位の皮膚が白色化し、さらにその部位に硬化が観察されるものがあった。これらの皮膚の紅斑形成評価点は4点とした。

惹起1～2週間後にMBTCと類似した構造を有するBTC (25,000 ppm)、CTC (10,000 ppm)、CMTC (500 ppm)、

TCMTB (50 ppm)、MITC (10,000 ppm) およびMDC (10,000 ppm) を惹起暴露して交差反応性を検討した。いずれの化学物質も皮膚刺激性の認められない濃度を用いた。交差反応性試験に用いた群は50 ppm 感作群 (10例)、500 ppm 感作群 (5例) および対照群 (5例) とした。

III. 実験結果

1. 皮膚感作性の有無および第2次感作処置の効果

MBTCについて皮膚感作性の有無、非感作濃度の推定および第2次感作処置の皮膚感作性に及ぼす効果を検討した結果をTable 1に示した。

高用量群 (第1次感作濃度5,000 ppm、第2次感作濃度10,000 ppm) の惹起濃度50および500 ppm、および閉塞貼付群 (第1次感作濃度0 ppm、第2次感作濃度10,000 ppm) の惹起濃度500 ppmに陽性反応が観察された。しかし低用量群 (第1次および第2次感作濃度は共に0.5 ppm) では500 ppm以下の惹起濃度では陽性反応は認められなかった。一方、惹起濃度5,000 ppmでは対照群を含む全ての群で全例に紅斑が認められ、この濃度がFCA処置動物に対して皮膚刺激性濃度であることが明らかになったので評価の対象から外した。

MBTCは閉塞貼付群でも感作が成立したことから、用量反応性の検討に際しては、第1次および第2次感作濃度を同一濃度として変化させた。

2. MBTC感作群の皮膚反応性

MBTCの皮膚感作性試験における用量反応性の結果をTable 2に示した。

対照群では惹起濃度1,600 ppmにおける48時間後の観察で2例に紅斑が認められ、皮膚刺激性濃度であることが明らかとなったので、この濃度を皮膚感作性の評価の対象から外した。500 ppm以下の惹起濃度では皮膚刺激性は認められなかった。

MBTC感作群で、皮膚刺激性のない500 ppm以下の惹起濃度で紅斑等の皮膚反応が認められたのは、感作濃

Table 2 Skin sensitization test of MBTC 48 and 72 h after the challenge dose.

Induction		N	Challenge	48 h		72 h	
id injection ¹⁾ ppm	topical ppm		topical ppm	SR ²⁾	MR ³⁾	SR	MR
0	0	5	0	0	0.0	0	0.0
			16	0	0.0	0	0.0
			50	0	0.0	0	0.0
			160	0	0.0	0	0.0
			500	0	0.0	0	0.0
			1,600	40	0.4	0	0.0
0.05	0.05	10	0	0	0.0	0	0.0
			16	0	0.0	0	0.0
			50	0	0.0	0	0.0
			160	0	0.0	0	0.0
			500	0	0.0	0	0.0
			1,600	20	0.2	0	0.0
0.5	0.5	10	0	0	0.0	0	0.0
			16	0	0.0	0	0.0
			50	0	0.0	0	0.0
			160	0	0.0	0	0.0
			500	0	0.0	0	0.0
			1,600	10	0.1	0	0.0
5	5	10	0	0	0.0	0	0.0
			16	0	0.0	0	0.0
			50	0	0.0	0	0.0
			160	20	0.2	20	0.2
			500	60	1.4	60	1.1
			1,600	80	3.2	80	2.9
50	50	10	0	0	0.0	0	0.0
			16	0	0.0	0	0.0
			50	40	0.4	40	0.4
			160	100	3.2	100	2.7
			500	100	4.8	100	5.1
			1,600	100	5.9	100	5.8
500	500	5	0	0	0.0	0	0.0
			16	0	0.0	0	0.0
			50	20	0.2	20	0.2
			160	100	2.2	100	1.4
			500	100	5.0	100	4.6
			1,600	100	5.6	100	5.6
5,000	5,000	5	0	0	0.0	0	0.0
			16	0	0.0	0	0.0
			50	0	0.0	0	0.0
			160	80	1.2	80	0.8
			500	100	4.0	100	3.2
			1,600	100	5.4	100	5.0

¹⁾ Intradermal injection

²⁾ Sensitization rate (%) = positive number of animals / total number of animals × 100

³⁾ Mean response = summation of numerical scoring / total number of animals

度5~5,000 ppmの各群であった。5および5,000 ppm感作群は160 ppm以上の惹起濃度で、50および500 ppm感作群は50 ppm以上の惹起濃度で陽性反応が認められた。5,000 ppm感作群の皮膚反応は、平均評価点 (MR) では50あるいは500 ppm感作群よりも低かった。50および500 ppm感作群の皮膚反応はほとんど同程度であった。

惹起濃度に関しては、陽性反応率 (SR) では5 ppm感作群を除いてすぐに100%となりきれいな用量反応性は認められなかったが、MRではいずれの感作群もきれいな用量反応性が認められた。最も強く感作された500 ppm感作群の各惹起濃度と皮膚反応の関係をFig. 3に示した。惹起濃度50から500 ppmの間で惹起濃度の対数値とMRの間に良好な直線関係が見られた。ここで得られた直線とx軸との交点、すなわち惹起の閾値は48.6 ppmと算出された。

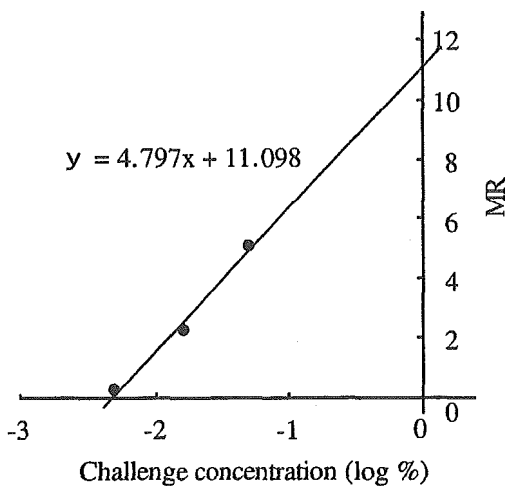


Fig. 3 Relationship between challenge concentration and skin reaction score for a group of animals sensitized with 500 ppm MBTC.
MR: mean response

