

(in this case, an induction dose of 0.1% HMBCDPB) to evaluate dose–response profiles in the elicitation phase.

3.2. Dose–response analysis of elicitation phase with GPMT

With each biocide, dose–response profiles in the elicitation phase were evaluated using corresponding maximally sensitized groups. Typical results with six biocides are shown in Fig. 3. When mean skin reaction values were plotted against the log elicitation dose, linear regression showed a good fit for each biocide. Elicitation-threshold doses calculated from these lines ranged from 0.6 ppm for TPN to 28,300 ppm for DMO. Other notable information obtained from Fig. 3 is that there is a wide variety among the slope values of the regression lines. These ranged from 0.41 for BIT to 4.8 for MBTC. We have proposed an index value to compare the relative elicitation potencies of chemical allergens in the GPMT (Yamano et al., 2001a). The proposed index, the area under the linear regression line between the threshold point and 1% of the elicitation dose (elicitation AUL) reflect the integrated degree of skin reaction that would occur, when a maximally sensitized animal is exposed to the allergen. Different orders of ranking for sensitizing biocides evaluated ei-

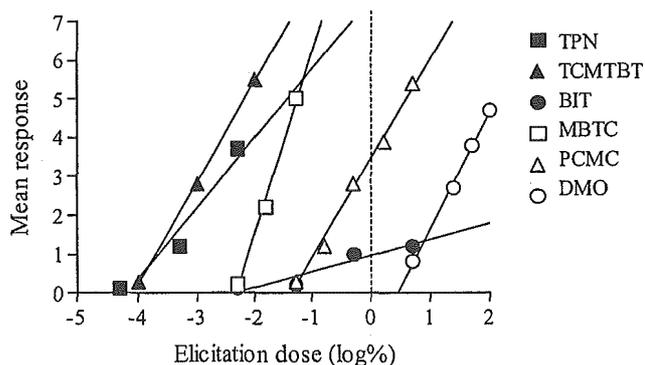


Fig. 3. Relationship between elicitation dose and skin-reaction score for six biocides in the GPMT. In order to evaluate the elicitation profile, a group of animals maximally sensitized with each biocide was used. With each biocide, three to five doses were employed with respect to the elicitation procedure. Each symbol represents the mean response score of the group 48 h after challenge with the relevant compound. The area under the linear regression line between the x -intercept and 1% of the elicitation dose expressed as a dotted line is defined as the relative elicitation potency index value of each allergen (elicitation AUL).

Table 3

Ranking of sensitizing biocides by elicitation potencies in GPMT

Biocide	Elicitation AUL		Elicitation threshold	
	AUL ^a	Ranking	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Ranking
TCMTBT	21.9	1	0.05	2
TPN	16.1	2	0.04	1
CPIP	15.9	3	1.0	3
TCMSP	13.3	4	1.1	4
MBTC	12.8	5	3.2	6
IPBC	9.8	6	5.7	8
BBIT	2.4	7	21	11
PCMC	2.4	8	29	12
HMBCDPB	1.7	9	21	10
BECDIP	1.5	10	4.4	7
BIT	1.1	11	3.1	5
CAA	0.8	12	50	14
TMBCDPB	0.7	13	16	9
PCMX	0.6	14	89	15
HO	0.5	15	33	13
BNPD	0.1	16	259	16
DMO	0.0	17	1840	17

^a AUL values were calculated as the area formed by linear regression line x -intercept and 1% of elicitation dose as per Fig. 3.

ther by the elicitation AUL or the elicitation threshold are summarized in Table 3.

3.3. Dose–response analysis of induction phase with LLNA

Results of the LLNA for 17 biocides are shown in Table 4. In our method, a chemical was designated positive, when a statistically significant increase in the SI value was obtained using a non-irritative dose. Thirteen out of 17 positive biocides in the GPMT gave positive results in the LLNA. Discrepancy of the results was observed with four biocides, three of which, BIT, BECDIP and BBIT, resulted in the significant increase in SI values only under irritative doses. Dose–response profiles for the SI values in the LLNA are shown in Fig. 4. Minimum induction doses ranged from 0.01% for TPN to 30% for HO, with about half of them having minimum induction doses less than 1%, while the others having the values of 1% or more.

3.4. Relationship between results from GPMT and LLNA

With respect to 13 biocides that were positive both in the GPMT and the LLNA, minimum induction doses

Table 4
Results of LLNA for 17 biocides

Biocide	Solvent	%	Cellularity index	BrdU incorporation index	SI	LOEL ^a (μg/cm ²)
TPN	AOO ^b	0	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.1	2.5
		0.003	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.2	
		0.01	1.3 ± 0.2	1.4 ± 0.2	1.8 ± 0.3*	
		0.03	2.7 ± 0.8*	2.6 ± 0.4*	7.2 ± 2.6*	
		0.1	3.0 ± 0.3*	3.2 ± 0.6*	9.7 ± 2.1*	
MBTC	AOO	0	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2	7.5
		0.003	1.1 ± 0.2	0.9 ± 0.3	1.0 ± 0.1	
		0.010	1.5 ± 0.4	1.2 ± 0.4	1.9 ± 1.0	
		0.030	2.0 ± 0.6*	1.3 ± 0.2	2.5 ± 0.8*	
		0.100	3.5 ± 1.3*	2.3 ± 0.5**	7.6 ± 1.2*	
IPBC	AOO	0	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	25
		0.03	1.2 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.2 ± 0.3	
		0.1	1.5 ± 0.2**	1.5 ± 0.1*	2.2 ± 0.4*	
		0.3	1.6 ± 0.1**	1.8 ± 0.1**	2.7 ± 0.4*	
		1	2.7 ± 0.2**	2.3 ± 0.5**	6.2 ± 1.3*	
TCMSP	AOO	0	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	25
		0.01	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.1	
		0.03	1.0 ± 0.2	1.2 ± 0.2	1.2 ± 0.3	
		0.1	1.2 ± 0.6	1.7 ± 0.8	1.7 ± 0.3*	
		0.3	2.8 ± 1.0*	3.5 ± 1.2*	10.4 ± 6.1*	
1	3.6 ± 0.6*	4.1 ± 0.9*	14.2 ± 1.4*			
CPIP	AOO	0	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.3	75
		0.03	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.3	
		0.1	1.0 ± 0.2	1.3 ± 0.3	1.3 ± 0.4	
		0.3	1.4 ± 0.1**	1.6 ± 0.2*	2.2 ± 0.3*	
		1	2.0 ± 0.2**	2.5 ± 0.5**	4.9 ± 1.2*	
TCMTBT	AOO	0	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	75
		0.03	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.3	
		0.1	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.2	1.2 ± 0.3	
		0.3	3.4 ± 1.2*	2.5 ± 0.2*	8.3 ± 2.5*	
		1	6.4 ± 1.1*	3.8 ± 0.9*	24.1 ± 7.6*	
BNPD	AOO	0	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.3	250
		0.1	0.8 ± 0.2	1.2 ± 0.4	1.0 ± 0.2	
		0.3	1.1 ± 0.1	1.2 ± 0.6	1.3 ± 0.7	
		1	1.9 ± 0.4**	2.4 ± 0.2**	4.5 ± 1.3*	
		3	2.3 ± 0.3**	3.1 ± 0.5**	7.3 ± 1.6*	
TMBCDPB	DMSO	0	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.3	750
		0.3	1.3 ± 0.2	0.8 ± 0.2	1.1 ± 0.4	
		1	1.4 ± 0.4	1.2 ± 0.3	1.6 ± 0.4	
		3	2.1 ± 0.2**	1.4 ± 0.4	2.8 ± 0.6**	
		10	2.2 ± 0.3**	1.5 ± 0.2**	3.2 ± 0.2**	
HMBCDPB	DMSO	0	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.3	750
		0.3	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.4	1.2 ± 0.4	
		1	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.2	1.2 ± 0.4	
		3	2.0 ± 0.2**	1.5 ± 0.3	3.0 ± 1.0**	
		10	3.1 ± 0.1**	2.0 ± 0.2**	6.3 ± 0.7**	
DMO ^c	AOO	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	1.1 ± 0.3	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.4	

Table 4 (Continued)

Biocide	Solvent	%	Cellularity index	BrdU incorporation index	SI	LOEL ^a ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
PCMC ^d	AOO	10	1.7 \pm 0.3*	1.5 \pm 0.3**	2.7 \pm 0.6*	2500
		25	3.0 \pm 0.3**	1.8 \pm 0.2**	5.4 \pm 0.8*	
		50	2.4 \pm 0.4**	1.8 \pm 0.2**	4.4 \pm 1.0*	
		100	2.7 \pm 0.5**	1.8 \pm 0.3**	4.8 \pm 0.9*	
		0	1.0 \pm 0.2	1.0 \pm 0.3	1.0 \pm 0.4	
PCMX ^d	AOO	5	1.3 \pm 0.2	1.1 \pm 0.3	1.5 \pm 0.6	2500
		10	1.6 \pm 0.4*	1.4 \pm 0.4	2.1 \pm 0.6*	
		25	2.4 \pm 0.4**	2.4 \pm 0.6**	6.1 \pm 2.5*	
		50	2.8 \pm 0.5**	1.8 \pm 0.9	5.1 \pm 2.9*	
		0	1.0 \pm 0.2	1.0 \pm 0.3	1.0 \pm 0.4	
HO	AOO	5	1.2 \pm 0.3	1.0 \pm 0.3	1.2 \pm 0.6	6250
		10	1.3 \pm 0.5	1.4 \pm 0.4	1.7 \pm 0.3	
		25	1.6 \pm 0.5	2.1 \pm 0.8**	3.6 \pm 2.1*	
		50	2.1 \pm 0.8**	1.7 \pm 0.4	3.7 \pm 2.1*	
		0	1.0 \pm 0.2	1.0 \pm 0.2	1.0 \pm 0.4	
BIT	DMSO	3	0.9 \pm 0.1	0.9 \pm 0.2	0.8 \pm 0.1	7500
		10	1.3 \pm 0.4	1.5 \pm 0.3	1.9 \pm 0.6	
		30	2.0 \pm 0.4**	1.6 \pm 0.2*	3.2 \pm 0.8*	
		100	3.2 \pm 0.2**	3.4 \pm 0.5**	11.0 \pm 2.5*	
		0	1.0 \pm 0.1	1.0 \pm 0.2	1.0 \pm 0.2	
BECDIP	AOO	0.3	0.8 \pm 0.0	0.9 \pm 0.3	0.7 \pm 0.2	Negative ^c
		1	1.2 \pm 0.1	1.1 \pm 0.4	1.3 \pm 0.4	
		3	1.3 \pm 0.4	1.3 \pm 0.2	1.7 \pm 0.6*	
		0	1.0 \pm 0.1	1.0 \pm 0.3	1.0 \pm 0.3	
BBIT	DMSO	0.1	1.0 \pm 0.2	0.8 \pm 0.1	0.8 \pm 0.2	Negative
		0.3	1.0 \pm 0.2	0.8 \pm 0.2	0.8 \pm 0.2	
		1	1.5 \pm 0.5*	1.0 \pm 0.3	1.5 \pm 0.7	
		3	2.0 \pm 0.2**	1.9 \pm 0.2**	3.7 \pm 0.3**	
		0	1.0 \pm 0.1	1.0 \pm 0.2	1.0 \pm 0.2	
CAA	DMSO	0.3	0.9 \pm 0.3	1.0 \pm 0.1	0.9 \pm 0.4	Negative
		1	1.2 \pm 0.2	1.2 \pm 0.2	1.5 \pm 0.4	
		3	1.6 \pm 0.5*	1.3 \pm 0.4	2.0 \pm 1.0*	
		0	1.0 \pm 0.1	1.0 \pm 0.2	1.0 \pm 0.2	
CAA	DMSO	10	1.0 \pm 0.2	0.9 \pm 0.0	0.9 \pm 0.1	Negative
		25	1.1 \pm 0.3	0.9 \pm 0.1	1.0 \pm 0.3	

Significantly different from control, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, respectively.

