

1992:

4. **Gunnar Aronsson, Ulf Bergqvist och Sofi Almers:**  
Arbetsorganisation och muskuloskeletala besvär vid bildskärmsarbete. En empirisk studie vid televerket, ett landsting och en kommun.
5. **Margareta Bergkvist, Gudrun Hedberg och Majken Rahm:**  
Utvärdering av test för bedömning av styrka, rörlighet och koordination.
6. **Per Lundberg (Ed):**  
Scientific Basis for Swedish Occupational Standards XII.
7. **Anton AE Wibowo:**  
DEC and SCG Basis for an Occupational Health Standard. Gasoline.
8. **Ewa Menckel:**  
Följ upp och värdera för att förändra. Om företagshälsovårdens utvärderingsarbete.
9. **Margareta Dallner och Francesco Gamberale:**  
Utveckling och prövning av en dagbok för registrering av muskuloskeletala belastningar och besvär.
10. **Lars Olander:**  
Laser printers and air contaminants. A review.
11. **Berit Nilsson och Elsy Jönsson:**  
Arbetsrelaterade sjukdomars sociala och psykosociala konsekvenser – uppföljning av patienter vid yrkesmedicinsk klinik.
12. **Marianne Byström, Anders Kjellberg och Ulf Landström:**  
Störningströsklar för kontinuerligt och intermitterant buller under arbete med olika uppgifter.
13. **Francesco Gamberale, Birgitta Anshelm Olson, Susann Lindblom Häggqvist och Maria Tesarz:**  
Det goda arbetet. En enkätundersökning bland gymnasieungdomar.
14. **Jan-Erik Hansson, Steve Kihlberg, Lennart Andersson, Martin Friberg, Anita Isaksson och Tomas Wilhelm:**  
Förararbetsplatser. Maximal förmåga till kroppsvridning samt maximal förmåga till kraftutveckling vid reglagemanövrering.
15. **Anders Kjellberg, Per Andersson, Björn Sköldström och Lennart Lindberg:**  
Trötthet hos flygtekniker efter låg och hög bullerexponering.
16. **Gunnevi Sundelin:**  
Electromyography of shoulder muscles – the effects of pauses, drafts and repetitive work cycles.
17. **Mats Hagberg and Åsa Kilbom (Eds):**  
International Scientific Conference on Prevention of Work-related Musculoskeletal Disorders. PREMUS, Sweden, May 12–14, 1992. Book of abstracts.
18. **Bengt-Olov Wikström:**  
Effekter av vridna kroppsställningar och helkroppsvibrationer. En fältundersökning med yrkesförare.
19. **Anders Iregren, Maria Tesarz och Ewa Wigaeus-Hjelm:**  
Exponering för metylisobutylketon. Psykofysiologiska effekter.
20. **Birgit Pingel och Hans Robertsson:**  
Arbetsorganisation inom sjukvården ur ett socialpsykologiskt perspektiv. En översikt över forskning och utvecklingsarbete inom landstingen.
21. **Gunnar Johanson och Elisabeth Lagerlöf (Eds):**  
Aktuell forskning om lösningsmedel i arbetsmiljön. Sammanfattning av några aktuella huvudområden.
22. **Elisabeth Åberg och Gunnela Westlander:**  
Kontorsarbetsplatser. Metodik för uppföljning av arbetsmiljön. Tre verklighetsanpassade modeller.
23. **May Hultengren, Ingemar Axelsson, Stina Johnsson och Gunnar Rosén:**  
Yrkeshygieniska risker vid ytbehandling i träindustrin. Exponering för formaldehyd och lösningsmedel vid industriell ytbehandling med syrahärdande färger och lacker.
24. **Nils F Petersson:**  
Städarbete 1970–1990. Arbetsbelastning – risker och åtgärder.
25. **Gunnar Rosén, Ing-Marie Andersson, Leif Juringe och Lars Rask:**  
PIMEX. En metod för arbetsmiljöförbättringar.
26. **Gunnar Nordberg:**  
Nordiska Expertgruppen för Gränsvärdesdokumentation. 101. Kadmium.
27. **Per Lundberg:**  
NEG and DECOS Basis for an Occupational Standard. Methyl Chloride.
28. **Mats Hagberg, Jan Fridén, Ulf Järholm, Ulf Lindblom, Steven J Linton och Berndt Stenlund:**  
Värk i nacke och skuldra – belastningsskador eller?
29. **Åsa Kilbom (Ed):**  
Early retirement and social security systems. – The situation of elderly workers in Denmark, Finland, Norway and Sweden.
30. **Björn Arvidson:**  
NEG and NIOSH Basis for an Occupational Health Standard. Ethyl ether.
31. **Björn Hellman:**  
NIOH and NIOSH Basis for an Occupational Standard. Chlorobenzene.

## Nordiska Expertgruppen för Gränsvärdesdokumentation

### 107. Limonen

Ann-Therése Karlberg  
Birgitta Lindell

## ARBETE OCH HÄLSA

Redaktör: Anders Kjellberg  
Redaktionskommitté: Åsa Kilbom, Elisabeth Lagerlöf,  
Anders Colmsjö och Nils Stjernberg.  
Grafisk produktion: Eva Nilsson  
© Arbetsmiljöstiftelsen och författarna.

*Vid Arbetsmiljöinstitutet arbetar drygt 300 forskare med arbetslivets miljö. Forskningen leds av 30 professorer. Institutet bedriver i stor utsträckning tillämpad forskning, men vissa problemområden kräver också riktad grundforskning.*

*Institutets vetenskapliga kompetens finns inom sex olika ämnesområden: fysiologi, kemi, medicin, psykologi, teknik och toxikologi. Denna breda kompetens gör att olika problem kan angripas tvärvetenskapligt.*

*Institutet svarar för utbildning av företagsläkare, företagssköterskor, skyddsingenjörer, sjukgymnaster och beteendevetare inom företagshälsovården.*

*Information om arbetsmiljöforskning är en annan viktig uppgift för institutet.*

© Arbetsmiljöinstitutet och författarna 1993

ISBN 91-7045-217-2

ISSN 0346-7821

## Förord

Inom Nordiska Ministerrådets projekt för dokumentation av yrkeshygieniska gränsvärden har bildats en expertgrupp för att leda arbetet. Den består för närvarande av:

- |                      |  |
|----------------------|--|
| •Helgi Gudbergsson   | Heilsuverndarstödin, Reykjavik           |
| •Petter Kristensen   | Statens Arbeidsmiljøinstitutt, Oslo      |
| •Per Lundberg (ordf) | Arbetsmiljöinstitutet, Solna             |
| •Vesa Riihimäki      | Institutet för arbetshygien, Helsingfors |
| •Adolf Schaich Fries | Arbejdsmiljøinstituttet, København       |

Målsättningen för arbetet är att ge ett vetenskapligt underlag inför diskussion om yrkeshygieniskt gränsvärde. Underlaget syftar till att från publicerad vetenskaplig litteratur komma fram till ett dos-respons-/dos-effekt-förhållande och en kritisk effekt, så långt detta är möjligt. Det är däremot inte expertgruppens uppgift att ge direkta förslag till gränsvärden.

Det insamlade materialet värderas och ett dokumentförslag utarbetas av författare som föreslås av expertgruppen. Den nationelle ledamoten fungerar som referent. Förslaget diskuteras av expertgruppen och bearbetas därefter av författaren innan det blir antaget.

Redaktionell granskning sker vid gruppens sekretariat vid Arbetsmiljöinstitutet i Solna. Vetenskaplig sekreterare är Brita Beije.

Endast artiklar som bedömts vara pålitliga och av betydelse för just denna diskussion återopas i detta dokument.

Biologiska halter är angivna i mol/l eller mg/kg, lufthalter i mg/m<sup>3</sup>. Om halterna i de refererade arbetena ej är uttryckta i dessa sorter är de såvitt möjligt omräknade med angivelse av den ursprungliga sorten inom parentes.

Värderingen av det insamlade materialet och sammanställningen av detta dokument har utförts av doktor Ann-Therése Karlberg och apotekare Birgitta Lindell, Arbetsmiljöinstitutet, Solna.

Dokumentförslaget har vid expertgruppens möte den 2 december 1992 antagits som dess dokument.

Brita Beije  
Sekreterare

Per Lundberg  
Ordförande

# Innehåll

1. Fysikaliska och kemiska data	1
2. Användning och förekomst	4
2.1. Användning	4
2.2. Luftkoncentration i arbetsmiljö	5
2.3. Luftkoncentration i hemmiljö	6
2.4. Metoder för att analysera lufthalter	6
3. Toxikokinetik	6
3.1. Upptag	6
3.1.1. Upptag genom inhalation	6
3.1.2. Hudupptag	7
3.1.3. Upptag från mag-tarmkanalen	7
3.2. Distribution	8
3.3. Biotransformation	8
3.4. Eliminering	10
4. Allmän toxicologi	10
4.1. Toxicologiska mekanismer	10
4.2. Akut toxicitet	12
4.3. Kronisk toxicitet	13
5. Organeffekter	13
5.1. Effekter på hud och slemhinnor	13
5.1.1. Irritation	13
5.1.2. Allergi	14
5.2. Effekter på andningsorganen	15
5.3. Effekter på lever	16
5.4. Effekter på njurar	17
5.5. Effekter på mag-tarmkanalen	19
5.6. Effekter på hjärta och blodkärl	19
5.7. Effekter på blod och blodbildande organ	19
5.8. Effekter på nervsystemet	19
6. Immunotoxicitet och allergi	20
6.1. Immunotoxicitet	20
6.2. Allergi	20
7. Mutagenicitet, genotoxicitet	21
8. Carcinogenicitet	21
9. Reproduktionstoxicologi	24
10. Samband mellan exponering, effekt och respons	24
11. Forskningsbehov	27

12. Diskussion och värdering	27
13. Sammanfattning	29
14. Summary	29
15. Referenser	30
Appendix	

27  
29  
29  
30

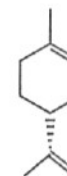
## 1. Fysikaliska och kemiska data

### *d-Limonen*

CAS nummer:	5989-27-5
Kemiskt namn:	(R)-1-metyl-4-(1-metylenetyl)cyklohexen
Synonymer:	(R)-(+)-limonen (+)-limonen (R)-limonen (R)-(+)-p-menta-1,8-dien

Bruttoformel: C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>

Strukturformel:



Molekylvikt:	136,23
Ångtryck (20°C):	0,19 kPa *
Täthet (20°C):	0,8411
Smältpunkt:	-74,35°C
Flampunkt:	48°C
Kokpunkt:	175,5-176,0°C
Optisk vridning ( $\alpha$ ) (20°C):	+125,6°

Omräkningsfaktor: 1ppm = 5,56 mg/m<sup>3</sup>      1mg/m<sup>3</sup> = 0,177ppm

\* Uträknad på basis av litteraturdata.

*d*-Limonen är en färglös lättantändlig vätska med lukt av citron som är löslig i organiska lösningsmedel, men praktiskt taget olöslig i vatten (9, 17, 45, 70, 86, 99, 131).

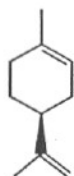
*d*-Limonen återfinns huvudsakligen i olja från skal av citrusfrukter, men förekommer även i många andra eteriska oljor såsom olja från kummin, dill, fänkål och selleri samt i terpentin. *d*-Limonen erhålls som biprodukt vid

tillverkning av framförallt apelsinjuice. Sedan juicen extraherats på mekanisk väg behandlas skalen från citrusfrukterna med alkali (0,15-0,30% kalciumhydroxid), varefter de pressas. Pressvätskan destilleras och d-limonen återvinns genom kondensation. Destillatet innehåller 90-98% d-limonen. De huvudsakliga föreningarna utgörs av andra monoterpener såsom myrcen,  $\alpha$ - och  $\beta$ -pinen, sabinen och  $\Delta^3$ -karen. Limonen oxideras lätt av luftens syre, varvid olika oxidationsprodukter bildas (karvon, limonenoxid, karveol och limonenhydroperoxider). Autooxidationen ger vätskan en gulaktig färg. Om oxidationsprocessen fortsätter bildas polymerer, vilket gör vätskan viskös (68, 69, 110, 119).

#### *l-Limonen*

CAS nummer: 5989-54-8  
 Kemiskt namn: (S)-1-metyl-4-(1-metyletenyl)cyklohexen  
 Synonymer: (S)-(-)-limonen  
 (-)-limonen  
 (S)-limonen  
 (S)-(-)-p-menta-1,8-dien  
 Bruttoformel:  $C_{10}H_{16}$

Strukturformel:



Molekylvikt: 136,23  
 Ångtryck (20°C): 0,19 kPa\*  
 Täthet (20°C): 0,8422  
 Smältpunkt: -74,35°C  
 Flampunkt: 48°C  
 Kokpunkt: 175,5-176,0°C  
 Optisk vridning ( $\alpha$ ) (20°C): -122,1°

Omräkningsfaktor: 1ppm = 5,56 mg/m<sup>3</sup>    1mg/m<sup>3</sup> = 0,177ppm

\* Uträknad på basis av litteraturdata.

Beskrivning se ovan för d-limonen.

l-Limonen återfinns huvudsakligen i tallbarrsolja och terpentin men också t ex i grönnymta och pepparmint. l-Limonen erhålls genom att monoterpener från vissa tallbarrsoljor renas och separeras eller på syntetisk väg genom syrakatalys av pinen (9, 17, 45, 70, 86, 100, 131).

#### *Dipenten*

CAS nummer: 138-86-3  
 Kemiskt namn: 1-metyl-4-(1-metyletenyl)cyklohexen  
 Synonymer: dl-limonen  
 p-menta-1,8-dien  
 4-isopropenyl-1-metyl-1-cyklohexen

Bruttoformel:  $C_{10}H_{16}$

Molekylvikt: 136,23

Ångtryck (20°C): 0,19 kPa\*

Täthet (20°C): 0,8402

Smältpunkt: -95,9°C

Flampunkt: 43°C

Kokpunkt: 175,5-176,0°C

Omräkningsfaktor: 1ppm = 5,56 mg/m<sup>3</sup>    1mg/m<sup>3</sup> = 0,177ppm

\* Uträknad på basis av litteraturdata.

Beskrivning se ovan för d-limonen.

Dipenten är den racemiska blandningen av d- och l-limonen och erhålls genom att man blandar lika delar av dessa. Dipenten med hög renhetsgrad (95%) kan framställas av  $\alpha$ -pinen (9, 17, 45, 70, 86, 131).

## 2. Användning och förekomst

### 2.1. Användning

#### *d-Limonen*

d-Limonen har börjat användas inom industrin som ersättningsmedel för klorerade kolväten, klorfluorkolväten (CFC) och andra organiska lösningsmedel. d-Limonen används som avfettningsmedel (limonenhalt ca 30%) före lackering av olika industriprodukter, för rengöring av kretskort inom elektronikindustrin (limonenhalt 50-100%), för att rengöra tryckvalsar i tryckerier (limonenhalt 30%-100%) samt som lösningsmedel i färger. I många histologiska laboratorier har d-limonen ersatt xylen.

d-Limonen används vidare som parfym och som födoämnestillsats i koncentrationer mellan 0,005% och 1% (99). Det används ofta som tillsatsämne i parfym eftersom det anses ha en hämmande effekt på närbesläktade ämnens allergena kapacitet (99).

d-Limonen adderas till system för transdermal applikation av läkemedel för att öka penetrationen av den aktiva substansen (96, 103, 147).

d-Limonen kan också användas som ett antisvampmedel (93).

#### *l-Limonen*

l-Limonen används som parfym i koncentrationer mellan 0,005% och 1%, men framförallt används d-limonen.

#### *Dipenten*

Dipenten används i många produkter på samma sätt som d-limonen. Limonen (enantiomer form ej angiven) har en antimikrobiell effekt och verkar även hämmande på växt av virus, svamp och larver. Det kan även ha en attraherande eller repellerande effekt på insekter (115).

Enligt Kemikalieinspektionens i Sverige produktregister från augusti 1992 användes totalt 11-120 ton d-limonen i 24 olika produkter i Sverige. Motsvarande siffror för dipenten var 110-1700 ton och 49 olika produkter. Ingen användning av l-limonen rapporterades.