以上のようにMBTCは感作誘導濃度および惹起濃度の双方に関して用量反応性が認められた。なお、50、500および5,000 ppm感作群では塗布後48ないし72時間後に塗布部位に皮膚の白色化と硬化が観察される動物が散見された。

以上の結果、MBTCの最低感作濃度は5 ppm、最低惹起濃度は50 ppmであった。

なお、MBTCを処置したいずれの動物にも観察終了時まで、一般状態に特記すべき異常は認められなかった。

3. MBTCの交差反応性

惹起の1~2週間後にBTC (25,000 ppm)、CTC (10,000 ppm)、CMTC (500 ppm)、TCMTB (50 ppm)、MITC (10,000 ppm) およびMDC (10,000 ppm) アセトン溶液を対照群、50および500 ppm MBTC感作群の背部に開放塗布してこれらの化合物の交差反応性を検討した結果をTable 3に示した。

BTC、CMTCおよびTCMTBの48および72時間後の観察で陽性反応が認められ、これらが交差反応性を有することが明らかとなったが、CTC、MITCおよびMDCには交差反応性は認められなかった。

IV. 考 察

水冷却系や製紙工場で藻類、カビ、バクテリア等の繁殖防止のための殺菌剤として使用されているMBTCの皮膚感作性試験を、モルモットを用いたmaximization法 [5] のNakamuraらによる改良法 [7] に従って実施した。

MBTCがGPMTにおいて陽性反応を示すことはすでにAndersenとHamann [6] によって報告されているので、本実験では感作誘導および惹起反応の双方に関する用量反応性および類似化合物との交差反応性を検討した。

MBTCは皮内投与による第1次感作を行わず、第2次感作の10,000 ppmワセリン軟膏閉塞貼付処置のみで明らかに感作が成立するという特性を示した (Table 1)。このような特性を示す化学物質では投与量の設定に当たって、第2次感作濃度を動物に適用可能な最高濃度で固定し、第1次感作濃度のみを変化させる従来の方法を採用することは出来ない。そこで用量反応性の検討に際しては、第1次および第2次感作濃度を同一濃度として変化させた。

MBTCの皮膚感作性には感作誘導濃度および惹起濃度の双方に関して用量反応性が認められた。感作誘導濃度に関しては、最高無感作濃度は0.5 ppmであり、50および500 ppm感作群では100%の動物に陽性反応が認められ、最も強く感作が成立した。しかし今回採用した最高感作誘導濃度である5,000 ppm感作群はSRは100%であったが、MRは50および500 ppm感作群よりもむしろ低下した。このことは高濃度のMBTC皮内投与により免疫系への毒作用が発現したためと考えられた。今回の試験で最高に感作された50および500 ppm感作群で求められたMBTCの最低惹起濃度は50 ppmであった。

AndersenとHamann [6] は、MBTCを10%含有する抗

Table 3 Cross-reactivity to thiocyanate, isothiocyanate and dicyanide compounds.

Induction		N	Challenge		48 h		72 h	
id injection ¹⁾ ppm	topical ppm		topical ppm	SR ²⁾	MR ³⁾	SR	MR	
0	0	5	25,000 BTC ⁴⁾	0	0.0	0	0.0	
			10,000 CTC ⁵⁾	0	0.0	0	0.0	
			500 CMTC ⁶⁾	0	0.0	0	0.0	
			50 TCMTB ⁷⁾	0	0.0	0	0.0	
			10,000 MITC ⁸⁾	0	0.0	0	0.0	
			10,000 MDC ⁹⁾	0	0.0	0	0.0	
50	50	10	25,000 BTC	70	1.8	60	1.1	
			10,000 CTC	0	0.0	0	0.0	
			500 CMTC	100	3.9	100	3.9	
			50 TCMTB	100	4.9	100	4.8	
			10,000 MITC	0	0.0	0	0.0	
			10,000 MDC	0	0.0	0	0.0	
500	500	5	25,000 BTC	80	1.8	80	1.8	
			10,000 CTC	0	0.0	0	0.0	
			500 CMTC	100	4.2	100	4.0	
			50 TCMTB	100	4.6	100	4.6	
			10,000 MITC	0	0.0	0	0.0	
			10,000 MDC	0	0.0	0	0.0	

MBTC-sensitized animals (50 or 500 ppm MBTC) and controls were rechallenged with BTC, CTC, CMTC, TCMTB, MITC or MDC 1 or 2 weeks after the challenge procedure.

¹⁾ Intradermal injection

²⁾ Sensitization rate (%) = positive number of animals / total number of animals × 100

³⁾ Mean response = summation of numerical scoring / total number of animals

⁴⁾ Benzyl thiocyanate

⁵⁾ Calcium thiocyanate tetrahydrate

⁶⁾ Chloromethyl thiocyanate

⁷⁾ 2-(Thiocyanomethylthio)benzothiazole

⁸⁾ Methyl isothiocyanate

⁹⁾ Methylene dicyanide

菌剤Cytox 3522を用いてGPMTを実施し、皮内投与5% (MBTCとして5,000 ppm)、閉塞貼付10% (MBTCとして10,000 ppm) で動物を感作すると、惹起濃度0.1% (MBTCとして100 ppm) 以上で陽性反応が認められたと報告している。今回我々は皮内投与および閉塞貼付濃度として共に5 ppm MBTCで感作処置をすることによって感作が成立することを確認し、MBTCが強い感作誘導能を有することを明らかにした。

Fig. 3に示す惹起に関する用量反応直線のx軸との交点からx=0 (惹起濃度10,000 ppm) までの直線下面積を我々は感作性物質の相対的惹起力価の一つの指標として用いることを提案している [9]。MBTCではこの値は12.8と計算された。我々が現在まで実施した感作性試験で感作性陽性と判定した20種の化学物質中、MBTCの最低感作濃度 (5 ppm) はN-(cyclohexylthio)phthalimide (最低感作濃度: 0.01 ppm以下) [10] および2,4,5,6-tetrachloroisophthalonitrile (最低感作濃度: 0.5 ppm) [11]

に続いて3番目に低く、相対的惹起力価に関しては、6番目に大きなものであった。今回の試験の結果、MBTCは感作誘導能および惹起能ともに比較的強い化学物質であることが明らかとなった。

