

ヒノキ葉粉末のモルモットにおける
皮膚感作性試験
・Buehler 法・
(試験番号 IET 03-0027)

最終報告書

2003年 9月 1日

この写しは原本と相違ないことを証明します。

財団法人 残留農薬研究所

試験責任者： 上田 英夫

日付： 2003 年 9 月 1 日

茨城県水海道市内守谷町4321

財団法人 残留農薬研究所

陳述書

試験名称：ヒノキ葉粉末のモルモットにおける皮膚感作性試験

本報告書の試験方法には当該試験で使用方法・手順が忠実に記述され、試験成績には当該試験の実施過程において得られた生データが正確に反映されている。

試験責任者

財団法人 残留農薬研究所
毒性第一部動物管理室主任

上田 英夫



2003 年 9 月 1 日

試験委託者

名称： 住友林業株式会社 筑波研究所
所在地： 茨城県つくば市緑ヶ原3-2 (〒 300-2646)

試験施設

名称： 財団法人 残留農薬研究所
所在地： 茨城県水海道市内守谷町4321 (〒303-0043)
運営管理者： 理事長 岩本 毅

毒性試験指針（ガイドライン）の適用

農林水産省（12農産第8147号，2-1-6，2000年）

記録等の保管

当該試験中に作出されたすべての生データ，試験計画書，最終報告書および記録は財団法人 残留農薬研究所の資料保管施設で保管する。

試験従事者

試験責任者 上田英夫

試験担当者

動物飼育管理，投与，観察： 中村達也
赤坂道明
逆井幸司

目次

	頁
表紙	1
陳述書	2
試験委託者	3
試験施設	3
毒性試験指針の適用	3
記録等の保管	3
試験従事者	3
目次	4
1. 要約	6
2. 試験目的	7
3. 被験物質	7
4. 試験方法	7
4.1. 供試動物	7
4.2. 動物飼育管理	7
4.3. 被験物質および陽性対照物質の投与液調製	8
4.4. 投与群および使用動物数	9
4.5. 投与方法	9
4.6. 皮膚反応の観察	10
4.7. 皮膚感作率の算出	10
4.8. 皮膚反応強度の算出	11
4.9. 皮膚感作性の評価	11
4.10. 臨床症状	11
4.11. 体重測定	11
5. 試験成績	12
5.1. 惹起による皮膚反応	12
5.2. 感作による皮膚反応	12
5.3. 臨床症状	13
5.4. 体重	13
6. 考察および結論	14
7. 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある 事態および試験計画書に従わなかったこと	15

目次 (続き)

	頁
8. 参考文献	16

TABLE

1. Summary of skin reaction for the challenge phase	17
---	----

APPENDICES

1. Score of skin reaction for the challenge phase - Individual data	18
2. Score of skin reaction for the induction phase - Individual data	22
3. Clinical signs - Individual data	26
4. Body weight - Individual values	30

1. 要約

ヒノキ葉粉末をハートレイ系 SPF 雌モルモットの皮膚に投与し、その皮膚感作性を検索した。試験はモルモットを用いた Buehler 法^{a)}に従い実施した。皮膚反応の採点は Magnusson and Kligman の基準^{b)}に従った。感作陽性対照物質としては DNCB (2,4-dinitrochlorobenzene) を用いた。

投与群は、被験物質投与群（感作・惹起とも被験物質を投与する群）、被験物質に対する陰性対照群（感作では被験物質を用いず、惹起でのみ被験物質を投与する群）、DNCB 投与群（感作・惹起とも DNCB を投与する群）および DNCB に対する陰性対照群（感作では DNCB を用いず、惹起でのみ DNCB を投与する群）の 4 群を設定した。被験物質投与群には 20 匹、その陰性対照群には 10 匹、DNCB 投与群には 10 匹、およびその陰性対照群には 5 匹の動物を供試した。感作および惹起経皮貼付濃度は、被験物質でいずれも 25% (w/v)、DNCB でそれぞれ 1.0 および 0.1% (w/v) とした。惹起経皮貼付除去後 24 および 48 時間に皮膚反応を観察し、皮膚感作率および皮膚反応強度を算出した。

