

遅発型皮膚反応の発現機序に関する研究

—遅発型皮膚反応の Adjuvant 的效果の検討*—

金沢大学結核研究所細菌免疫部（主任：西東利男教授）

佐々木 静

（受付：昭和41年4月11日）

緒 言

遅発型皮膚反応 (DHS) 発現の人工的手段が開発¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾されて以来、この反応の包蔵する免疫学的意義、その発生機序あるいは即時型皮膚反応 (IHS) との関連性などは免疫アレルギー学分野で重要な研究課題となつて今日に至っている。

教室同人ら⁶⁾⁷⁾もこの線に沿つて DHS と IHS に関する知見の拡大深化に努力しているが、著者は Freund's complete adjuvant を注射してツベルクリン (「ツ」) 反応陽性となつた動物において「ツ」に diphtheria toxoid を混合して皮膚反応を行なつたところ、きわめて顕著に antitoxin が増産されたという Humphrey and Turk⁸⁾ の報告に接し、このような条件下で血中抗体の増産に先行して DHS の

発現がみられるか否かについて検討を加えた。このことは DHS と IHS の発現機序および関連性を解明する上で誠に重要な意義を有していると考えられるからである。

その結果「ツ」を含めてある種抗原（第1の抗原）に対する DHS 感受性の存在が第2の抗原に対する DHS 発現の増強に作用することではなく、さらに第1の抗原に対する DHS も、このじゃっ起試験に加えて用いられた第2の抗原への DHS の発現を増強することもなく、DHS 発現の増強は油中結核菌の注射によって生ずる「ツ」感受性以外の“ある特定の状態”——おそらく Wax D によって招来される——に基づくものとみられる成績がえられた。以下はその成績の概要である。

実験材料および実験方法

I 実験材料

- 1) 動物：一定期間一定条件下で飼育した体重 400 gm 前後のモルモットを用いた。
- 2) 免疫用抗原
 - a) Cole の緒方変法⁹⁾により再結晶を繰返えして作製した精製ニワトリアルブミン (HEA)
 - b) ウサギ血清を2倍に希釈し、これに最終濃度が 1.4M になるようにあらかじめ 3.4M に調製してある硫酸溶液を加え、えられた沈澱を水に溶解し更に沈澱させる操作を繰返えして精製した γ -globulin (RGG)
 - c) ツベルクリン蛋白 (PF)

ツベルクリン原液から浅見ら¹⁰⁾の方法に従つて分画した。

3) 皮膚反応用抗原

OT, HEA, RGG, PF および越沢ら¹¹⁾に準じて作製した o-aminophenol azo-HEA (OM-HEA) ならびに o-aminophenol-PF (OM-PF)

II 実験方法

1) 前処置および感作

谷口¹²⁾に準じ Freund's type adjuvant 法による前処置で第1の抗原に対し DHS 感受性となつた動物の背部で第1の抗原に第2の抗原を混じて皮膚反応を行なう (感作)。その後 第2の抗原

* 本論文の要旨は第1回日本細菌学会中部地方会で発表した。

に対する DHS 発現の状態を観察する. Freund's adjuvant 法による前処置は特に述べないかぎり両後足趾に行なった.

以下 Freund's complete adjuvant および Freund's incomplete adjuvant をそれぞれ FCA および FIA, 抗原を FCA あるいは FIA で water-in-oil emulsion としたものを抗原 in FCA あるいは抗原 in FIA, また2つの抗原(A および B)を混じたものを A+B と記載した.

2) 皮膚反応の術式および判定規準

ほぼ多田⁷⁾に準じて行なった. ただしあらたに次のような判定規準を設けた.

(i) 即時型皮膚反応

一. 正常無処置動物では認められないような軽度の反応

二. 浮腫の疑わしいもの

(ii) 遅発型皮膚反応

硬結を伴なわない境界不鮮明な淡い発赤は

一. 直径ほぼ 10 mm 以上

二. 直径ほぼ 20 mm 以上

ただし硬結は伴なわないが境界鮮明な比較的明瞭な発赤を示す反応は多田⁷⁾の規準に従って記載した.