50および500 ppm MBTC感作群および対照群を用いてthiocyano基を有する4種の化合物 (BTC、CTC、CMTC、TCMTB)、isothiocyano基を有する1種の化合物 (MITC) およびcyano基を有する1種の化合物 (MDC) との間の交差反応性を検討した。その結果、MBTCはBTC、CMTCおよびTCMTBとの間に交差反応性が認められ、CTC、MITC、MDCとの間には交差反応性は認められなかった。以上からMBTCとの交差反応性にはFig. 2の破線で囲まれたthiocyanomethyl基が関与している可能性が考えられた。なお、BTCおよびCMTCの皮膚感作性に関する知見はないが、TCMTBの皮膚感作性については、我々はTCMTBが強い皮膚感作性を有することを報告した [12]。また、今回交差感作性が認められなかったCTC、MITC、

MDCの皮膚感作性に関しては、MITCは皮膚感作性を有することが報告されている [13] が、CTCおよびMDCについては皮膚感作性に関する知見はない。

MBTCのヒトへの皮膚感作性についてはいくつかの報告がある。デンマークで1606人の皮膚炎患者に0.2% Cytox 3522ワセリン軟膏 (200 ppm MBTCに相当する) を塗布したところ5例に皮膚の紅斑が見られたが、この紅斑がMBTCによるアレルギーであるとは確認できなかった [2]。MBTCに常時暴露している34名の従業員にMBTCのパッチテストを実施しても明確なアレルギー反応は得られなかった [4]。また、紡績関係に従事している皮膚炎患者および対照群にMBTCをパッチしても、皮膚反応は両群とも同程度であった [3]。すなわち、MBTCは皮膚刺激性および腐食性を有することから、パッチテストにおける刺激性と感作性の区別が難しいことがその原因の一つかもしれないが、Jäppinenと

Eskelinen [4] は、MBTCは動物に対しては強い皮膚感作性を有するが、ヒトに対する皮膚感作性は弱い可能性があると考えしている。MBTCの皮膚感作性に種差が存在するか否かについては今後の検討課題である。

V. まとめ

抗菌剤のmethylene-bis(thiocyanate)についてモルモット maximization法による皮膚感作性試験を実施した。MBTCは第1および2次感作濃度がともに5 ppm以上の濃度で感作が成立した。また、第2次感作誘導処置 (10,000 ppm閉塞貼付処置) のみでも感作が成立した。最低感作誘導濃度は5 ppm、最低惹起濃度は50 ppm、相対的惹起力値は12.8であった。交差反応性試験の結果、MBTC感作動物はthiocyanomethyl基を有するbenzyl thiocyanate、chloromethyl thiocyanateおよび2-(thiocyanomethylthio)benzothiazoleに反応性を示した。

参 考 文 献

- 1) BIBRA working group. Methylene bis(thiocyanate). Toxicology profile, BIBRA Toxicology International. (1996) [cited in TOXLINE Data base]
- 2) Andersen KE, Veien NK. Biocide patch tests. *Cont Dermat* 1985; 12: 99-103.
- 3) Burrows D, Campbell HS. Contact dermatitis to polyester spin finishes. *Cont Dermat* 1980; 6: 362-363.
- 4) Jäppinen P, Eskelinen A. Patch tests with methylene-bis-thiocyanate in paper mill workers. *Cont Dermat* 1987; 16: 233.
- 5) Magnusson B, Kligman AM. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J Invest Dermat* 1969; 52: 268-276.
- 6) Andersen KE, Hamann K. Is Cytox 3522 (10% methylene-bis-thiocyanate) a human skin sensitizer? *Cont Dermat* 1983; 9: 186-189.
- 7) Nakamura A, Momma J, Sekiguchi H, Noda T, Yamano T, Kaniwa M, et al. A new protocol and criteria for quantitative determination of sensitization potencies of chemicals by guinea pig maximization test. *Cont Dermat* 1994; 31: 72-85.
- 8) 野田 勉, 山野哲夫, 清水 充. 抗菌剤ヒバ油の安全性試験 1. 皮膚感作性試験. *生活衛生* 2000; 44: 13-19.
- 9) Yamano T, Shimizu M, Noda T. Relative elicitation potencies of seven chemical allergens in the guinea pig maximization test. *J Health Sci* 2001; 47: 123-128.
- 10) 野田 勉, 山野哲夫, 清水 充. 家庭用品に使用される化学物質の皮膚感作性試験 (Ⅶ) - N-(cyclohexylthio)phthalimide (CTP), diethylene glycol mono-n-butyl ether acetate (DEGBEA), di-n-butyl sebacate (DBS) のモルモットにおける皮膚感作性 - . *生活衛生* 2004; 48: 77-86.
- 11) 野田 勉, 山野哲夫, 清水 充. 家庭用品に使用される抗菌剤2,4,5,6-tetrachloroisophthalonitrileの皮膚感作性. *日本薬学会第123年会講演要旨集* 2003; 28[P2] I-424.
- 12) Yamano T, Shimizu M, Noda T. Allergenicity evaluation of N-(1-ethylheptyl)-N'-phenyl-p-phenylenediamine and 2-(thiocyanomethylthio)benzothiazole by the guinea pig maximization test. *J Health Sci* 2001; 47: 331-338.
- 13) Richter G. Allergic contact dermatitis from methylisothiocyanate in soil disinfectants. *Cont Dermat* 1980; 6: 183-186.
- 14) 佐藤悦久, 野村芳雄, 市川秀之, 小林敏明, 中島啓介. モルモットによる光感作性試験法 (Adjuvant-strip法). *西日皮膚* 1980; 42: 831-837.

(2004年6月28日受付・2004年7月28日受理)

Allergenicity evaluation of Bioban CS-1135 in experimental animals

TETSUO YAMANO, MITSURU SHIMIZU AND TSUTOMU NODA

Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences, 8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan

An industrial preservative, Bioban CS-1135, was evaluated for its contact allergenicity by means of multiple-dose guinea-pig maximization test and non-radioactive murine local lymph node assay. In the guinea-pig test, an induction dose of 0.5% Bioban CS-1135 sensitized all animals of the group. The dose-response study of the elicitation phase determined a minimum elicitation dose of 5% for positive skin reactions. In the murine assay, Bioban CS-1135 at doses of 10% and more exerted significant effects on lymphoid cell proliferation. Although the data clearly designated Bioban CS-1135 as a skin sensitizer, its relative potency was ranked lowest among skin-sensitizing biocides previously evaluated in this laboratory.

Key words: 5-bromo-2'-deoxyuridine; allergic contact dermatitis; biocides; guinea-pig maximization test; murine local lymph node assay; risk assessment. © Blackwell Munksgaard, 2004.