被験物質投与群では 20 例全例が評点 0（肉眼的に変化なし）であった。一方、被験物質に対する陰性対照群では 10 例全例とも評点 0 であったことから、被験物質投与群における感作陽性の評点基準を評点 1（散在性の軽度の紅斑）以上とした。その結果、本被験物質の皮膚感作率は 0% と算出され、感作性評価区分では I（微弱）に分類された。

DNCB 投与群では 10 例全例が評点 2（中等度およびび漫性の紅斑）であった。一方、DNCB に対する陰性対照群では 5 例全例とも評点 0 であったことから、評点 1 以上を陽性と判定した。この結果、DNCB の皮膚感作率は 100% と算出され、感作性評価区分では V（極度）に分類された。

皮膚反応強度において、各群の惹起経皮貼付除去後 24 および 48 時間の観察時における 1 匹当たりの平均皮膚反応強度（点数の総和／供試動物数）は、被験物質投与群では除去後 24 および 48 時間とも 0、被験物質に対する陰性対照群では両観察時とも 0 であった。一方、DNCB 投与群では除去後 24 時間で 2.00、48 時間で 1.90、DNCB に対する陰性対照群で両観察時とも 0 であった。

以上の結果から、モルモットを用いた皮膚感作性試験（Buehler 法）において、本被験物質の皮膚感作性は陰性であると判定した。

2. 試験目的

当該試験はヒノキ葉粉末の皮膚感作性を検索するため、モルモットの Buehler 法を用いて行った。

3. 被験物質

名称： ヒノキ葉粉末
ロット番号： SFHI030519
外観： 緑褐色粉末
保管条件： 室温暗所

4. 試験方法

4.1. 供試動物

試験には日本チャールス・リバー株式会社筑波飼育センターにより生産されたハートレイ系 SPF モルモット (Crj:Hartley) の雌動物を用いた。動物は 5 週齢にて購入し (入荷動物数 50 匹, 入荷時体重範囲 298 ~ 334 g), 試験環境に 8 日間検疫・馴化した。検疫・馴化期間中に体重増加および健康状態を確認したが異常が認められなかったため, 6 週齢にて試験に供した。第 1 回感作経皮貼付時における動物の体重の平均値 (最小値~最大値) は 379 g (340 ~ 408 g) であった。第 1 回感作経皮貼付終了後余剰動物 5 匹は試験より除外した。

4.2. 動物飼育管理

4.2.1. 飼育方法

室温 23℃, 湿度 55%, 換気回数 10 回以上/時間 (オールフレッシュエアー方式), 照明時間 12 時間/日 (午前 7 時点灯, 午後 7 時消灯) に設定された飼育室 (動物室 208) で動物を飼育した。動物飼育室の温度および湿度を毎日監視したが, 試験結果に影響を及ぼすと思われる異常値は認められなかった。

動物は, ステンレス鋼製ラックに設置した金網床付きアルミニウム製ケージ (350 W × 480 D × 300 H mm: トキワ科学器械株式会社) に 5 匹ずつ収容し, 飼育した。各ケージには試験番号, 被験物質名, 試験の種類, 投与群および動物番号を明記したラベルを貼付した。

4.2.2. 飼料および飲料水

飼料には保証飼料である固型飼料 LRC4 (オリエンタル酵母工業株式会社) を用い, ステンレス鋼製給餌器により自由に摂取させた。

水は急速濾過・活性炭吸着装置と次亜塩素酸ナトリウムにより浄化・殺菌した井戸水を自動給水装置 (トキワ科学器械株式会社) および給水瓶により自由に摂取させた。

飼料および飲水中の汚染物質の分析結果を確認したところ、いずれも残留農薬研究所が定めた許容基準値の範囲内であった。

4.2.3. 動物の群分けおよび個体識別

入荷時に無作為に各ケージに分配した動物について、馴化期間終了時に試験供試動物の選定を行った後、原則としてケージ番号の小さい順に各群に振り分ける方法で、各陰性対照群との体重の平均値がほぼ同様になるように、群分けを行った。