^a Lowest-observed-effect level calculated by multiplying minimum sensitizing dose by factor of 250.

^b Acetone and olive oil in 4:1 ratio.

^c Values are from Yamano et al. (2004).

^d Values are from Yamano et al. (2003).

^e Statistically significant increase in SI was not observed within the non-irritative induction dose range used.

^f Statistically significant increase in SI was observed with skin irritation.

from both methods were compared. Data were converted from application concentrations (%) to the dose per animal ($\mu\text{g}/\text{head}$) with the factors of 2000 (1% agent in 50 μl vehicle, four injection sites correspond to 2000 $\mu\text{g}/\text{head}$) and 500 (1% agent in 25 μl vehicle, two application sites corresponds to 500 $\mu\text{g}/\text{head}$)

for the GPMT and the LLNA, respectively. Relationship was evaluated after logarithmic transformation. Correlation between two induction doses seemed poor ($r^2 = 0.33$), for example, log $\mu\text{g}/\text{head}$ doses in the GPMT for eight biocides ranged 0.0–0.3, while those in the LLNA ranged over three orders (0.2–3.1) (Fig. 5). In

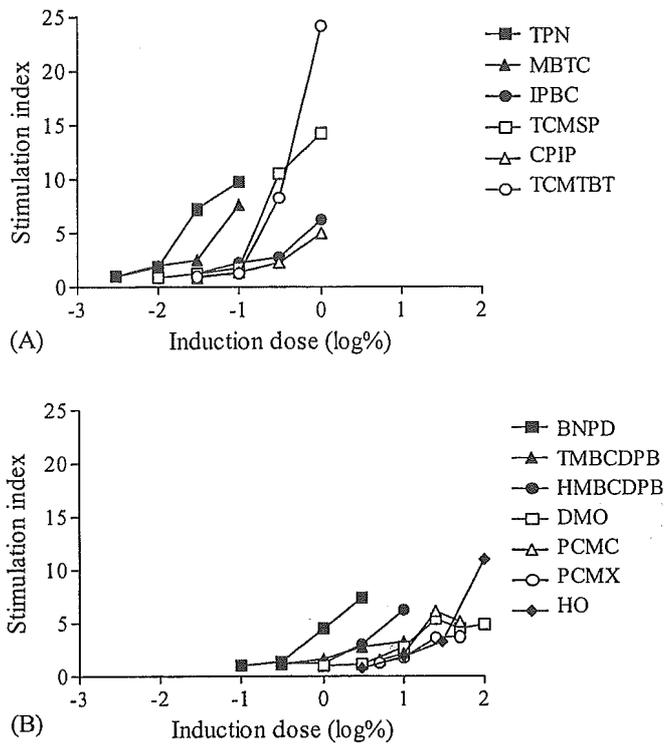


Fig. 4. Dose–response profiles for the induction phase of various biocides in the LLNA. Each symbol represents dose-related stimulation index values as per Table 4: (A) group of biocides with minimum induction doses less than 1%; (B) group of biocides with minimum induction doses of 1% and more.

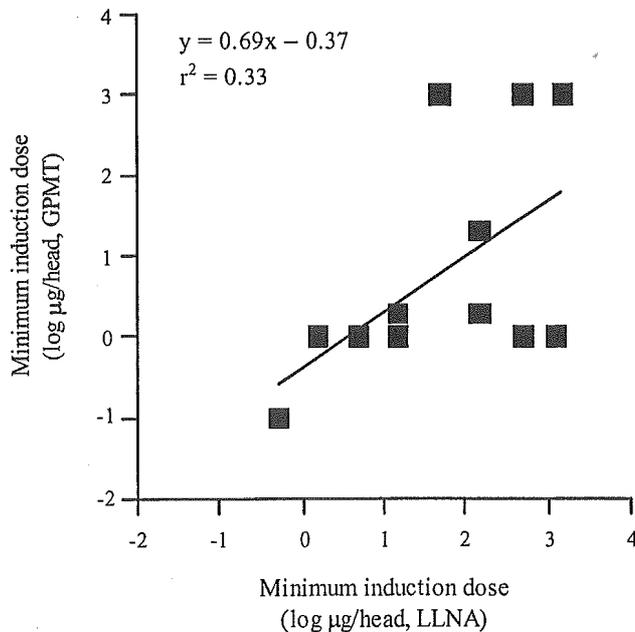


Fig. 5. Correlation of minimum induction doses of the LLNA with minimum first induction doses of the GPMT. Values are expressed as µg/head. Linear regression was performed on the logarithmically transformed values.

the same way, minimum induction doses in the LLNA (%) and elicitation-threshold doses in the GPMT (%) were converted to corresponding area doses ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) by the factors of 250 (1% agent in 25 μl vehicle, two application sites of 2 cm^2 corresponds to 250 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) and 650 (1% agent in 100 μl vehicle, one application site of 1.54 cm^2 corresponds to 650 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), and values were compared after logarithmic transformation. In this case, linear regression with a relatively good fit was observed ($r^2 = 0.54$).

4. Discussion

Recent several analytical studies have reported a close relationship between experimentally obtained human induction threshold doses and those from the LLNA, and proposed use of LLNA data as a starting point to estimate human tolerable doses (Kimber et al., 2003; Griem et al., 2003; Schneider and Akkan, 2004). On the other hand, for the GPMT, another standard method to test contact sensitizers, quantitative comparison of data with those of the LLNA or human experiments has yet to be sufficiently performed despite the accumulation of dose–response analysis data using modified protocols of the original GPMT (Andersen et al., 1995; Nakamura et al., 1994; van Och et al., 2001). In this study, a good consistency was generally observed between the results from two methods, as 13 of 17 tested biocides gave the same results in the GPMT and the LLNA. Discrepancy of the results was observed with four biocides, namely BIT, BECDIP, BBIT and CAA. Although false positive results of the GPMT can be suspected as a cause of discrepancy, at the least, BIT and CAA are known human skin-sensitizers (Lama et al., 1986; Assier-Bonnet and Revuz, 1999; Muhn and Sasseville, 2003). Actually, in the cases of BIT, BECDIP and BBIT, a significant increase in SI values in the LLNA was observed, but only at irritative doses. These results were designated as negative, because it is impossible to discriminate irritants from sensitizers by simply measuring lymphoid cell proliferation, although it is plausible that these biocides induced specific helper-T lymphocytes related to delayed-type hypersensitivity. In order to evaluate allergenicity of irritating chemicals in the LLNA, other indices, such as analysis of B- and T-cell subpopulations (Homey et al., 1998; Gerberick et al., 2002) seem to be needed. In the

case of CAA, its low ability to penetrate skin epidermis, as presumed from its low octanol–water partition coefficient ($\log K_{o/w} = -0.53$) compared to other biocides (Table 1), might be responsible for the inconsistent result.

It is a matter of debate which of the two steps of the induction steps in the GPMT should be used as the relevant metric. Kimber et al. (2003) recommended use of the second topical application, rather than the first intradermal administration, because the concentration for the latter is frequently determined and limited by the addition of Freund's complete adjuvant. However, as shown in Table 2, about half of the biocides that tested positive in the GPMT failed to sensitize animals with tolerable maximum second induction doses, when the first induction step was omitted. This means that, at least in these cases, topical application only acted to boost the effect of the intradermal injection. Furthermore, although the maximum intradermal doses are limited to 5% or non-necrotic highest doses, most of biocides testing these doses covered a whole range of dose-related changes in sensitization rates, such as saturation or overload effect of skin reaction. Thus, we employed the first induction as the measure of the induction phase. When the minimum induction doses from the GPMT were compared to those from the LLNA, the results showed poor correlation between the two (Fig. 5). van Och et al. (2001) also reported discrepancy of the order of sensitizing potencies of three chemicals evaluated by the LLNA and the GPMT, with the first induction doses being used as the metric. This discrepancy in results is only natural considering that the GPMT uses an injection of the test substance, in addition to adjuvant as a vehicle, thus bypassing the skin barrier. The point of making multiple induction dose groups in the GPMT is to identify the optimally sensitized group of animals to evaluate elicitation profiles, because, as shown in Fig. 2, it is well known that the dose–response profile of the elicitation phase is influenced by the degree to which sensitization is induced. The elicitation-threshold values thus obtained in the optimally sensitized guinea pigs are likely the lowest values for individual biocides that are obtainable in experimental animals and ideal for use in elicitation risk assessment, as risk ought to be evaluated on the basis of a worst-case scenario. When minimum induction area doses in the LLNA and elicitation-threshold area doses in the GPMT for 13 biocides were

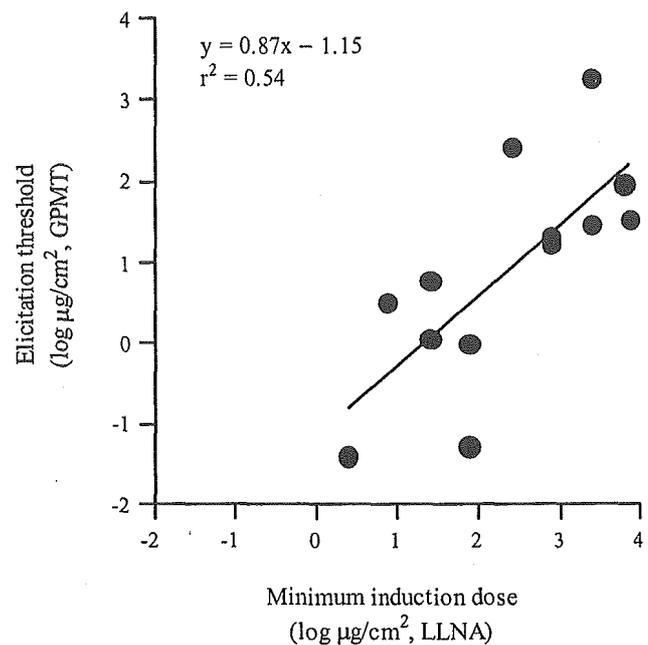


Fig. 6. Correlation of minimum induction doses of the LLNA with elicitation-threshold doses of the GPMT. Values are expressed as $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Linear regression was performed on the logarithmically transformed values.