Accepted for publication 6 April 2004

Bioban CS-1135 is a broad-spectrum bactericide based on oxazolidine (4,4-dimethyloxazolidine) chemistry. It has been widely used as a preservative in products and applications such as metal-working fluids, oilfield water systems and mineral slurries. Most biocides exert their toxic effects on microorganisms through reactivity with proteins, and this, in turn, suggests a higher risk of biocides as skin sensitizers, because a low molecular weight chemical has to bind with endogenous proteins/peptides to be recognized as an immunogen. In fact, numerous cases of allergic contact dermatitis from various kinds of biocides have been reported (1, 2). Among them, positive skin reactions to a series of Biobans are not rare, especially in metalworkers, with 3.4% of 408 workers being positive to some kinds of Biobans (3). However, the skin reactions are often weak and not reproducible. Furthermore, in many cases, the clinical relevance of skin reactions with the use of Biobans is not ascertained. These data suggest that, although Biobans have intrinsic potencies for skin sensitization, the potencies are relatively weak compared with other biocides. Thus, in this study, we decided to evaluate the sensitization potency of Bioban CS-1135 using 2 different animal tests: multiple-dose guinea-pig

maximization test (GPMT) and non-radioactive local lymph node assay (LLNA).

Materials and Methods

Chemicals

Bioban CS-1135 (active ingredient: 78% 4,4-dimethyl-1,3-oxazolidine) was obtained from Nagase & Co., Ltd. (Tokyo, Japan). All other reagents used were of superior grade.

Guinea-pig maximization test

5- to 6-week-old female Hartley guinea pigs from Japan SLC, Inc. (Shizuoka, Japan) were used. The GPMT (4) was performed with some modifications in that dose-response profiles were evaluated for both induction and elicitation phases, and challenge test was done openly (5). 5 or 10 animals were used for each sensitization group. The concentrations for the first (intradermal) and the second (topical) inductions are summarized in Tables 1 and 2. 2 weeks after topical induction, 0.1 ml aliquots of various concentrations of Bioban CS-1135 in acetone or an undiluted solution were applied all at once to a shaved area of the flank for challenge. 48 h after the

Table 1. Results of first guinea-pig maximization test for Bioban CS-1135

Induction (%)		Elicitation (%)*	SR (%)	n
Intradermal	Topical			
0	0	100	0	5
0	10	100	60	5
0.5	10	100	100	5

SR = sensitization rate.

*Animals were challenged 2 weeks after 2nd induction with 100% Bioban CS-1135, and skin reactions were evaluated 48 h thereafter.

challenge, each site was scored for erythema (0–4) and oedema (0–3) according to the criteria of Sato et al. (6). For each challenge concentration group, the percentage of animals showing a positive reaction was taken as the sensitization rate.

Non-radioactive murine LLNA

6- to 8-week-old female BALB/c mice from CLEA Japan, Inc. (Tokyo, Japan) were used. The assay was performed according to the method of Takeyoshi et al. (7) with some modifications (8). Briefly, groups of mice ($n=4$) were exposed to 25 μ l of various concentrations of Bioban CS-1135 in vehicle (acetone/olive oil, 4:1) or as an undiluted solution, through application to the dorsum of both ears on 3 consecutive days (days 0–2). On day 4, 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, 150 mg/kg/15 ml saline) was administered intraperitoneally to each mouse. The next day, a pair of auricular lymph nodes from each mouse was excised, and single-cell suspensions were prepared by gentle mechanical disaggregation in saline. The total cell count in each suspension was measured, and the suspensions were then diluted with saline to a concentration of 4×10^5 cells/ml and dispensed (50 μ l) into the wells of a flat-bottom microplate. BrdU concentrations in the wells were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Total lymph node cell

count in a chemical-treated animal divided by mean lymph node cell count in control group was designated as a cellularity index, whereas BrdU incorporation (OD) per well of cells from a chemical-treated animal divided by mean BrdU incorporation (OD) per well of cells from a control group was used as a BrdU incorporation index. A stimulation index (SI) was calculated by multiplying the cellularity index by the BrdU incorporation index.

Statistical analysis

In the LLNA, index values for each chemical-treated group and vehicle-treated control group were compared via Dunnett's or Steel's multiple comparison method using a StatLight software package (Yukms Co., Ltd, Tokyo, Japan).

Results

GPMT results for Bioban CS-1135 are summarized in Tables 1 and 2. An intradermal induction concentration of 0.5% and a topical induction dose of 10% were selected as the maximum tolerable doses for each step of the GPMT. All of 5 guinea pigs sensitized with maximum induction doses exhibited positive skin reactions when challenged with 100% Bioban CS-1135. Notably, Bioban CS-1135 could sensitize animals by the

Table 2. Results of second guinea-pig maximization test for Bioban CS-1135

Challenge dose (%)	Induction dose*			
	SR (%)†			
	0%‡	0.005%	0.05%	0.5%
0.05	0	0	0	0
0.5	0	0	0	0
5	0	0	0	70
25	0	0	0	100
50	0	0	0	100
100	0	0	0	100

SR = sensitization rate. Number of animals was 5 for 0% induction-dose group and 10 for the other 3 induction-dose groups.

*Each group of animals was sensitized using the same dose of Bioban CS-1135 for both intradermal and topical induction procedures.

†Skin reactions were evaluated 48 h after challenge.

‡Animals were treated with vehicle in both intradermal and topical induction procedures.

topical induction procedure alone, although the sensitization rate of the group was lower than that of the maximally sensitized group (Table 1). Because the topical induction procedure alone sensitized the animals, in the subsequent dose-response study, the topical induction concentrations were varied in line with intradermal induction concentrations. As summarized in Table 2, positive skin reactions were observed only at the highest induction dose of 0.5%. The minimum challenge dose of Bioban CS-1135 that elicited positive skin reaction in this group was 5%.

A dose-response profile for the allergenicity of Bioban CS-1135 in the induction phase was further evaluated by another animal test, the non-radioactive LLNA (Table 3). Statistically significant increases in the cellularity index, the BrdU index and SI, which is obtained by multiplying the cellularity and BrdU indices, were observed at doses of 10% and more of Bioban CS-1135.

We have thus far evaluated dose-response profiles for both induction and elicitation phases of allergic contact dermatitis with 20 different biocides using multiple-dose GPMT, and 15 of them have been designated as positive skin sensitizers. As summarized in Table 4, both the minimum induction dose and minimum elicitation dose of Bioban CS-1135 in the guinea-pig test ranked last place among the designated sensitizers.

