

採取した24時間蓄積尿を用いて、尿量、色調、浸透圧(氷点降下法; OSMOMETER OM801, VOGEL社)および比重(屈折率法; 尿屈折計, (株)アタゴ)を測定した。

3) 血液学検査

投与期間終了時および回復期間終了時に、動物を18時間以上絶食させたのち、ペントバルビタール・ナトリウム麻酔下に開腹し、腹部大静脈から採血を行った。採取した血液の一部はEDTA-2Kで処理し、多項目自動血球計数装置(Sysmex CC-780, 東亜医用電子(株))により白血球数(電気抵抗検出方式)、赤血球数(電気抵抗検出方式)、ヘモグロビン量(オキシヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(血球パルス波高値検出方式)および血小板数(電気抵抗検出方式)を測定し、これらを基に平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球色素量(MCH)および平均赤血球色素濃度(MCHC)を算出した。また、血液の一部は塗抹標本とし、May-Grünwald-Giemsa染色を施して白血球百分比を視算した。さらに、3.8%クエン酸ナトリウム加血液を3000回転/分で15分間遠心分離し、得られた血漿を用いて全自動血液凝固測定装置(Sysmex CA-5000, 東亜医用電子(株))により、プロトロンビン時間(散乱光検出方式)および活性化部分トロンボプラスチン時間(散乱光検出方式)を測定した。

4) 血液生化学検査

血液学検査に引き続き採取した血液を室温で約60分間放置後、3000回転/分で10分間遠心分離し、得られた血清を用いて自動分析装置(736-10, (株)日立製作所)により、総蛋白質(ビウレット法)、アルブミン(BCG法)、A/G比(総蛋白質およびアルブミンより算出)、総ビリルビン(アルカリアゾビリルビン法)、GOT(Karmen法)、GPT(Wróblewski-La Due法)、 γ -グルタミルトランスアミナーゼ(L- γ -グルタミル-DBHA基質法)、アルカリ性フォスファターゼ(p-ニトロフェニルリン酸基質法)、総コレステロール(COD-DAOS法)、トリグリセライド(GPO-DAOS法・グリセリン消去法)、リン脂質(酵素法・DAOS発色法)、グルコース(グルコキナーゼ・G-6-PDH法)、尿素窒素(ウレアーゼ-GIDH法)、クレアチニン(Jaffé法)、無機リン(モリブデン酸直接法)およびカルシウム(OCPC法)を測定した。また、電解質分析装置(PVA- α Ⅲ, (株)アナリティカル・インスツルメンツ)によりナトリウム(電極法)、カリウム(電極法)およびクロール(電量滴定法)を測定した。

5) 器官重量の測定、剖検および病理組織学検査

採血終了後に、外側腸骨動脈を切断して放血死させ、剖検した。剖検時に脳、心臓、肺(気管支を含む)、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣および卵巣を摘出して器官重量(絶対重量)を測定するとともに、剖検日の体重を基に体重比器官重量(相対重量)を算出した。これらの器官に加え、下垂体、脊髄、眼球、甲状腺(上皮小体を含む)、脾臓、胃、膀胱、大腿骨(骨髄を含む)および肉眼的異常部位を採取して10%中性緩衝ホルマリン

溶液(眼球はグルタルアルデヒド溶液、精巣はプアン液で前固定)で固定した。

投与期間終了時の対照群および1000 mg/kg群の肝臓、脾臓、心臓、腎臓、副腎および肉眼的異常部位については、常法に従ってパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を施して光学顕微鏡下で観察した。

5. 統計処理

体重、摂餌量、尿検査(定性反応は除く)、血液学検査、血液生化学検査、器官重量および体重比器官重量について、各群ごとに平均値と標準偏差を求め、Bartlett法により分散の均一性を検定した。分散が均一な場合は一元配置型の分散分析を行い、この解析で群間に有意差が認められた場合はDunnnett法により各群の一对比較検定を行った。分散が均一でない場合はKruskal-Wallis法によって順位検定を行い、この検定で群間に有意差が認められた場合はDunnnett型的一对比較検定を行った。上述の分散分析あるいはKruskal-Wallis法による順位検定で群間に有意差が認められなかった場合は、各群間の多重比較は行わなかった。なお、いずれの場合も有意水準は5%とした。