compared, relatively good correlation between them was observed (Fig. 6). The result was to some extent expectable, because, as mentioned by Griem et al. (2003), various factors, such as skin penetration, metabolism, protein binding, uptake by antigen presenting cells, and so on, are common to both induction and elicitation phases, when sensitizers were applied topically. Although different vehicles, namely, acetone, acetone/olive oil (4:1, v/v), and dimethyl sulphoxide were used for topical applications in the GPMT and the LLNA for maximizing the test concentrations, this may have little impact on the accuracy of basic hazard identification (Basketter et al., 2001). At this time, it is difficult to evaluate the relationship between human and animal elicitation-threshold doses because of the lack of appropriate data, especially from humans, and future improvement of the human database is unlikely mainly due to ethical reasons. Although the obtained linear regression between GPMT elicitation thresholds and LLNA induction thresholds is not the final form and needs further improvement, the results suggest the possibility to estimate human elicitation-threshold doses, which are definitely lacking in the process of risk assessment for skin-sensitizers, directly from LLNA data.

It is generally said that elicitation-threshold doses are lower than that for induction, although experimental evidence from strictly controlled dose–response analysis are lacking. In Fig. 6, all data points lay below the diagonal line, meaning that the minimum area doses required to elicit skin reaction are always lower than that for induction. Ratios of minimum doses of the LLNA (induction) to those of the GPMT (elicitation) ranged from 1.0 for BNPD to 1465 for TCMTBT. A lower elicitation threshold compared to an induction threshold of a sensitizer leads to a concern that if future regulations to limit consumer exposure to sensitizing chemicals were implemented on the basis of induction threshold concentrations, then a person who had been previously sensitized to a certain chemical could be exposed to that chemical at doses higher than the elicitation threshold. In such a case, another index other than the threshold dose is needed for better risk assessment of elicitation. The area of a triangle enclosed by the *x*-axis, a dotted vertical line and a linear regression line for each allergen in Fig. 3 reflect the integrated degree of skin reaction that would occur, when a sensitized individual is exposed to an allergen. This value, in its mathematical expression, includes both the threshold concentration and the dose–response profile (the slope of the regression line) and seems suitable to compare relative elicitation potencies in a situation, such as that mentioned above.

In conclusion, the present study revealed a relatively good correlation between minimum induction doses in the LLNA and elicitation-threshold doses in the GPMT, suggesting the possibility to estimate human elicitation-threshold doses from the LLNA. Further study is needed to better elucidate the relationship between minimum induction doses in mice and minimum elicitation doses in guinea pigs, and those in humans.

References

- Andersen, K.E., Volund, A., Frankild, S., 1995. The guinea pig maximization test with a multiple dose design. *Acta Dermatol. Venereol.* 75, 463–474.
- Assier-Bonnet, H., Revuz, J., 1999. Chloroacetamide as a cause of contact dermatitis in hairdressing. *Contact Dermat.* 40, 284–285.
- Basketter, D.A., Cookman, G., Gerberick, G.F., Hamaide, N., Potokar, M., 1997. Skin sensitisation thresholds: determination in predictive models. *Food Chem. Toxicol.* 35, 417–425.
- Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I., 2001. Skin sensitization, vehicle effects and the local node assay. *Food Chem. Toxicol.* 39, 621–627.
- Gerberick, G.F., Cruse, L.W., Ryan, C.A., Hulette, B.C., Chaney, J.G., Skinner, R.A., Dearman, R.J., Kimber, I., 2002. Use of a B cell marker (B220) to discriminate between allergens and irritants in the local lymph node assay. *Toxicol. Sci.* 68, 420–428.
- Griem, P., Goebel, C., Scheffler, H., 2003. Proposal for a risk assessment methodology for skin sensitization based on sensitization potency data. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 38, 269–290.
- Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P., Vohr, H.W., 1998. An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 153, 83–94.
- Jacobs, M.C., White, I.R., Rycroft, R.J., Taub, N., 1993. Patch testing with preservatives at St John's from 1982 to 1993. *Contact Dermat.* 33, 247–254.
- Kimber, I., Gerberick, G.F., Basketter, D.A., 1999. Thresholds in contact sensitization: theoretical and practical considerations. *Food Chem. Toxicol.* 37, 553–560.
- Kimber, I., Basketter, D.A., Butler, M., Gamer, A., Garrigue, J.L., Gerberick, G.F., Newsome, C., Steiling, W., Vohr, H.W., 2003. Classification of contact allergens according to potency: proposals. *Food Chem. Toxicol.* 41, 1799–1809.
- Lama, L., Vanni, D., Barone, M., Patrone, P., Antonelli, C., 1986. Occupational dermatitis to chloroacetamide. *Contact Dermat.* 15, 243.
- Magnusson, B., Kligman, A.M., 1969. The identification of contact allergens by animal assay: the guinea pig maximization test. *J. Invest. Dermatol.* 52, 268–276.
- Muhn, C., Sasseville, D., 2003. Occupational allergic contact dermatitis from 1,2-benzisothiazolin-3-one without cross-sensitization to other isothiazolinones. *Contact Dermat.* 48, 230–231.
- Nakamura, A., Momma, J., Sekiguchi, H., Noda, T., Yamano, T., Kaniwa, M., Kojima, S., Tsuda, M., Kurokawa, Y., 1994. A new protocol and criteria for quantitative determination of sensitization potencies of chemicals by guinea pig maximization test. *Contact Dermat.* 31, 72–85.
- Noda, T., Yamano, T., Shimizu, S., 1998. Allergenicity evaluation of chemicals for use in household products. Part 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.* 60, 24–34.
- Noda, T., Shimizu, S., 2000. Toxicity study of hiba oil. Part 1: contact allergenicity of hiba oil in guinea pigs. *Seikatsu Eisei* 44, 13–24.
- Noda, T., Yamano, T., Shimizu, S., 2001. Toxicity study of *N*-*n*-butyl-1,2-benzisothiazolin-3-one. Part 1: contact allergenicity of *N*-*n*-butyl-1,2-benzisothiazolin-3-one in guinea pigs. *Seikatsu Eisei* 45, 137–147.
- Noda, T., Yamano, T., Shimizu, S., 2004a. Allergenicity evaluation of chemicals for use in household products. Part 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* 48, 396–406.

- Noda, T., Yamano, T., Shimizu, S., 2004b. Contact allergenicity of methylene-bis(thiocyanate) in the guinea pig maximization test. *Seikatsu Eisei* 48, 276–282.
- Sato, Y., Katsumura, Y., Ichikawa, H., Kobayashi, T., Kozuka, T., Morikawa, F., Ohta, S., 1981. A modified technique of guinea pig testing to identify delayed hypersensitivity allergens. *Contact Dermat.* 7, 225–237.
- Schneider, K., Akkan, Z., 2004. Quantitative relationship between the local lymph node assay and human skin sensitization assays. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 39, 245–255.
- Schnuch, A., Geier, J., Uter, W., Frosch, P.J., 1998. Patch testing with preservatives, antimicrobials and industrial biocides: results from a multicentre study. *Br. J. Dermatol.* 138, 467–476.
- Shimizu, M., Yamano, T., Noda, T., 2000. Allergenicity evaluation of chemicals for use in household products. Part IV: contact allergenicity of three halide bactericides, 3-iodo-2-propynyl butylcarbamate (IPBC), *p*-chlorophenyl-3-iodopropargylformyl (CPIP) and 1-bromo-3-ethoxycarbonyloxy-1,2-diiido-1-propene (BECDIP) in guinea pigs. *Seikatsu Eisei* 44, 129–138.
- Shimizu, M., Yamano, T., Noda, T., 2002. Allergenicity evaluation of biocides for use in household products. Part 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.* 64, 1–5.
- Takeyoshi, M., Yamasaki, K., Yakabe, Y., Takatsuki, M., Kimber, I., 2001. Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation. *Toxicol. Lett.* 119, 203–208.
- van Och, F.M.M., Vandebriel, R.J., Prinsen, M.K., De Jong, W.H., Slob, W., van Loveren, H., 2001. Comparison of dose-responses of contact allergens using the guinea pig maximization test and the local lymph node assay. *Toxicology* 167, 207–215.
- Yamano, T., Shimizu, M., Noda, T., 2001a. Relative elicitation potencies of seven chemical allergens in the guinea pig maximization test. *J. Health Sci.* 47, 123–128.
- Yamano, T., Shimizu, S., Noda, T., 2001b. Allergenicity evaluation of *N*-(1-methylheptyl)-*N'*-phenyl-*p*-phenylenediamine and 2-(thiocyanomethylthio) benzothiazole by the guinea pig maximization test. *J. Health Sci.* 47, 331–338.
- Yamano, T., Shimizu, S., Noda, T., 2003. 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* 190, 259–266.
- Yamano, T., Shimizu, M., Noda, T., 2004. Allergenicity evaluation of Bioban CS-1135 in experimental animals. *Contact Dermat.* 50, 339–343.

10,10'-oxybis-10*H*-phenoxarsineを含む抗菌剤の モルモットにおける感作性試験

清水 充, 山野 哲夫, 野田 勉

Contact allergenicity of a product containing biocide, 10,10'-oxybis-10*H*-phenoxarsine, in guinea pigs

Mitsuru SHIMIZU, Tetsuo YAMANO and Tsutomu NODA

Abstract

10,10'-Oxybis-10*H*-phenoxarsine (OBPA) has been used as a fungicide and bactericide for household products. We examined contact allergenicity of OBPA with the modified guinea pig maximization test (GPMT). In this study, a commercial product (Vinyzene BP5-2PG, VZPG) which contains 2% of OBPA in propylene glycol (PG) was used in GPMT. VZPG-treated guinea pigs in GPMT showed no contact allergenicity even at maximal concentration of intradermal injection and topical challenge of VZPG. Moreover, these animals had no skin reaction against PG. These results suggest that OBPA had no contact allergenicity in this study.