実 験 成 績

I. FCA 投与動物における ツベルクリン感受性の発現経過

FCA 注射後日を追って OT, PF および OM-PF を抗原として皮膚反応を行なった. その成績の概要を表 1 に示した. この表からわかるように FCA 投与後 4 日目には明らかに上記 3 種抗原に対する DHS が発現しており, 7 日目, 14 日目および 21 日目と漸次反応性の増強が認められる. 一方 IHS は 4 日目および 7 日目には全く陰性であったが, 14 日目および 21 日目にはきわめて軽微ながら認められ, その中では OT によるものが最も明らかであり, OM-PF によるものは最も弱く PF によるものはその中間であった.

II. ツベルクリン皮膚反応の他種 DHS 発現に及ぼす効果

表 2a には FCA 投与後 1 週目に—この時期にはすでに ツベルクリン 感受性をえている—HEA 単独および HEA+OT を背部皮内に注射した両群についてじごの HEA に対する DHS の発現経過を比較した成績が示されている. これによると FCA 投与動物に対し HEA+OT を注射しその部に OT による DHS をじゃっ起させても, HEA のみを注射しても, その後 HEA のに対する DHS の発現はいずれもきわめて軽微で両者間でほとんど差が認められず, OT による DHS の存在が OT と同時に同一局所に与えられた HEA に対する

DHS 発現に特に効果的であると考えられる成績はえられなかった. しかして FCA 前処置は HEA 注射後の HEA に対する DHS の発現増強に効果的であるといえるようである.

また同じ表 2a に FCA 投与後 1 週目に 1 群には HEA を, 他群には HEA+OT を両後肢大腿部に注射し, 両群の HEA に対する DHS および IHS 発現の経過を観察した成績が示されている. HEA in FCA 投与群と FCA 投与後両後肢大腿部に HEA を注射した群との間で HEA に対する DHS の発現にほとんど差の認められないことはすでに谷口⁹⁾の指摘しているところであるが, ここでも明らかにその事実が再確認されるとともに, さらに後者では HEA のかわりに HEA+OT を注射しても HEA に対する DHS の発現には少しも異なるところがないという成績がえられた.

表 2b は FCA 投与後 3 週目に—この時期には ツベルクリン 感受性は 1 週目よりかなり強くなっている—HEA 単独, HEA+OT あるいは HEA と OT を同時に別々に背部皮内に注射し, その後 HEA に対する皮膚反応の発現状況を比較観察した成績を一括したものである. この表から FCA で前処置した 3 群と FCA 前処置を行なわなかった 1 群の間にはわずかながら DHS 発現に差があって, 後者ではほとんど認められないのに反し, 前 3 者ではきわめて軽微とはいえ認められるようである. すなわち

FCA 前処置が HEA 注射後の HEA に対する DHS 発現増強に資していることがここでもうかがえる。しかし前3者間においては全く差がなく、FCA 投与で「ツ」感受性となっている動物の背部で「ツ」反応をじゃっ起することは、HEA が同時にその局所に与えられるか、あるいは別のところに与えられるかにかかわりなく、HEA に対する DHS の発現に無影響であることを示している。

Ⅲ. ツベルクリン以外の抗原に対する DHS の他種 DHS 発現への影響

「ツ」感受性動物において HEA 単独と HEA + OT との皮内注射後の HEA に対する DHS 発現経過を比較検討した上記実験で、両者の間で差のないことが立証されたが、それでは「ツ」反応以外の DHS の他種 DHS 発現への影響はどうであろうか。この追究のため HEA in FIA あるいは RGG in FIA を注射した後、HEA あるいは RGG による DHS の陽性であることが確かめられている注射後7日目に、HEA in FIA 投与動物には RGG 単独あるいは RGG + HEA, RGG in FIA 投与動物には HEA 単独あるいは HEA + RGG を背部皮内に注射した。その後4, 5, 7, 10および14日目に HEA in FIA 投与動物では RGG, RGG in FIA 投与動物では HEA に対する DHS の発現経過を観察した。

表 3a はその成績を示したものであるが、これによると HEA に DHS 感受性を有する動物において RGG + HEA をもって DHS をじゃっ起させたものも、RGG 単独で DHS をじゃっ起させなかったものも、いずれもその後 RGG に対する DHS の発現増強は認められなかった。同様に RGG 感受性動物においてそれぞれ HEA 単独および HEA + RGG を注射された両者でともに HEA に対する DHS の発現増強は認められなかった。

一方 FIA のかわりに FCA を用いた場合の成績を表 3b に示した。この場合も RGG in FCA 投与動物では HEA 単独および HEA + RGG 注射群の間で HEA に対する DHS の発現に、HEA in FCA 投与動物では RGG