結果および考察

1. 一般状態

投与4週目に、1000 mg/kg群の雄1例で上顎切歯先端部の欠損がみられたが、偶発的変化と考えられた。このほかには一般状態に変化はなかった。

2. 体重(Fig.1)および摂餌量

体重では、投与期間および回復期間を通して、対照群と各投与群との有意な差は認められなかった。

摂餌量では、投与4週目に1000 mg/kg群の雄で一過性の摂餌量の増加がみられたが、軽微な変動であり、毒性的意義はないものと考えられた。

3. 尿検査(Table 1)、血液学検査(Table 2)および血液生化学検査(Table 3)

尿検査では、投与4週目に500 mg/kg群の雄で尿比重の軽微な上昇がみられたのみであった。

血液学検査では、投与期間終了時および回復期間終了時ともに変化はなかった。

血液生化学検査では、投与期間終了時に変化はなく、回復期間終了時のみの軽微な変化として、1000 mg/kg群の雄でGOTの上昇、同群の雌でカルシウムの減少が認められた。

4. 器官重量(Table 4)

投与期間終了時に、全投与群の雌で心臓の相対重量の減少がみられた。また、このうち250および1000 mg/kg群では心臓の絶対重量の減少がみられ、500 mg/kg群の雌でも同様の傾向が認められた。しかし、いずれも軽微