Key words : 10,10'-oxybis-10*H*-phenoxarsine, biocide, contact dermatitis, guinea pig maximization test

緒 言

実験材料および方法

家庭用品に使用される抗菌剤として有機ヒ素系抗菌剤10, 10'-oxybis-10*H*-phenoxarsine (OBPA) はポリ塩化ビニル樹脂, ポリウレタン樹脂などのプラスチック用の抗菌剤であり, さらにソファやダイニングテーブルの椅子張り地のポリ塩化ビニルをベースとした人工皮革にも使用されている。最近, ヒトでOBPAで抗菌加工された人工皮革製椅子によるアレルギー接触皮膚炎の症例が報告され, OBPAの皮膚感作性が疑われている²⁾。OBPAの毒性に関しては眼および皮膚刺激性があり, またマウスにおける急性経口LD50値が40mg/kgで, 肺, 消化管および肝臓に障害作用を有することが報告されている³⁾。しかし, OBPAの実験動物における皮膚感作性に関する知見はない。そこで, OBPAの感作性についてモルモットマキシミゼーション法 (GPMT)⁴⁾のNakamuraらによる改良法⁵⁾を用いて検討した。なお, 感作性試験に用いた試験品はOBPAを2%含むpropylene glycol (PG) 溶液である市販製品Vinyzene BP5-2PG (VZPG) を用いた。VZPGの溶媒はPGであり, PGに関しては皮膚感作性がないことは報告されているので⁶⁾, この製品のOBPAの含有濃度は低いOBPAに関する感作性の有無を確認するために使用した。

1. 試 薬

本試験ではOBPAの市販製品Vinyzene BP5-2PG (VZPG) (㈱野村事務所) を用いた。本試料はOBPAの2% propylene glycol 溶液である。OBPA (CAS No. 58-36-6) の化学構造式をFigureに示した。陽性対照物質として2, 4-dinitrochlorobenzene (DNCB, 片山化学工業) を用いた。

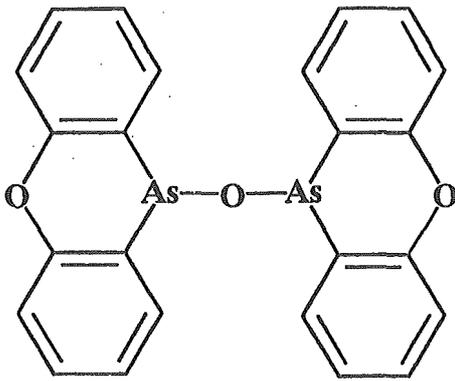
その他, フロイント完全アジュバンド (FCA: ㈱ヤトロン製), 特級アセトン, 白色ワセリン, 注射用蒸留水, 特級プロピレングリコールを使用した。

2. 使用動物

5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, 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。実験開始の週齢は6週齢であった。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(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℃, 点灯時間7:00~19:00に調節された動物飼育室で行った。

3. 試験方法

Magnusson and KligmanのGPMT⁴⁾のNakamuraらによる改良



10,10'-oxybis-10H-phenoxarsine
(OBPA)

Figure. Chemical structures of OBPA

法⁹⁾に準じて行った。本法は皮内注射および塗布による感作暴露と一定期間後に投与部位への再塗布による免疫反応（紅斑，浮腫の発現）を惹起させる惹起暴露より構成されている。

3. 1. 群構成

Magnusson and KligmanのGPMT⁹⁾のNakamuraらによる改良法⁹⁾では，GPMTの各工程（皮内投与，閉塞貼付，開放塗布）における最高投与量として皮内投与で壊死のみられない用量，閉塞貼付で壊死がみられず適度な刺激性を有する用量および開放塗布により刺激性がみられない最高非刺激濃度が採用されている。そこでGPMTの実施に先立ち，GPMTの各工程（皮内投与，閉塞貼付，開放塗布）における最高投与量設定のためにVZPGの皮膚刺激性試験を実施した。その結果，第1次感作の最高濃度を50,000 ppmとし，以下公比10で減少する3群（5,000，500および50 ppm）を設け，第2次感作暴露濃度は100%（VZPG原液）とした。惹起濃度に関して，従来なら惹起濃度には最高非刺激濃度までの濃度が採用されるが，VZPGの皮膚感作性をより明確にするために刺激性濃度も採用した。なお，溶媒のみを投与した非感作群および陽性対照物質であるDNCB感作群も設けた。これら各群の動物数，感作および惹起暴露の濃度をTableに示した。

3. 2. 試験物質の調製

第1次感作時には所定濃度のVZPGの局方オリブ油溶液および，その2倍の濃度になるようにVZPGをFCAに溶解させた後，等量の生理食塩水を混合させて作成した乳化液を用時調製して用いた。第2次感作時にはVZPG原液を用いた。惹起暴露には所定濃度のVZPGアセトン溶液およびPGの25,000 ppmアセトン溶液を用いた。なお，陽性対照のDNCBは第1次感作時に1,000 ppmのDNCBの局方オリブ油溶液および，その2倍の濃度になるようにDNCBをFCAに溶解させた後，等量の生理食塩水を混合させて作成した乳化液を用時調製して用いた。第2次感作時にはDNCB1,000 ppm白色ワセリン軟膏を用時調製して用いた。惹起暴露には所定濃度のDNCBアセトン溶液を用いた。

3. 4. 感作方法

第1次感作暴露の前日に，モルモットの背部肩甲骨部位（4

×6 cm）を剪毛した。各感作群ともに第1次感作暴露（皮内感作）はFCAを等量の生理食塩水と混合したFCA乳化液，VZPGのオリブ油溶液，およびVZPGのFCA乳化液を頭側より順にそれぞれ0.05mlずつ左右2ヶ所に皮内注射した。第1次感作暴露の6日後にその部位を再度剪毛し，翌日にVZPG原液（0.2 g）を塗布した2×3 cmのリント布を48時間閉塞貼付し，2回目の感作暴露（塗布感作）とした。非感作群は，それぞれの溶媒および基剤のみを同様に処置した。

3. 5. 惹起暴露

第2次感作終了後11日目に，第1次感作時と同じ方法で動物の背部約6×6 cmを剪毛し，その剪毛した背部皮膚に直径1.4 cmの円形印をつけた。翌日に所定濃度に調製したVZPGのアセトン溶液を円形部位に直接塗布し，開放塗布による惹起暴露を行った。開放塗布の24時間後に同部位を70%エタノールで清拭した。なお，投与量はいずれも0.1 mlとした。

3. 6. 観察および評価基準

惹起暴露後48および72時間目に投与部位の皮膚反応を判定した。そのほか，一般状態についても観察した。皮膚反応の評価基準は佐藤らの評価基準⁷⁾により，発赤（0～4）および浮腫（0～3）の程度を評価した。これらの値から各感作群における陽性反応率（SR）および平均評価点（MR）を算出した。

$$\text{陽性反応率 (\%)} (\text{SR}) = \frac{\text{陽性動物数}}{\text{全動物数}} \times 100$$

$$\text{平均評価点 (MR)} = \frac{\text{評価点の合計}}{\text{全動物数}}$$

実験結果

惹起暴露48および72時間後における各VZPG感作群および非感作群の皮膚反応の陽性反応率および平均評価点をTableに示した。

非感作群で惹起濃度5,000 ppmまでの濃度では皮膚反応が認められなかったが，惹起濃度10,000 ppm以上の濃度で皮膚反応が観察された。従って，今回の試験においてVZPGの最高非刺激濃度は5,000 ppmであった。

最高非刺激濃度である5,000 ppmの濃度で惹起しても，各観察時点でVZPG各感作群に皮膚反応は認められなかった。また，刺激性がみられる惹起濃度である10,000および25,000 ppmの惹起により非感作群およびVZPG各感作群ともに皮膚反応がみられたが，これらの陽性反応率および平均評価点に非感作群と感作群の間にほとんど差が認められなかった。例えば，最高惹起濃度25,000 ppmにおける48時間後の陽性反応率は非感作群およびVZPG各感作群いずれも100%であり，平均評価点は非感作群で2.8，50 ppm感作群で2.4，500 ppm感作群で1.9，5,000 ppm感作群で2.5，50,000 ppm感作群で1.9であった。このように各惹起濃度における非感作群およびVZPG各感作群の皮膚反応にほとんど差は認められなかった（Table）。

PGに関して，25,000 ppmの濃度で惹起しても非感作群および各VZPG感作群に皮膚反応は観察されなかった（Table）。

以上の結果より，OBPAを含有するVZPGで感作処置した動物はVZPGに対して陽性反応がみられず，PGに対しても陽性反応が認められなかった。

なお，本感作性試験と同時にを行った陽性対照物質であるDNCBで感作した群でDNCBに対して良好な感作性を示すこと

Table. Skin sensitization test of VZPG 48 and 72 hrs after the challenge dose¹⁾

Induction		Challenge		48 hrs								72 hrs																
id injection ²⁾	topical ppm	topical %	topical ppm	SR ³⁾ %	MR ⁴⁾	Score						SR ³⁾ %	MR ⁴⁾	Score														
						0	1	2	3	4	5			6	0	1	2	3	4	5	6							
0	0	0	-	0	0.0	5 ⁵⁾	0	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0.0	5 ⁴⁾	0	0	0	0	0	0	0	0	N	
			50 VZPG ¹⁾	0	0.0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0.0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	N
			500 VZPG	0	0.0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0.0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	N
			2500 VZPG	0	0.0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0.0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	N
			5000 VZPG	0	0.0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0.0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	N
			10000 VZPG	80	0.8	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	I	20	0.2	4	1	0	0	0	0	0	0	0	I
			25000 VZPG	100	2.8	0	0	1	4	0	0	0	0	0	0	I	80	1.2	1	2	2	0	0	0	0	0	0	I
			25000 PG ⁶⁾	0	0.0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0.0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	N
50	100	0	-	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	N		
			50 VZPG	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	N	
			500 VZPG	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	N	
			2500 VZPG	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	N	
			5000 VZPG	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	N	
			10000 VZPG	80	0.9	2	7	1	0	0	0	0	0	0	I	10	0.1	9	1	0	0	0	0	0	0	0	I	
			25000 VZPG	100	2.4	0	2	3	4	1	0	0	0	0	I	80	0.9	2	7	1	0	0	0	0	0	0	I	
			25000 PG	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	N	
500	100	0	-	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	N		
			50 VZPG	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	N		
			500 VZPG	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	N		
			2500 VZPG	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	N		
			5000 VZPG	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	N		
			10000 VZPG	60	0.8	4	4	2	0	0	0	0	0	0	I	10	0.1	9	1	0	0	0	0	0	0	0	I	
			25000 VZPG	100	1.9	0	5	1	4	0	0	0	0	0	I	50	0.6	5	4	1	0	0	0	0	0	0	I	
			25000 PG	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	N	
5000	100	0	-	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	N		
			50 VZPG	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	N		
			500 VZPG	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	N		
			2500 VZPG	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	N		
			5000 VZPG	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	N		
			10000 VZPG	50	0.5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	I	10	0.1	9	1	0	0	0	0	0	0	I		
			25000 VZPG	100	2.5	0	0	5	5	0	0	0	0	0	I	100	1.2	0	8	2	0	0	0	0	0	I		
			25000 PG	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	N		
50000	100	0	-	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	N		
			50 VZPG	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	N		
			500 VZPG	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	N		
			2500 VZPG	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	N		
			5000 VZPG	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	N		
			10000 VZPG	70	0.8	3	6	1	0	0	0	0	0	0	I	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	N		
			25000 VZPG	100	1.9	0	4	3	3	0	0	0	0	0	I	50	0.7	5	3	2	0	0	0	0	0	I		
			25000 PG	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0.0	10	0	0	0	0	0	0	0	N		
0	0	0	DNCB	0	0.0	5	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0.0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	N		
			10 DNCB	0	0.0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0.0	5	0	0	0	0	0	0	0	N		
			100 DNCB	0	0.0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0.0	5	0	0	0	0	0	0	0	N		
			1000 DNCB	0	0.0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0.0	5	0	0	0	0	0	0	0	N		
DNCB 1000 ppm	DNCB 1000 ppm	0	DNCB	0	0.0	5	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0.0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	N		
			10 DNCB	0	0.0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0.0	5	0	0	0	0	0	0	0	N		
			100 DNCB	100	3.0	0	1	0	3	0	1	0	0	P	100	1.8	0	4	0	0	0	0	1	0	P			
			1000 DNCB	100	5.2	0	0	0	0	0	4	1	0	P	100	3.8	0	0	1	2	0	1	1	0	P			