Discussion

This study clearly designated Bioban CS-1135 as a contact sensitizer using 2 representative animal tests, GPMT and LLNA. Recently, Brinkmeier et al. (3) reported the patch test results on exposure to a series of Biobans among metalworkers, a high-risk group for this group of preservatives. The test showed that 3.4% out of 408 workers

reacted to at least 1 of the Biobans (2.2% P-1487, 2.0% CS-1246 and 1.5% CS-1135). Previous multicentre patch test data provided by the Information Network of Departments of Dermatology in Germany and Austria (2) showed a 1.1% positive reaction rate to Bioban CS-1135 in 1760 patients. In both reports, skin reaction was weak and most reactions were not reproducible during retesting.

In order to improve occupational hygiene and protect consumers from the risk of skin sensitization, it is essential to elucidate the relative sensitizing potencies of individual sensitizers. There have been several animal studies evaluating dose-response profiles of skin-sensitizing biocides (9-11). In our database of biocide-sensitizing potencies evaluated using multiple-dose GPMT, Bioban CS-1135 ranked last place in the list, especially for the minimum elicitation dose. Although the minimum induction dose of 0.5% Bioban CS-1135 in the multiple-dose GPMT also ranked last, this dose was within the range of those for other biocides. The minimum induction dose of 10% Bioban CS-1135 in the mouse test also seemed in the range of those for other chemical allergens. In our recent studies using non-radioactive LLNA, the minimum induction doses for 2 preservatives, *p*-chloro-*m*-cresol (PCMC) and *p*-chloro-*m*-xylenol (PCMX), were 10% and 25%, respectively (8). The results may suggest that the potency of Bioban CS-1135 to induce specific T-cell proliferation is comparable to other biocides, but that its intrinsic potency to cause positive skin reaction is relatively weak. This is in line with the weak skin reactions observed in patch testing in clinical studies, because it is the elicitation reaction that is observed in the patch test.

In addition to evaluating relative potencies, cross-reactivity is another important factor in risk assessment for skin sensitizers. With respect

Table 3. Results of local lymph node assay for Bioban CS-1135

Induction dose (%)	Cellularity index	BrdU incorporation index	Stimulation index
0	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.0
1	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.3
3	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.4
10	1.7 ± 0.3*	1.5 ± 0.3†	2.7 ± 0.6*
25	3.0 ± 0.3†	1.8 ± 0.2†	5.4 ± 1.0*
50	2.4 ± 0.4†	1.8 ± 0.2†	4.4 ± 1.0*
100	2.7 ± 0.5†	1.8 ± 0.3†	4.8 ± 0.9*

Values are means ± SD.

Cellularity index = $\frac{\text{total lymph node cell count in a chemical - treated animal}}{\text{mean lymph node cell count in control group}}$

BrdU incorporation index = $\frac{\text{BrdU incorporation (OD) per well of cells from a chemical - treated animal}}{\text{mean BrdU incorporation (OD) per well of cells from control group}}$

Stimulation index = Cellularity index × BrdU incorporation index.

*Significantly different from control, $P < 0.05$.

†Significantly different from control, $P < 0.01$.

Table 4. Results of guinea-pig maximization test for various biocides

Chemicals	Abbreviation	Minimum induction dose (p.p.m.)*	SR (%)†	Minimum elicitation dose (p.p.m.)‡	Reference
2,4,5,6-tetrachloroisophthalonitrile	TPN	0.5	100	0.5	§ (12)
2-(thiocyanomethylthio)benzothiazole	TCMTBT	10	100	1	(13)
<i>p</i> -chlorophenyl-3-iodopropargylformyl	CPIP	5	100	50	§ (14)
2,3,5,6-tetrachloro-4-(methylsulphonyl)pyridine	TCMSP	50	100	50	(15)
1,2-benzisothiazolin-3-one	BIT	50	50	50	(16)
3-iodo-2-propynyl butylcarbamate	IPBC	5	100	100	(17)
<i>N,N'</i> -tetramethylene-bis(4-carbamoyl-1-decylpyridinium bromide)	TMBCDPPB	100	100	1000	(18)
<i>N,N'</i> -hexamethylene-bis(4-carbamoyl-1-decylpyridinium bromide)	HMBCDPPB	10	100	1000	(19)
<i>p</i> -chloro- <i>m</i> -cresol	PCMC	5	100	500	(20)
hiba oil	HO	5000	50	5000	(21)
2-chloroacetamide	CAA	500	100	1600	(22)
<i>p</i> -chloro- <i>m</i> -xylenol	PCMX	5	90	5000	(23)
<i>N</i> - <i>n</i> -butyl-1,2-benzisothiazolin-3-one	BBIT	5000	20	500	(24)
2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol	BNPD	5000	10	5000	(25)
4,4-dimethyl-1,3-oxazolidine	Bioban CS-1135	5000	100	50000	(26)

*Minimum first (intradermal) induction dose that sensitized at least one animal in the group.

†Sensitization rate observed in the maximally sensitized group in a dose-response study.

‡Minimum challenge dose that elicited allergic skin reaction at least one animal in the group.

§Noda et al. unpublished data.

to the 3 sensitizing Biobans, P-1487, CS-1135 and CS-1246, some patients reacted to 2 or 3 of them (3). Although both CS-1135 and CS-1246 have the structure to release a formaldehyde molecule, it is difficult to elucidate whether the cross-reaction was due to structural analogy or simply due to concomitant exposure to them. In this respect, the GPMT has an advantage in that it can precisely evaluate cross-reactivity among sensitizers under strictly controlled conditions. Further information including animal study data would appear to be necessary to assess the risk of a wide range of preservatives such as Biobans.