#### *d-Limonen*

Användningsområde	Antal	Konc. (%)	Total volym (ton)
Övriga färger och lacker	4	17 - 40	0,84 - 8,4
Rengöringsmedel och bilvårdsprodukter	7	0,1 - 15	1,9 - 17
Avfettningsmedel	9	5 - 99	6,8 - 83
Tvätmedel och lösningsmedel	2	99	0,99 - 9,9
Vätmedel	2	10 - 80	0,18 - 1,8
<b>Totalt</b>	<b>24</b>		<b>11 - 120</b>

#### *Dipenten*

Användningsområde	Antal	Konc. (%)	Total volym (ton)
Övriga färger och lacker	5	1 - 10	0,14 - 5,7
Rengöringsmedel	6	1,5 - 100	0,2 - 5,0
Avfettningsmedel, tvätmedel	6	2 - 100	3,5 - 32
Lösningsmedel	3	1 - 100	1,1 - 11
Flotationsmedel och friktionsmedel	2	5 - 25	0,60 - 10
Färger, lacker, färgborttagningsmedel och lim	15	1 - 30	100 - 1500
Polermedel	4	1 - 10	0,016 - 0,22
Spädningsmedel (för färg o dyl.)	6	1 - 100	0,26 - 11
Övrigt	2	4 - 6	4 - 50
<b>Totalt</b>	<b>49</b>		<b>110 - 1700</b>

### 2.2. Luftkoncentration i arbetsmiljö

#### *d-Limonen*

Luftkoncentrationen av d-limonen mättes i två fabriker under arbete med avfettning av metallytor före lackering. De avfettningsprodukter som används består vanligen av vatten, limonen och tensider i olika koncentrationer. I den första fabriken doppades detaljerna i ett inbyggt bad som innehöll 6% d-limonen. Lufthalter mellan 0,9-6 mg/m<sup>3</sup> uppmättes runt badet. I den andra fabriken utfördes avfettningen manuellt i ett öppet bad som innehöll 2-3% d-limonen, men också med hjälp av högtrycksspolning. Koncentrationen d-limonen i produkter för högtrycksspolning var 7%. Den genomsnittliga luftkoncentrationen uppmättes till omkring 50 mg/m<sup>3</sup> under en hel arbetsdag. Halten ökade till 80-100 mg/m<sup>3</sup> när den manuella tvätten utfördes och steg till ca 400 mg/m<sup>3</sup> vid högtryckstvätten.

Lufthalterna mättes också i en elektronikindustri vid tvätt av kretskort i ett litet inbyggt bad innehållande 46% d-limonen. Den genomsnittliga halten runt badet uppmättes till 10 mg/m<sup>3</sup>, men halter på upp till 200 mg/m<sup>3</sup> uppmättes vid de manuella momenten (13).

Lufthalten d-limonen i tryckerier där man använde limonenhaltiga medel för valstvätt har undersökts i två studier. I den ena undersökningen uppmättes en halt av i medeltal 69,7 mg/m<sup>3</sup> för stationära prover och 22,7 mg/m<sup>3</sup> för personburna prover (16), medan det i den andra studien endast uppmättes halter på ca 2 mg/m<sup>3</sup> för personburna prover (13). Produkterna i den första studien innehöll omkring 50% d-limonen, 15% glykoletrar, 15% naturliga oljor och 5% tensider.

#### *l-Limonen*

Uppgifter saknas.

### *Dipenten*

Den totala lufthalten av terpenerna  $\alpha$ - och  $\beta$ -pinen,  $\Delta^3$ -karen och limonen mättes i fyra snickerier. Den totala halten varierade mellan 19-123 mg/m<sup>3</sup> och förhållandet mellan de olika terpenerna var 10:0,8:4:0,2. Koncentrationen limonen i luften var således mycket låg (31).

Halten limonen i luft mättes på 16 olika arbetsplatser i Norge under åren 1985 - 1992 enligt uppgifter från "National Exposure Database" vid Statens Arbeidsmiljöinstitut i Oslo. De flesta mätningarna hade företagits i tryckerier. Det aritmetiska medelvärdet för alla mätningar var 28 mg/m<sup>3</sup> (spridning 0-886 mg/m<sup>3</sup>) (41).

## 2.3. Luftkoncentration i hemmiljö

Halten limonen (enantiomer form ej angiven) i inomhus- och utomhusluft har undersökts i Los Angeles. Mätningarna utfördes huvudsakligen genom provtagning under två på varandra följande 12 timmars pass (kl. 06-18 och kl. 18-06). Det aritmetiska medelvärdet för personlig exponering dagtid och för koncentration i inomhusluft uppgick båda till  $4 \times 10^{-2}$  mg/m<sup>3</sup>, medan motsvarande värde för utomhusluft var  $0,2 \times 10^{-2}$  mg/m<sup>3</sup>. Prov från utandningsluft tagna kväll, morgon och påföljande kväll visade avsevärd stabilitet fastän den personliga exponeringen kunde variera. Mediankoncentrationerna av limonen i utandningsluft uppgick till  $1,2-2,4 \times 10^{-2}$  mg/m<sup>3</sup> (139).

## 2.4. Metoder för att analysera lufthalter

Provtagning av terpenier i luft kan ske på kolrör. Terpenerna desorberas med koldisulfid varefter analysen sker med gaskromatografi (85). Metoden har använts för flödes hastigheter på 7,2 ml/min (32), 30 ml/min (122) och 50 ml/min vid långtidsuppsamling samt även för hastigheter på 250 ml/min vid korttidsuppsamling (13).

## 3. Toxikokinetik

### 3.1. Upptag

#### 3.1.1. Upptag genom inhalation

d-Limonen har relativt hög löslighet i humant blod och tas lätt upp från alveolerna. Fördelningskoefficienten blod/luft in vitro är 42 (37). Det relativa upptaget av d-limonen, hos frivilliga försökspersoner exponerade 2 timmar under lätt fysiskt arbete (50W) för 10, 225 eller 450 mg d-limonen/m<sup>3</sup>, har vid de båda högsta koncentrationerna bestämts till i genomsnitt 68% och vid den lägsta exponeringsnivån till 63% (38). Halten d-limonen i arteriellt blod rapporterades öka snabbt till en början, men nådde mot slutet av exponeringen en jämnare nivå (38).

### 3.1.2. Hudupptag

#### d-Limonen

Det finns mycket få uppgifter om hudupptag av d-limonen. I en experimentell humanstudie fann man att halten d-limonen i blodet, efter 2 timmars exponering av ena handen i d-limonen (98%), var låg jämfört med inhalationsexponering (10 mg/m<sup>3</sup>, 50W). Maximal halt (appr.  $1,4 \times 10^{-6}$  mol/l) av d-limonen uppnåddes i det arteriella kapillärblodet i den icke-exponerade handen 140 min efter det att exponeringen startat. Denna nivå bibehölls under den tid mätningarna pågick (240 min) (36).

Effekten av att applicera ett kommersiellt insektsmedel bestående av 78,2% d-limonen och en nonjontensid (polysorbate 80), en enstaka gång på huden har studerats på katt. Katter i olika grupper doppades i insektsmedlet i olika koncentrationer av limonen i vatten ( $6,5 \times 10^{-2}$  mol/l - 1 mol/l). Upptaget genom huden mättes inte, men en toxikologisk systemeffekt noterades vid högre koncentrationer. Man måste emellertid även räkna med en påverkan på grund av inandning och att katterna slickade sig. Andra komponenter i medlet som inte deklarerats kan också ha påverkat resultatet (58).

d-Limonen används för att öka penetrationen vid transdermal läkemedelsapplikation (103, 130). Denna effekt anses bero på nedbrytning av lipiderna i hornlagret (147).

#### l-Limonen

Genom att mäta utandningsluften från olika försökspersoner bestämdes hudupptaget av limonen från bad innehållande olika koncentrationer tallbarrsolja. Enantiomer form är inte angiven men enligt uppgift i litteraturen är det huvudsakligen l-limonen som återfinns i tallbarrsolja. Den del av limonen som eliminerades oförändrad med utandningsluften kunde bestämmas genom ett förförsök varvid kända mängder limonen injicerades intravenöst. Författarna beräknade att absorptions hastigheten för limonen var ca  $0,02 \mu\text{l}/\text{cm}^2 \times \text{h}$ , vilket är i samma storleksordning som upptag av syre, radon och koldioxid, men 100 gånger högre än för vatten (113).

### *Dipenten*

Den perkutana absorptionen av dipenten (tillsammans med mentol, kamfer, isoborneolacetat och  $\beta$ -pinen) i ett skumbad mättes på möss genom användning av radioaktivt märkta ingredienser. Koncentrationen dipenten i badet var  $1,9 \times 10^{-5}$  mol/l (2,62  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Exponeringstiden (5-40 min) varierades liksom den rakade och epilerade hudytan (1,5-6 cm<sup>2</sup>). Halten dipenten i blodet utgjorde en direkt funktion av storleken på den involverade hudytan. En maximal blodnivå på ca  $11 \times 10^{-2}$  mg dipenten/l blod erhöles efter 10 minuter vid exponering av en 6 cm<sup>2</sup> stor hudyta (121).

#### 3.1.3. Upptag från mag-tarmkanalen

d-Limonen tas upp snabbt från mag-tarmkanalen. Efter oral administration av 800 mg <sup>14</sup>C-märkt d-limonen/kg kroppsvikt till råttor rapporterades mängden radioaktivitet i blod vara maximal 2 timmar efter administrationen för att sedan,

efter 10 timmar på en hög nivå, avsevärt minska. 24 timmar efter administrationen var mängden radioaktivitet i blod försumbar (60).

### 3.2. Distribution

Efter absorptionen försvinner d-limonen snabbt från blodet. Detta beror huvudsakligen på att ämnet distribueras till olika vävnader och metaboliseras. Clearance hos människa efter exponering för 450 mg/m<sup>3</sup>, uppmätt under 21 timmar efter avslutad exponering, har bestämts till 1,1 l/kg x timme (38). Affinitet till fettväv indikeras av hög löslighet av d-limonen i olivolja (beräknad fördelningskoefficient olja/blod=140) och en lång halveringstid i blod under den långsamma delen av eliminationsfasen (37,38).

I en studie på råttor uppmättes maximal radioaktivitet inom 2 timmar efter oral administration av 800 mg 14C-märkt d-limonen/kg kroppsvikt (60). Koncentrationerna i lever, njurar och binjuror var högre än i andra vävnader. Radioaktiviteten i levern var som högst en timme efter administrationen och motsvarade 2,5% av administrerad radioaktivitet (60). Andra vävnader än lever, njurar och blod innehöll vid alla mätillfällen mindre än 0,2% (60). Mängden radioaktivitet var försumbar i alla vävnader 48 timmar efter administrationen (60).

Skillnader mellan olika djurslag har observerats när det gäller renal disposition och proteinbindning av d-limonen. På råttor föreligger skillnader i renal disposition även mellan könen (82,146). 24 timmar efter administration av d-limonen via magsond till råttor har koncentrationen av d-limonenekvivalenter i njurarna hos handjur rapporterats vara ungefär 3 gånger högre än hos hondjur (80,82). Den totala mängden d-limonenekvivalenter i njurarna hos hanråttor representerade ca 0,15% av administrerad dos och av detta var ungefär 40% reversibelt bundet till  $\alpha_2$ -globulin, ett protein som är specifikt för hanråttor (80,82). Ingen signifikant interaktion mellan d-limonenekvivalenter och njurproteiner rapporterades hos bonråttor (80,82).

Inga könsskillnader har observerats på mus när det gäller renal disposition av d-limonen. 24 timmar efter en oral dos utgjorde mängden d-limonenekvivalenter i njurarna ca 0,02% av administrerad dos och det förelåg ingen bindning till proteiner i njurarna eller någon interaktion mellan d-limonenekvivalenter och det dominerande proteinet i urin hos hammus, MUP (79,80). Bindningsstudier in vitro har bekräftat att MUP inte binder d-limonen-1,2-oxid (80).

### 3.3. Biotransformation

Biotransformationen av d-limonen har undersökts på många olika djurslag. Det finns flera olika metabolismvägar, t ex oxidation av 8,9-dubbelbindningen eller 1,2-dubbelbindningen, oxidation av metylgrupper till hydroxyl- och vidare till karboxylsyra-derivat, ringhydroxylering vid C-1 och C-6 och glycin- eller glukuronidkonjugering. Speciesskillnader har observerats när det gäller plasma- och urinmetaboliter.

Hos människa omvandlas d-limonen i stor utsträckning till p-ment-1-en-8,9-diol (uroterpenol; se fig 1; M-II), som sedan utsöndras som en glukuronid (se fig 1; M-VI) i urinen (76,125). 8,9-Diolen bildas sannolikt från d-limonen-8,9-epoxid

(76,141). I en studie (76) rapporterades den procentuella utsöndringen i urinen av d-limonen-8,9-diol och dess glukuronid hos människa vara ungefär 25-30% av en oral dos, medan dessa metaboliter hos andra djurslag (se fig 1) utgjorde en ungefär lika stor eller en mindre del av urinmetaboliterna (76).

Oxidation av 1,2-dubbelbindningen har också beskrivits. I ett abstrakt (20) rapporterades limonen-1,2-diol ha påvisats i humant blod. I studier in vitro med levermikrosomer från mus och råttor har 1,2-epoxiden identifierats efter inkubation med d-limonen (79,141). Resultatet indikerade dock att cis-d-limonen-1,2-oxid förekom i ringa utsträckning hos mus och råttor och representerade mindre än 1% av den totala mängden metaboliserat d-limonen (79). Smärre mängder av trans-d-limonen-1, 2-oxid påträffades också, men endast hos mus (79,80).

En alternativ metabolismväg inkluderar perillsyra (se fig 1; M-III) och metaboliter erhållna efter omvandling av perillylalkohol och perillsyra (se fig 1; M-IV, M-VII, M-VIII, M-IX) (76,105). Ungefär 30-50% av en oralt administrerad dos rapporterades i en studie (76) utsöndras i urinen hos gnagare som perillsyra och senare metaboliter, medan motsvarande siffra för människa endast var 7-11%. Perillsyra, dihydroperillsyra och respektive metylestrar har också rapporterats förekomma i plasma hos råttor och människa efter administration av d-limonen eller apelsinolja innehållande 95% d-limonen (19,20). Både perillsyra och dihydroperillsyra uppgavs som huvudmetaboliter i plasma, såväl hos råttor som hos människa (20).

Andra vägar för biotransformation av d-limonen har också rapporterats förekomma. Ringhydroxylering vid C-6 (se fig 1; M-X, M-XI) och i viss utsträckning även C-1 (råttor) har observerats (76,105). Hos människa identifierades i en studie (76) mindre än 7% av dosen som en triol, troligen p-ment-1-en-6,8,9-triol (se fig 1; M-XI), i urinen efter peroral administration av d-limonen. Limonen-6-yl acetat har rapporterats förekomma i humanurin efter intag av tallolja innehållande 6% ospecificerat limonen och är också sannolikt en limonenmetabolit (77). Vidare har metaboliter erhållna efter oxidation av C-10-metylgruppen (se fig 1; M-I, M-V) rapporterats föreligga i urinen i smärre mängder (1% hos människa) efter administration av d-limonen (76).

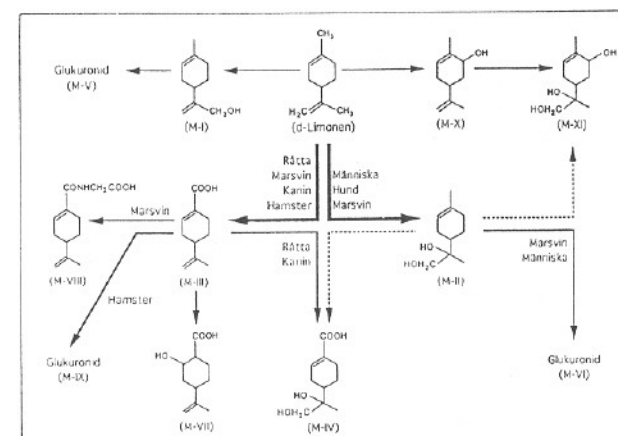


Fig 1. Några vägar för biotransformation av d-limonen (från ref 76).