単独および RGG + HEA 注射群の間で RGG に対する DHS の発現に差は認められなかった。

しかしながらここで注目すべきことは表 3b に示されているように前処置としての第1の抗原を FCA に混じて投与した場合には第2の抗原の投与方法にかかわりなく、軽微ながら第2の抗原に対して DHS の発現増強が認められるが、FCA のかわりに FIA を用いると表 3a に示されているようにこのような現象が認められないことである。

Ⅳ. FCA 前処置の DHS 発現増強効果の検討

表 4 は PF in FIA 投与後7日目に1群には HEA 単独、他の1群には HEA + OT を背部皮内に注射し、その後4, 5, 7, 10および14日目に HEA に対する DHS 発現の状態を観察した成績の概要を示したものである。PF in FIA 投与後7日目には明らかに OT に対する DHS の発現がみられる。この時期に HEA 単独あるいは HEA + OT を背部皮内に注射すると後者では明らかに DHS のじゃっ起が認められ、前者では認められない。しかしその後の HEA に対する DHS の発現は両者間で差がなく、いずれにおいてもほとんど DHS の発現増強は認められなかった。この事実 FCA で前処置した後 HEA あるいは HEA + OT を背部皮内に注射した両群において軽度であるがほぼ同程度の HEA に対する DHS 発現増強がみられたことと対比してみると誠に重要であると思われる。すなわち他種 DHS の発現に必要なのは「ツ」感受性の存在ではなくて、油中結核菌の注射によって招来される「ツ」感受性以外の“ある特種な状態”であることを示している。

Anderson¹²⁾の方法でヒト型結核菌 H₃₇Rv 株より精製した wax D で動物を前処置しこれに HEA を注射すると、FCA で前処置し HEA を投与した動物における同様に HEA に対し DHS が発現するという臼井¹⁷⁾の成績は両前処置の DHS 発現効果の近似性を示すもので“ある特種な状態”とは wax D による感作状態であろうと推測される。

考

抗原を Freund's type adjuvant とともに投与するか,あるいは単独で結核病巣内に投与することによって,血中抗体の増産現象の認められることおよびこれに先行して遅発型皮膚反応の発現することは周知のところである。最近 Humphrey and Turk⁸⁾はツベルクリン(「ツ」)感受性動物の背部で「ツ」反応を行なうに際し, PPD に diphtheria toxoid を混じて注射するときわめて顕著な antitoxin の増産が招来されると報告した。著者は遅発型皮膚反応と即時型皮膚反応の発現機序および相互関係についての研究の一環として,上記 Humphrey and Turk⁸⁾に準じた方法で抗原を投与することにより,血中抗体の増産に先行して遅発型皮膚反応の発現が認められるか否かについて検討を加えた。

まず FCA を両後足趾に注射後7日あるいは21日目に一この期間はいずれも「ツ」蛋白による DHS 陽性である—(1) HEA あるいは RGG を混合した「ツ」を, (2)「ツ」反応と別個の部位に同時に HEA あるいは RGG を, (3) HEA あるいは RGG のみをそれぞれ 背部皮内に注射し, 逐日的に HEA あるいは RGG に対する DHS の発現経過を観察した。その結果抗原と「ツ」を混合して,あるいは別々にまたは抗原のみを注射してもいずれも感作4日後ころより軽度の DHS の発現をみ, その程度にも感作方法による差異は認められなかった。このことは「ツ」感受性の動物において,他の抗原に対する DHS を招来するためには必ずしも「ツ」反応じゃ起部位に抗原の存在する必要がなく,また抗原投与時別個に「ツ」反応をじゃ起させる必要性もないことを示すものであって,単に動物が「ツ」感受性の状態にあればよいと考えられる。Diens ら¹³⁾あるいは Hanks¹⁴⁾の報告をみると,いずれも結核病巣の存在下で特定の場所に抗原が投与されるとこれに対し DHS が発現しており,この際「ツ」投与はなされておらない。一方谷口⁹⁾もまた FCA を両後足趾に注射されて「ツ」感受性となった後でも抗原の投与部位