References

- Jacobs M C, White I R, Rycroft R J G, Taub N. Patch testing with preservatives at St John's from 1982 to 1993. *Contact Dermatitis* 1985; 33: 247-254.
- Schnuch A, Geier J, Uter W, Frosch P J. Patch testing with preservatives, antimicrobials and industrial biocides. Results from a multicentre study. *Br J Dermatol* 1998; 138: 467-476.
- Brinkmeier T, Geier J, Lepoittevin J P, Frosch P J. Patch test reactions to Biobans in metalworkers are often weak and not reproducible. *Contact Dermatitis* 2002; 47: 27-31.
- Magnusson B, Kligman A M. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J Invest Dermatol* 1969; 52: 268-276.
- Nakamura A, Momma J, Sekiguchi H. A new protocol and criteria for quantitative determination of sensitization potencies of chemicals by guinea pig maximization test. *Contact Dermatitis* 1994; 31: 72-85.
- Sato Y, Katsumura Y, Ichikawa H. A modified technique of guinea pig testing to identify delayed hypersensitivity allergens. *Contact Dermatitis* 1981; 7: 225-237.
- Takeyoshi M, Yamasaki K, Yakabe Y, Takatsuki M, Kimber I. Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation. *Toxicol Lett* 2001; 119: 203-208.
- Yamano T, Shimizu S, Noda T. Allergenicity evaluation of *p*-chloro-*m*-cresol and *p*-chloro-*m*-xylenol by non-radioactive murine local lymph-node assay and multiple-dose guinea pig maximization test. *Toxicology* 2003; 190: 259-266.
- Jayjock M A, Lewis P G. Low-applied-dose extrapolation of induction and elicitation of contact allergy in the evaluation and management of sensitization risk from Kathon CG isothiazolone in products. *Am J Contact Dermat* 1992; 3: 86-91.
- Andersen K E, Vølund A, Frankild S. The guinea pig maximization test with a multiple dose design. *Acta Derm Venerol* 1995; 75: 463-469.
- Basketter D A, Rodford R, Kimber I, Smith I, Wahlberg J E. Skin sensitization risk assessment: a comparative evaluation of 3 isothiazoline biocides. *Contact Dermatitis* 1999; 40: 150-154.
- Yamano T, Shimizu S, Noda T. Allergenicity evaluation of *N*-(1-methylheptyl)-*N'*-phenyl-*p*-phenylenediamine and 2-(thiocyanomethylthio) benzothiazole by the guinea pig maximization test. *J Health Sci* 2001; 47: 331-338.
- Shimizu M, Yamano T, Noda T. Allergenicity evaluation of chemicals for use in household products IV: contact allergenicity of three halide bactericides, 3-iodo-2-propynyl butylcarbamate (IPBC), *p*-chlorophenyl-3-iodopropagylformyl (CPIP) and 1-bromo-3-ethoxycarbonyloxy-1,2-diiodo-1-propene (BECDIP) in guinea pigs. *Seikatsu Eisei* 2000; 44: 129-138.
- Noda T, Yamano T, Shimizu S. Allergenicity evaluation of chemicals for use in household products III: contact allergenicity of 2,4,5,6-tetrachloroisophthalonitrile (TPN), 1,2-benzisothiazolin-3-one (BIT), 2-hydroxy-4-isopropyl-2,4,6-cycloheptatrien-1-one (HICHO) and 2,5-di-tert-amylhydroquinone (DAHQ) in guinea pigs. *Annu Rep Osaka City Inst Public Health Environ Sci* 1998; 60: 24-34.
- Shimizu M, Yamano T, Noda T. Allergenicity evaluation of biocides for use in household products V: contact allergenicity of 4,4'-(tetramethylenedicarbonyldiamino) bis(1-decylpyridinium bromide) and *N,N'*-hexamethylene bis(4-carbamoyl-1-decylpyridinium bromide) in guinea pigs. *Annu Rep Osaka City Inst Public Health Environ Sci* 2002; 64: 1-5.
- Noda T, Shimizu S. Toxicity study of hiba oil. 1. Contact allergenicity of hiba oil in guinea pigs. *Seikatsu Eisei* 2000; 44: 13-19.
- Noda T, Yamano T, Shimizu S. Allergenicity evaluation of chemicals for use in household products VI: contact antimicrobial agents 2-chloroacetamide, 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol and zinc bis(2-pyridylthio-1-oxide) in guinea pigs. *Seikatsu Eisei* 2004; 48: 396-406.
- Noda T, Yamano T, Shimizu S. Toxicity study of *N*-*n*-butyl-1,2-benzisothiazolin-3-one. 1. Contact allergenicity of *N*-*n*-butyl-1,2-benzisothiazolin-3-one in guinea pigs. *Seikatsu Eisei* 2001; 45: 137-142.

Address:

Tetsuo Yamano
Osaka City Institute of Public Health and Environmental
Sciences
8-34 Tojo-cho
Tennoji-ku
Osaka 543-0026
Japan
Tel: +81 6 6771 3186
Fax: +81 6 6772 0676
e-mail: tetsuo.yamano@iphes.city.osaka.jp



Quantitative comparison of the results obtained by the multiple-dose guinea pig maximization test and the non-radioactive murine local lymph-node assay for various biocides

Tetsuo Yamano*, Mitsuru Shimizu, Tsutomu Noda

Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences, 8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan

Received 15 December 2004; accepted 19 February 2005

Available online 1 April 2005

Abstract

We compared the results of the multiple-dose guinea pig maximization test (GPMT) and the non-radioactive murine local lymph-node assay (LLNA) for various biocides. Thirteen out of 17 positive biocides in the GPMT gave positive results in the LLNA. In the GPMT, the minimum first induction doses ranged over four orders (0.00005–0.5%), while elicitation-threshold doses, which were evaluated using an optimally sensitized group of animals in the multiple-dose studies, ranged over five orders (0.00006–2.8%). In the LLNA, minimum induction doses ranged over more than three orders (0.01–30%). With respect to 13 biocides that were positive in both the GPMT and the LLNA, results were quantitatively compared. When compared after conversion to corresponding area doses ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), the minimum doses required to elicit skin reaction in guinea pigs were always lower than that for induction in mice with all biocides. Correlation between minimum induction doses from the GPMT and the LLNA seemed poor ($r=0.57$), while that between minimum induction doses in the LLNA and elicitation-threshold doses in the GPMT was relatively good ($r=0.73$). The results suggest the possibility to estimate human elicitation-threshold doses, which are definitely lacking in the process of risk assessment for skin-sensitizers, from the data of the LLNA.

© 2005 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Contact dermatitis; Murine local lymph-node assay; Guinea pig maximization test; 5-Bromo-2'-deoxyuridine; Risk assessment; Elicitation threshold; Minimum induction dose

1. Introduction

Allergic contact dermatitis consists of two phases, induction and elicitation, and the existence of

threshold values for both phases has been reported (Basketter et al., 1997; Kimber et al., 1999). Risk for skin-sensitization, thus, should be managed based on threshold doses and dose–response profiles for both phases. The murine local lymph-node assay (LLNA), an internationally accepted stand-alone method for detection of contact allergens, quantitatively evaluates induction potencies. Recent analytical studies have

* Corresponding author. Tel.: +81 6 6771 3186;

fax: +81 6 6772 0676.