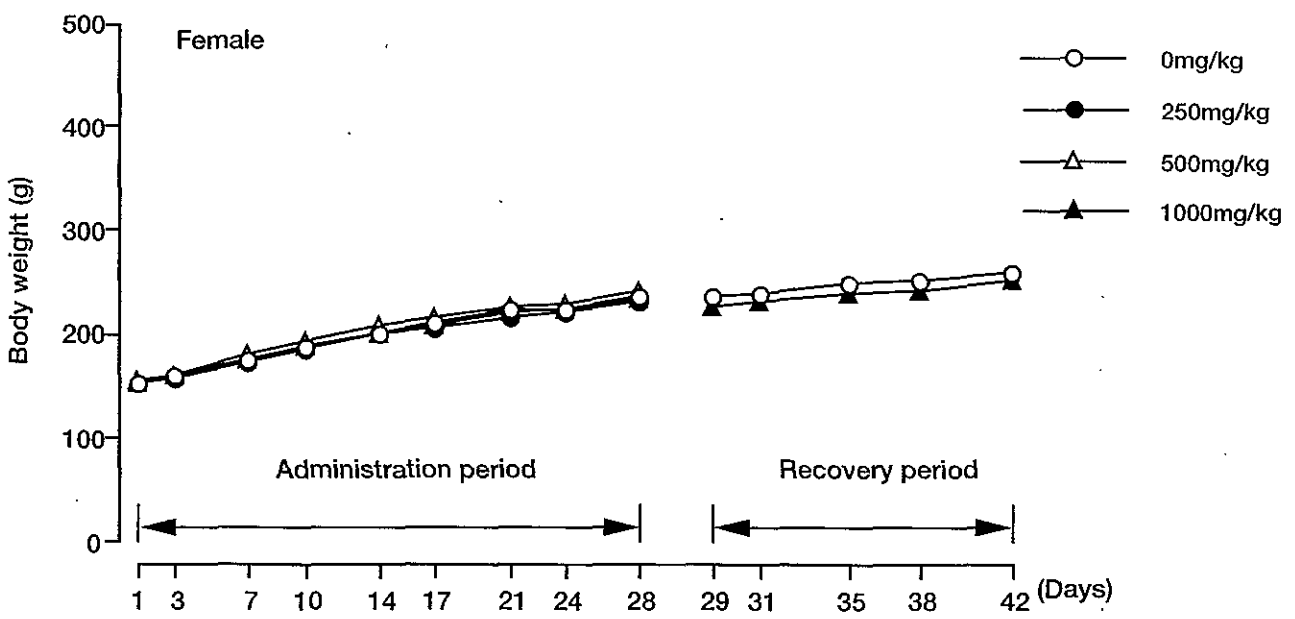
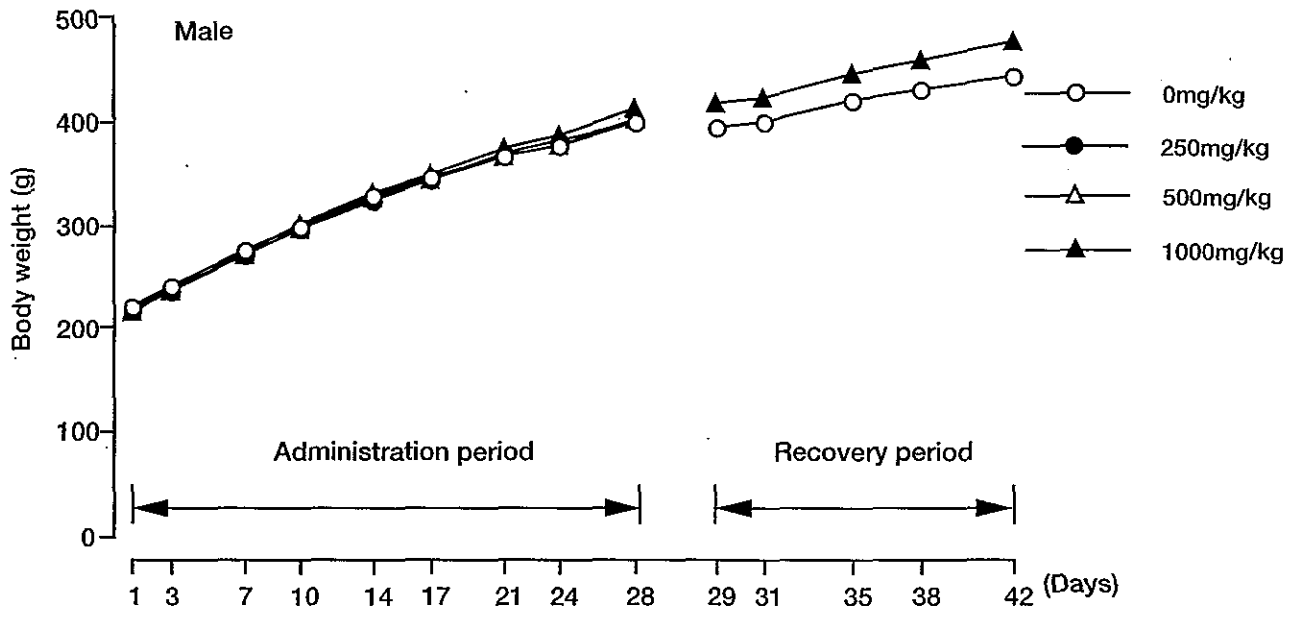