### 3.4. Eliminering

Man har vid mätning av limonenkoncentrationen i humant blod, efter exponering genom inhalation under 2 timmar för 450 mg d-limonen/m<sup>3</sup>, visat att utsöndring sker i tre faser. Halveringstiderna rapporterades vara ungefär 3 minuter, 33 minuter och 750 minuter (38).

d-Limonen metaboliseras i mycket stor utsträckning. Metaboliterna utsöndras huvudsakligen i urinen. Manliga försökspersoner som erhöll 1,6 g 14-C-märkt d-limonen per os, rapporterades i en studie (76) utsöndra 55-83% av radioaktiviteten i urinen under 2 dagar. I en annan undersökning (38) på frivilliga försökspersoner med exponering genom inhalation (450 mg d-limonen/m<sup>3</sup> under 2 timmar) påvisades c:a 1% av det totala upptaget i oförändrad form i utandningsluften efter avslutad exponering, medan 0,003% eliminerades i urinen. Utsöndringen av metaboliter hade inte undersökts i denna studie (38).

Vid peroral administration av 14C-märkt d-limonen till försöksdjur utsöndrades 60-95% av radioaktiviteten i urinen under 2-3 dagar, till största delen under de första 24 timmarna (60,73,76). Fekal utsöndring under 2-3 dagar rapporterades motsvara mindre än 10% av dosen och endast 2% av administrerad radioaktivitet återfanns inom 48 timmar som CO<sub>2</sub> i utandningsluften (60, 73,76). I en studie på råttor uppmättes inom 24 timmar c:a 25% av administrerad dos (14-C) i gallan (60).

## 4. Allmän toxikologi

Limonen oxideras lätt av luftens syre och kan därvid spontant bilda ett flertal andra produkter. Det är dock få studier över effekter av d-limonen (limonen) på organismen, i vilka hänsyn tagits till detta faktum. De effekter som studerats kan sålunda åtminstone till en del vara orsakade av andra produkter än limonen per se och/eller dess metaboliter.

### 4.1. Toxikologiska mekanismer

Vid peroral administration av d-limonen har man i djurexperimentella studier observerat en effekt på kolesterolnivåerna i serum och lever (4,104,145). Orsaker till de minskade kolesterolnivåer som noterats hos råttor, kan vara en ökad nedbrytning eller minskat upptag av kolesterol från mag-tarmkanalen (4). Minskad aktivitet av enzymet 3-hydroxi-3-metylglutaryl-coenzym A (HMG-CoA) reduktas i levern har emellertid också rapporterats (14,104). En möjlighet är att den kolesterolsänkande effekten, lika väl som den anticarcinogena effekt som observerats i djurstudier med d-limonen, åtminstone till en del har samband med nivån av HMG-CoA reduktas (104). HMG-CoA reduktas är ett enzym aktivt vid biosyntesen av mevalonat, som är en prekursor till isoprenoïda molekyler t ex kolesterol. Tumörceller, liksom normala celler, behöver mevalonatprodukter för att kunna växa (19,35,117).

Isoprenoïda produkter bildade från mevalonat har visats vara nödvändiga för att modifiera proteiner som påverkar cellväxt och celledelning, t ex ras proteiner, på ett sådant sätt att aktivering erhålles (19,55,83,117). Aktiverade ras proteiner kan

stimulera cellväxt (19). 10-20% av alla humana tumörer liksom ett stort antal kemiskt inducerade bröstkörteltumörer har visats innehålla aktiverade ras gener (117,149). d-Limonen och i ännu högre grad vissa metaboliter som t ex perillsyra, dihydroperillsyra och perillylalkohol har vid prövning på celler in vitro rapporterats selektivt hämma isoprenylering av ras-liknande små proteiner (19,48,51). Denna observation ger en möjlig förklaring till mekanismen bakom den anticarcinogena effekten på kemiskt inducerade tumörer t ex bröstkörteltumörer, som observerats i djurexperimentella studier (19,48). Det faktum att d-limonen hämmar proteinisoprenylering i mer än en celltyp kan förklara att det är effektivt även mot andra typer av tumörer (19). Att man experimentellt har kunnat visa att d-limonen vid subtoxiska doser effektivt minskar förekomsten av tumörer och till och med kan få redan uppkomna tumörer att gå tillbaka, kan bero på att maligna celler har ett större behov än normala celler av någon eller några typer av isoprenylerade tillväxtkontrollerande proteiner (19).

Andra mekanismer som sannolikt har betydelse för den anticarcinogena effekten av d-limonen är påverkan på de enzymer som är involverade i metabolisk aktivering eller detoxifiering av carcinogena ämnen eller i reparation av DNA (90,91,126,143,144). Dessa mekanismer är av intresse speciellt då d-limonen administreras under initieringsstadiet (47,90). Ökad mängd och aktivitet av fas 1 enzymer i levern, t ex cytokrom p-450, har rapporterats i flera studier med limonen (4,5,90). Nyligen har induktion av fas 2 enzymer (glutation transferas och UDP-glukuronyl transferas) också beskrivits (48,92,150). Denna ökade aktivitet av fas 2 enzymer har i studier med det carcinogena ämnet 7,12-dimetylbenz(a)antracen (DMBA) visats korrelera väl med en ökad urinutsöndring av DMBA och dess metaboliter och med en signifikant minskning i koncentrationen av DMBA-DNA addukter i lever, lungor, mjälte och njurar (21,48,90,92). Vid administration av 5% d-limonen i födan till råttor under 2 veckor före tillförsel av DMBA var utsöndringen av radioaktivt märkt DMBA och/eller DMBA-metaboliter i urinen dubbelt så stor som vid tillförsel av enbart DMBA. Koncentrationen av DMBA-DNA addukter i vävnaderna 24 timmar efter administrationen av det carcinogena ämnet minskade med ungefär 50% (21,90).

d-Limonen har visats orsaka en njurskada som brukar benämnas  $\alpha$ 2u-globulin nefropati. Denna njurskada, som enbart uppträder hos hanrättor, har även observerats efter exponering för ett antal andra industri- och miljökemikalier (1,2,53,87,101,146). Tillståndet karakteriseras av en serie njurförändringar som kan observeras i ljusmikroskop. Det första som kan noteras är en extrem ansamling av hyalindroppar ( $\alpha$ 2u-globulin) inne i cytoplasman i epitelcellerna i njurarna, framför allt i P2 segmentet av de proximala slingriga njurkanalerna (PCT). Detta inträffar redan efter en kort tids exponering, men går tillbaka om exponeringen upphör (1). Om exponeringen istället fortsätter, skadas cellen med celldöd, avstötning av individuella epitelceller och en kompensatorisk cellproliferation som följd. Vid subakut administration kan granulära ansamlingar av nekrotiska cellrester i den yttre zonen av njurmärgen och en dilatation av det påverkade tubulisegmentet observeras. Efter längre tids exponering uppträder också lineär mineralisering av njurkanalerna i njurpapillerna och ett förvärrande (även i form av tidigare uppkomst) av de multipla förändringar som brukar betecknas som kronisk progressiv nefros och som normalt kan observeras i

njurbarken hos åldrande råttor, speciellt hanar (1,30,65,66,106,123,129,146). Förutom dessa successiva patologiska förändringar som karakteriserar  $\alpha$ 2u-globulin nefropati, kan hyperplasi och neoplas i njurkanalerna utvecklas.

Det inledande steget i denna kedja av händelser förefaller vara ansamlingen av proteinet  $\alpha$ 2u-globulin.  $\alpha$ 2u-Globulin är det protein som förekommer i störst mängd i urinen hos alla typer av hanrättor utom i den sk NBR stammen, men däremot inte hos honrättor (23,30,80,87,106,108,109). Hos andra djurslag - inklusive människa - har detta protein inte rapporterats förekomma (2,23,87,98,129). Den ansamling av  $\alpha$ 2u-globulin i tubulära njurceller som observerats hos hanrättor efter exponering för d-limonen, beror sannolikt på att det bildas ett reversibelt komplex mellan  $\alpha$ 2u-globulin och en metabolit, cis-d-limonen-1,2-oxid (11,81,82,87). Bildningen av detta komplex leder till en förändring av den renala metabolismen av  $\alpha$ 2u-globulin (troligen en inducerad defekt i den lysosomala nedbrytningen av  $\alpha$ 2u-globulin), vilket i sin tur leder till ackumulering av stora lysosomer sk hyalindroppar i epitelcellerna i den proximala delen av tubuli (PCT) (23,67,81,87,98). Denna ansamling av protein i epitelcellerna anses leda till sönderfall av lysosomerna och cellskada (65,88,129).

Den ökade tumörbildningen i njurarna som observerats vid kronisk administration av d-limonen till hanrättor tror man har sitt ursprung i den ökade cellproliferation i de tubulära epitelcellerna som blir följden av en återkommande cellskada. Cellproliferation i proximala tubuliceller har visats vara ett bestående fenomen vid långtidsadministration av kemikalier som förorsakar ansamling av  $\alpha$ 2u-globulin, medan varken ökad förekomst av hyalindroppar eller cellproliferation observerats några dagar efter en avslutad korttidsexponering (24,123,124).

Denna mekanism som förutsätter förekomsten av en tröskel kan involvera ett ökat antal spontana mutationer och/eller promotion/progression av initierade celler (24,30,46,87,95,123, 128,129). Bedömningen av d-limonen i ett antal genotoxiska tester har visat att d-limonen knappast är genotoxiskt (3,15,34,43,56,94,95,102,126,132,140,141), vilket stöder teorin om en epigenetisk mekanism. Den absoluta könsspecificiteten, ansamlingen av hyalindroppar i det tidiga skedet av njurskadan, liksom den låga incidensen av njurtumörer som noterats vid administration av d-limonen är andra fakta som talar för att d-limonen verkar via en annan mekanism än de "klassiska" njurcarcinogenerna t ex nitrosoföreningarna (30,42). d-Limonen har vidare i promotionsstudier rapporterats orsaka cellproliferation och promotion av tumörer i njurarna hos hanrättor som utsöndrar  $\alpha$ 2u-globulin i urinen (F344), men inte hos en stam (NBR) som saknar  $\alpha$ 2u-globulin (24). Denna studie kan därmed sägas utgöra basen för hypotesen att  $\alpha$ 2u-globulin spelar en nyckelroll vid utvecklingen av neoplastiska såväl som icke neoplastiska njurförändringar.

#### 4.2. Akut toxicitet

Akut toxicitet av d-limonen uttryckt som LD<sub>50</sub>-värden visas i tabell 1. LD<sub>50</sub>-värden för l-limonen vid oral tillförsel till råttor har rapporterats vara i samma storleksordning som för d-limonen, dvs > 5g/kg (Moreno, 1975, citerad i ref 100). LD<sub>50</sub>-värdet vid hudapplikation på kanin (d-limonen och l-limonen) har också

rapporterats överstiga 5 g/kg (Moreno, 1972, citerad i ref 99; Moreno, 1975, citerad i ref 100).

Tabell 1. Genomsnittliga letaldoser (LD<sub>50</sub>) för d-limonen i djurexperimentella studier (134).

Djurslag	Kön	Administrationssätt	LD <sub>50</sub> (g/kg kroppsvikt)
mus	hane	peroralt	5,6*
mus	hona	peroralt	6,6*
råttor	hane	peroralt	4,4
råttor	hona	peroralt	5,2
mus	hane	intraperitonealt	1,3*
mus	hona	intraperitonealt	1,3*
råttor	hane	intraperitonealt	3,6
råttor	hona	intraperitonealt	4,5
råttor	hane	intravenöst	0,125*
råttor	hona	intravenöst	0,110*

\*Värdet är sannolikt angivet i ml/kg kroppsvikt och har inte räknats om till g/kg kroppsvikt.

#### 4.3. Kronisk toxicitet

Något lägre kroppsvikt (medeltal), men inga kliniska symtom som kunde relateras till administrationen av d-limonen, observerades under en 2-årig NTP-studie (se sid 21) hos hanrättor och honrättor doserade med 150 respektive 600 mg d-limonen/kg kroppsvikt/dag (hög-dosgrupper) och hos honmöss doserade med 1000 mg d-limonen/kg kroppsvikt/dag (hög-dosgrupp) (95). Hos honrättor i högdosgruppen var också överlevnaden efter vecka 39 signifikant reducerad. Medelvikten i låg-dosgrupperna och hos hanmössen i högdosgruppen (500 mg/kg kroppsvikt/dag) överensstämde med den vikt som noterades hos kontrollerna (95).

### 5. Organeffekter

#### 5.1. Effekter på hud och slemhinnor

##### 5.1.1. Irritation

d-Limonen har en hudirriterande effekt (18, 40). I äldre rapporter beskrivs hudsjukdomar orsakade av arbete med citrusfrukter. Det är emellertid svårt att dra några säkra slutsatser från dessa undersökningar eftersom exponeringen var mycket komplex. Många olika faktorer kunde bidra till hudbesvär såsom allergena ämnen, mekanisk skada, irritation och sekundära infektioner på grund av våtarbete. De flesta fall som beskrevs utgjordes av hudirritation (8, 10, 120). Hudläkare diagnostiserar sällan irritation orsakad av citrusfrukter bland konsumenter eftersom problemen försvinner när frukterna undviks (62).

Hudupptag av d-limonen har studerats experimentellt genom att en försöksperson höll ena handen i d-limonen (98%) under 2 timmar. En brännande känsla förenad med smärtsam klåda uppträdde inom några minuter och ökade under studiens gång. Klådan minskade mot slutet av exponeringen, medan den brännande känslan fortsatte att öka ytterligare tio minuter efter det att exponeringen upphört. Huden på handens ovansida var svullen med moderat rodnad. Svullnaden försvann 1,5 timmar efter avslutad exponering. Purpura (små hudblödningar) uppträdde efter ytterligare 4,5 timmar och nådde sitt maximum efter 1-2 dygn. Tillståndet kvarstod under flera veckor (36).

d-Limonens hudirriterande effekt har undersökts i en dos-responsstudie utförd på kanin (97). Den hudirriterande effekten har även studerats hos katt som doppats i ett bad med insekticid effekt. Rekommenderad brukslösning bestod av d-limonen ( $6,5 \times 10^{-2}$  mol/l) i vatten med tillsats av nonjontensid (polysorbate 80). Inga hudförändringar erhöles vid exponering för brukslösningen och för en kontrollösning bestående av nonjontensid i vatten. Sådana uppkom emellertid vid exponering för högre koncentrationer. Katter som exponerats för den starkaste lösningen (1 mol/l) uppvisade rodnad och rivmärken i den perianala regionen och på skrotum. Histopatologi visade en mild till måttlig akut inflammation i epidermis med multipla sårbildningar. Flera av de mer uttalade skadorna som åstadkommit av de mest koncentrerade lösningarna omfattade multifokala ulcerationer i överliggande epidermis med utbredd infiltration av neutrofiler och mononukleära inflammatoriska celler och med nekrotiskt material i underliggande dermis. Författarna antar att den ytliga akuta nekrotiserande epidermala komponenten var sekundär till dermal infiltration och till självtraumatisering (58).

Åtta friska försökspersoner exponerades för d-limonen (10, 225 and 450 mg/m<sup>3</sup>) i en exponeringskammare, men ingen av personerna upplevde några besvär i ögon och näsa (38).

### 5.1.2. Allergi

Några rapporter i vilka d-limonen utpekats som enda orsaken till allergiskt kontakteksem har inte påträffats i litteraturen. d-Limonen betraktas som det huvudsakliga allergenet i citrusfrukter, men incidensen kontaktallergi som orsakats av frukterna är okänd (62). d-Limonen räknas till de ämnen som kan ge parfymallergi (22, 138). Bland 179 patienter med kontaktallergi mot parfym uppvisade två personer positiva lapptestreaktioner mot d-limonen (116). Kontaktallergi mot såväl d- som l-limonen finns beskriven hos en patient som ursprungligen blivit sensibiliserad av terpentin (25). Allergiskt kontakteksem orsakat av dipenten i förtunningsmedel för målarfärg samt i honingsolja har beskrivits i litteraturen (12, 112).