案

によって発現する DHS の程度に顕著な差の存在することを確かめた。すなわち抗原を後脚あるいは背部に注射するとそれぞれ強度あるいは軽度の DHS の発現がみられるが,前肢に投与したのでは全くその発現は認められなかったという。このような成績からみると他の抗原に対する DHS 発現の背景をなすものは「ツ」蛋白に対する DHS 感受性ではなくて,恐らく油中結核菌によって招来される“ある特定な状態”であろうと推定される。

この推定のもう一つの根拠は PF in FIA 投与動物についての実験成績からえられた。すなわち PF in FIA 投与1週後—この時期は「ツ」蛋白による DHS 陽性である—PF + HEA あるいは PF + RGG で皮膚反応を行なっても,その後 HEA あるいは RGG による DHS の発現は認められなかった。

さらに「ツ」感受性以外の DHS 感受性を有する動物についても検討を行なった。すなわち HEA in FIA あるいは RGG in FIA 投与1週後それぞれに RGG あるいは HEA を,または両者に HEA + RGG を背部皮内に注射し,その後逐日的に前者では RGG 後者では HEA に対する DHS 発現の有無を検索した。しかしながらいずれにおいても DHS の発現は認められるに至らなかった。

Sterzl¹⁵⁾は HSA in lipid adjuvant 注射で HSA 感受性となっている動物は HSA + HEA を静脈内に注射して anti HEA の増強を認めており,その原因として,HSA 感受性動物に対して HSA は endotoxin-like に作用するのであろうとしている。この際 HEA に対する DHS の発現がみられるかどうかは記載されていない。

Humphrey and Turk⁸⁾もまた「ツ」感受性動物において,血中抗体の産生は抗原を PPD と混合して皮内に与えたか,単独で与えたかによって著しく左右され,前者では顕著であることを認め,その原因として,「ツ」反応部位に集まってくる細胞の中に抗体産生に関与する細胞

が存在し、かつ「ツ」反応部位に抗原が長期間とどまって免疫学的効果を発現することを考慮すべきだとしているが、さらに competent cell の数的増加の必要性を示唆している。この数的増加の背景をなすのが FCA による感作であろう。しかし彼らもまた DHS に関しては全くふれていない。

さて著者はさきに DHS の発現に必要な条件は油中結核菌によってもたらされる“ある特定の状態”であろうと述べた。Raffel et al¹¹⁾によるとそれは結核菌の wax D と密接に関連しているという。谷口¹⁰⁾の成績は FCA 投与部位と抗原投与部位が所属リンパ腺を同じくする領域であることが DHS 発現に重要であることを示しており、著者の成績もまたこれを確認していると同時に、この場合も抗原への「ツ」の添加の

有無によって DHS の発現に差異を認めていない。

さらに谷口¹⁰⁾は FCA を両後足臑内に注射後、前肢に抗原を注射するとき、その間隔が7日であると DHS は発現しないが、35日では発現するのを認め、FCA 投与によってまず局所リンパ腺に、続いて日時の経過とともに全身のリン巴系組織に DHS に関与する因子が準備されると推定している。このような準備状態下では抗原が「ツ」反応試験部位に同時に与えられることは当該抗原に対する DHS 発現には全く必要でないが、Humphrey and Turk⁸⁾によると血中抗体の産生には有効であるということである。IHS と DHS の発生機序を考える上で誠に興味があり、かつ重要な示唆を提供しているといわなければならない。

結

無処置、抗原 (A) in FIA 処置、FCA 処置あるいは抗原 (A) in FCA 処置動物に抗原 (B) を投与すると前2群に比べて後2群では軽度ながら明らかに抗原 (B) に対する DHS の発現増強が認められる。後3者において抗原 (B) を単独、OT+抗原 (B) あるいは抗原 (A)

論

+抗原 (B) の形で投与しても DHS の発現は同程度である。

また FCA 処置動物において抗原 (B) に対する DHS 発現増強の原因をなしているのは wax D により招来される動物の「特定の状態」であろうと推定される。

文

- 1) Jones, T. D. and Mote, J. R. : cf. J. Exp. Med., 108, 823, 1958.
- 2) Uhr, J. W. et al. : J. Exp. Med., 105, 11, 1957.
- 3) Landsteiner, K. and Chase, M. W. : J. Exp. Med., 71, 237, 1940.
- 4) Freund, J. and McDermott, K. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 49, 548, 1942.
- 5) Salvin, S. B. : J. Exp. Med., 107, 109, 1958.
- 6) 谷口恭子 : 金大結研年報, 23(下), 149, 1966.
- 7) 多田信平 : 金大結研年報, 24(上), 17., 1966.
- 8) Humphrey, J. H. and Turk, J. L. : Immunology, 6, 119, 1963.