Fig. 1 Mean body weight changes of rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphtalenesulfonic acid in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Table 1 Urinary findings of rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)		
	0	250	500	1000	0	1000	
Male							
No. of animals	12	6	6	12	6	6	
Urine volume (ml/24 hr)	19.9 ± 6.0	16.8 ± 2.8	13.4 ± 5.9	18.4 ± 6.3	18.0 ± 6.4	21.4 ± 6.5	
Osmotic pressure (Osm/kg)	1.130 ± 0.287	1.250 ± 0.195	1.511 ± 0.306	1.394 ± 0.392	1.443 ± 0.424	1.333 ± 0.480	
Specific gravity	1.036 ± 0.009	1.042 ± 0.006	1.052 ± 0.011*	1.045 ± 0.013	1.046 ± 0.013	1.042 ± 0.016	
pH	8.0 ± 0.1	7.8 ± 0.3	8.2 ± 0.3	8.0 ± 0.3	7.8 ± 0.3	7.8 ± 0.5	
Color							
	pale yellow	10	2	1	5	2	5
	yellow	2	4	4	7	4	1
	yellowish brown	0	0	1	0	0	0
Protein	-	3	1	2	6	1	3
	±	6	5	1	6	3	1
	+	3	0	3	0	1	1
	++	0	0	0	0	1	1
Glucose	-	12	6	6	12	6	6
Ketone body	-	12	6	6	12	6	6
Bilirubin	-	12	6	6	12	6	6
Occult blood	-	11	6	4	11	5	5
	+	1	0	0	1	1	1
	++	0	0	0	0	0	0
	+++	0	0	2	0	0	0
Urobilinogen (mg/dl)	<1	11	6	6	12	4	6
	1	1	0	0	0	2	0
Female							
No. of animals	12	6	6	12	6	6	
Urine volume (ml/24 hr)	7.6 ± 3.9	6.8 ± 3.4	8.5 ± 4.0	7.3 ± 4.8	10.2 ± 7.0	9.9 ± 4.5	
Osmotic pressure (Osm/kg)	1.650 ± 0.605	1.520 ± 0.414	1.508 ± 0.417	1.910 ± 0.695	1.523 ± 0.524	1.600 ± 0.654	
Specific gravity	1.053 ± 0.017	1.050 ± 0.014	1.050 ± 0.013	1.060 ± 0.020	1.047 ± 0.017	1.049 ± 0.020	
pH	8.2 ± 0.4	8.1 ± 0.4	8.3 ± 0.3	8.3 ± 0.5	7.4 ± 0.6	7.8 ± 0.3	
Color							
	pale yellow	3	1	0	1	2	2
	yellow	9	5	6	11	4	4
	yellowish brown	0	0	0	0	0	0
Protein	-	11	6	5	7	5	2
	±	0	0	1	4	1	3
	+	1	0	0	1	0	1
	++	0	0	0	0	0	0
Glucose	-	12	6	6	12	6	6
Ketone body	-	12	6	6	12	6	6
Bilirubin	-	12	6	6	12	6	6
Occult blood	-	9	5	5	11	5	6
	+	1	1	1	1	0	0
	++	2	0	0	0	1	0
	+++	0	0	0	0	0	0
Urobilinogen (mg/dl)	<1	11	6	6	9	5	2
	1	1	0	0	3	1	4

*: P < 0.05 (significantly different from control)