ケージ内での各動物の個体識別は、ピクリン酸飽和70%エタノール溶液にて下記のごとく被毛の一部を染色することで行った。

No. 1 右前肢	No. 2 左前肢	No. 3 右後肢
No. 4 左後肢	No. 5 無染色	

4.3. 被験物質および陽性対照物質の投与液調製

被験物質および陽性対照物質は調製前に乳鉢等により微粉末化して用いた。被験物質および陽性対照物質の投与液は、感作あるいは惹起経皮貼付直前に調製した。

4.3.1. 被験物質

本試験に先立ち、被験物質の予備調製で被験物質を脱イオン水 (G-10C, オルガノ株式会社, を用いて製造) に混合した時に 50% (w/v) 濃度では脱イオン水との混合が十分できないことから投与不可能と判断した。しかし、25%以下の濃度では懸濁可能であることを確認した。したがって、本試験では賦形剤として感作および惹起投与とも脱イオン水を選択し、25%以下の濃度で感作および惹起経皮貼付濃度を決定するための予備試験を行ったところ以下の成績を得た。

被験物質投与前日にモルモットの左右側腹部被毛を電気バリカンおよび電気カミソリにて剪毛、剃毛した。被験物質を6匹の動物に閉塞経皮貼付により6時間経皮投与した。すなわち、被験物質を脱イオン水で懸濁することにより調製した 1% (w/v) および 25% 濃度の薬液を3匹の動物の左右側腹部皮膚に、5% および 10% 濃度の薬液を3匹の動物の左右側腹部皮膚に、各濃度それぞれ 0.2 ml 投与した。貼付除去後 24 時間に観察、採点を行った。閉塞貼付、観察および採点は本試験と同様の方法で行った。その結果、25%以下の濃度で刺激性変化は認められなかった。

したがって、本試験における感作経皮貼付濃度および惹起経皮貼付濃度とも 25% (w/v) を選択することにした。

4.3.2. 陽性対照物質

陽性対照物質として DNCB (2,4-dinitrochlorobenzene) (Lot No. FHH01, 純度 99.0%, 東京化成工業株式会社) を用いた。陽性対照物質の感作経皮貼付薬液には、当研究所の背

景データに基づき、80%エタノール（和光純薬工業株式会社）に溶解した1%（w/v）濃度のDNCB溶液を用い、惹起経皮貼付薬液には、アセトン（和光純薬工業株式会社）に溶解した0.1%（w/v）濃度のDNCB溶液を用いた。

4.4. 投与群および使用動物数

投与群は、感作・惹起とも本被験物質を投与する被験物質投与群（A群）、感作投与では被験物質を用いず、惹起でのみ被験物質を投与する被験物質に対する陰性対照群（B群）、感作・惹起ともDNCBを投与するDNCB投与群（C群）および感作投与ではDNCBを用いず、惹起でのみDNCBを投与するDNCBに対する陰性対照群（D群）の4群とし、A群では20匹（動物番号1～20）、B群では10匹（動物番号21～30）、C群では10匹（動物番号31～40）、D群では5匹（動物番号41～45）の動物を試験に用いた。

4.5. 投与方法

4.5.1. 第1回感作経皮貼付

投与前日に供試動物全例の左肩甲部被毛を電気バリカンおよび電気カミソリにて剪毛および剃毛し、投与区画（2×2 cm）を設けた。

A群では5×5 cmの閉塞性サージカルテープ（Blenderm®, 3M Co.）上にのせたリント布パッチ（2×2 cm）に25%濃度の被験物質の感作経皮貼付薬液を注射筒を用いて0.2 ml滴下し、この面を投与部位の皮膚にあてた。C群ではサージカルテープ上にのせたリント布に1%濃度のDNCBの貼付薬液0.2 mlをピペットを用い滴下し、このリント布面を剪毛・剃毛した左肩部の投与部位にあてた。その上をサージカルテープ（Transpore®, 3M Co.; 7.5×40 cm）で動物の胴体をしっかりと巻き、閉塞貼付した。