1) Test sample (VZPG), which contains 2% of OBPA in propylene glycol, is used in skin sensitization test.

2) Intradermal injection

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

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

5) No. of animals

6) PG: propylene glycol

N: Negative reaction

I: Irritation

P: Positive reaction (control group exhibited negative reaction at the same challenge dose)

が確認された (Table)。

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

考 察

OBPAを含有する抗菌剤VZPGの感作性についてGPMT⁴⁾の Nakamuraらによる改良法⁵⁾を用いて検討した。今回用いた試料はOBPAを2%含むPG溶液の市販製品である。溶媒であるPGに関して皮膚感作性がないことが既に報告されており⁹⁾、さらに本試験でも高濃度のPGの惹起によっても皮膚反応が観察されなかった。従って、この製品のOBPAの含有濃度は低いことがOBPAに関する感作性の有無を確認するために有用であると考えられた。

GPMTによる感作性の評価に際しては、刺激性を有する惹起濃度では誤った判定をもたらす可能性があり、非刺激濃度を用いるべきであるとされている^{4,5)}。しかし、VZPGの感作性を詳細に検討するために、本試験ではあえて惹起濃度に刺激性のある濃度も加えて、惹起後の皮膚反応について観察した。その結果、従来の最高非刺激濃度で惹起してもいずれの感作群にも皮膚反応が観察されなかった。さらに刺激性濃度で惹起しても皮膚反応は非感作群と感作群にほとんど差異が認められなかった。本試験に用いた試料はOBPAを2%含むことから、OBPAの濃度として第1次感作暴露の最高濃度1,000 ppm、第2次感作暴露の最高濃度20,000 ppmでモルモットを感作誘導したことになり、この動物に対してOBPAを含む本試料で惹起しても陽性反応が認められなかったことから、本実験条件下ではOBPAに皮膚感作性がないと推定された。

OBPAに関して1997年にOBPA製品により抗菌加工された合成皮革椅子張り地によるアレルギー性接触皮膚炎の事例が報告された²⁾。この事例で皮疹を生じた患者13名中6名がOBPA配合のポリ塩化ビニル製の人工皮革に陽性反応を示し、OBPAが原因化学物質と推定された²⁾。ポリ塩化ビニル製品などへのVZPGの添加量は1.5~2.5% (総重量比) であり、OBPAとして0.03~0.05% (300~500 ppm) とされている⁹⁾。しかし、五十嵐らはOBPAによると疑われる皮膚障害を起こした椅子ビニルレーザを分析したところOBPAが検出されなかったことから、OBPA自体でなくその分解物が感作性の本体と推察している⁹⁾。本試験でもOBPAを含む抗菌剤に皮膚感作性がなかったことから、今後はOBPAを含めた分解産物についてもさらなる皮膚感作性について検討を加える必要がある。

結 論

有機ヒ素系抗菌剤OBPAを含有する抗菌剤について皮膚感作性をモルモットマキシミゼーション法のNakamuraらの改良法で調べた結果、OBPAを含有する抗菌剤は皮膚感作性を示さなかった。

参考文献

- 1) 榎野村事務所：プラスチック用抗菌防カビ剤「vinyzene (バイナジン)」，“抗菌剤のすべて”，p. 498-500. 繊維社，大阪 (1997)
- 2) 鹿庭正昭，五十嵐良明：合成皮革製椅子によるアレルギー性接触皮膚炎：有機ヒ素系抗菌剤の役割，第35回全国衛生化学技術協議会年会講演要旨集，p. 216-217 (1998)
- 3) Ballantyne, B.: The comparative short-term mammalian toxicity of phenarsazine oxide and phenoxarsine oxide, *Toxicology*, 10, 341-361 (1978)
- 4) Magnusson, B. and Kligman, A.M.: The identification of contact allergens by animal assay, *J. Invest. Dermatol.*, 52, 268-276 (1969)
- 5) Nakamura, A., Momma, J., Sekiguchi, H., Noda, T., Yamano, T., Kaniwa, M., Kojima, S., Tsuda, M. and Kurokawa, Y.: A new protocol and criteria for quantitative determination of sensitization potencies of chemicals by guinea pig maximization test, *Contact Dermatitis.*, 31, 72-85 (1994)
- 6) Guillot, J.P., Gonnet, F.F., Clement, C. and Faccini, J.M.: Comparative study of methods chosen by the Association Francaise de Normalisation (AFNOR) for evaluating sensitizing potential in the albino guinea-pig, *Food Chem. Toxicol.*, 21, 795-805 (1983)
- 7) 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*，42, 831-837 (1980)
- 8) 阿部嘉長，須藤 真：防カビ剤，“新版・プラスチック配合剤—基礎と応用”，p.430-435, 大成社，東京 (1984)
- 9) 五十嵐良明，鹿庭正昭，中村晃忠：椅子張り地に用いられる人工皮革中の抗菌剤10,10'-Oxybis-10H-phenoxarsineの分析，*薬学雑誌*，120, 795-799 (2000)

LC/MS によるアレルギー性化学物質の検出と スクリーニングへの応用*

森 脇 洋**・清水 充**
田 中 正 宣**・鶴 保 謙四郎**

キーワード ① LC/MS ② GPC カラム ③ アレルギー性化合物 ④ スクリーニング

要 旨

生活環境，室内環境に存在する可能性のあるアレルギー性化合物 5 種について LC/MS を用いた検出法を開発し，LC/MS がこれら物質のスクリーニングに用いることができないか検討を行った。選択した化合物は有機金属化合物や 4 級アンモニウムを含む化合物を含み，GC/MS による一斉検出は困難である。一方，LC/MS では GPC カラムにより分離を行うことにより，これら物質のピークが得られた。本法では，5 種のアレルギー性化合物の一斉検出が可能であった。

1. はじめに

スギ花粉症やアトピー性皮膚炎といったアレルギー疾患を有する人の増加傾向に伴い，近年，「アレルギー」に対する関心が高まっている。アレルギーとは“免疫反応が結果として生体に危害を与えてしまう状態”と定義できる。このアレルギーの原因となる物質(アレルゲン)は多岐にわたっており，身体への侵入経路により大きく分類されている。呼吸などから侵入する吸入アレルゲン(たとえばスギ花粉など)，食物を通じて侵入する経口アレルゲン(卵など)，皮膚接触を通じて侵入する接触アレルゲン(ニッケルなど)などが挙げられる。とくに室内環境におけるアレルゲンの存在は，アレルギー症状を引き起こす重要な原因となりうることから，環境問題としてアレルギーを考える動きがさかんになってきている¹⁾。

室内環境，あるいは生活環境に起因するアレルギーとして問題になると考えられるのは吸入アレ

ルゲンと接触アレルゲンであろう。これらアレルゲンのスクリーニングは，アレルギーの原因が何か早急に突き止めるうえで重要な意味を有する。本報では，とくに接触アレルゲンに着目した。

われわれが日常生活において曝露する可能性がある接触アレルゲンとしてはニッケルをはじめとする金属類，あるいは生活用品に使用されている種々の有機化合物が考えられる。重金属類の分析は，アレルギー性が疑われる試料を水や酸で溶出試験を行ない，溶出液を ICP/MS などにより分析することにより，その存在の有無を明確にすることができる。一方，接触アレルゲンとして考えられる有機化合物の分析については，分析法が確立されていない物質も多く，簡易なスクリーニング法，分析法の開発が急がれるところである。

身の回りに存在する接触アレルゲンとして考えられる有機化合物には，どのような物質があるのだろうか？近年の抗菌ブームの高まりなどからブ

*Detection of Allergenic Chemicals by LC/MS and the Application for the Screening of Allergen

**Hiroshi Moriwaki, Mitsuru Shimizu, Masanobu Tanaka, Kenshiro Tsuruho (大阪市立環境科学研究所), Osaka City Institute of Public Health & Environmental Sciences

表 1 アレルギー性を有する抗菌剤の例

抗菌剤	略 式	人に対する 皮膚感受性	実験動物に対する 皮膚感受性	使用例	参考文献
10, 10'-oxybis-10H-phenoxarsine	OBPA	有	報告例無し	人工皮革	2
4, 4'-(tetramethylenedicarbonyldiamino)- bis(1-decylpyridinium bromide)	TMCBDPB	報告例無し	有	塗料	3
N,N'-hexamethylene- bis(4-carbamoyl-1-decylpyridinium bromide)	HMBCDPB	報告例無し	有	塗料	3
1, 2-benzisothiazolin-3-one	BIT	有	有	印刷用インク・壁紙用接着剤	4
N-n-butyl-1, 2-benzisothiazolin-3-one	BBIT	報告例無し	有	プラスチック製品・塗料	5