献

- 9) 緒方富雄 : 血清学実験法,
- 10) 浅見 望, 他 : 日本細菌学雑誌, 9, 271, 1954.
- 11) 越沢みち子, 他 : 金大結研年報, 23(下), 143, 1966.
- 12) Anderson, R. J. : J. Biol. Chem., 83, 505, 1929.
- 13) Diens, L. and Schoenheit, E. W. : J. Immunol., 14, 9, 1927.
- 14) Hanks, H. J. : J. Immunol., 28, 105, 1935.
- 15) Sterzl, J. : Experimentia, 16, 518, 1960.
- 16) Raffel, S. et al. : J. Exp. Med., 90, 53, 1949.
- 17) 臼井 澄 : 未発表.

Table 1. Development of DHS and IHS following the administration of FCA

Sensitization (S)	Days after S	Animal No.	DHS With			IHS with		
			OT	PF	OM-PF	OT	PF	OM-PF
F C A into hind foot pads	4	1	—	—	—	—	—	—
		2	±	±	±	—	—	—
		3	±	±	±	—	—	—
		4	+	++	+	—	—	—
		5	++	+	+	—	—	—
		6	++	+	+	—	—	—
		7	++	+	+	—	—	—
	7	8	++	++	+	—	—	—
		9	++	++	++	—	—	—
		10	++	++	++	—	—	—
		11	++	++	++	—	—	—
		12	++	++	++	—	—	—
		13	++	++	++	—	—	—
		14	++	++	++	—	—	—
	14	15	++	++	++	÷	÷	÷
		16	++	++	++	÷	÷	—
		17	++	++	++	÷	÷	—
		18	++	++	++	÷	÷	—
		19	++	++	++	÷	÷	÷
	21	20	++	++	++	÷	÷	÷
		21	++	++	++	÷	÷	÷
		22	++	++	++	÷	÷	÷
		23	++	++	++	+	÷	÷
		24	++	++	++	+	÷	÷
		25	++	++	++	+	÷	÷
		26	++	++	++	÷	÷	÷
		27	++	++	++	÷	÷	÷

Table 2a. Development of DHS and IHS to HEA in guinea pigs pretreated with FCA after intradermal injections of HEA with or without addition of OT

Pretreatment (P)	Sensitization (S) 7 days after P	skin test					
		Days after S	Animal No.	HEA		OM-HEA	
				DHS	IHS	DHS	IHS
	H E A into back skin	4	1	—	—	—	—
			2	—	—	—	—
			3	—	—	—	—
		7	4	—	—	—	—
			5	—	—	—	—
			6	—	—	—	—
		14	7	—	+	—	—
			8	—	++	—	—
			9	—	++	—	—
	H E A in FCA into hind foot pads	4	1	++	—	++	—
			2	++	—	++	—
			3	++	—	++	—
		7	4	++	—	++	—
			5	++	—	++	—
			6	++	—	++	—
		14	7	++	++	++	—
			8	++	++	++	—
			9	++	++	++	—
	H E A into back skin	4	1	±	—	÷	—
			2	±	—	±	—
			3	+	—	+	—
		7	4	±	—	±	—
			5	±	—	+	—
			6	+	—	±	—
		14	7	—	+	—	—
			8	—	+	—	—
			9	—	+	—	—
	H E A + OT into back skin	4	1	±	—	÷	—
			2	÷	—	÷	—
			3	+	—	±	—
		7	4	±	—	±	—
			5	±	—	±	—
			6	+	—	±	—
		14	7	—	+	—	—
			8	—	+	—	—
			9	—	+	—	—

F C A into hind foot pads	H E A into hind thighs	4	1	++	—	++	—
			2	++	—	++	—
			3	++	—	++	—
		7	4	++	—	++	—
			5	++	—	++	—
			6	##	—	++	—
		14	7	##	##	++	÷
			8	##	##	++	÷
			9	##	++	++	÷
	H E A + O T into hind thighs	4	1	++	—	++	—
			2	++	—	++	—
			3	++	—	++	—
		7	4	++	—	++	—
			5	##	—	++	—
			6	##	—	++	—
		14	7	##	++	++	÷
			8	##	++	++	÷
			9	##	##	++	÷