B群では被験物質の感作経皮貼付薬液の溶媒である脱イオン水0.2 mlを用い、D群ではDNCBの感作経皮貼付薬液の溶媒である80%エタノール0.2 mlを用いAおよびC群と同様の閉塞貼付を行った。

各群とも貼付物は6時間後に除去した。

4.5.2. 第2回感作経皮貼付

投与は第1回感作経皮貼付後7日に行い、各群とも第1回感作経皮貼付と同じ部位に同様の処置を行った。

4.5.3. 第3回感作経皮貼付

投与は第1回感作経皮貼付後14日に行い、各群とも第1回感作経皮貼付と同じ部位に同様の処置を行った。

4.5.4. 惹起経皮貼付

投与は第1回感作経皮貼付後28日に行った。投与前日に供試動物全例について左右側腹部の被毛を剪毛・剃毛し、左右の投与区画(2×2 cm)2ヵ所を設けた。

AおよびB群では25%濃度の被験物質の惹起経皮貼付薬液0.2 mlを、CおよびD群では0.1%濃度のDNCBの惹起経皮貼付薬液0.2 mlを、左側腹部の投与区画に閉塞貼付した。閉塞貼付は感作経皮貼付と同様に、各群とも閉塞性サージカルテープ(5×5 cm)上にのせたリント布に惹起経皮貼付薬液0.2 mlを滴下し、この塗布面を貼付部位の皮膚にあて投与した。

AおよびB群の右側腹部には被験物質の惹起経皮貼付薬液の溶媒である脱イオン水0.2mlを、またCおよびD群の右側腹部にはDNCBの惹起経皮貼付薬液の溶媒であるアセトン0.2 mlを用い、左側腹部と同様の処置を行った。

これら貼付物が皮膚から外れないように、粘着性伸縮包帯(7.5×40 cm, Silkytex®, アルケア株式会社)で胴体をしっかりと巻いた。

各群とも貼付物は6時間後に除去した。

4.6. 皮膚反応の観察

4.6.1. 惹起における皮膚反応の観察

観察は惹起経皮貼付除去後24および48時間に行い、48時間の時点で観察を終了した。

惹起経皮貼付除去後24時間の観察の約3時間前に左右側腹部の被毛を剃毛した。各群の全例について惹起による側腹部皮膚の紅斑、浮腫の程度を肉眼的に観察し、以下に示す基準に従って採点した。

	点数
肉眼的に変化なし	0
散在性の軽度の紅斑	1
中等度およびび漫性の紅斑	2
重度の紅斑および浮腫	3

4.6.2. 感作における皮膚反応

第1回感作投与後1, 8, 15日(3回の各感作投与の翌日)に供試動物全例の感作貼付部位における紅斑および浮腫の程度を肉眼的に観察し、惹起における皮膚反応採点基準(4.6.1. 惹起における皮膚反応の観察)に用いた基準に従って採点した。

4.7. 皮膚感作率の算出

各動物において、惹起経皮貼付除去後24および48時間の観察時に採点された点数のうち、最高点をその動物の評点とした。被験物質投与群および陽性対照物質投与群において、それぞれの陰性対照群に認められた最高評点より高い値の評点(ただし評点1以上)を示し

たものを感作陽性動物とした。皮膚感作率は〔(感作陽性動物数／使用動物数)×100〕として算出した。

4.8. 皮膚反応強度の算出

惹起経皮貼付除去後24および48時間の観察時期ごとに各動物の点数を総和し、これを供試動物数で除することにより、各群の両観察時期における1匹当たりの平均皮膚反応強度を算出した。