Grade sign: -, none; ±, trace; +, slight; ++, moderate; +++, severe

Table 2 Hematological findings of rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	250	500	1000	0	1000
Male						
Male						
No. of animals	6	6	6	6	6	6
Leucocyte ($10^2/\mu\text{l}$)	64 ± 19	66 ± 19	77 ± 13	65 ± 10	87 ± 23	108 ± 46
Erythrocyte ($10^4/\mu\text{l}$)	816 ± 37	797 ± 35	805 ± 26	777 ± 31	806 ± 41	831 ± 38
Hemoglobin (g/dl)	14.8 ± 0.7	14.6 ± 0.3	14.5 ± 0.4	14.7 ± 0.3	15.0 ± 0.7	15.1 ± 0.6
Hematocrit (%)	47.9 ± 2.0	47.0 ± 1.2	45.8 ± 1.0	47.0 ± 1.8	46.7 ± 1.5	47.5 ± 1.8
Platelet ($10^4/\mu\text{l}$)	100.3 ± 7.0	104.1 ± 7.6	101.7 ± 11.2	108.1 ± 16.0	84.8 ± 37.1	100.5 ± 10.4
MCV (fl)	59 ± 2	59 ± 2	57 ± 2	60 ± 1	58 ± 3	58 ± 1
MCH (pg)	18.2 ± 0.7	18.3 ± 0.7	18.0 ± 0.6	18.9 ± 0.4	18.6 ± 0.9	18.2 ± 0.5
MCHC (%)	31.0 ± 0.4	31.0 ± 0.7	31.7 ± 0.2	31.3 ± 0.6	32.1 ± 0.5	31.8 ± 0.6
Prothrombin time (sec)	16.9 ± 4.1	17.7 ± 1.6	13.9 ± 1.3	14.1 ± 2.5	16.1 ± 2.2	16.1 ± 2.4
APTT (sec)	24.7 ± 1.8	24.5 ± 2.3	22.6 ± 0.7	22.8 ± 1.2	23.9 ± 1.4	23.9 ± 1.1
Female						
No. of animals	6	6	6	6	6	6
Leucocyte ($10^2/\mu\text{l}$)	60 ± 7	56 ± 13	72 ± 11	69 ± 21	44 ± 10	47 ± 10
Erythrocyte ($10^4/\mu\text{l}$)	780 ± 23	783 ± 20	780 ± 18	780 ± 20	759 ± 41	752 ± 20
Hemoglobin (g/dl)	14.5 ± 0.5	14.4 ± 0.5	14.4 ± 0.4	14.4 ± 0.4	13.8 ± 0.5	13.8 ± 0.2
Hematocrit (%)	45.6 ± 1.5	45.5 ± 1.5	45.8 ± 1.0	45.4 ± 1.6	43.3 ± 1.5	43.5 ± 1.0
Platelet ($10^4/\mu\text{l}$)	106.7 ± 6.3	112.9 ± 9.6	110.9 ± 9.8	109.9 ± 9.6	107.1 ± 9.5	104.3 ± 8.3
MCV (fl)	59 ± 1	58 ± 1	59 ± 1	58 ± 1	57 ± 2	58 ± 1
MCH (pg)	18.6 ± 0.2	18.3 ± 0.4	18.5 ± 0.4	18.4 ± 0.3	18.2 ± 0.5	18.4 ± 0.4
MCHC (%)	31.9 ± 0.7	31.6 ± 0.3	31.6 ± 0.6	31.7 ± 0.8	31.9 ± 0.8	31.7 ± 0.7
Prothrombin time (sec)	10.9 ± 0.6	11.2 ± 0.4	11.0 ± 0.4	11.1 ± 0.4	10.8 ± 0.5	10.5 ± 0.1
APTT (sec)	18.1 ± 0.9	18.8 ± 1.1	19.4 ± 1.9	20.1 ± 0.7	18.9 ± 0.9	18.1 ± 0.9

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ (significantly different from control)

Values are mean ± S.D.