Experimentell sensibilisering med d-limonen enligt "Human maximization test" utfördes på 25 frivilliga försökspersoner. Någon sensibilisering kunde dock inte framkallas (49).

I en jämförande studie av olika marsvinsmetoder erhöles sensibilisering för limonen (den enantiomera formen angavs ej) enligt tre av fyra använda metoder (71). Någon signifikant sensibilisering uppkom inte när d-limonen testades på möss (89) och inte heller vid experimentella studier på marsvin med d-limonen (98%) (68, 69). Däremot erhöles en klar sensibilisering av marsvinen då nya

studier utfördes med d-limonen som utsatts för luftexponering under 2 månader. Kemisk analys av luftexponerad d-limonen visade att produkten innehöll olika oxidationsprodukter bland vilka limonen-1,2-oxid, karvon och karveol identifierades. Limonen-1,2-oxid och karvon befanns vara potenta kontaktallergen, medan karveol inte gav någon sensibilisering i djurförsök (68, 69).

Ett fall av immunomedierad dermatos på hund orsakad av d-limonen finns rapporterat (44). Hunden doppades i ett insektsmedel innehållande 78,2% d-limonen. Hunden utvecklade efterhand hudförändringar med blåsbildning som snabbt progredierade till en svår konfluerande nekrotiserande dermatit med stora områden med hudavlossning. Tillståndet diagnostiserades som toxisk epidermal nekrolys. Histopatologisk undersökning gjordes emellertid inte.

d-Limonen använt för att förhindra uppkomst av kontaktallergi av närbesläktade föreningar (quenching) diskuteras under 6. Immunotoxicitet.

## 5.2. Effekter på andningsorganen

Åtta friska försökspersoner exponerades i en exponeringskammare för d-limonen i koncentrationerna 10, 225 och 450 mg/m<sup>3</sup>; 10 mg/m<sup>3</sup> utgjorde kontrollnivån. För att efterlikna lätt fysiskt arbete i industrin valdes en arbetsbelastning på 50 W. De exponerade individerna uppgav ingen irritation i ögon eller luftvägar. En statistisk signifikant minskning av vitalkapaciteten observerades efter exponering för 450 mg/m<sup>3</sup> jämfört med 10 mg/m<sup>3</sup>. Sänkningen av vitalkapacitet var liten (2%) och hade förmodligen ingen praktisk betydelse. Man fann ingen förändring i de andra lungfunktionsvariablerna: forcerad expiratorisk volym på en sekund (FEV<sub>1</sub>), "peak expiratory flow", residualvolym, total lungkapacitet, mittexpiratoriskt flöde (MEF<sub>50</sub>) och luftvägsmotstånd (38). I en undersökning av luftexponering och symtom hos arbetare i fyra snickerier fann man att prevalensen av irritationsbesvär i ögon och näsa var avsevärt högre bland snickeriarbetarna än bland referenspopulationen, medan prevalensen av slemhinnesymtom från svalg och nedre luftvägar överensstämde med den för referensgruppen. De angivna besvären ansågs emellertid huvudsakligen härröra från trädammsexponering. Man fann ingen säkerställd nedsättning av lungfunktionen bland arbetarna i de studerade snickerierna (31).

Yrkesastma finns beskriven hos en arbetare som exponerats för koncentrerad parfym huvudsakligen bestående av isoamylacetat, limonen, kanelaldehyd och bensaldehyd. Man hade inte företagit några specifika mätningar av de olika komponenterna i luften (63).

Effekten av d-limonen, skvalen och fytol på lunga hos hamster och råtta har studerats (84). Varje vecka droppades (instillerades) 0,2 ml av endera substansen i luftstrupen på olika grupper av hamster och råtta. Autopsi utfördes på djur som dött under behandlingens gång. Efter sex instillationer avlivades djuren i olika intervall. Destruktion av bronkerna och bronkepitelet med blödning i lungblåsorna uppkom 24 timmar efter den tredje instillationen. Sex veckor efter den sista instillationen var lungorna hos hamstern förstörade, bleka och blåsfyllda och några djur uppvisade även subpleurala blåsor. Lungblåsorna var utspända med delvis förtunnade skiljeväggar. Scanning med elektronmikroskopi avslöjade

skador på lungblåsornas väggar. Såren var mer akuta hos råttor och de flesta dog några timmar efter det att substanserna administrerats. De refererade resultaten härrör från en kongressrapport eftersom någon fullständig artikel ej återfunnits. De enskilda ämnenas effekt diskuteras inte.

### 5.3. Effekter på lever

Data över effekter på människa är bristfälliga. På försöksdjur har d-limonen visats påverka mängd och aktivitet av olika leverenzymmer, levervikt, kolesterolnivå och gallflöde.

Något förlängd hexobarbitalinducerad sömntid har observerats på mus vid oral singeladministration av 3 ml d-limonen/kg kroppsvikt (133). En signifikant ökad aktivitet av cytokrom p-450 och  $\beta$ -aminolevulinsyra(ALA)syntetas har rapporterats hos råttor, 24 timmar efter en oral singeldos av 1200 mg d-limonen/kg (4). Vid dosnivån 600 mg/kg noterades bara en övergående ökning (mindre än 24 timmar) av  $\beta$ -ALA-syntetasaktiviteten (4). I en annan studie (5) observerades en liten, men signifikant ( $p < 0,05$ ) ökning av mängden cytokrom p-450 hos honråttor vid dosnivån 40 mg/kg/dag, efter administration av tre dagliga injektioner i bukhålan av ospecificerat limonen.

En signifikant ökad total mängd av cytokrom p-450 och av epoxidhydratas-(EH)aktivitet har nyligen rapporterats på råttor efter administration av 5% d-limonen i födan under 2 veckor (90). Ökad EH aktivitet observerades även vid administration av 1% d-limonen (90). En ökning av glutationtransferas och UDP-glukuronyltransferas, dvs fas 2 enzymer, vid administration av 5% limonen i födan har också beskrivits i en kort sammanfattning (92). På mus har induktion av glutation-S-transferas noterats vid peroral administration av 20 mg limonen en gång varannan dag vid sammanlagt 3 tillfällen (150).

Vid upprepad peroral administration till råttor av 400 mg d-limonen/kg under 30 dagar har en ökning i mängd och aktivitet av olika leverenzymmer (cytokrom p-450, cytokrom b5, aminopyrindemetylas, anilinhydroxylas) med 20-30%, en något ökad relativ levervikt ( $p < 0,05$ ) samt ett ökat innehåll av fosfolipider i levern observerats (4). Ökad relativ levervikt (signifikant vid dosnivån 300 mg/kg kroppsvikt) rapporterades också hos råttor vid peroral administration av 75-300 mg d-limonen/kg kroppsvikt 5 eller 20 gånger (66). I en annan studie på råttor (146) med sondmatning av 2-75 mg d-limonen/kg kroppsvikt/dag, 5 dagar/vecka under 91 dagar observerades en signifikant ökad relativ levervikt vid dosnivån 75 mg/kg. Inga histopatologiska förändringar i levern observerades i ljusmikroskop i någon av studierna (66,146) och de ökade relativa levervikterna kan sålunda representera en mikrosomal induktion (66,146). Mängd och aktivitet av olika leverenzymmer hade inte undersökts i de båda senare studierna.

Vid prövning på hund har en ökning av alkaliska fosfataser i serum och en ökad mängd serumkolesterol (35%) rapporterats förekomma efter peroral administration av 1,2 ml d-limonen/kg kroppsvikt/dag under upp till 6 månader (=1000 mg/kg kroppsvikt/dag) (145). Vid en lägre dos (=100 mg/kg kroppsvikt/dag) noterades inga behandlingsrelaterade skillnader. I en 28-dagars pilotstudie rapporterades något ökad absolut och relativ levervikt, men inga

behandlingsrelaterade histopatologiska förändringar vid administration av 1,2 ml d-limonen/kg kroppsvikt/dag (145).

En minskning av leverkolesterol med 49% och av serumkolesterol med 8% har rapporterats på råttor efter dagliga orala doser av 400 mg d-limonen/kg under 30 dagar (4). En minskning av LDL-kolesterolnivån i serum och en 45%-ig minskning av 3-hydroxi-3-metylglutaryl-coenzym A (HMG-CoA) reduktas i levern rapporterades i en annan studie på råttor (104) efter administration av 1% d-limonen i födan under 3 månader. Detta motsvarar ett dagligt intag av ungefär 150 mg d-limonen. En signifikant hämning av HMG-CoA reduktasaktiviteten i levern har också observerats på råttor efter intubering med 409 mg ospecificerat limonen/kg kroppsvikt vid ett tillfälle (14).

Oral singeladministration av 8,5-850 mg d-limonen/kg till råttor rapporterades i en studie ge en ökning av gallflödet med en dos-responskorrelation, signifikant från dosnivån 85 mg/kg (72). Hydroxylmetaboliterna p-menta-1,8-dien-10-ol, p-ment-1-en-8,9-diol och p-menta-1,8-dien-6-ol inducerade en mycket större ökning av gallflödet än d-limonen per se (72).

På människa har d-limonen i form av en 97%-ig beredning, som givits som infusion direkt in i gallsystemet (5-29 ml d-limonen/infusion), visats kunna upplösa gallstenar (kolesterolstenar) (59,61). I samband med behandlingen har övergående öknings av serumaminotransferaser (ASAT, ALAT) och alkaliska fosfataser noterats (61). Då 20 g d-limonen gavs peroralt till fem manliga frivilliga försökspersoner observerades inga biokemiska förändringar i levern (totalprotein, totalbilirubin, totalkolesterol, ASAT, ALAT, alkaliska fosfataser) (59).

Vid injektion av en 97%-ig beredning av d-limonen direkt i gallregionen på katt har varierande grad av akuta eller kroniska inflammatoriska förändringar i hepatobiliära vävnader observerats (118).

En annan toxisk effekt på levern har observerats vid långtidsadministration av d-limonen till mus (95). Ökad incidens av hepatocytar innehållande tre eller flera kärnor och cytomegali förekom hos hanmöss (men inte hos honmöss) vid peroral administration av 500 mg d-limonen/kg kroppsvikt 5 dagar/vecka under 2 år (95).

### 5.4. Effekter på njurar

Få data över effekter av d-limonen på njurarna föreligger när det gäller människa. I en studie (59) rapporterades smärre mängder protein i urinen övergående ha noterats hos fem manliga frivilliga försökspersoner efter peroralt intag av 20 g d-limonen. Signifikansen av detta fynd är emellertid okänd.

Histopatologiska bevis på njurtoxicitet har rapporterats i många studier vid administration av d-limonen till hanråttor, medan honråttor, hanråttor av en stam som inte producerar  $\alpha_2$ -globulin och andra däggdjur som mus, hamster, marsvin, hund och apa inte förefaller drabbas av skador av den typ som karakteriserar  $\alpha_2$ -globulin nefropati (2,23,64,95,106,129,145,146). Visserligen har smärre förändringar bestående av proteinansamlingar i njurkanalerna rapporterats förekomma i en japansk studie på hund (honor och hanar), vid peroral administration av 1,2 eller 3,6 ml d-limonen/kg kroppsvikt/dag under 6 månader, men signifikansen av dessa fynd är osäker (135). I en senare studie på hund (145),

med sondmatning 2 gånger/dag under 6 månader (100 eller 1000 mg d-limonen/kg kroppsvikt/dag) rapporterades heller inga histopatologiska förändringar i njurarna, men vid den högsta dosnivån däremot ökade absoluta (endast honor) och relativa (båda könen) njurvikter.

På hanrätta har symptom på det nefrotoxiska syndromet observerats redan 24 timmar efter en oral dos av d-limonen (82,146). Ansamling av hyalindroppar påvisades hos Sprague-Dawley och Fischer 344 råttor efter administration av en oral singeldos på  $\geq 41$  mg d-limonen/kg kroppsvikt (82,146), medan ingen signifikant ökning av hyalindroppar noterades vid dosnivån 14 mg/kg kroppsvikt (82). Ökat innehåll av  $\alpha 2u$ -globulin kunde fastställas vid dosnivån 200 mg/kg (146).

En dos-relaterad ökning av hyalindroppar i epitelcellerna i den proximala delen av de slingriga njurkanalerna (PCT) associerat med en ackumulation av  $\alpha 2u$ -globulin rapporterades också i en studie (95) på F344/N råttor (handjur) doserade via magsond med 75-1200 mg d-limonen/kg en gång/dag under 14 dagar under en 21-dagarsperiod. Samma förändringar noterades i en annan studie (66) på Fischer 344 råttor efter administration av 75, 150 eller 300 mg d-limonen/kg kroppsvikt per os under 1 eller 4 veckor (5 dagar/vecka). En förvärrad kronisk nefros noterades vid alla dosnivåer på de behandlade hanrättorna av typ Fischer 344 efter 4 veckor, medan granulära ansamlingar speciellt observerades vid den högsta dosnivån (efter 4 veckor) (66). Signifikant ökade relativa njurvikter påvisades också efter administration av 5 eller 20 doser av 300 mg d-limonen/kg kroppsvikt (66).

I en studie över Sprague-Dawley råttor av hankön, vilka doserats per os med 300 mg d-limonen/kg/dag under 14 dagar, rapporterades ackumulation av hyalindroppar i epitelcellerna i proximala tubuli (PCT) och ökade mängder av  $\alpha 2u$ -globulin i njurarna. Vid histopatologisk undersökning observerades lindrig tubulär cellsdegeneration/-nekros. I urinen påvisades den specifika form av  $\alpha 2u$ -globulin som förekommer i njurarna, vilket tyder på en avstötning av skadade celler från proximala tubuli (114).

I en subkronisk studie på Fischer 344 råttor av hankön observerades en ökning av hyalindroppar både vad gäller storlek och antal efter 8 dagars behandling per os med d-limonen, vid dosnivån 10 mg/kg kroppsvikt (146). En förvärrad kronisk nefros noterades efter 91 dagar vid dosnivån  $\geq 30$  mg/kg kroppsvikt, medan granulära ansamlingar i den yttre zonen av märgen och signifikant ökade relativa njurvikter (91 dagar) förelåg vid slutet av studien vid den högsta dosnivån dvs 75 mg/kg kroppsvikt (146). Innehållet av  $\alpha 2u$ -globulin undersöktes inte vid någon dosnivå. En dosnivå vid vilken ingen effekt på njurarna kunde observeras (NOEL) fastställdes i denna 91-dagarsstudie till 5 mg/kg kroppsvikt (146).

I studier (64,95) med administration av 150-2400 mg d-limonen/kg kroppsvikt/dag per os under 3 månader till hanrätta påvisades dos-beroende renala förändringar som kronisk nefros och granulära ansamlingar i den yttre delen av märgen, utom vid den högsta dosnivån där förändringarna var likartade med de som kunde observeras i låg-dosgruppen och i vehikelkontrollen. Vid den högsta dosnivån (2400 mg/kg kroppsvikt/dag) noterades hyalinansamlingar och dilatation i tubuli och gångar i bark/märg och tillfälligtvis också hyalint material i glomerulus. Inga skillnader när det gällde hyalindroppsbildning i cytoplasma i

epitelceller i PCT kunde dock påvisas mellan kontroller och d-limonenbehandlade djur vid någon dosnivå, vilket måste betraktas som egendomligt. Detta faktum kan emellertid förklaras av att 3 dagar förflöt mellan tidpunkten för den sista administrationen och avlivningen. Studier med dekalin (en annan kemikalie som orsakar den typ av nefropati som är specifik för hanrätta) har visat att proteindroppar i cytoplasma snabbt upplöses efter avslutad exponering (1).

d-Limonen har också prövats i en långtidsstudie (95). I likhet med resultaten från korttidsstudierna visade denna studie att njurarna är målorganet hos råttor av hankön. Hanrättor (F344/N) sondmatade med 75 eller 150 mg d-limonen/kg kroppsvikt/dag 5 dagar/vecka under 2 år visade en rad olika dos-relaterade njurskador t ex förvärrad spontan åldersrelaterad nefropati, mineralisering av märg och papill, fokal hyperplasi av det epitel som ligger över papillen och proliferativa skador av epitelceller i njurtubuli (hyperplasi och neoplasi). Inga dylika effekter som kunde relateras till exponeringen observerades hos mus eller honrätta.