4.9. 皮膚感作性の評価

得られた皮膚感作率を以下に示す基準⁶⁾に当てはめ、皮膚感作性を評価した。

感作率 (%)	区分	程度
0 - 8	I	微弱
9 - 28	II	軽度
29 - 64	III	中等度
65 - 80	IV	重度
81 - 100	V	極度

4.10. 臨床症状

全動物について第1回感作経皮貼付日から惹起経皮貼付除去後48時間の観察終了日まで少なくとも1日1回ケージの外から観察した。

4.11. 体重測定

第1回感作経皮貼付前と惹起経皮貼付除去後48時間の観察終了時にすべての動物の体重を測定した。

5. 試験成績 (Table 1, Appendices 1 - 4)

各群の惹起による皮膚反応強度と皮膚感作率を Table 1に、惹起による皮膚反応の個体別の点数をAppendix 1に、感作による皮膚反応の個体別の点数をAppendix 2に示す。各動物の臨床症状をAppendix 3に、体重をAppendix 4に示す。

5.1. 惹起による皮膚反応

5.1.1. 皮膚感作率

被験物質投与群では20例中全例が評点0（肉眼的に変化なし）であった。一方、被験物質に対する陰性対照群では10例全例とも評点0であったことから、被験物質投与群における感作陽性の評点基準を評点1（散在性の軽度の紅斑）以上とした。その結果、本被験物質の皮膚感作率は0%と算出された。

DNCB投与群では10例中全例が評点2（中等度および慢性の紅斑）であった。一方、DNCBに対する陰性対照群では5例全例とも評点0であったことから、評点1以上を陽性と判定した。この結果、DNCBの皮膚感作率は100%と算出された。

5.1.2. 皮膚反応強度

各群の惹起経皮貼付除去後24および48時間の観察時における1匹当たりの平均皮膚反応強度は、被験物質投与群では除去後24および48時間とも0、被験物質に対する陰性対照群では両観察時とも0であった。一方、DNCB投与群では除去後24時間では2.00、48時間では1.90、DNCBに対する陰性対照群で両観察時とも0であった。

5.2. 感作による皮膚反応

被験物質投与群における第1回感作投与後1, 8, 15日の観察では20例全例とも評点0（肉眼的に変化なし）であった。被験物質に対する陰性対照群の観察では、いずれの感作投与後においても10例全例とも評点0であった。

一方、DNCB投与群における第1回感作投与後1日の観察では10例中7例が評点1、3例が評点2であった。第1回感作投与後8日の観察では10例中2例が評点2、7例が評点3（重度の紅斑および浮腫）、15日の観察では10例全例が評点3（重度の紅斑および浮腫）であった。

これら皮膚反応に加え、DNCB投与群では第1回感作投与後8および15日に感作投与部位の痂皮が8例に観察された。その他の動物ではこれらの皮膚反応は観察されなかった。

5.3. 臨床症状

DNCB投与群において、背部皮膚の痂皮が第1回感作投与後6日に8例、15日に10例全例に観察された。背部皮膚のびらん・潰瘍が第1回感作投与後21日に4例、24日に3例認められた。これら症状は第1回感作投与後27日に2例が消失したが、8例は30日（観察終了時）まで認められた。その他の群の動物では観察期間を通して症状は観察されなかった。

5.4. 体重

惹起経皮貼付除去後48時間の観察終了時において、すべての動物で第1回感作経皮貼付前と比べ体重が増加した。

6. 考察および結論

本試験において、被験物質投与群の皮膚感作率は0%であったことから、本被験物質の皮膚感作性は区分Iの微弱に分類された。また、貼付除去後24および48時間の平均皮膚反応強度はともに0であった。

一方、DNCB投与群の皮膚感作率は100%であったことから、皮膚感作性は区分Vの極度と分類された。各観察時期の皮膚反応強度は明確な反応（貼付除去後24時間で2.00, 48時間で1.90）を示した。これらのことは当該試験の信頼性を十分保証しているものと考えられる。