プラスチック製品、繊維、食品、塗料などの家庭製品には各種の抗菌剤が使用されている。清水らはこれら抗菌剤の多くに、アレルギー性の接触皮膚炎を生じさせる可能性のある皮膚感受性を示す物質があることを報告した²⁻⁵⁾。清水らにより報告された皮膚感受性を有する抗菌剤を表 1 に示す。これら化合物は、たとえば人工皮革など皮膚と直接、接触する機会の多い家庭用品に含まれていることが報告されており⁶⁾、アレルギー症状を起こす原因となりうる。表 1 に示した化合物のうち OBPA のような有機金属化合物、TMCBDPB

や HMBCDPB のような 4 級アンモニウムを含む化合物は不揮発性であることから、GC/MS による測定が困難である。そこで、本報では、家庭用品に用いられる抗菌剤のうちアレルゲンの可能性が指摘されている 5 種の物質 (OBPA, TMCBDPB, HMBCDPB, BIT, BBIT: 図 1 にその化学構造式を示した) を取り上げ、LC/MS による簡易スクリーニング法を検討した。

2. 実 験

OBPA は市販製品 Vinylzene BP 5-2 PG (株野村事務所) から再結晶法により単離したものを使用した。TMCBDPB は市販製品ダイマー136 (イヌイ (株)), HMBCDPB はダイマー38 (イヌイ (株)) をそのまま使用した。BIT はセネガ製の Proxel PL, BBIT はアビシア (株) 製の市販品 Vanquish 100 を用いた。アセトニトリルは HPLC グレードを用いた。

LC/MS はアプライドバイオ社製 API2000 を用いた。液体クロマトグラムはアジレント製 HP1200 シリーズを使用した。質量分析計の条件を表 2 に示す。

カラムには東ソー Tosoh VMPAK25 (2.0×150 mm) を用いた。移動相はアセトニトリルと水 (酢酸アンモニウム 2 mM, 酢酸 2 ml/l) を用い、アセトニトリルの比率が 0-10 分では 10% に固定し、10

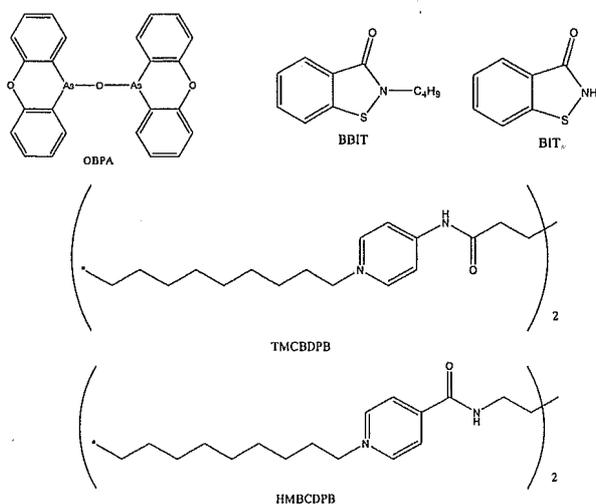


図 1 アレルギー性化合物の化学構造式

表 2 主な MS の操作パラメーター

Parameter	Setting
イオン化法	エレクトロスプレー法 (ポジティブイオンモード)
イオンスプレー電圧	5.0kV
カーテンガス	40 ^a
ペーパライザー温度	500°C
デクラスター電圧	30, 50, 50, 20, 20 (それぞれ OBPA, TMCBDPB, HMBCDPB, BIT, BBIT)

a 機器の設定値

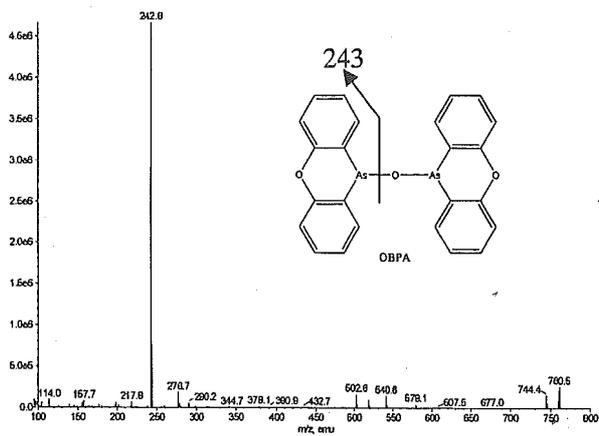
-20分で90%まで上昇させ、20-30分で90%に固定した。

3. アレルギー性化合物のマススペクトル

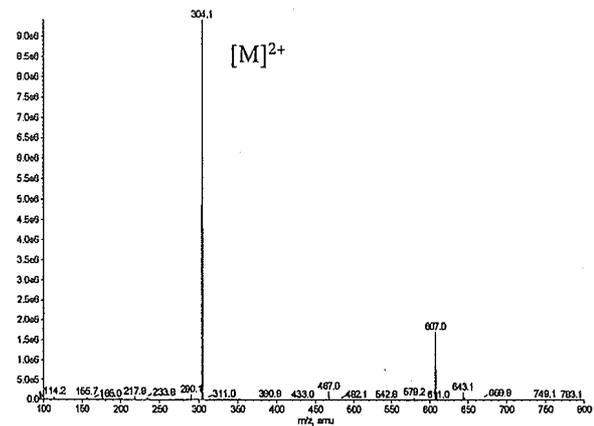
最初にOBPA, TMCBDPB, HMBCDPB, BIT, BBITのマススペクトルをエレクトロスプレーイオン化法のポジティブイオンモードを用いて測定した。各化合物の100ppmのアセトニトリル溶液を用い、フローインジェクション法によりマススペクトルを得た。OBPAでは砒素と酸素の結合が切れたフラグメントイオン(m/z 243)がベースピークとして観測された。一方、TMCBDPB, HMBCDPBについてはそれぞれの二価イオンが得られた。BIT, BBITについてはプロトンが付加したイオン[M+H]⁺が検出された。各化合物のマススペクトルを図2に示す。

4. アレルギー性化合物のLC分離

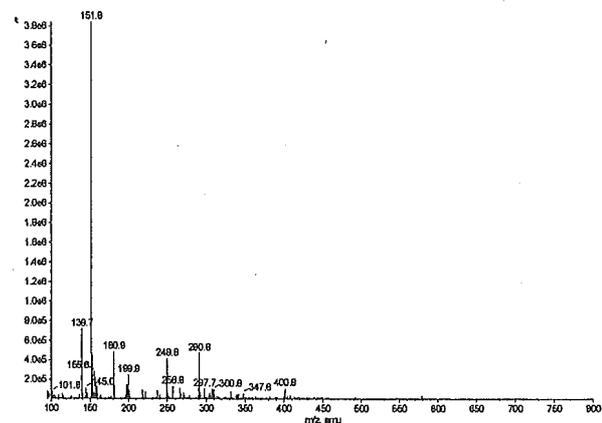
最初に5種の化合物についてODSカラムを用いた分離分析を検討した。しかし、TMCBDPB, HMBCDPBのピークが全く得られなかった。これはODSのシラノール残基とこれら化合物の4級アミン部位が強く相互作用するためであると考えられる。また、OBPAについてはピークにテーリ