### 5.5. Effekter på mag-tarmkanalen

Illamående och kräkningar rapporterades i en japansk studie på hund efter oral administration av 0,4, 1,2 eller 3,6 ml d-limonen/kg/dag under 6 månader (135). Illamående, kräkningar, diarré, smärta i övre delen av buken samt övergående höjningar av serumamylas har också rapporterats hos människa vid infusion i gallsystemet av en 97%-ig beredning av d-limonen (5-29 ml d-limonen/infusion) (59,61). Då fem frivilliga försökspersoner erhöll 20 g d-limonen oralt rapporterades diarré och smärtsamma trängningar (59).

### 5.6. Effekter på hjärta och blodkärl

Vid applikation på kaninöra lokalt har d-limonen visats vara ett effektivt käravidgande medel (78).

### 5.7. Effekter på blod och blodbildande organ

Inga data har påträffats.

### 5.8. Effekter på nervsystemet

I en nyligen avrapporterad studie (38), där 8 frivilliga försökspersoner exponerades genom inhalation för 10, 225 eller 450 mg d-limonen/m<sup>3</sup> under 2 timmar rapporterades inga subjektiva besvär från CNS, som kunde relateras till exponeringen.

I några djurstudier har emellertid effekter som kan tänkas utgå från CNS rapporterats förekomma. Om dessa effekter representerar en allmän toxisk påverkan eller beror på en direkt påverkan på CNS kan inte bedömas. Peroral administration av 3 ml d-limonen/kg till mus och råttor rapporterades i en studie (133) dämpa aktiviteten i CNS och minska den spontana rörligheten. Sänkt kroppstemperatur kunde också påvisas hos mus (133). Slöhet och uttalat tårflöde

rapporterades i en 13-veckors-studie vid sondmatning av råttor av båda könen med 1200 och 2400 mg/kg/dag. Den högsta dosnivån var också letal för många av djuren. På mus observerades minskad aktivitet vid dosnivåerna 1000 och 2000 mg/kg/dag (95).

På katt har ökad salivation av kort varaktighet och svaga diarréer observerats efter det att man doppat djuren i en vattenlösning av ett insektsbekämpningsmedel innehållande 78,2% d-limonen (58). Koncentrationen av d-limonen var ungefär  $6,5 \times 10^{-2}$  mol/l vatten. Vid högre koncentrationer (omkring  $3 \times 10^{-1}$  mol/l vatten) led katterna också av en viss orörlighet och hade lägre kroppstemperatur än normalt. Alla förgiftningssymptom förvärrades ytterligare vid ännu högre koncentrationer (1 mol/l), men avklingade alltid (utom hudeffekterna) inom 7 timmar (58). I dessa fall kan man dock inte anse att en eventuell påverkan på nervsystemet med säkerhet beror på d-limonen, då många insekticider innehåller små mängder kolinesterashämmare.

## 6. Immunotoxicitet och allergi

### 6.1. Immunotoxicitet

Signifikant immunosuppression erhöles hos BALB/c möss som sondmatats med d-limonen. Minskad respons uppträdde i det primära och sekundära antikroppssvaret samt i T- och B-cells frisättningen. Man framlägger bevis för att d-limonen verkade genom polyklonal stimulering (33). I en humanstudie fann man att d-limonen dämpade icke-immunologisk kontakturtikaria för kanelaldehyd. Kompetitiv hämning på receptornivå har föreslagits som suppressionsmekanism (50).

Inom parfymindustrin använder man d-limonen som sk "quenching agent", vilket innebär att d-limonen tillsätts parfym för att förhindra att andra parfymämnen, främst citral och kanelaldehyd, orsakar kontaktsensibilisering (99). I en studie med olika grupper av marsvin inducerades en grupp med citral med tillsats av d-limonen, medan en annan grupp endast inducerades med citral. En viss påverkan (quenching) på citrals sensibiliserande effekt på marsvin vid tillsats av d-limonen kunde konstateras genom histologiska undersökningar och studier med hjälp av radioaktiv märkning. Någon skillnad i sensibilisering mellan djurgrupperna kunde emellertid inte konstateras vid provokativ testning (6, 54).

Resultaten från en nyligen genomförd djurstudie (7) gav mycket lite stöd åt resultaten i äldre publikationer angående det sk "quenching" fenomenet vid kontaktallergi. d-Limonen minskade inte reaktionerna för kanelaldehyd i sensibiliserade djur. Några bevis för att d-limonen skulle utöva en dämpande effekt på kontaktallergena reaktioner mot limonenoxid och karvon vid test på marsvin kunde inte rapporteras i en studie av Karlberg et al (69).

### 6.2. Allergi

Några rapporter om typ I allergi mot limonen har inte påträffats. Angående typ IV allergi (kontaktallergi) se 5.1.2.

## 7. Mutagenicitet, genotoxicitet

d-Limonen och ospecificerat limonen har prövats in vitro i bakterietester med *Salmonella typhimurium* TA1535, TA 1537, TA 1538, TA 98, TA 100, UTH 8414 och UTH 8413 med eller utan tillsats av ett metaboliserande system. Mutationsfrekvenserna rapporterades inte vara ökade i de dosintervall som användes (0,3-3333 µg/platta) (15,43,56,141), men limonen rapporterades vara toxiskt för bakterier i doser  $\geq 400$  µg/platta (43). Varken d-limonen-1,2-epoxid eller d-limonen-8,9-epoxid visade mutagen aktivitet vid prövning på *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 eller TA 1538 med eller utan S9 mix (140,141), men däremot ansenlig cytotoxicitet. Letalitet rapporterades vid användning av bakteriestam TA 100 vid dosen 1,0 µmol/platta (140,141).

Negativa, icke konklusiva eller tveksamma resultat (den totala bedömningen var negativ) rapporterades också vid prövning av d-limonen i det sk TK-locus testet, vid användning av L5178Y celler med eller utan metabolisk aktivering i dosintervallet 5-100 nl/ml (94). I några av experimenten noterades letalitet vid koncentrationer  $\geq 50$  nl/ml.

Vid prövning in vivo i spot-testet på mus, med injektion i bukhålan av 215 mg/kg/dag dag 9-11 under graviditet, rapporterades d-limonen inte vara mutagen (34).

Vid användning av CHO-celler för undersökning av kromosomaberrationer (ABS) och systerkromatidutbytet (SCE) uppgavs d-limonen inte inducera cytogenetisk skada vid de doser som testades dvs upp till 100 µg/ml när det gällde ABS utan S9, upp till 500 µg/ml för ABS med S9 och upp till 162 µg/ml för SCE (+S9, -S9). Doser överstigande dessa var toxiska (3,95).

Ospecificerat limonen inducerade inte malign celltransformation i det testade dosintervallet (0,1-100 µg/ml) vid användning av syrianska hamsterembryoceller (102). Vid prövning på andra typer av celler (Rauscher murin leukemi virusinfekterade F344 råttembryoceller), som behandlats med subeffektiva doser av 3-metylcholantren (MCA) och därefter med ospecificerat limonen observerades hämmad celltransformation vid dosen 15 µg/ml, men inte vid en lägre koncentration (1,5 µg/ml) (132). Då limonen (15 µl/ml) användes utan initiering med MCA påvisades ingen celltransformation (132). I en senare studie in vitro (126) visades d-limonen (21,9 µM), vid administration efter exponering för det carcinogena ämnet benzo(a)pyren, hämma bildningen av transformerade cellkolonier av trakeala epitelceller från råttor.

## 8. Carcinogenicitet

I en cancerstudie som ingår i National Toxicology Program (95) doserades hanråttor per os med 75 eller 150 mg d-limonen/kg kroppsvikt/dag 5 dagar/vecka under 2 år. Resultatet av denna studie visade en dos-relaterad ökning av hyperplasi och adenom/ adenocarcinom i renala tubuliceller. 8 av 50 råttor i låg-dosgruppen och 11 av 50 råttor i hög-dosgruppen hade tumörer från cellerna i njurtubuli. Inga njurskador eller njurtumörer observerades hos d-limonenbehandlade hanråttor (300 och 600 mg/kg/dag), hanmöss (250 och 500

mg/kg/dag) eller honmöss (500 och 1000 mg/kg/dag) (95). Det fanns sålunda klara bevis ("clear evidence") för carcinogen aktivitet i njurarna vid administration av d-limonen under givna försöksbetingelser till hanrätta, men det fanns inga bevis för carcinogen aktivitet av d-limonen hos honrätta eller mus (båda könen) (95). I en äldre studie (127), där man studerade förekomsten av lungtumörer på mus rapporterades ingen ökad incidens lungtumörer efter injektioner i bukhålan av 200 mg eller 1000 mg d-limonen/kg kroppsvikt 3 gånger i veckan under 8 veckor.

I en initierings-promotionsstudie (24), där 500 ppm EHEN (N-etyl-N-hydroxietylnitrosamin) administrerades som initiator i dricksvatten under 2 veckor och d-limonen som promotor via magsond under 30 veckor (150 mg/kg kroppsvikt/dag, 5 dagar/vecka), rapporterades en ökad cellproliferation i P2 celler och ökad incidens och medeltal/rätta av atypiska tubuli och atypisk hyperplasi av tubuliceller på F344 rätta. Motsvarande förändringar observerades även i den kontrollgrupp (F344) som behandlats med enbart d-limonen. En 10-faldig ökning av incidensen njuradenom i F344 gruppen (i jämförelse med den initierade kontrollgruppen) noterades också efter promotion med d-limonen. Rapporterade incidenser och medeltal/rätta av observerade njurskador hos hanrättor av den rättstam (NBR) som saknar  $\alpha$ 2u-globulin visade däremot, att d-limonen här inte hade någon effekt förekomsten av renal neoplasi (24). I samma studie (24) noterades en signifikant lägre incidens levertumörer hos de F344 rättor som behandlats med både EHEN och d-limonen, i jämförelse med de djur av samma stam som behandlats enbart med EHEN.

I en studie på mus där 0,05 ml d-limonen efter administration av safrol, tanninsyra eller metylcholantren (injicerat under huden efter födelsen dag 1, 7, 14 och 21) gavs via magsond en gång/vecka under ett år rapporterades, i jämförelse med de grupper som inte behandlats med d-limonen, en signifikant reduktion av totala antalet möss som bar tumörer (148).

I en annan studie, där mus doserades per os med 0,2 mmol (27 mg) d-limonen en gång/vecka vid 8 tillfällen en timme före peroral administration av 20 mg/kg kroppsvikt av det carcinogena ämnet N-nitrosodietylamin (NDEA), rapporterades d-limonen effektivt minska antalet tumörer i magsäcken (forestomach) och i mindre utsträckning även i lungorna (143). En kraftigt reducerad förekomst av lungadenom och en total hämning av tumörer i magsäcken (forestomach) noterades också, då 25 mg d-limonen administrerades peroralt till mus som enstaka dos eller två gånger/vecka under 8 veckor, en timme före administration av ett carcinogent ämne (4-(metylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon; NNK) som förekommer i tobak (142). Motsägande resultat har redovisats i en gammal studie på mus (39). d-Limonen befanns då vara mycket irriterande och möjligen svagt carcinogent för epitelceller i magsäcken (forestomach) vid peroral administration av 40 doser à 0,05 ml 1 gång/vecka, efter förbehandling (intubering) med polyetylen glykol 400 eller 50  $\mu$ g benzo(a)pyren (BP). Apelsinolja som administrerades på samma sätt som d-limonen befanns dock vara mer effektivt än d-limonen, när det gällde att framkalla tumörer i magsäcken (39).

En signifikant minskning av incidensen lungtumörer har observerats på mus som varje vecka under 16 veckor erhållit intravenösa injektioner av ungefär 1 mg d-limonen efter en singelinjektion under huden av 0,5 mg dibenzpyren (DBP)

(57). Bildningen av fibrosarkom hos mus efter en singelinjektion under huden av 25  $\mu$ g DBP rapporterades också vara signifikant långsammare vid behandling (under huden) med totalt 0,2 ml d-limonen (57).

Då ospecificerat limonen (10 mg/ applikation) administrerades tillsammans med benzo(a)pyren (5 $\mu$ g/applikation) på huden på mus tre gånger i veckan under 440 dagar, noterades i en undersökning (137) en svagt hämmande effekt på hudtumörer. I några andra försök (107) rapporterades apelsinolja innehållande mer än 90% d-limonen fungera som promotor i promotionstest (hud) på mus, men däremot inte vara carcinogent per se. Då koncentrerad (99,7%) d-limonen i en senare studie (28) prövades på mushud (0,2 ml två gånger i veckan under 40 veckor) efter initiering med 51  $\mu$ g DMBA, observerades endast en liten promotiv effekt för hudtumörer ( $p < 0,05$ ) 34 veckor efter initieringen. Apelsinolja ansågs vara en starkare (men fortfarande svag) promotor (28). Det sammanfattades att den promotiva effekten av apelsinolja knappast kunde anses bero på d-limonen (28). Då 1% d-limonen eller 1% apelsinolja tillsattes till födan, noterades ingen promotiv effekt för hudtumörer (28).

Många studier på rätta angående påverkan av d-limonen på kemiskt inducerade tumörer i bröstkörteln har publicerats. Incidensen brösttumörer och det genomsnittliga antalet brösttumörer/djur har visats kunna reduceras effektivt då en diet innehållande 5% d-limonen administrerats 2 veckor före initiering med en intravenös singelinjektion av nitrosometylurea (30-50 mg NMU/kg) och till slutet av försöket (vid 23 veckor) eller enbart under promotions-/progressionsfasen. Ingen effekt på tumörincidens eller antal tumörer observerades då d-limonen administrerades enbart under initieringsfasen dvs 2 veckor före till en vecka efter administrationen av det carcinogena ämnet (47,91).

I studier med det indirekt verkande carcinogena ämnet 7,12-dimetylbenz(a)antracen (DMBA) som initiator (50-65 mg/kg som oral singeldos) har d-limonen, då det administrerats som 5% i födan under initieringsfasen eller 1% eller 0,1% under hela försökstiden (från 1-2 veckor före DMBA administrationen), visats öka latenstiden för brösttumörer och vid de högre doserna även reducera antalet brösttumörer (21,26,29,91,111). Då 0,5%-1% d-limonen administrerades i födan enbart under initieringsfasen rapporterades detta inte signifikant påverka latenstiden eller antalet tumörer (21,111). Två metaboliter (p-ment-1-en-8,9-diol och p-ment-1,8-dien-6-ol) påvisades däremot som effektiva vid koncentrationen 1% i födan under initieringsfasen, när det gällde att förhindra DMBA-inducerade brösttumörer (21). Administration av 5% d-limonen enbart under promotions-/ progressionsstadiet (65 mg DMBA/kg som initiator) har inte rapporterats vara lika effektivt som administration under initiering, men har visats ge en signifikant reduktion i det genomsnittliga antalet brösttumörer/djur (29).

Vid en jämförelse mellan resultaten från initierings-promotionsstudierna med DMBA eller NMU och d-limonen och resultaten från den 2-åriga NTP studien (se sid 21), som bl a visar en dos-relaterad minskning i förekomsten av fibroadenom, adenom, cystadenom eller adenocarcinom (kombinerat) i bröstkörteln hos honrätta, förefaller även dessa senare uppgifter (trots reducerad överlevnad i högdosgruppen) vara av viss betydelse (95).

Förutom en förebyggande effekt av d-limonen har också en terapeutisk effekt när det gäller tumörer observerats. Tillbakabildning av brösttumörer rapporterades

i en studie på råttor vid administration av 0,1% eller 1% d-limonen i födan före administration av DMBA och under 27 veckor därefter (26). I två senare studier (27,52) visades primära bröstkörteltumörer (induktion med 50-130 mg DMBA/kg peroralt eller 50 mg NMU/kg iv) kunna gå tillbaka (och färre tumörer senare uppkomma) då tumörbärande råttor behandlades med 10 % d-limonen i födan. När 2,5%, 5%, 7,5% eller 10% d-limonen blandades i födan och gavs till DMBA-behandlade djur under minst 15 veckor observerades fullständig tillbakabildning av primära brösttumörer vid de båda högsta dosnivåerna, medan en fullständig tillbakabildning av sekundära tumörer noterades vid dosnivåer  $\geq 5\%$  (52). En metabolit, perillylalkohol, har rapporterats vara ännu mer effektiv när det gäller att framkalla tillbakabildning av brösttumörer (51).