Table 3 Blood chemical findings of rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	250	500	1000	0	1000
Male						
No. of animals	6	6	6	6	6	6
T.protein (g/dl)	4.9 ± 0.2	4.9 ± 0.1	4.9 ± 0.2	4.8 ± 0.2	5.0 ± 0.2	5.0 ± 0.2
Albumin (g/dl)	3.5 ± 0.1	3.5 ± 0.2	3.6 ± 0.3	3.6 ± 0.2	3.4 ± 0.1	3.5 ± 0.1
A/G ratio	2.70 ± 0.26	2.70 ± 0.24	2.73 ± 0.49	2.81 ± 0.18	2.20 ± 0.10	2.57 ± 0.60
T.bilirubin (mg/dl)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
GOT (IU/l)	79 ± 10	91 ± 15	77 ± 9	92 ± 10	71 ± 10	86 ± 12*
GPT (IU/l)	22 ± 4	23 ± 3	19 ± 3	20 ± 3	22 ± 3	26 ± 3
ALP (IU/l)	325 ± 21	357 ± 39	330 ± 53	337 ± 27	265 ± 37	267 ± 17
T.cholesterol (mg/dl)	37 ± 7	32 ± 3	37 ± 2	34 ± 10	36 ± 7	34 ± 5
Triglycerides (mg/dl)	28 ± 8	21 ± 8	26 ± 5	29 ± 19	39 ± 15	42 ± 9
Phospholipids (mg/dl)	69 ± 10	60 ± 3	70 ± 3	65 ± 15	66 ± 7	66 ± 8
Glucose (mg/dl)	122 ± 13	124 ± 10	122 ± 12	130 ± 14	130 ± 13	126 ± 14
BUN (mg/dl)	16.3 ± 1.3	16.4 ± 3.0	15.3 ± 1.8	14.7 ± 1.2	15.7 ± 2.1	17.8 ± 1.9
Creatinine (mg/dl)	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1
IP (mg/dl)	7.4 ± 0.2	7.9 ± 0.3	7.5 ± 0.6	7.2 ± 0.4	6.5 ± 0.7	6.6 ± 0.4
Ca (mg/dl)	9.1 ± 0.3	9.3 ± 0.2	9.3 ± 0.3	9.1 ± 0.2	9.2 ± 0.2	9.2 ± 0.2
Na (mEq/l)	147.0 ± 1.1	147.3 ± 0.7	146.1 ± 0.6	146.6 ± 0.4	146.1 ± 0.9	145.7 ± 0.9
K (mEq/l)	3.98 ± 0.20	4.19 ± 0.35	4.08 ± 0.16	4.09 ± 0.18	3.86 ± 0.34	4.14 ± 0.16
Cl (mEq/l)	107.6 ± 0.8	108.0 ± 1.1	107.0 ± 1.0	106.6 ± 2.3	106.3 ± 1.3	104.9 ± 0.8
Female						
No. of animals	6	6	6	6	6	6
T.protein (g/dl)	5.2 ± 0.2	5.1 ± 0.2	5.1 ± 0.3	5.2 ± 0.4	5.1 ± 0.2	5.0 ± 0.3
Albumin (g/dl)	3.8 ± 0.2	3.7 ± 0.3	3.8 ± 0.3	3.8 ± 0.4	3.7 ± 0.1	3.7 ± 0.2
A/G ratio	2.68 ± 0.46	2.84 ± 0.74	2.83 ± 0.67	2.75 ± 0.44	2.68 ± 0.35	2.78 ± 0.45
T.bilirubin (mg/dl)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
GOT (IU/l)	87 ± 11	94 ± 17	101 ± 27	101 ± 13	78 ± 6	78 ± 12
GPT (IU/l)	17 ± 2	16 ± 2	18 ± 4	21 ± 6	17 ± 3	17 ± 4
ALP (IU/l)	195 ± 49	218 ± 47	213 ± 24	216 ± 33	152 ± 19	161 ± 12
T.cholesterol (mg/dl)	48 ± 10	47 ± 7	44 ± 13	39 ± 7	39 ± 8	38 ± 2
Triglycerides (mg/dl)	13 ± 2	12 ± 2	11 ± 2	11 ± 3	14 ± 3	14 ± 3
Phospholipids (mg/dl)	88 ± 15	85 ± 9	80 ± 15	73 ± 12	75 ± 11	73 ± 4
Glucose (mg/dl)	123 ± 16	113 ± 4	111 ± 14	112 ± 15	107 ± 7	111 ± 15
BUN (mg/dl)	20.3 ± 2.2	22.4 ± 2.4	22.7 ± 4.0	23.6 ± 3.4	18.1 ± 1.7	18.1 ± 1.7
Creatinine (mg/dl)	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.0
IP (mg/dl)	8.2 ± 0.8	9.2 ± 1.0	8.5 ± 0.5	7.9 ± 0.6	6.3 ± 0.4	6.5 ± 0.5
Ca (mg/dl)	9.7 ± 0.2	9.6 ± 0.3	9.6 ± 0.4	9.6 ± 0.4	9.5 ± 0.3	9.2 ± 0.2*
Na (mEq/l)	146.5 ± 0.4	147.1 ± 0.5	146.2 ± 0.6	147.1 ± 1.0	145.8 ± 0.9	145.1 ± 1.9
K (mEq/l)	4.19 ± 0.22	4.33 ± 0.26	4.27 ± 0.25	4.12 ± 0.26	4.36 ± 0.25	4.33 ± 0.27
Cl (mEq/l)	108.1 ± 1.0	108.3 ± 1.0	108.0 ± 1.4	109.2 ± 1.3	110.2 ± 1.0	109.2 ± 2.8

*: P<0.05, **: P<0.01 (significantly different from control)

Values are mean ± S.D.