E-mail address: tetsuo.yamano@iphes.city.osaka.jp
(T. Yamano).

reported a close relationship between minimum induction doses from the LLNA and experimental human induction threshold values, and the use of LLNA data has been recommended for categorizing potencies of skin-sensitizers (Griem et al., 2003; Kimber et al., 2003; Schneider and Akkan, 2004). The LLNA, however, has several disadvantages such that by its nature, it can only be used to evaluate the induction phase. Although the original guinea pig maximization test (GPMT) was proposed by Magnusson and Kligman (1969) as a method to identify skin-sensitizers, profiles of both phases can be examined by varying induction and elicitation doses using a modified protocol of the GPMT (Nakamura et al., 1994). Our laboratory has reported threshold values of both phases with various allergens using this method (Yamano et al., 2001a, 2003, 2004). However, relationships between data from the GPMT to those of the LLNA or human experiments have not been evaluated thus far.

Numerous cases of allergic contact dermatitis due to various kinds of biocides have been reported (Jacobs et al., 1995; Schnuch et al., 1998). This is because most biocides exert their toxic effects on microorganisms through reactivity with proteins, which is a critical factor in determining skin-sensitizers. Thus, it seems appropriate to compare the results from different methods to evaluate skin-sensitizing potencies using biocides as a model group of test compounds. In this study, we eval-

uated dose–response profiles of induction phases for 17 biocides using the non-radioactive LLNA (Yamano et al., 2003). The data were compared with those previously obtained from the multiple-dose GPMT to reveal quantitative relationships between these two standard animal tests for skin-sensitizers.

2. Methods

2.1. Chemicals

The names, abbreviations and the octanol–water partition coefficients ($\log K_{o/w}$) of the 17 biocides employed are listed in Table 1. All other reagents used for the GPMT or the LLNA were of superior grade.

2.2. Multiple-dose GPMT

Five- to six-week-old female Hartley guinea pigs from Japan SLC Inc. (Shizuoka, Japan) were used. The GPMT was performed as described previously (Nakamura et al., 1994); 5 or 10 animals were used for each sensitization group. In a pilot study, each biocide was evaluated to see if it could sensitize animals by the topical, occluded step alone using a tolerable maximum dose, without the first intradermal induction step. When at least one animal in the group exhibited skin re-

Table 1
List of biocides tested

Chemical name	Abbreviation	$\log K_{o/w}$
2,4,5,6-Tetrachloroisophthalonitrile	TPN	3.05
Methylene-bis(thiocyanate)	MBTC	0.62
3-Iodo-2-propynyl butylcarbamate	IPBC	2.45
2,3,5,6-Tetrachloro-4-(methylsulfonyl)pyridine	TCMSP	1.95
<i>p</i> -Chlorophenyl-3-iodopropargylformyl	CPIP	3.48
<i>p</i> -Chloro- <i>m</i> -cresol	PCMC	2.70
<i>p</i> -Chloro- <i>m</i> -xlenol	PCMX	3.25
2-(Thiocyanomethylthio)benzothiazole	TCMTBT	3.30
<i>N,N'</i> -Hexamethylene-bis(4-carbamoyl-1-decylpyridinium bromide)	HMBCDPB	nd
1,2-Benzisothiazolin-3-one	BIT	0.64
1-Bromo-3-ethoxycarbonyloxy-1,2-diiodo-1-propene	BECDIP	nd
<i>N-n</i> -Butyl-1,2-benzisothiazolin-3-one	BBIT	nd
<i>N,N'</i> -Tetramethylene-bis(4-carbamoyl-1-decylpyridinium bromide)	TMBCDPB	nd
2-Chloroacetamide	CAA	−0.58
2-Bromo-2-nitropropane-1,3-diol	BNPD	−0.64
4,4'-Dimethyl-1,3-oxazoline	DMO	−0.08
Hiba oil	HO	nd

nd, no data available.

action using this procedure, then the induction profiles were evaluated by varying the intradermal induction doses in line with those for topical induction (Yamano et al., 2001b). Otherwise, the induction profiles were evaluated by varying the intradermal induction doses with fixed second induction doses at tolerable maximum levels. Maximum doses for the first induction were set at 5% or the highest non-necrotic dose, and three to four doses in logarithmic dilutions were used in a dose–response study.

Two weeks after the second (topical, occluded) induction, 100 μ l aliquots of various concentrations of test chemicals in acetone were applied all at once for challenge on shaved circular areas (1.4 cm in diameter) of the flank. Forty-eight hours after the challenge, each site was scored for erythema (0–4) and edema (0–3) according to the criteria of Sato et al. (1981). Total group scores (erythema plus edema) with the same challenge concentration in a group were summed and divided by the number of animals in the group to give the mean response (MR) value as an index of skin reaction to challenge with a given concentration of test chemical. For each elicitation-dose group, the percentage of animals showing a positive reaction was taken as the sensitization rate (SR). In some cases, MR values were plotted against log elicitation doses and a linear regression calculated. The area under the linear regression line (AUL) between the x -intercept, and 1% of elicitation dose was defined as the relative elicitation potency index value of the allergen (elicitation AUL) (Yamano et al., 2001a).

2.3. Non-radioactive murine LLNA

Six- to eight-week-old female BALB/c mice from CLEA Japan (Tokyo, Japan) were used. The LLNA was performed as previously reported (Takeyoshi et al., 2001; Yamano et al., 2003). Four animals were used for each sensitization group. Skin irritation was judged from apparent ear erythema and swelling. Total lymph-node cell count in a chemical-treated animal divided by mean lymph-node cell count in control group was designated as a cellularity index, whereas 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation (expressed as optical density) per well of cells from a chemical-treated animal divided by mean BrdU incorporation per well of cells from a control group was used as a BrdU incorporation index. A stimulation index (SI) was calculated

by multiplying the cellularity index by the BrdU incorporation index.

2.4. Statistical analysis

In the LLNA, index values for each chemical-treated group and vehicle-treated control group were compared via Dunnett's or Steel's multiple comparison method using a StatLight software package (Yukms Co., Ltd., Tokyo, Japan).