DNCB投与群の感作投与部位における皮膚反応の観察では、第1回感作投与後1日の皮膚反応よりも8および15日では皮膚反応が増強した。これら感作皮膚部位での皮膚反応はDNCBの累積性の皮膚刺激などによるものと思われた。

以上のことから、モルモットを用いた皮膚感作性試験（Buehler 法）において、本被験物質は皮膚感作性が陰性であると判定した。

**7. 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態
および試験計画書に従わなかったこと**

試験期間を通じて、予見する事ができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす事態および試験計画書からの逸脱は認められなかった。

8. 参考文献

- a) Ritz, H.L. and Buehler, E.V. (1980) Planning, conduct, and interpretation of guinea pig sensitization patch tests. In "Current Concepts in Cutaneous Toxicity" (Drill, V.A. and Lazar, P., eds.), pp. 25-40, Academic Press, New York.
- b) Magnusson, B. and Kligman, A. M. (1969). The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. J. Invest. Dermatol., 52:268-276.

Table 1 Summary of skin reaction for the challenge phase

Group	N	Intensity of skin reaction		Sensitization rate	
		24 hr ^a	48 hr ^a	Fraction	%
Test substance-treated group	20	0	0	0/20	0
Negative control group to test substance	10	0	0	-	
DNCB- treated group	10	2.00	1.90	10/10	100
Negative control group to DNCB	5	0	0	-	

N: No. of animals examined.

a: Time after the challenge.

Appendix 1- 1 Score of skin reaction for the challenge phase - Individual data

Test substance- treated group

Animal number	Score of skin reaction at:		Decision of sensitization
	24 hr ^a	48 hr ^a	
1	0	0	-
2	0	0	-
3	0	0	-
4	0	0	-
5	0	0	-
6	0	0	-
7	0	0	-
8	0	0	-
9	0	0	-
10	0	0	-
11	0	0	-
12	0	0	-
13	0	0	-
14	0	0	-
15	0	0	-
16	0	0	-
17	0	0	-
18	0	0	-
19	0	0	-
20	0	0	-
Intensity of skin reaction	0	0	

a: Time after the challenge.

- : Negative.

Score of skin reaction: 0, No reaction;

1, Scattered mild redness;

2, Moderate and diffuse redness;

3, Intense redness and swelling.

Appendix 1- 2 Score of skin reaction for the challenge phase - Individual data

Negative control group to test substance

Animal number	Score of skin reaction at:	
	24 hr ^a	48 hr ^a
21	0	0
22	0	0
23	0	0
24	0	0
25	0	0
26	0	0
27	0	0
28	0	0
29	0	0
30	0	0
Intensity of skin reaction	0	0

a: Time after the challenge.

Score of skin reaction: 0, No reaction;

1, Scattered mild redness;

2, Moderate and diffuse redness;

3, Intense redness and swelling.

Appendix 1- 3 Score of skin reaction for the challenge phase - Individual data

DNCB- treated group

Animal number	Score of skin reaction at:		Decision of sensitization
	24 hr ^a	48 hr ^a	
31	2	2	+
32	2	2	+
33	2	2	+
34	2	2	+
35	2	2	+
36	2	2	+
37	2	2	+
38	2	2	+
39	2	2	+
40	2	1	+
Intensity of skin reaction	2.00	1.90	

a: Time after the challenge.

+: Positive.

Score of skin reaction: 0, No reaction;

1, Scattered mild redness;

2, Moderate and diffuse redness;

3, Intense redness and swelling.

Appendix 1- 4 Score of skin reaction for the challenge phase -
 Individual data
 Negative control group to DNCB

Animal number	Score of skin reaction at:	
	24 hr ^a	48 hr ^a
41	0	0
42	0	0
43	0	0
44	0	0
45	0	0
Intensity of skin reaction	0	0

a: Time after the challenge.

Score of skin reaction: 0, No reaction;

1, Scattered mild redness;

2, Moderate and diffuse redness;

3, Intense redness and swelling.