Table 2b. Development of DHS and IHS to HEA in guinea pigs pretreated with FCA after intradermal injection of HEA with or without adding OT

Pretreatment (P)	Sensitization (S) 21 days after P into back skin	Skin test			
		No. of animals	Days after S	No. of animals showed positive skin reaction to HEA	
				DHS	IHS
F C A into hind foot pads	H E A	4	4	2 (2)	0
		4	7	1 (3)	0
		2	14	0	2
	H E A O T	4	4	1 (1)	0
		12	7	6 (5)	0
		4	10	1 (2)	1
		2	14	0	2
	H E A + O T	6	4	3 (3)	0
		4	5	2 (2)	0
		10	7	5 (5)	0
		4	10	2	2
		6	14	0	5
	H E A + O T	2	4	0	0
		2	5	0 (1)	0
		4	7	0 (2)	0
		2	10	0	2
		2	14	0	2

note ; Numersls in () are No. of animals showed ÷~÷ reaction

Table 3a. Development of DHS and IHS to the second antigen in guinea pigs pretreated with the first antigen in FIA after intradermal injection of the second antigen added to the first.

Pretreatment (P) into hind foot pads	Sensitization (S) 7 days after P into back skin	Skin test					
		No. of animals	Days after S	No. of animals showed positive skin reaction to			
				HEA		RGG	
				DHS	IHS	DHS	IHS
FIA	HEA	5/day	4	0 (2)	0	.	
			5	0 (3)	0		
			7	0 (3)	0		
			10	0 (2)	2		
			14	0	5		
	HEA + OT		4	0 (1)	0	.	
			5	0 (2)	0		
			7	0 (4)	0		
			10	0 (1)	4		
			14	0	5		
RGG in FIA	HEA		4	0	0	.	
			5	0 (3)	0		
			7	0 (4)	0		
			10	0 (2)	3		
			14	0	5		
	HEA + RGG		4	0	0	.	
			5	0 (2)	0		
			7	0 (3)	0		
			10	0 (1)	4		
			14	0	5		
HEA in FIA	RGG		4	.		0	0
			5			0 (2)	0
			7			0 (3)	0
			10			0 (2)	3
			14			0	5
	RGG + HEA		4	.		0	0
			5			0 (1)	0
			7			0 (4)	0
			10			0 (2)	2
			14			0	5

Table 3b. Development of DHS and IHS to the second antigen in guinea pigs pretreated with the first antigen in FCA after intradermal injection of the second antigen with or without adding the first antigen

Pretreatment (P) into hind foot pads	Sensitization (S) 7 days after P into back skin	Skin test					
		No. of animals	Days after S	No. of animals showed positive skin reaction to			
				HEA		RGG	
				DHS	IHS	DHS	IHS
FCA	HEA	5/day	4	1 (1)	0	.	
			5	2 (3)	0		
			7	2 (3)	0		
			10	2 (3)	2		
			14	0	5		
	HEA + OT		4	1 (3)	0	.	
			5	3 (2)	0		
			7	2 (3)	0		
			10	2 (3)	3		
			14	0	5		
RGG in FCA	HEA		4	2 (2)	0	.	
			5	2 (3)	0		
			7	2 (3)	0		
			14	0	5		
	HEA + RGG		4	1 (1)	0	.	
			5	2 (3)	0		
			7	3 (1)	0		
			14	0	5		
HEA in FCA	RGG		4	.		0 (2)	0
			5			1 (2)	0
			7			2 (3)	0
			14			0	5
	RGG + HEA		4	.		1 (1)	0
			5			2 (1)	0
			7			2 (2)	0
			14			0	5

Tale 4. Development of DHS and IHS to HEA in tuberculin-sensitive guinea pigs after intradermal injections of HEA with or without adding OT

Pretreatment (P)	Sensitization (S) 7 days after P into back skin	Skin test			
		No. of animals	Days after S	No. of animals showed positive skin reaction to HEA	
				DHS	IHS
PF in FIA into hind foot pads	HEA	5/day	4	0 (1)	0
			5	0 (2)	0
			7	0 (2)	0
			10	0 (1)	4
			14	0	5
	HEA + OT		4	0	0
			5	0 (2)	0
			7	0 (3)	0
			10	0 (1)	3
			14	0	5