3. Results

3.1. Dose–response analysis of induction phase with GPMT

Table 2 summarizes the results of 17 positive biocides in the GPMT. In the multiple-dose GPMT, a chemical was designated positive, when at least one animal in the sensitized groups exhibited skin reaction with maximum non-irritative elicitation doses. Of the 17 biocides, 8 were found to sensitize guinea pigs using the second (topical) induction step alone, whereas the others required the first (intradermal) induction procedure. In both cases, dose–response profiles of the induction phase were evaluated against the first induction dose. The minimum induction doses ranged over four orders, 0.5–5000 ppm. Dose–response profiles for the induction phase in the GPMT were categorized into three patterns: (1) saturation of sensitization rate was observed within the induction dose range used; (2) overload effect of skin reaction was observed within the induction dose range used; (3) positive skin reaction was observed only at the highest dose used. Typical examples of each pattern are shown in Fig. 1.

The influence of the first induction dose on the elicitation-dose-related skin reaction in the GPMT is shown in Fig. 2 using HMBCDPB as an example. In 0.001 and 0.01% HMBCDPB-sensitized groups, the minimum elicitation dose was 1%, while one order lower HMPCDPB-elicited skin reaction in 0.1 and 1% HMBCDPB-sensitized groups. At an elicitation dose of 1%, positive skin reaction rates in each group were 30, 70, 100 and 60% in 0.001, 0.01, 0.1 and 1% HMPCDPB-sensitized groups, respectively. The result suggests the importance of using a maximally sensitized group of animals in the multiple-dose GPMT

Table 2
Results of GPMT for 17 biocides

Biocide	Intradermal and topical induction ^a	Topical induction only ^b	Minimum induction dose ^c (ppm)	Maximum induction dose ^d (ppm)	SR ^e (%)	Elicitation-threshold dose ^f (ppm)	Elicitation-threshold area dose ^g (μg/cm) ²	References
TPN	Positive	Positive	0.5	50	100	0.6	0.04	Unpublished data
MBTC	Positive	Positive	5	500	100	49	3.2	Noda et al. (2004b)
IPBC	Positive	Negative	5	500	100	88	5.7	Shimizu et al. (2000)
TCMSP	Positive	Positive	5	500	100	17	1.1	Unpublished data
CPIP	Positive	Negative	5	500	100	15	1.0	Shimizu et al. (2000)
PCMC	Positive	Positive	5	5000	100	444	29	Yamano et al. (2003)
PCMX	Positive	Positive	5	5000	90	1375	89	Yamano et al. (2003)
TCMTBT	Positive	Positive	10	100	100	0.8	0.05	Yamano et al. (2001b)
HMBCDPB	Positive	Negative	10	1000	100	316	21	Shimizu et al. (2002)
BIT	Positive	Negative	50	5000	50	48	3.1	Noda et al. (1998)
BECDIP	Positive	Negative	50	50	10	68	4.4	Shimizu et al. (2000)
BBIT	Positive	Negative	50	5000	90	327	21	Noda et al. (2001)
TMBCDPB	Positive	Negative	100	1000	100	249	16	Shimizu et al. (2002)
CAA	Positive	Positive	500	5000	100	763	50	Noda et al. (2004a)
BNPD	Positive	Negative	5000	5000	10	3981	259	Noda et al. (2004a)
DMO	Positive	Positive	5000	5000	100	28303	1840	Yamano et al. (2004)
HO	Positive	Negative	5000	50000	50	501	33	Noda and Shimizu (2000)

^a Designated as positive, when at least one animal in the group exhibited skin reaction with maximum intradermal and topical induction and challenge doses.

^b Designated as positive, when at least one animal in the group exhibited skin reaction with maximum topical induction and challenge doses without intradermal induction.

^c Minimum first induction dose that sensitized at least one animal in the group.

^d First induction dose that maximally sensitized animals in the group in a dose-response study.

^e Sensitization rate observed in the maximally sensitized group in a dose-response study.

^f Calculated from linear regression lines between log elicitation doses and mean response scores.

^g Calculated by multiplying elicitation-threshold dose by factor of 0.065.

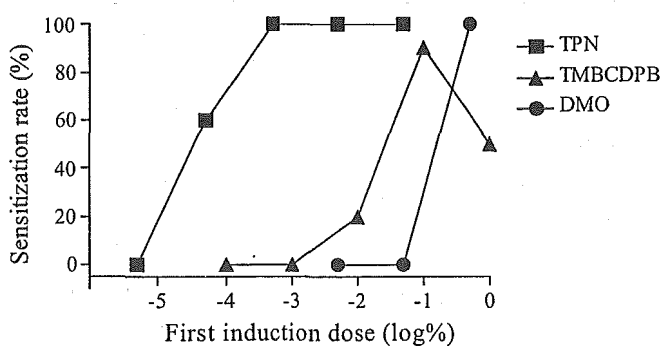


Fig. 1. Dose-related skin reaction for the first induction dose with three biocides in the GPMT. With each biocide, three to five doses were employed with respect to the intradermal induction step. Each symbol represents the sensitization rate of the group 48 h after challenge with maximum concentration of each compound; TPN, saturation of sensitization rate was observed within the induction dose range used; TMBCDPB, overload effect of skin reaction was observed within the induction dose range used; DMO, positive skin reaction was observed only at the non-necrotic highest dose used.

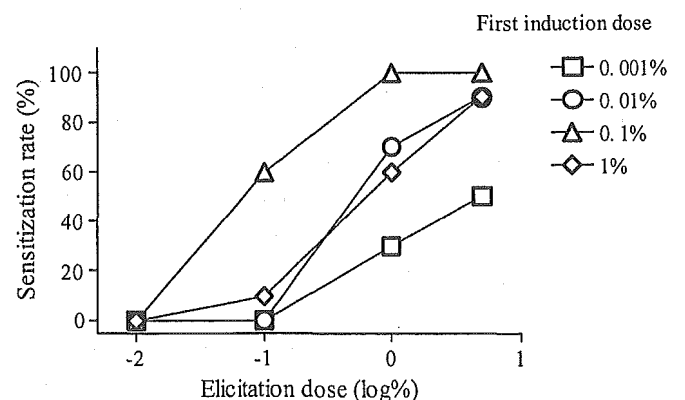


Fig. 2. Relationship between the first induction dose and the elicitation-dose-related skin reaction in the GPMT. Each group of animals was sensitized at intradermal induction doses of 0.001, 0.01, 0.1 or 1% HMBCDPB. Each symbol represents the sensitization rate 48 h after challenge with each elicitation dose.