Appendix 2- 1 Score of skin reaction for the induction phase - Individual data

Test substance- treated group

Animal number	Score of skin reaction on:			Other skin reactions
	Day 1	Day 8	Day 15	
1	0	0	0	NAD
2	0	0	0	NAD
3	0	0	0	NAD
4	0	0	0	NAD
5	0	0	0	NAD
6	0	0	0	NAD
7	0	0	0	NAD
8	0	0	0	NAD
9	0	0	0	NAD
10	0	0	0	NAD
11	0	0	0	NAD
12	0	0	0	NAD
13	0	0	0	NAD
14	0	0	0	NAD
15	0	0	0	NAD
16	0	0	0	NAD
17	0	0	0	NAD
18	0	0	0	NAD
19	0	0	0	NAD
20	0	0	0	NAD

Day 0 = The day of first induction.

Score of skin reaction: 0, No reaction;

1, Scattered mild redness;

2, Moderate and diffuse redness;

3, Intense redness and swelling.

NAD: No abnormalities detected.

Appendix 2- 2 Score of skin reaction for the induction phase - Individual data

Negative control group to test substance

Animal number	Score of skin reaction on:			Other skin reactions
	Day 1	Day 8	Day 15	
21	0	0	0	NAD
22	0	0	0	NAD
23	0	0	0	NAD
24	0	0	0	NAD
25	0	0	0	NAD
26	0	0	0	NAD
27	0	0	0	NAD
28	0	0	0	NAD
29	0	0	0	NAD
30	0	0	0	NAD

Day 0 = The day of first induction.

Score of skin reaction: 0, No reaction;

1, Scattered mild redness;

2, Moderate and diffuse redness;

3, Intense redness and swelling.

NAD: No abnormalities detected.

Appendix 2- 3 Score of skin reaction for the induction phase - Individual data

DNCB- treated group

Animal number	Score of skin reaction on:			Other skin reactions
	Day 1	Day 8	Day 15	
31	2	3	3	Scab (Days 8, 15)
32	1	3	3	Scab (Days 8, 15)
33	1	2	3	NAD
34	1	2	3	NAD
35	1	3	3	Scab (Days 8, 15)
36	1	3	3	Scab (Days 8, 15)
37	2	3	3	Scab (Days 8, 15)
38	1	3	3	Scab (Days 8, 15)
39	2	3	3	Scab (Days 8, 15)
40	1	3	3	Scab (Days 8, 15)

Day 0 = The day of first induction.

Score of skin reaction: 0, No reaction;

1, Scattered mild redness;

2, Moderate and diffuse redness;

3, Intense redness and swelling.

NAD: No abnormalities detected.

Appendix 2- 4 Score of skin reaction for the induction phase - Individual data

Negative control group to DNCB

Animal number	Score of skin reaction on:			Other skin reactions
	Day 1	Day 8	Day 15	
41	0	0	0	NAD
42	0	0	0	NAD
43	0	0	0	NAD
44	0	0	0	NAD
45	0	0	0	NAD

Day 0 = The day of first induction.

Score of skin reaction: 0, No reaction;

1, Scattered mild redness;

2, Moderate and diffuse redness;

3, Intense redness and swelling.

NAD: No abnormalities detected.

Appendix 3- 1 Clinical signs - Individual data

Test substance- treated group

Animal number	Day of signs noted ^a	Clinical signs
1	0- 30	No abnormalities detected
2	0- 30	No abnormalities detected
3	0- 30	No abnormalities detected
4	0- 30	No abnormalities detected
5	0- 30	No abnormalities detected
6	0- 30	No abnormalities detected
7	0- 30	No abnormalities detected
8	0- 30	No abnormalities detected
9	0- 30	No abnormalities detected
10	0- 30	No abnormalities detected
11	0- 30	No abnormalities detected
12	0- 30	No abnormalities detected
13	0- 30	No abnormalities detected
14	0- 30	No abnormalities detected
15	0- 30	No abnormalities detected
16	0- 30	No abnormalities detected
17	0- 30	No abnormalities detected
18	0- 30	No abnormalities detected
19	0- 30	No abnormalities detected
20	0- 30	No abnormalities detected

a: The day after first induction (Day 0 = The day of first induction).