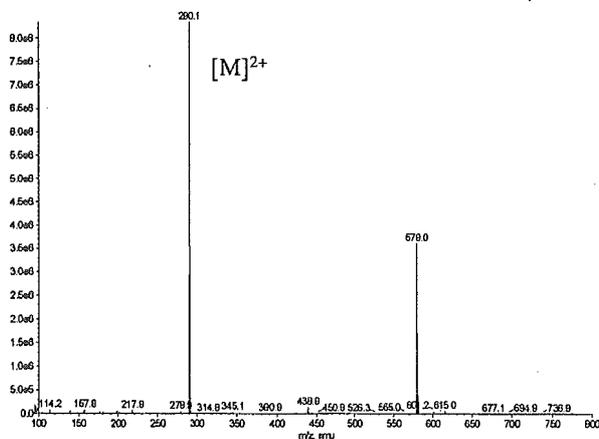
a) OBPAのマススペクトル



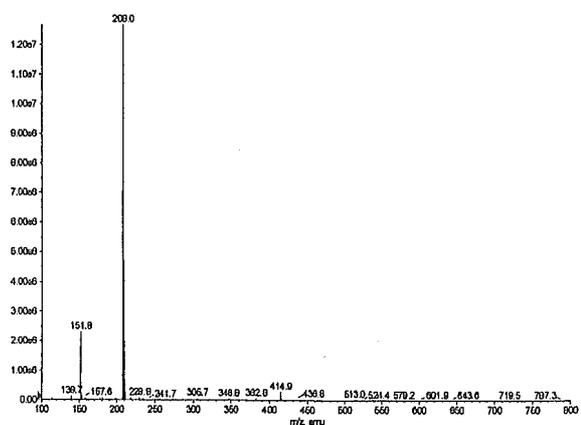
c) HMBCDPBのマススペクトル



d) BITのマススペクトル



b) TMCBDPBのマススペクトル



e) BBITのマススペクトル

図2 アレルギー性化合物のマススペクトル

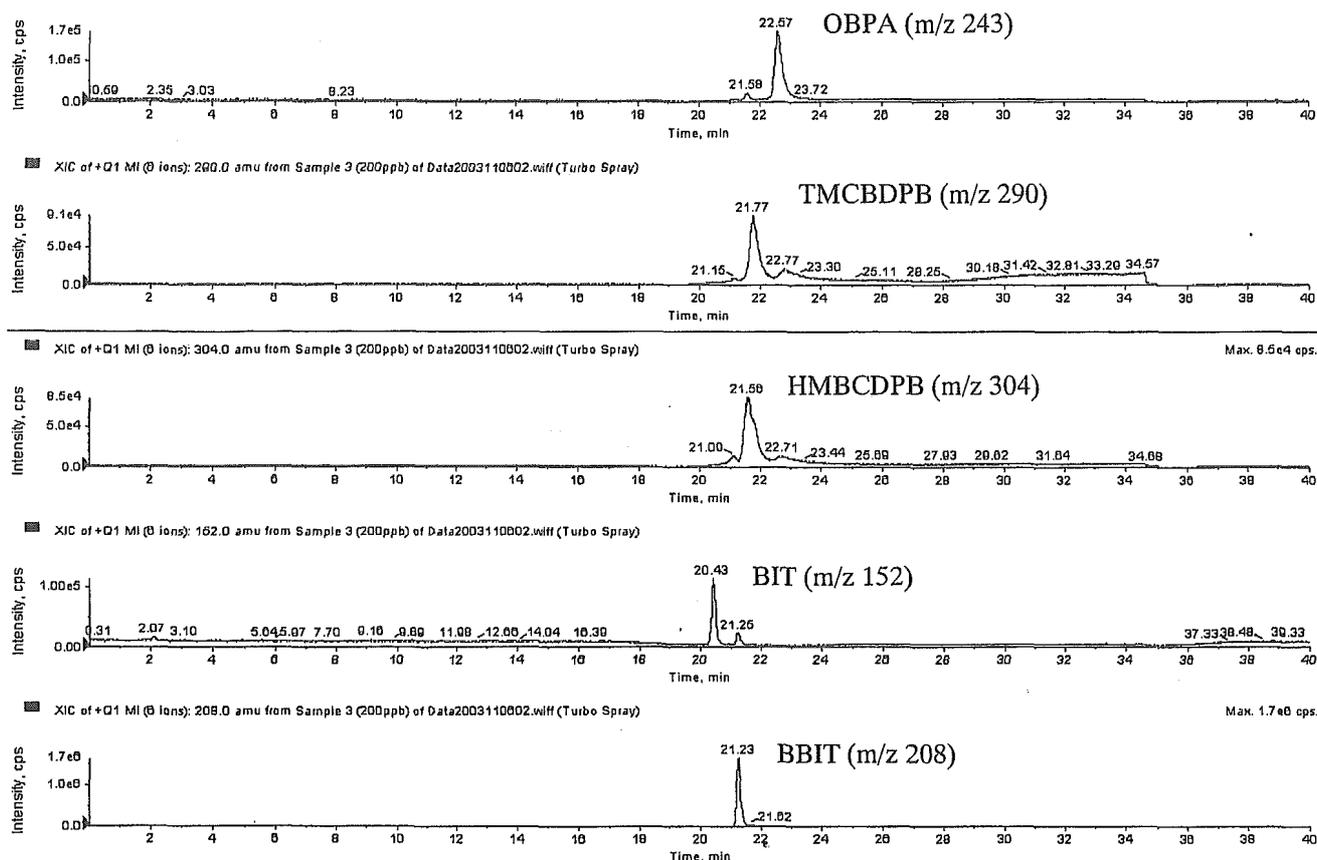


図3 アレルギー性化合物のマスククロマトグラム(200 ng/ml, 標準溶液, SIMモード)

ングの現象が見られた。そこで、ビニルポリマーを基材とした充填剤を用いた極性有機溶媒系GPCカラムであるVMPAK25を用いて、測定を行ったところ、比較的良好的な形状のピークがいずれの抗菌剤についても得られた。得られたマスククロマトグラムを図3に示す。

5. アレルギー性化合物のLC/MSによる測定

LC/MSを用い、5種のアレルギー性物質の検量線を作成した。検量線はSIMモードで行った(選択したイオンはOPBA: m/z 243, TMCBDPB: m/z 290, HMBCDPB: m/z 304, BIT: m/z 152, BBIT: m/z 208)。いずれの化合物についても10-1000ng/mlの濃度範囲で $r^2 > 0.999$ の良好な直線性を示した。

この測定条件を用いて、実試料についてアレルギー性化合物のスクリーニングに用いることができないか検討を行った。実際試料としては椅子の背もたれに用いられている細菌の合成人工皮革を用いた。人工皮革はさまざまな抗菌剤が使用され

てきた経緯があり、また、人工皮革との接触によりアレルギー症状が見られた例なども報告されている⁶⁾。それゆえ、人工皮革中のアレルギー性物質のスクリーニング法を確立することは重要である。そこで廃棄されていた椅子から人工皮革を採取し(n=4)、5種のアレルギー性物質のLC/MS分析を行った。抽出方法はOBPA分析における五十嵐らの方法を参照した。すなわち細かく切った人工皮革(1gの試料を約1mm×1mmとなるようにはさみで裁断する。)にメタノール5mlを抽出溶媒として加え、30分間、振とう抽出した。溶液をろ過し、LC/MSに注入して測定を行った。今回、分析を行った人工皮革からアレルギー性物質はいずれも検出されなかった。五十嵐らは、UV検出法により古い時代の人工皮革についてOBPAを検出している⁶⁾。本研究のLC/MS法ではその検出濃度に充分対応できるが、最近の試料ではOBPAが使用されていない可能性が高い。

6. おわりに

5種のアレルギー性物質の一斉スクリーニングにLC/MSを用いる手法を示した。

なお、五十嵐らはHPLCを用いたOBPAの分析法を報告している。彼らの方法における問題点はUV検出法の選択性の低さからOBPAのピークがマトリックスピークと区別するのが困難である点であった。本報で述べたLC/MSによる分析法はMSを検出器として用いた結果、UV検出と比較し、選択性が高く、マトリックスの影響を受けにくい。実際、OBPAに対応するm/z 243におけるSIMモードのマスキロマトグラムにおいては、実試料の測定においても、ほとんどマトリックス由来のピークは見られなかった。

本手法は定量に用いるためには、抽出方法などについてさらなる検討が必要なものの、簡易スクリーニング法としては、人工皮革以外のさまざまな試料についても応用が可能であると考えられ

る。抗菌剤にはアレルギー性を示すものが少なくないが、近年、さかんに販売されている「抗菌グッズ」にどのような抗菌剤が使用されているかは、ほとんど不明である。これら抗菌グッズによるアレルギー症例が起こった際、本法は原因物質を特定するために、有用な手法となるであろう。

—参考文献—

- 1) 伊藤幸治：環境問題としてのアレルギー，NHKブックス（日本放送出版協会），東京，1995
- 2) 清水 充，山野哲夫，野田 勉：大阪市立環境科学研究所報告 調査研究年報 第64集，54-57，2002
- 3) 清水 充，山野哲夫，野田 勉：大阪市立環境科学研究所報告 調査研究年報 第64集，1-5，2002
- 4) 野田 勉，山野哲夫，清水 充：大阪市立環境科学研究所報告 調査研究年報 第60集，24-34，1998
- 5) 野田 勉，山野哲夫，清水 充：生活衛生，45，137-142，2001
- 6) 五十嵐良明，鹿庭正昭，中村晃忠：薬学雑誌，120（9），795-799，2000

ラットの胎児期および新生児期に4-nonylphenolあるいはbisphenol Aを
暴露したときの雌雄生殖器官への影響—雌雄生殖器官の組織学的変化—

清水 充, 山野哲夫, 野田 勉

Effects of prenatal and/or neonatal exposure to 4-nonylphenol or bisphenol A on the reproductive organs in
male and female rats —Histological findings—

Mitsuru SHIMIZU, Tetsuo YAMANO and Tsutomu NODA

Abstract

In the present study, we examined histopathologically the effects of prenatal and neonatal treatment with nonylphenol (NP) or bisphenol A (BPA) on the reproductive organs of rats. Pregnant Wistar rats were treated with NP (0, 0.02 and 2 mg/kg, s.c.) from gestational day 14 to postnatal day (PND) 6. Half of the F₁ rats from each dam were further treated with NP (0, 0.02 and 2 mg/head, s.c., corresponding to the respective maternal dose) from PND 0 to 6. Histopathological examinations were performed at 6 months of age. Only female F₁ rats treated both prenatally and neonatally with the higher dose of NP (2 mg/head, almost 200-400 mg/kg) exhibited abnormal changes in the uterus and ovary, such as cystic ovaries without corpora lutea and endometrial hyperplasias. However, male F₁ rats treated both prenatally and neonatally with NP showed no histological abnormality of the reproductive organs, including testis, epididymis, prostate and seminal vesicle.

In the second study, neonatal rats of both sexes were treated with BPA (0, 0.04, 0.4 and 4 mg/kg, s.c.) from PND 0 to 2. In this case too, histopathological changes in reproductive organs at 6 months of age were observed only in female rats treated with the highest dose (4 mg/head, almost 400-800 mg/kg) of BPA. While the spectrum of histopathological findings was somewhat different between NP and BPA, the male rats treated postnatally with BPA again showed no histopathological abnormality of the reproductive organs. These results suggest that neonatal exposure to NP or BPA affects reproductive organs in female rats but not in male rats.

Key words : nonylphenol, bisphenol A, rat, reproduction, histopathology

緒 言

内分泌攪乱化学物質がヒトや野生生物に与える影響が懸念されている。nonylphenol (NP) は洗剤の原料やゴム, プラスチックの添加剤として, bisphenol A (BPA) はポリカーボネート樹脂の原料等として大量に使用される。NPおよびBPAはいずれも内分泌攪乱作用が疑われる化学物質である¹⁾。NPおよびBPAは*in vitro*におけるMCF-7細胞を用いた増殖試験^{2,3)}, 酵母を用いたエストロゲン作用試験⁴⁾, さらにラットを用いた子宮肥大試験で弱いエストロゲン作用^{5,6)}を有することが報告されている。

著者らは妊娠14日から出生後6日まで妊娠ラットに

NPを皮下投与し, さらに雌雄の新生児にも生後0~6日までNPを皮下投与した結果, 雄児では生殖器官への影響が見られなかったが, 雌児ではNP皮下投与により生殖能や生殖器の影響が見られたことを報告した⁷⁾。

BPAについても著者らはラットの新生児期におけるBPAの皮下投与によって, 雌児では生殖器への影響が見られ, 雄児でも軽度な生殖器への影響が見られたことを報告した⁸⁾。そこで本報は, 胎児期および新生児期にNPを暴露した生後6月齢ラットおよびBPAを新生児期に暴露した生後6月齢ラットの生殖器の病理組織学的変化について報告する。

大阪市立環境科学研究所

〒543-0026 大阪市天王寺区東上町8-34

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

実験材料および方法

1. 試 薬

4-nonylphenol (NP) は関東化学 (株) から、bisphenol A (BPA) は和光純薬から購入した。

2. 動 物

生後4週齢のJcl:Wistar系ラットを日本クレアから購入し、妊娠動物を得るために生後11週齢で未経産の雌と雄を1対1で同居させた。その後、毎朝膈垢を検鏡し、精子の確認された雌を交尾成立動物とし、その日を妊娠0日と起算した。妊娠17日から哺育21日まで床敷としてウッドチップを入れたプラスチック製エコケージ (日本クレア (株)) に個別に収容した。生後21日齢の新生児は金属製金網ケージに収容した。

飼料は妊娠期間および哺育期間ではオリエンタル酵母工業 (株) NMFを、新生児については生後21日齢からオリエンタル酵母工業 (株) のMFを自由に摂取させた。また、全期間を通じて飲料水として水道水を自由に摂取させた。

3. 投与方法

3-1 NPの胎生期および新生児期投与

1群6匹の妊娠雌ラットに0, 0.02および2 mg/kgのNPを妊娠14日から出産後6日 (出産日を0日) まで皮下投与した。NPは局方オリブ油に溶解し、投与液量は1 ml/kgとした。NPを投与された母獣から生まれた新生児は一腹の雌雄を各々半分に分けて、一方にはさらに0, 0.02および2 mg/匹のNPをそれぞれの母獣の投与量に対応させて生後0~6日まで皮下投与した (新生児期群)。NPは局方オリブ油に溶解し、投与液量は25 μ l/匹とした。他方の新生児は無処置とした (胎生期群)。