## 9. Reproduktionstoxikologi

Effekter av d-limonen på fosterutvecklingen undersöktes i en studie på råttor genom oral administration av 591 mg eller 2869 mg d-limonen/kg dag 9-15 under graviditeten. Vid den högre dosnivån observerades toxiska effekter på moderdjuren i form av minskad kroppsvikt och dödsfall. På avkomman rapporterades vid denna dosnivå fördröjd förbening och minskade organvikter (tymus, mjälte, äggstockar) (136). Vid prövning på mus med oral administration under graviditeten av doser i samma storleksordning (591 eller 2363 mg d-limonen/kg dag 7-12), noterades i hög-dosgruppen reducerad tillväxt hos moderdjuren och hos avkomman signifikant ökad incidens skelettanomalier och fördröjd förbening (74). I en studie på kanin (75) med peroral administration av 250, 500 eller 1000 mg d-limonen/kg dag 6-18 under graviditeten uppges dock inga dos-relaterade anomalier hos fostren ha observerats. Hos moderdjuren däremot noterades vid den högsta dosen dödsfall och försämrad viktökning och i mellandos-gruppen en något försämrad tillväxt (75).

Inga biologiskt signifikanta skillnader i serumöstradiol och prolaktinnivåer eller i duration av estruscykeln rapporterades i en studie på råttor (29) efter sonmatning en gång med det carcinogena ämnet DMBA (65 mg/kg) och efterföljande administration av 1% eller 5% d-limonen i födan.

## 10. Samband mellan exponering, effekt och respons

Det finns få studier över effekter på människa av limonen.

Den enda undersökning med exponering genom inhalation som publicerats, är en studie över 8 frivilliga försökspersoner som under lätt fysiskt arbete (50W) under 2 timmar exponerades för 10, 225 eller 450 mg d-limonen/m<sup>3</sup>. Denna studie visade en liten men statistiskt signifikant minskning i vitalkapacitet efter exponering för d-limonen vid den högsta exponeringsnivån, medan inga signifikanta skillnader i lungfunktion kunde utläsas ur övriga uppmätta variabler. Förändringen i vitalkapacitet var troligen inte signifikant ur funktionell synpunkt. Irritationssymtom och symtom relaterade till det centrala nervsystemet

rapporterades inte föreligga hos exponerade personer. Slutsatserna i denna del av studien baserades emellertid endast på en subjektiv bedömning.

d-Limonen har en hudirriterande effekt. Då en hand neddoppades i en 98%-ig lösning av d-limonen under 2 timmar upplevdes redan efter några minuter smärtsam klåda och en brännande känsla och symptomen förvärrades efterhand. Huden på handryggen var svullen med måttlig rodnad. Svullnaden försvann 1,5 timmar efter avslutad exponering, men efter ytterligare 4,5 timmar uppträdde ett område med små hudblödningar (purpura). Denna förändring var som mest markant efter 1-2 dagar, men kvarstod under åtskilliga veckor. Blodkoncentrationen av d-limonen som uppmättes, befanns vara låg i jämförelse med den som erhållits efter exponering genom inhalation (10 mg/m<sup>3</sup>, 50W).

Rapporter över allergisk kontaktdermatit hos människa, där man med säkerhet vet att d-limonen framkallat allergin har inte påträffats. Experimentella studier på marsvin med d-limonen av hög renhet (98%) gav ingen sensibilisering, men då ämnet i nya försök exponerades under längre tid för luftens syre kunde en klar sensibilisering påvisas. Kemisk analys av luftexponerat d-limonen visade att produkten innehöll olika oxidationsprodukter av vilka limonen-1,2-oxid och karvon befanns vara potenta kontaktallergen vid försök på marsvin.

Djurexperimentella studier över limonen med exponering genom inhalation saknas. Många studier med administration av limonen (framför allt d-limonen) på andra sätt, vanligen peroralt, föreligger dock. Dessa resultat sammanfattas i tabell 2.

Tabell 2. Några dos-effekt data\* från djurstudier med d-limonen.

Exponering	Djurslag	Effekt	Referens
5,2 g/kg p.o.	råttor (hona)	LD 50	134
3 ml/kg p.o. en gång	mus råttor	minskad rörlighet, sänkt kroppstemperatur, förlängd hexobarbital-inducerad sömntid	133
1200 mg/kg/dag p.o. 13 veckor	råttor	slöhet, tårflöde	95
1200 mg/kg p.o. en gång	råttor	enzyminduktion	4
~1000 mg/kg/dag p.o. upp till 6 månader	hund	ökning av alkaliska fosfataser och kolesterol, ökad njurvikt	145
1000 mg/kg/dag p.o. 13 veckor	mus	minskad rörlighet	95



Tabell 2 forts.

Exponering	Djurslag	Effekt	Referens
~1000 mg/kg/dag p.o. 28 dagar	hund	ökad levervikt	145
600 mg/kg p.o. en gång	råtta	ökad $\delta$ ALA-syntetas- aktivitet	4
500 mg/kg/ dag p.o. 2 år	mus	hepatocyter inne- hållande tre eller flera kärnor, cytomegali	95
1 % i födan (~ 500 mg/kg/dag) 3 månader	råtta	hämning av HMG-CoA reduktas aktivitet och serum LDL kolesterol	104
1 % i födan (~ 500 mg/kg/dag) 2 veckor	råtta	enzyminduktion	90
**409 mg/kg p.o. en gång	råtta	hämrad HMG-CoA reduktasaktivitet	14
400 mg/kg/ dag p.o. 30 dagar	råtta	enzyminduktion, ökad relativ levervikt, minskning av kole- sterolnivåer	4
0,4 ml/kg/ dag p.o. 6 månader	hund	illamående, kräkningar	135
300 mg/kg p.o. 5 eller 20 gånger	råtta	ökad relativ levervikt	66
85 mg/kg p.o. en gång	råtta	ökad gallflöde	72
75 mg/kg/ dag p.o. 91 dagar	råtta	ökad relativ levervikt	146
**40 mg/kg ip 3 gånger	råtta	enzyminduktion	5

\* Data rörande njurskador (neoplastiska och icke-neoplastiska) specifika för hanråtta är inte inkluderade.

\*\* Optisk isomer av limonen har inte specificerats.

## 11. Forskningsbehov

d-Limonen oxideras lätt av luftens syre. Experimentella studier angående dess hudsensibiliserande verkan har visat att d-limonen per se inte är allergent, utan att allergena produkter bildas genom autooxidation. Vanligen har man dock vid studier över andra hälsoeffekter av d-limonen (limonen) inte tagit hänsyn till en eventuell effekt av olika oxidationsprodukter. De studerade effekterna kan därför åtminstone till en del bero på andra ämnen än limonen och dess metaboliter. I framtida studier är det av största vikt att man har kontroll även över dessa faktorer.

Det föreligger få studier över limonen vid yrkesmässig exponering. Inga mätningar över dess oxidationsprodukter har heller företagits. Nya metoder för att upptäcka och bestämma koncentrationerna av dessa ämnen i luft behöver därför utvecklas.

Det finns få data när det gäller effekter av limonen på ögon och luftvägar. Mer information angående lungfunktion och irritationseffekter vid exponering genom inhalation för limonen och dess oxidationsprodukter är av stort värde. Dessutom föreligger ett behov av forskning för att klarlägga om eventuella effekter på CNS föreligger.

Det har påvisats i djurexperimentella studier att d-limonen kan påverka levern. Inga studier med exponering genom inhalation, där man studerat effekter på levern föreligger emellertid och sådana studier vore därför av intresse. Inhalationsstudier där man bestämmer eventuella effekter av limonen på reproduktionen behövs också.

## 12. Diskussion och värdering

Limonen har en hudirriterande effekt. Äldre undersökningar anger citrusfrukter som orsak till förekomst av olika hudsjukdomar inom konservindustrin, framför allt irritativ kontaktdermatit, men exponeringen var i dessa fall komplex och många faktorer fanns som kunde bidra till att framkalla dermatit. d-Limonen i hög koncentration har dock visats orsaka kraftig irritation både vid försök på människa och i djurexperimentella studier.

Några fallstudier över kontaktallergi mot d-limonen, l-limonen och dipenten har publicerats, men renheten hos produkterna har (i dessa fall) inte undersökts närmare. Rapporter över allergiskt kontakteksem, där d-limonen med säkerhet kan sägas vara den enda utlösande faktorn har inte påträffats. d-Limonen anses sedan gammalt vara det hudsensibiliserande ämnet i citrusfrukter, men incidensen av kontaktallergi efter kontakt med dessa frukter är okänd. Ämnet är också inkluderat bland de sk parfymallergenerna. Experimentella studier på marsvin har visat att d-limonen per se inte ger signifikant sensibilisering, men att luftoxiderat d-limonen ger kontaktallergi. Dessa studier bör även vara giltiga för l-limonen och dipenten, eftersom d- och l-limonen är två enantiomera former (spegelbilder) av samma ämne. Dipenten är en blandning av d- och l-limonen. Oxidationsprodukterna och inte limonen som sådant, kan alltså ha varit det som förorsakat

allergierna även i de kliniska studierna. Hantering och renhet av limonen är sålunda kritiskt för den allergiframkallande förmågan.

Få uppgifter angående hudupptag av d-limonen föreligger. Den blodkoncentration som uppmättes hos en försöksperson efter dermal exponering av en hand för d-limonen i hög koncentration, var låg i jämförelse med den koncentration som erhöles genom exponering genom inhalation (10 mg/m<sup>3</sup>, 50 W).

Den information som föreligger angående människa vid exponering genom inhalation för d-limonen begränsar sig till en enda studie. En liten minskning i vitalkapacitet, troligen inte av betydelse ur funktionell synpunkt, noterades i en nyligen publicerad studie. Baserat på denna uppgift skulle den kritiska effekten hos människa möjligen kunna vara en effekt på andningssystemet, men mer information behövs innan man kan fastslå detta.

Limonen har visats påverka levern på försöksdjur vid peroral administration och vid injektioner i bukhålan. Ökad mängd och aktivitet av olika leverenzymmer, ökad levervikt och en minskning av HMG-CoA reductasaktiviteten i levern är bland de effekter som noterats. En förändrad metabolism av kända carcinogena ämnen har också påvisats experimentellt. Denna förändrade metabolism anses vara en anledning till den observerade anticarcinogena effekten av d-limonen. På grundval av tillgänglig information angående effekter av d-limonen på levern, kan den kritiska effekten av d-limonen på försöksdjur, utom hanrätta, anses vara levereffekter. Induktion av leverenzymmer har rapporterats vid injektioner i bukhålan, vid dosnivån 40 mg/kg/dag. Vid peroral administration av något högre doser har en ökad relativ levervikt också observerats. Inga toxiska effekter på levern har emellertid noterats vid dessa dosnivåer eller vid dosnivåer som ligger mer än tio gånger högre. De observerade effekterna på levern är därför sannolikt tecken på en fysiologisk anpassning. En omräkning ger vid handen att detta fysiologiska svar skulle kunna tänkas föreligga även hos människa vid inhalation av limonen vid exponeringsnivåer omkring 350 mg/m<sup>3</sup> eller högre, men inga undersökningar där man studerat levereffekter vid inhalation som kan bekräfta detta finns. Effekter på levern kan därför inte med säkerhet anges som den kritiska effekten hos människa.

Det är väl känt att d-limonen kan påverka njurarna hos hanrätta. För människa är dock dessa effekter på njurarna inte relevanta. Detta beror på att det protein som anses utgöra grunden för uppkomsten av de observerade njurskadorna,  $\alpha$ 2u-globulin, inte har rapporterats förekomma hos något annat djurslag än råttan (handjur). Hela det skadepanorama, inklusive den ökade incidensen av njurtumörer, som påvisats på njurarna hos hanrätta vid exponering för d-limonen har följaktligen inte heller observerats vid provning på något annat djurslag.

### 13. Sammanfattning

Karlberg A-T, Lindell B. Nordiska expertgruppen för gränsvärdesdokumentation. 107. Limonen. Arbete och Hälsa 1993:14, sid 1-37.

Det finns få data över effekter av limonen på människa. En liten minskning i vitalkapacitet har observerats vid exponering genom inhalation för 450 mg d-limonen/m<sup>3</sup> (2 timmar). Vid exponering av hud för d-limonen i höga koncentrationer har kraftig irritation rapporterats. Kontaktsensibilisering har påvisats i djurexperimentella studier med luftoxiderat d-limonen. d-Limonen per se gav ingen sensibilisering i dessa studier.

Levereffekter är den kritiska effekten på försöksdjur, utom hanrätta. Hos hanrätta orsakar d-limonen en speciell typ av njurskada och njurtumörer. Ett protein specifikt för hanrätta,  $\alpha$ 2u-globulin, anses utgöra grunden för utvecklingen både av de neoplastiska och de icke neoplastiska njurskadorna. Korttidstester in vitro har visat att d-limonen inte är genotoxiskt.

Nyckelord: allergi, cancer, dipenten,  $\alpha$ 2u-globulin, hudirritation, hygieniskt gränsvärde, lever, limonen, lungfunktion, njurar, yrkesmässig exponering

### 14. Summary

Karlberg A-T, Lindell B. Nordic Expert Group for Documentation of Occupational Exposure Limits. 107. Limonene. Arbete och Hälsa 1993:14, p 1-37.

There are few data regarding toxicity of limonene in human. A slight decrease in vital capacity at a concentration of 450 mg d-limonene/m<sup>3</sup> (2 h) was observed in one study. Skin exposure to d-limonene in high concentrations gives a marked irritancy of the skin. Contact allergy has been shown in animal studies with air oxidized d-limonene. d-Limonene itself gave no significant sensitization in these studies. Liver effects are the critical effects in animals, except in male rats. In the male rat, d-limonene causes damage to the kidney and renal tumours. The male-rat specific protein  $\alpha$ 2u-globulin is considered to have a crucial role in the development of the neoplastic as well as the nonneoplastic kidney lesions. d-Limonene has been studied in a battery of short term tests in vitro and found to be nongenotoxic.