Appendix 3- 2 Clinical signs - Individual data

Negative control group to test substance

Animal number	Day of signs noted ^a	Clinical signs
21	0- 30	No abnormalities detected
22	0- 30	No abnormalities detected
23	0- 30	No abnormalities detected
24	0- 30	No abnormalities detected
25	0- 30	No abnormalities detected
26	0- 30	No abnormalities detected
27	0- 30	No abnormalities detected
28	0- 30	No abnormalities detected
29	0- 30	No abnormalities detected
30	0- 30	No abnormalities detected

a: The day after first induction (Day 0 = The day of first induction).

Appendix 3- 3 Clinical signs - Individual data

DNCB- treated group

Animal number	Day of signs noted ^a	Clinical signs
31	6- 30	Scab in the dorsal region
32	6- 30	Scab in the dorsal region
	21- 23	Erosion and/or ulcer in the dorsal resion
33	15- 30	Scab in the dorsal region
	21- 23	Erosion and/or ulcer in the dorsal resion
34	15- 26	Scab in the dorsal region
35	6- 30	Scab in the dorsal region
	21- 30	Erosion and/or ulcer in the dorsal resion
36	6- 30	Erosion and/or ulcer in the dorsal resion
	24- 30	Erosion and/or ulcer in the dorsal resion
37	6- 30	Scab in the dorsal region
	24- 30	Erosion and/or ulcer in the dorsal resion
38	6- 30	Scab in the dorsal region
	21- 30	Erosion and/or ulcer in the dorsal resion
39	6- 26	Scab in the dorsal region
40	6- 30	Scab in the dorsal region
	24- 30	Erosion and/or ulcer in the dorsal resion

a: The day after first induction (Day 0 = The day of first induction).

Appendix 3- 4 Clinical signs - Individual data

Negative control group to DNCB

Animal number	Day of signs noted ^a	Clinical signs
41	0- 30	No abnormalities detected
42	0- 30	No abnormalities detected
43	0- 30	No abnormalities detected
44	0- 30	No abnormalities detected
45	0- 30	No abnormalities detected

a: The day after first induction (Day 0 = The day of first induction).

Appendix 4- 1 Body weight - Individual values

Test substance- treated group			Negative control group to test substance		
Animal number	Body weight (g)		Animal number	Body weight (g)	
	(A)	(B)		(A)	(B)
1	382	556	21	369	553
2	391	600	22	373	580
3	388	573	23	348	501
4	374	538	24	367	499
5	392	594	25	375	500
6	395	542	26	399	618
7	372	538	27	401	584
8	361	511	28	399	600
9	340	500	29	353	550
10	362	546	30	379	587
11	375	611			
12	370	535			
13	377	526			
14	381	605			
15	374	535			
16	381	551			
17	392	583			
18	367	499			
19	408	647			
20	376	570			
Mean	378	558	Mean	376	557
S.D.	15	39	S.D.	19	44

(A): At the first induction.

(B): 48 hr after the challenge.

S.D.: Standard deviation.

Appendix 4- 2 Body weight - Individual values

DNCB- treated group			Negative control group to DNCB		
Animal number	Body weight (g)		Animal number	Body weight (g)	
	(A)	(B)		(A)	(B)
31	381	564	41	383	604
32	372	506	42	399	655
33	390	544	43	390	592
34	396	577	44	370	574
35	375	530	45	394	573
36	387	580			
37	386	614			
38	380	518			
39	379	589			
40	373	549			
Mean	382	557	Mean	387	600
S.D.	8	34	S.D.	11	34

(A): At the first induction.

(B): 48 hr after the challenge.

S.D.: Standard deviation.