3-2 BPAの新生児期投与

1群4匹のJcl:Wistar系妊娠ラットから生まれた新生児を用いた。雌雄の新生児に0, 0.04, 0.4および4 mg/匹のBPAを出生日から3日間 (生後0~2日) 連続

的に皮下投与した。BPAはdimethyl sulfoxideに溶解し、投与液量は25 μ l/匹とした。新生児は生後4日に可能な限り雌雄各4匹に間引きした。なお、BPA4 mg群は母獣4例のうち2例で生後5日までに全新生児が死亡した。

4. 病理組織学的検査

NPあるいはBPAを暴露した雌雄の新生児は生後6月齢にエーテル麻酔下で放血屠殺した。雄児について精巣、精囊腺、精巣上体、前立腺を、雌児について卵巣、子宮を摘出した。これらの臓器は0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリン液で固定した。パラフィン包埋後、薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色して組織学的検査を行った。

結 果

1. NPの胎生期および新生児期投与

Table 1 に胎生期群の組織学的検査の結果を示した。胎生期群はいずれの雄児ラットの精巣にも組織学的な変化は観察されなかった。また、精巣上体、前立腺および精囊にも組織学的な変化は認められなかった (Table 1)。さらに、雌児ラットでも卵巣および子宮に組織学的な変化は観察されなかった (Table 1)。

Table 2 に新生児期群の組織学的検査の結果を示した。NP 2 mg/匹を皮下投与した雌児ラットで、卵胞嚢胞および黄体形成不全を特徴とする萎縮性的変化が観察された (Fig. 1)。さらに同群の雌児ラットの子宮内膜上皮および子宮腺に組織学的な変化が見られた。子宮内膜上皮は高円柱状細胞で被われ、上皮内膜内に小腺組織の形成が観察された (Fig. 2)。子宮内膜上皮の間質層への増生が見られ、子宮腺の扁平上皮化生も観察される例もあった。しかし、NPを0.02 mg/匹を投与した雌児ラットでは卵巣および子宮に組織学的な変化は見られなかった (Table 2)。

一方、新生児群の雄児ラットでも精巣、精巣上体、前立腺および精囊に組織学的な変化は認められなかつ

Table 1 Histopathological findings of reproductive organs in offspring from dams treated with nonylphenol (NP) from gestational day 14 to postnatal day 6*

Organ	Findings	Male (mg/kg)			Female (mg/kg)		
		0	0	0	0	0.02	2
	No. of animals	11	12	15	6	9	10
Testis		ND	ND	ND	—	—	—
Epididymis		ND	ND	ND	—	—	—
Seminal vesicle		ND	ND	ND	—	—	—
Prostate		ND	ND	ND	—	—	—
Ovary		—	—	—	ND	ND	ND
Uterus		—	—	—	ND	ND	ND

ND: No abnormalities were detected.

*: Offsprings were not treated with NP.

Table 2 Histopathological findings of reproductive organs in offspring treated with nonylphenol (NP) from postnatal day 0 to 6

Organ	Findings	Male (mg/head)			Female (mg/head)		
		0 ^a	0.02 ^b	2 ^c	0 ^a	0.02 ^b	2 ^c
Testis	No. of animals	6	9	10	7	6	6
	Atrophy of seminiferous tube	0	1*	0	—	—	—
Epididymis	Decrease of sperm	0	1*	0	—	—	—
Seminal vesicle		ND	ND	ND	—	—	—
Prostate		ND	ND	ND	—	—	—
Ovary		—	—	—	—	—	—
Uterus	Atrophy	—	—	—	0	0	6
	Follicular cysts	—	—	—	0	0	6
	Absence of corpus lutea	—	—	—	0	0	6
	Hyperplasia of epithelium	—	—	—	0	0	4
	Metastasis of uterine glands	—	—	—	0	0	2
	Atrophy of endmetrium	—	—	—	0	0	2
	Atrophy of uterine glands	—	—	—	0	0	2
	Dilatation of lumen	—	—	—	0	0	2
Infiltration inflammatory cell in lumen	—	—	—	0	0	2	

ND : No abnormalities were detected.

a : Dams were treated with nonylphenol 0mg/kg from gestational day 14 to postnatal day 6.

b : Dams were treated with nonylphenol 0.02mg/kg from gestational day 14 to postnatal day 6.

c : Dams were treated with nonylphenol 2mg/kg from gestational day 14 to postnatal day 6.

* : Unilateral organ

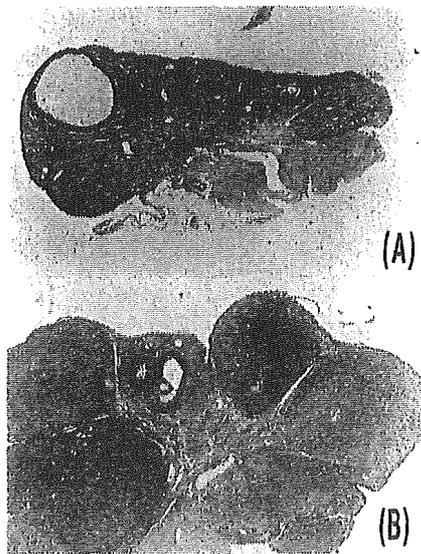


Fig. 1 Ovary in female rats, from whose dams were treated with nonylphenol (NP, 2 mg/kg, s.c.), treated with NP 2 mg/head from postnatal day 0 to 6 (A), and in control rats (B). A: Note follicular cysts and complete absence of normal corpora lutea in the ovary from the NP-treated rat. B: Histological abnormalities were not observed in control rat. H & E staining, 30 \times .

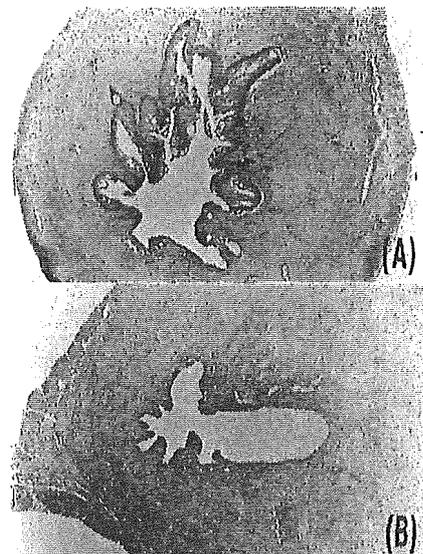


Fig. 2 Uterus in female rats, from whose dams were treated with nonylphenol (NP, 2 mg/kg, s.c.), treated with NP 2 mg/head from postnatal day 0 to 6 (A), and in control rats (B). A: Note endometrial hyperplasia and gland formation in the endometrial lining epithelium in NP-treated rat. B: Histological abnormalities were not observed in control rat. H & E staining, 100 \times .

Table 3 Histopathological findings of reproductive organs in offspring treated with bisphenol A (BPA) from postnatal day 0 to 6

Organ	Findings	Male (mg/head)				Female (mg/head)			
		0	0.04	0.4	4	0	0.04	0.4	4
	No. of animals	16	16	16	7	16	16	16	10
Testis		ND	ND	ND	ND	—	—	—	—
Epididymis		ND	ND	ND	ND	—	—	—	—
Seminal vesicle		ND	ND	ND	ND	—	—	—	—
Prostate		ND	ND	ND	ND	—	—	—	—
Ovary		—	—	—	—				
	Atrophy					0	0	0	5
	Follicular cysts					0	0	0	5
	Atretic follicles					0	0	0	5
	Absence of corpus lutea					0	0	0	5
Uterus		—	—	—	—				
	Atrophy of endometrium					0	0	0	5
	Atrophy of uterine glands					0	0	0	5

ND : No abnormalities were detected.

* : Dams were not treated with BPA.

た. 0.02mg/匹を投与した雄児1例のみに左精巣の精細管萎縮, および左精巣上体管内の精子減少が見られたが, 同例の前立腺および精囊には全く異常が見られなかった (Table 2). この精巣の萎縮性変化が片側のかつ単発例であることから, 自然発症的な変化とした.

2. BPAの新生児期投与

Table 3 にBPAを新生児期に投与した生後6月齢雌

雄ラットの生殖臓器の組織学的検査の結果を示した. BPAを投与したいずれの雄児ラットも, 精巣の組織学的な変化は観察されなかった. また, 精巣上体, 前立腺および精囊にも組織学的な変化は認められなかった (Table 3).

一方, BPA 4 mg/匹を投与した雌児ラットでは, 10例中5例に卵巣で卵胞嚢胞, 閉鎖卵胞および黄体形成

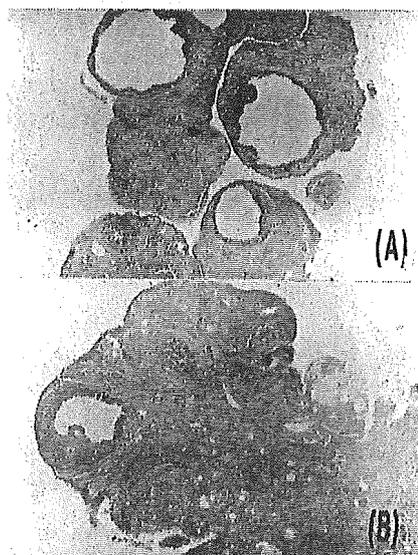


Fig. 3 Ovary in female rats treated with bisphenol A (BPA) 4 mg/head from postnatal day 0 to 2 (A), and in control rats (B). A: Note multiple follicular cysts and complete absence of normal corpora lutea in the ovary from the BPA-treated rat. B: Histological abnormalities were not observed in control rat. H & E staining, 30 \times .

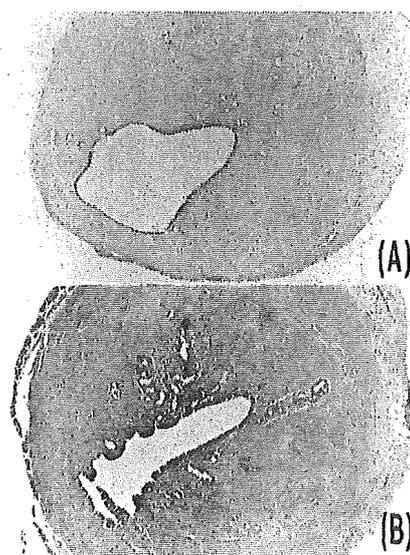


Fig. 4 Uterus in female rat treated with BPA 4 mg/head from postnatal day 0 to 2 (A), and in control rat (B). A: Note the endometrial atrophy and a reduction in size of uterine glands on BPA-treated rat. B: Histological abnormalities were not observed in control rat. H & E staining, 100 \times .