Key words: allergy, cancer, dipentene,  $\alpha$ 2u-globulin, kidney, limonene, liver, lung function, occupational exposure limits, skin irritancy

## 15. Referenser

1. Alden C L, Kanerva R L, Ridder G, Stone L C. The pathogenesis of the nephrotoxicity of volatile hydrocarbons in the male rat. In: Advances in Modern Environmental Toxicology vol VII, Princeton Scientific Publ, Princeton NJ, 1984 pp 107-120.
2. Alden C L. A review of unique male rat hydrocarbon nephropathy. Toxicol Pathol 14 (1986) 109-111.
3. Anderson B E, Zeiger E, Shelby M D, Resnick M A, Gulati D K, Ivett J L, Loveday K S. Chromosome aberration and sister chromatid exchange test results with 42 chemicals. Environ Mol Mutagen 16 (1990) 55-137.
4. Ariyoshi T, Arakaki M, Ideguchi K, Ishizuka Y, Noda K, Ide H. Studies on the metabolism of d-limonene (p-mentha-1,8-diene). III. Effects of d-limonene on the lipids and drug-metabolizing enzymes in rat livers. Xenobiotica 5 (1975) 33-38.
5. Austin C A, Shephard E A, Pike S F, Rabin B R, Phillips I R. The effect of terpenoid compounds on cytochrome P-450 levels in rat liver. Biochem Pharmacol 37 (1988) 2223-2229.
6. Barbier P, Benzra C. The influence of limonene on induced delayed hypersensitivity to citral in guinea pigs. II. Label distribution in the skin of <sup>14</sup>C-labelled citral. Acta Dermatovenereol (Stockholm) 63 (1983) 93-96.
7. Basketter D, Allenby C F. Studies on the quenching phenomenon in delayed contact hypersensitivity reactions. Contact Dermatitis 25 (1991) 160-171.
8. Beerman H, Fondé G H, Callaway J L. Citrus fruit dermatoses. Arch Derm Syph 38 (1938) 225-234.
9. Beilstein. Factual searching. Beilstein Institute for Organic Chemistry. Springer Verlag, GmbH & Co. KG, Frankfurt am Main FR Germany 1990.
10. Birmingham D J, Campbell Jr P C, Doyle H N, McDonald J M. Investigation of occupational dermatoses in the citrus fruit canning industry. Arch Ind Hyg Occup Med 3 (1951) 57-63.
11. Borghoff S J, Miller A B, Bowen J P, Swenberg J A. Characteristics of chemical binding to  $\alpha$ 2u-globulin in vitro evaluating structure-activity relationships. Toxicol Appl Pharmacol 107 (1991) 228-238.
12. Calnan C D. Allergy to dipentene in paint thinner. Contact Dermatitis 5 (1979) 123-124.
13. Carlsson H, Andersson-Sköld Y, Antonsson A-B, Solyom P. Limonen, lösningen på miljöproblemen eller....? IVL Rapport B 1030 (1991).
14. Clegg R J, Middleton B, Bell G D, White D A. Inhibition of hepatic cholesterol synthesis and S-3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase by mono and bicyclic monoterpenes administered in vivo. Biochem Pharmacol 29 (1980) 2125-2127.
15. Connor T H, Theiss J C, Hanna H A, Monteith D K, Matney T S. Genotoxicity of organic chemicals frequently found in the air of mobile homes. Toxicol Lett 25 (1985) 33-40.
16. Corner R. Alternativa vaskmedel. Examensarbete Arbetsmiljöinstitutets skyddsingenjörutbildning 1990/1991.
17. CRC Handbook of Chemistry and Physics, 73rd ed. CRC Press Inc, Boca Raton Florida USA 1992-1993.
18. Cronin E (Ed). Contact Dermatitis. Churchill Livingstone, London (1980) 532-534.
19. Crowell P L, Chang R R, Ren Z, Elson C E, Gould M N. Selective inhibition of isoprenylation of 21-26-kDa proteins by the anticarcinogen d-limonene and its metabolites. J Biol Chem 266 (1991) 17679-17685.
20. Crowell P L, Elegbede J A, Elson C E, Lin S, Vedejs E, Cunningham D, Bailey H H, Gould M N. Human metabolism of orally administered d-limonene. Proceed Amer Assoc Cancer Res 33 (1992) 524.
21. Crowell P L, Kennan W S, Haag J D, Ahmad S, Vedejs E, Gould M N. Chemoprevention of mammary carcinogenesis by hydroxylated derivatives of d-limonene. Carcinogenesis 13 (1992) 1261-1264.
22. de Groot C. Adverse reactions to cosmetics. Thesis, State University of Groningen, Groningen, the Netherlands 57 (1988).
23. Dietrich D R, Swenberg J A. NCI-Black-Reiter (NBR) male rats fail to develop renal disease following exposure to agents that induce  $\alpha$ 2u-globulin ( $\alpha$ -2u) nephropathy. Fundament Appl Toxicol 16 (1991) 749-762.
24. Dietrich D R, Swenberg J A. The presence of  $\alpha$ 2u-globulin is necessary for d-limonene promotion of male rat kidney tumors. Cancer Res 51 (1991) 3512-3521.
25. Doms-Goossens A, Degreef H, Holvoet C, Maertens M. Turpentine-induced hypersensitivity to peppermint oil. Contact Dermatitis 3 (1977) 304-308.
26. Elegbede J A, Elson C E, Qureshi A, Tanner M A, Gould M N. Inhibition of DMBA-induced mammary cancer by the monoterpene d-limonene. Carcinogenesis 5 (1984) 661-664.
27. Elegbede J A, Elson C E, Tanner M A, Qureshi A, Gould M N. Regression of rat primary mammary tumors following dietary d-limonene. J Natl Ca Inst 76 (1986) 323-325.
28. Elegbede J A, Maltzman T H, Verma A K, Tanner M A, Elson C E, Gould M N. Mouse skin tumor promoting activity of orange peel oil and d-limonene: a re-evaluation. Carcinogenesis 7 (1986) 2047-2049.
29. Elson C E, Maltzman T H, Boston J L, Tanner M A, Gould M N. Anti-carcinogenic activity of d-limonene during the initiation and promotion/progression stages of DMBA-induced rat mammary carcinogenesis. Carcinogenesis 9 (1988) 331-332.
30. EPA. Alpha  $\alpha$ 2u-globulin: Association with chemically induced renal toxicity and neoplasia in the male rat. Risk Assessment Forum, US Environ Protect Agency, Washington DC, 1991.
31. Eriksson K, Levin J-O, Lindén G et al. Terpenexponering och lungfunktionspåverkan hos snickeriarbetare. Arbete och Hälsa 21 (1992) 147-156.
32. Eriksson K, Levin J-O. Identification of *cis* and *trans*-verbenol in human urine after occupational exposure to terpenes. Arch Occup Environ Health 62 (1990) 379-383.
33. Evans D, Miller D, Jacobsen K, Bush P. Modulation of immune responses in mice by d-limonene. J Toxicol Environ Health 20 (1987) 51-66.
34. Fahrig R. Genetic mode of action of cocarcinogens and tumor promoters in yeast and mice. Mol Gen Genet 194 (1984) 7-14.
35. Fairbanks K P, Barbu V D, Witte L D, Weinstein I B, Goodman D S. Effects of mevinolin and mevalonate on cell growth in several transformed cell lines. J Cell Physiol 127 (1986) 216-222.
36. Falk A, Fischer T, Hagberg M. Purpuric rash caused by dermal exposure to d-limonene. Contact Dermatitis 25 (1991) 198-199.
37. Falk A, Gullstrand E, Löf A, Wigaeus-Hjelm E. Liquid/air partition coefficients of four terpenes. Brit J Ind Med 47 (1990) 62-64.
38. Falk Filipsson A, Löf A, Hagberg M, Wang Z, Wigaeus Hjelm E. d-Limonene exposure to humans by inhalation: Uptake, distribution, elimination, and effects on the pulmonary function. J Toxicol Environ Health 38 (1992) 77-88.
39. Field W E, Roe F J. Tumor promotion in the forestomach epithelium of mice by oral administration of citrus oils. J Natl Ca Inst 35 (1965) 771-787.
40. Fisher A A (Ed). Contact Dermatitis, 3rd ed. Churchill Livingstone, London (1986) 264, pp. 421-422, 582-583.
41. Fjelstad P E, Woldback T. A national exposure database. In Brown R H, Curtis M, Saunders K J, Vandendriessche (Eds). Clean air at work. New trends in assessment and measurement for the 1990s. Royal Society of Chemistry, Cambridge (1992) 303-310. Fjelstad P E. Limonene data: personal communication. Natl Inst Occup Health, Oslo 1992.

42. Flamm G W, Lehman-McKeeman L D. The human relevance of the renal tumor-inducing potential of d-limonene in male rats: Implications for risk assessment. *Regul Toxicol Pharmacol* 13 (1991) 70-86.
43. Florin I, Rutberg L, Curvall M, Enzell C R. Screening of tobacco smoke constituents for mutagenicity using the Ames' test. *Toxicology* 18 (1980) 219-232.
44. Frank A A, Ross J L, Sawvell B K. Toxic epidermal necrolysis associated with flea dips. *Vet Hum Toxicol* 34 (1992) 57-61.
45. Gildemeister E, Hoffman F. Die ätherischen Öle. In Triebels W, Merkel D (Eds). Band 3A. Akademie-Verlag, Berlin (1960) 45-75.
46. Goldworthy T L, Morgan K T, Popp J A, Butterworth B E. Chemically-induced cell proliferation. *CIIT Activities* 10 (1990) 1-7.
47. Gould M N, Wacker W D, Maltzman T H. Chemoprevention and chemotherapy of mammary tumors by monoterpenoids. *Prog Clin Biol Res* 347 (1990) 255-268.
48. Gould M N. Chemoprevention and treatment of experimental mammary cancers by limonene. *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res* 32 (1991) 474-475.
49. Greif N. Cutaneous safety of fragrance material as measured by the Maximization Test. *Am Perfumer Cosmet* 82 (1967) 54-57.
50. Guin J, Meyer B, Drake R, Haffley P. The effect of quenching agents on contact urticaria caused by cinnamic aldehyde. *J Am Academy Dermatol* 1 (1984) 45-51.
51. Haag J D, Crowell P L, Gould M N. Enhanced inhibition of protein isoprenylation and tumor growth by perillyl alcohol, an hydroxylated analog of d-limonene. *Proc Amer Ass Cancer Res* 33 (1992) 524.
52. Haag J D, Lindström M J, Gould M N. Limonene-induced regression of mammary carcinomas. *Cancer Res* 52 (1992) 4021-4026.
53. Halder C A, Holdsworth C E, Cockrell B Y, Piccirillo V J. Hydrocarbon nephropathy in male rats: Identification of the nephrotoxic components of unleaded gasoline. *Toxicol Ind Health* 1 (1985) 67-87.
54. Hanau D, Grosshans E, Barbier P, Benzra C. The influence of limonene on induced delayed hypersensitivity to citral in guinea pigs. I. Histological study. *Acta Dermatovener (Stockh)* 63 (1983) 1-7.
55. Hancock J F, Magee A I, Childs J E, Marshall C J. All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell* 57 (1989) 1167-1177.
56. Haworth S, Lawlor T, Mortelmans K, Speck W, Zeiger E. Salmonella mutagenicity test results for 250 chemicals. *Environ Mutagen* 1 (1983) 3-142.
57. Homburger F, Treger A, Boger E. Inhibition of murine subcutaneous and intravenous benzo(a)pyrene carcinogenesis by sweet orange oils and d-limonene. *Oncology* 25 (1971) 1-10.
58. Hooser S B, Beasley V R, Everitt J I. Effects of an insecticidal dip containing d-limonene in the cat. *J Am Vet Med Assoc* 189 (1986) 905-908.
59. Igimi H, Hisatsugu T, Nishimura M. The use of d-limonene preparation as a dissolving agent of gallstones. *Dig Dis* 21 (1976) 926-939.
60. Igimi H, Nishimura M, Kodama R, Ide H. Studies on the metabolism of d-limonene (p-mentha-1,8-diene) I. The absorption, distribution and excretion of d-limonene in rats. *Xenobiotica* 4 (1974) 77-84.
61. Igimi H, Tamura R, Toraiishi K, Yamamoto F, Kataoka A, Ikejiri Y, Hisatsugu T, Shimura H. Medical dissolution of gallstones. Clinical experience of d-limonene as a simple, safe, and effective solvent. *Dig Dis Sci* 36 (1991) 200-208.
62. Jansson P H. Citrusfrüchte und Hauterkrankungen. *Tschr Haut u Geschlechtskr* 14 (1953) 144-147.
63. Jensen O C, Petersen I. Ehrvervsasthma fremkaldt af duftstoffer i kattegrus. *Ugeskr Læger* 153 (1991) 939-940.
64. Kanerva R L, Alden C L. Review of kidney sections from a subchronic d-limonene oral dosing study conducted by the national cancer institute. *Fd Chem Toxic* 25 (1987) 355-358.
65. Kanerva R L, McCracken M S, Alden C L, Stone L C. Morphogenesis of decalin-induced renal alterations in the male rat. *Fd Chem Toxic* 25 (1987) 53-61.
66. Kanerva R L, Ridder G M, Lefever F R, Alden C L. Comparison of short-term renal effects due to oral administration of decalin or d-limonene in young adult male Fischer-344 rats. *Fd Chem Toxic* 25 (1987) 345-453.
67. Kanerva R L, Ridder G M, Stone L C, Alden C L. Characterization of spontaneous and decalin-induced hyaline droplets in kidneys of adult male rats. *Fd Chem Toxic* 25 (1987) 63-82.
68. Karlberg A-T, Boman A, Melin B. Animal experiments on the allergenicity of d-limonene - the citrus solvent. *Ann Occup Hyg* 35 (1991) 419-426.
69. Karlberg A-T, Magnusson K, Nilsson U. Air oxidation of d-limonene (the citrus solvent) creates potent allergens. *Contact Dermatitis* 26 (1992) 332-340.
70. Kirk-Othmer (Ed). *Encyclopedia of Chemical Technology*, Vol 19. John Wiley & Sons, New York USA (1969) 815-817.
71. Klecak G, Geleick H, Frey J R. Screening of fragrance materials for allergenicity in the guinea pig. I. Comparison of four testing methods. *J Soc Cosmet Chem* 28 (1977) 53-54.
72. Kodama R, Inoue H, Noda K, Ide H. Effect of d-limonene and related compounds on bile flow and biliary lipid composition in rats and dogs. *Life Sci* 19 (1976) 1559-1568.
73. Kodama R, Noda K, Ide H. Studies on the metabolism of d-limonene (p-mentha-1,8-diene) II. The metabolic fate of d-limonene in rabbits. *Xenobiotica* 4 (1974) 85-95.
74. Kodama R, Okubo A, Araki E, Noda K, Ide H, Ikeda T. Studies on d-limonene as a gallstone solubilizer (VII). Effects on development of mouse fetuses and offsprings. *Oyo Yakuri* 13 (1977) 863-873.
75. Kodama R, Okubo A, Sato K, Araki E, Noda K, Ide H, Ikeda T. Studies on d-limonene as a gallstone solubilizer (IX). Effects on development of rabbit fetuses and offsprings. *Oyo Yakuri* 13 (1977) 885-898.
76. Kodama R, Yano T, Furukawa K, Noda K, Ide H. Studies on the metabolism of d-limonene (p-mentha-1,8-diene). IV. Isolation and characterization of new metabolites and species differences in metabolism. *Xenobiotica* 6 (1976) 377-389.
77. Köppl C, Tenczer J, Tönnemann U, Schirop T, Ibe K. Acute poisoning with pine oil - metabolism of monoterpenes. *Arch Toxicol* 49 (1981) 73-78.
78. Lacy M J, Kent C R, Voss Jr E W. d-Limonene: An effective vasodilator for use in collecting rabbit blood. *Lab Anim Sci* 37 (1987) 485-487.
79. Lehman-McKeeman L D, Caudill D, Takigiku R, Schneider R E, Young J A. Comparative disposition of d-limonene in rats and mice: relevance to male-rat-specific nephrotoxicity. *Toxicol Lett* 53 (1990) 193-195.
80. Lehman-McKeeman L D, Caudill D. Biochemical basis for mouse resistance to hyaline droplet nephropathy: lack of relevance of the  $\alpha$ 2u-globulin protein superfamily in this male rat-specific syndrome. *Toxicol Appl Pharmacol* 112 (1992) 214-221.
81. Lehman-McKeeman L D, Rivera-Torres M I, Caudill D. Lysosomal degradation of a  $\alpha$ 2u-globulin and  $\beta$ 2u-globulin-xenobiotic conjugates. *Toxicol Appl Pharmacol* 103 (1990) 539-548.
82. Lehman-McKeeman L D, Rodriguez P A, Takigiku R, Caudill D, Fey M L. d-Limonene-induced male rat-specific nephrotoxicity: Evaluation of the association between d-limonene and  $\alpha$ 2u-globulin. *Toxicol Appl Pharmacol* 99 (1989) 250-259.

83. Leonard S, Beck L, Sinensky M. Inhibition of isoprenoid biosynthesis and the post-translational modification of pro-p21<sup>ras</sup>. *J Biol Chem* 265 (1990) 5157-5160.
84. Leroy E P. Pulmonary toxicity of some terpenoids in rats and hamsters. 68th Annual Meeting of the Federation of American Societies for Experimental Biology, St Louis, MO USA April 1-6, 1990.
85. Levin J-O (Ed). *Principer och metoder för provtagning och analys av ämnen upptagna på listan över hygieniska gränsvärden. Arbete och Hälsa* 40 (1990).
86. Limonene no. 5371. In Budavari S, O'Neil M J, Smith A, Heckelman P E (Eds). *The Merck Index*, 11th ed. Merck & Co Inc, Rahway NJ USA (1989) 865.
87. Lock E A. Chronic nephrotoxicity of 2,2,4-trimethylpentane and other branched-chain hydrocarbons. *Toxicol Lett* 53 (1990) 75-80.
88. Maack T, Johnson V, Kau S T, Figueiredo J, Sigulem D. Renal filtration, transport, and metabolism of low-molecular-weight proteins: A review. *Kidney Int* 16 (1979) 251-270.
89. Maisey J, Miller K. Assessment of the ability of mice fed on vitamin A supplemented diet to respond to a variety of potential contact sensitizers. *Contact Dermatitis* 15 (1986) 17-23.
90. Maltzman T H, Christou M, Gould M N, Jefcoate C R. Effects of monoterpenoids on in vivo DMBA-DNA adduct formation and on phase I hepatic metabolizing enzymes. *Carcinogenesis* 12 (1991) 2081-2087.
91. Maltzman T H, Hurt L M, Elson C E, Tanner M A, Gould M N. The prevention of nitrosomethylurea-induced mammary tumors by d-limonene and orange oil. *Carcinogenesis* 10 (1989) 781-783.
92. Maltzman T H. Anticarcinogenic mechanism of action of dietary limonene during the initiation stage of DMBA-induced rat mammary carcinogenesis. *Dissert Abstr Int* 51 (1991) 4283-B.
93. Matsuoka H, Yoshikazu II, Yukihiro T, Teraoka T. Evaluation of antifungal volatile compounds on the basis of the elongation rate of a single hypha. *Appl Environ Microbiol* 56 (1990) 3779-3784.
94. Myhr B, McGregor D, Bowers L, Riach C, Brown A G, Edwards I, McBride D, Martin R, Caspari W J. L5178Y Mouse lymphoma cell mutation assay results with 41 compounds. *Environ Molecul Mutagen* 16 (1990) 138-167.
95. NTP. National Toxicology Program (1990). Toxicology and carcinogenesis studies of d-limonene in F344/N rats and B6C3F<sub>1</sub> mice. NTP Technical Report No 347. NIH, US Department of Health and Human Services, Springfield, VA 1990.
96. Obata Y, Takamaya K, Machida Y. Combined effect of cyclic monoterpenes and ethanol on percutaneous absorption of diclofenac sodium. *Drug Des Discovery* 8 (1991) 137-144.
97. Okabe H, Obata Y, Takayama K, Nagai T. Percutaneous absorption enhancing effect and skin irritation of monocyclic monoterpenes. *Drug Design and Delivery* 6 (1990) 229-238.
98. Olson M J, Garg B D, Murty C V R, Roy A K. Accumulation of  $\alpha$ 2u-globulin in the renal proximal tubules of male rats exposed to unleaded gasoline. *Toxicol Appl Pharmacol* 90 (1987) 43-51.
99. Opydyke D L J. Monographs on Fragrance Raw Materials. *Fd Cosmet Toxicol Special Issue II*. Vol 13 Suppl. Pergamon Press, Oxford (1975) 825-826.
100. Opydyke D L J. Monographs on Fragrance Raw Materials. *Fd Cosmet Toxicol Special Issue IV*. Vol 16 Suppl. Pergamon Press, Oxford (1978) 809.
101. Phillips R D, Cockrell B Y. Effect of certain light hydrocarbons on kidney function and structure in male rats. In: Renal effects of petroleum hydrocarbons. *Advances in Modern Environmental Toxicology* M A Mehlman, C P Hemstreet, J J Thorpe, N K Weaver (eds). Princeton Sci Publ, Inc Princeton, NJ, 1984, pp 89-105.
102. Pienta R J. Evaluation and relevance of the syrian hamster embryo cell system. *Appl Meth Oncol* 3 (1980) 149-169.
103. Priborsky J, Takamaya K, Muhlbachova E et al. Effect of cyclic monoterpenes on percutaneous absorption of flufenamic acid. *Yakuzaigaku* 51 (1991) 123-128.
104. Qureshi A A, Mangels W R, Din Z Z, Elson C E. Inhibition of hepatic mevalonate biosynthesis by the monoterpene, d-limonene. *J Agric Food Chem* 36 (1988) 1220-1224.
105. Regan J W, Bjeldanes L F. Metabolism of (+)-limonene in rats. *J Agric Food Chem* 24 (1976) 377-380.
106. Ridder G M, von Barga E C, Alden C L, Parker R D. Increased hyaline droplet formation in male rats exposed to decalin is dependent on the presence of  $\alpha$ -2u-globulin. *Fund Appl Toxicol* 15 (1990) 732-743.
107. Roe F J C, Peirce W E H. Tumor promotion by citrus oils: Tumors of the skin and urethral orifice in mice. *J Natl Ca Inst* 24 (1960) 1389-1403.
108. Roy A K, Raber D L. Immunofluorescent localization of  $\alpha$ 2u-globulin in the hepatic and renal tissues of rat. *J Histochem Cytochem* 20 (1972) 89-96.
109. Roy A K, Schiop M J, Dowbenko D J. Regulation of the hepatic synthesis of  $\alpha$ 2u-globulin and its corresponding messenger RNA in maturing male rats. *Febs Lett* 70 (1976) 137-140.
110. Royals E E, Horne Jr S E. Observations on the rate of autooxidation of d-limonene. *J Am Chem Soc* 77 (1955) 187-188.
111. Russin W A, Hoesly J D, Elson C E, Tanner M A, Gould M N. Inhibition of rat mammary carcinogenesis by monoterpenoids. *Carcinogenesis* 10 (1989) 2161-2164.
112. Ryeroffi R J G. Allergic contact dermatitis from dipentene in honing oil. *Contact Dermatitis* 6 (1980) 325-329.
113. Römmelt H, Zuber K, Dirnagl K, Drexel H. Zur resorption von Terpenen aus Badezusätzen. *Münch Med Wschr* 116 (1974) 537-540.
114. Saito K, Uwagawa S, Kaneko H, Yoshitake A. Behaviour of  $\alpha$ 2u-globulin accumulating in kidneys of male rats treated with d-limonene: Kidney-type  $\alpha$ 2u-globulin in the urine as a marker of d-limonene nephropathy. *Toxicology* 79 (1991) 173-183.
115. Sandmeyer E E. Terpenes. In Clayton G D, Clayton F E (Eds). *Patty's Industrial Hygiene and Toxicology*, 3rd ed. John Wiley & Sons, New York USA (1981) 3227-3228.
116. Santucci B, Cristaudo A, Cannistraci C, Picardo M. Contact dermatitis to fragrances. *Contact Dermatitis* 16 (1987) 93-95.
117. Schafer W R, Kim R, Sterne R, Thomer J, Kim S-H, Rine J. Genetic and pharmacological suppression of oncogenic mutations in RAS genes of yeast and humans. *Science* 245 (1989) 379-385.
118. Schenk J, Döbrönte Z, Koch H, Stolte M. Untersuchungen zur Gewebeerträglichkeit von D-Limonen als einem Lösungsmittel cholesterinreicher Gallensteine. *Z Gastroenterologie* 18 (1980) 389-394.
119. Schenk O G, Neumiller O A, Ohloff G, Schroeter S. Zur Autooxidation des (+)-Limonens. *Justus Liebig Ann Chem* 687 (1965) 26-39.
120. Schwartz L. Cutaneous hazards in the citrus fruit industry. *Arch Dermatol* 37 (1938) 631-649.
121. Schäfer R, Schäfer W. Die perkutane Resorption verschiedener Terpene - Menthol, Campher, Limonen, Isobornylacetat,  $\alpha$ -Pinen - aus Badezusätzen. *Arzneim Forsch/Drug Res* 32 (1982) 56-58.
122. Searle E. Determination of airborne limonene vapour by charcoal tube sampling and gas-liquid chromatographic analysis. *Analyst* 114 (1989) 113-114.
123. Short B G, Burnett V L, Swenberg J A. Elevated proliferation of proximal tubule cells and localization of accumulated  $\alpha$ 2u-globulin in F344 rats during chronic exposure to unleaded gasoline or 2,2,4-trimethylpentane. *Toxicol Appl Pharmacol* 101 (1989) 414-431.
124. Short B G, Swenberg J A. Pathologic investigations of the mechanism of unleaded gasoline-induced renal tumors in rats. *CIIT Activities* 8 (1988) 1-6.

125. Smith O W, Wade A P, Dean F M. Uroterpenol, a pettenkofer chromogen of dietary origin and a common constituent of human urine. *J Endocr* 45 (1969) 17-28.
126. Steele V E, Kelloff G J, Wilkinson B P, Arnold J T. Inhibition of transformation in cultured rat tracheal epithelial cells by potential chemopreventive agents. *Cancer Res* 50 (1990) 2068-2074.
127. Stoner G D, Shimkin M B, Kniazeff A J, Weisburger J H, Wiesburger E K, Gori G B. Test for carcinogenicity of food additives and chemotherapeutic agents by the pulmonary tumor response in strain A mice. *Cancer Res* 33 (1973) 3069-3085.
128. Swenberg J A, Richardson F C, Boucheron J A, Deal F H, Belinsky S A, Charbonneau M, Short B G. High- to low-dose extrapolation: Critical determinants involved in the dose response of carcinogenic substances. *Environ Health Persp* 76 (1987) 57-63.
129. Swenberg J A, Short B, Borghoff S, Strasser J, Charbonneau M. The comparative pathobiology of  $\alpha$ 2u-globulin nephropathy. *Toxicol Appl Pharmacol* 97 (1989) 35-46.
130. Takamaya K, Kikuchi K, Obata Y, Okaba H, Machida Y, Nagai T. Terpenes as percutaneous absorption promoters. *S.T.P. Pharm Sci* 1 (1991) 83-88.
131. The Sigma-Aldrich library of chemical safety data, 2nd ed Vol 1. Aldrich-Chemie, Steinheim Germany 1992-1993.
132. Traul K A, Hink R J Jr, Kachevsky V, Wolff J S. Two-stage carcinogenesis in vitro: Transformation of 3-methylcholanthrene-initiated rauscher murine leukemia virus-infected rat embryo cells by diverse tumor promoters. *J Natl Ca Inst* 66 (1981) 171-175.
133. Tsuji M, Fujisaka Y, Yamachika K, Nakagami K, Fujisaki F, Mito M, Aoki T, Kinoshita S, Okubo A, Watanabe I. Studies on d-limonene, as gallstone solubilizer (I) general pharmacological studies. *Oyo Yakuri* 8 (1974) 1439-1459.
134. Tsuji M, Fujisaki Y, Arikawa Y, Masuda S, Kinoshita S, Okubo A, Noda K, Ide H, Iwanaga Y. Studies on d-limonene, as gallstone solubilizer (II) acute and subacute toxicities. *Oyo Yakuri* 9 (1975) 387-401.
135. Tsuji M, Fujisaki Y, Arikawa Y, Masuda S, Tanaka T, Sato K, Noda K, Ide H, Kikuchi M. Studies on d-limonene, as gallstone solubilizer (IV). Chronic toxicity in dogs. *Oyo Yakuri* 9 (1975) 775-808.
136. Tsuji M, Fujisaki Y, Okubo A, Arikawa Y, Noda K, Ide H, Ikeda T. Studies on d-limonene as gallstone solubilizer (V). Effects on development of rat fetuses and offsprings. *Oyo Yakuri* 10 (1975) 179-186.
137. Van Duuren B L, Goldschmidt B M. Cocarcinogenic and tumor-promoting agents in tobacco carcinogenesis. *J Natl Ca Inst* 56 (1976) 1237-1242.
138. Wahlberg JE, Boman A. In Andersen KE, Maibach HI (Eds). *Current Problems in Dermatology*, Vol 14. Karger, Basel (1985) 59-106.
139. Wallace L, Nelson W, Ziegenfus R, Pellizzari E, Michael L, Whitmore R, Zelon H, Hartwell T, Perritt R, Westerdahl D. The Los Angeles team study: Personal exposures, indoor-outdoor air concentrations, and breath concentrations of 25 volatile organic compounds. *J Expos Analys Environ Epidem*, Vol 1. 2 (1991) 157-192.
140. Watabe T, Hiratsuka A, Isobe M, Ozawa N. Metabolism of d-limonene by hepatic microsomes to non-mutagenic epoxides toward *Salmonella typhimurium*. *Biochem Pharmacol* 29 (1980) 1068-1071.
141. Watabe T, Hiratsuka A, Ozawa N, Isobe M. A comparative study on the metabolism of d-limonene and 4-vinylcyclohex-1-ene by hepatic microsomes. *Xenobiotica* 11 (1981) 333-344.
142. Wattenberg L W, Coccia J B. Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone carcinogenesis in mice by D-limonene and citrus fruit oils. *Carcinogenesis* 12 (1991) 115-117.
143. Wattenberg L W, Sparnins V L, Barany G. Inhibition of N-nitrosodiethylamine carcinogenesis in mice by naturally occurring organosulfur compounds and monoterpenes. *Cancer Res* 49 (1989) 2689-2692.
144. Wattenberg L W. Inhibition of carcinogenesis by minor anutrient constituents of the diet. *Proc Nutr Soc* 49 (1990) 173-183.
145. Webb D R, Kanerva R L, Hysell D K, Alden C L, Lehman-McKeeman L D. Assessment of the subchronic oral toxicity of d-limonene in dogs. *Fd Chem Toxic* 28 (1990) 669-675.
146. Webb D R, Ridder G M, Alden C L. Acute and subchronic nephrotoxicity of d-limonene in Fischer 344 rats. *Fd Chem Toxic* 27 (1989) 639-649.
147. Williams A C, Barry B W. Terpenes and the lipid-protein-partitioning theory of skin penetration enhancement. *Pharm Res*, Vol 8. 1 (1991) 17-24.
148. Wrba H, El-Mofly M M, Schwaireb M H, Dutter A. Carcinogenicity testing of some constituents of black pepper. *Exp Toxic Pathol* 44 (1992) 61-65.
149. Zarbl H, Sukumar S, Arthur A V, Martin-Zanca D, Barbacid M. Direct mutagenesis of *H-ras-1* oncogenes by N-nitroso-N-methylurea during initiation of mammary carcinogenesis in rats. *Nature* 315 (1985) 382-285.
150. Zheng G, Kenney P M, Lam L K T. Anethofuran, carvone, and limonene: potential cancer chemopreventive agents from dill weed oil and caraway oil. *Plant Med* 58 (1992) 338-341.

Insänt för publicering 93-05-28

Appendix I. Lista över tillåtna eller rekommenderade högsta halter av limonen i luft

Land	mg/m <sup>3</sup>	ppm	Anm	År	Ref
Danmark	-	-		1988	1
Finland	-	-		1987	2
Island	-	-		1989	3
Nederländerna	-	-		1989	4
Norge	-	-		1989	5
Sverige	150 300	25 50	NGV HS KTV	1990	6
USA (ACGIH)	-	-		1991-92	7
(NIOSH)	-	-			8

HS = hudsensibiliserande  
 NGV= nivågränsvärde  
 KTV = korttidvärde

Referenser till appendix I

1. Arbejdstilsynet. Graensevaerdier for stoffer og materialer. AT-anvisning Nr.3.1.0.2. København (1988).
2. Työhygieniset raja-arvot eri maissa. Katsauksia 82. Työterveyslaitos, Helsinki (1987).
3. Mengunarmörk og adgerdir til ad draga úr mengun. Skrá yfir mengunarmörk. Vinnuefirlit Ríkisins. Reykjavík 1989.
4. De Nationale MAC-Lijst 1989. Arbeidsinspectie P no 145. Voorburg 1989.
5. Administrative normer for forurensninger i arbeids-atmosfaere. Veiledning til arbeidsmiljøloven. Bestillings-nr. 361. Direktoratet for Arbeidstilsynet, Oslo (1989).
6. Arbetarskyddsstyrelsens författningssamling: Hygieniska gränsvärden. AFS 1990:13.
7. ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists INC) Documentation of the threshold limit values and biological exposure indices. 1991-92. Cincinnati OHIO.
8. NIOSH. Recommendations for Occupational Safety and Health. DHHS Publication No 92-100 (1992) US Department of Health and Human Services.