Table 4 Organ weights of rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	250	500	1000	0	1000
Male						
No. of animals	6	6	6	6	6	6
Final Body Weight (g)	365.5 ± 24.8	361.7 ± 16.0	367.4 ± 23.4	370.3 ± 14.9	408.2 ± 23.4	438.2 ± 36.3
Absolute organ weight						
Brain (g)	2.08 ± 0.06	2.11 ± 0.09	2.09 ± 0.05	2.10 ± 0.06	2.08 ± 0.07	2.14 ± 0.03
Heart (g)	1.32 ± 0.17	1.43 ± 0.11	1.41 ± 0.20	1.37 ± 0.11	1.41 ± 0.10	1.38 ± 0.12
Lungs (g)	1.37 ± 0.09	1.28 ± 0.02	1.30 ± 0.04	1.31 ± 0.07	1.28 ± 0.06	1.38 ± 0.10*
Thymus (g)	0.49 ± 0.08	0.56 ± 0.06	0.50 ± 0.08	0.57 ± 0.10	0.50 ± 0.06	0.45 ± 0.13
Liver (g)	11.15 ± 1.21	10.59 ± 0.80	11.08 ± 1.14	10.94 ± 0.91	11.27 ± 1.20	12.17 ± 1.45
Spleen (g)	0.72 ± 0.07	0.72 ± 0.15	0.78 ± 0.10	0.65 ± 0.05	0.75 ± 0.06	0.76 ± 0.11
Kidneys (g)	2.68 ± 0.22	2.87 ± 0.34	2.83 ± 0.21	2.77 ± 0.40	2.70 ± 0.23	2.89 ± 0.30
Adrenals (mg)	65.0 ± 6.0	61.3 ± 4.7	63.1 ± 6.6	68.3 ± 8.2	69.4 ± 7.2	70.1 ± 10.6
Testes (g)	3.25 ± 0.09	3.08 ± 0.30	3.25 ± 0.23	3.17 ± 0.32	3.15 ± 0.24	3.40 ± 0.22
Relative organ weight						
Brain (g/100 gB.W.)	0.57 ± 0.03	0.59 ± 0.03	0.57 ± 0.04	0.57 ± 0.03	0.51 ± 0.04	0.49 ± 0.04
Heart (g/100 gB.W.)	0.36 ± 0.03	0.39 ± 0.02	0.38 ± 0.04	0.37 ± 0.02	0.35 ± 0.03	0.31 ± 0.02*
Lungs (g/100 gB.W.)	0.38 ± 0.02	0.35 ± 0.01	0.36 ± 0.03	0.35 ± 0.02	0.32 ± 0.01	0.32 ± 0.03
Thymus (g/100 gB.W.)	0.14 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.15 ± 0.03	0.12 ± 0.02	0.10 ± 0.03
Liver (g/100 gB.W.)	3.04 ± 0.16	2.92 ± 0.11	3.01 ± 0.14	2.95 ± 0.16	2.76 ± 0.17	2.77 ± 0.12
Spleen (g/100 gB.W.)	0.20 ± 0.02	0.20 ± 0.03	0.21 ± 0.02	0.18 ± 0.01	0.19 ± 0.02	0.17 ± 0.02
Kidneys (g/100 gB.W.)	0.74 ± 0.09	0.79 ± 0.06	0.77 ± 0.07	0.75 ± 0.09	0.66 ± 0.03	0.66 ± 0.05
Adrenals (mg/100 gB.W.)	17.8 ± 1.4	17.0 ± 1.0	17.2 ± 1.3	18.4 ± 2.1	17.0 ± 1.7	16.0 ± 1.5
Testes (g/100 gB.W.)	0.89 ± 0.08	0.85 ± 0.08	0.89 ± 0.08	0.86 ± 0.10	0.77 ± 0.07	0.78 ± 0.10
Female						
No. of animals	6	6	6	6	6	6
Final Body Weight (g)	220.7 ± 14.7	210.9 ± 15.5	220.1 ± 12.5	218.8 ± 9.9	234.8 ± 19.3	227.8 ± 23.8
Absolute organ weight						
Brain (g)	1.91 ± 0.07	1.88 ± 0.09	1.90 ± 0.09	1.94 ± 0.04	1.93 ± 0.06	1.91 ± 0.05
Heart (g)	0.94 ± 0.07	0.80 ± 0.08**	0.86 ± 0.05	0.84 ± 0.05*	0.82 ± 0.08	0.83 ± 0.07
Lungs (g)	1.03 ± 0.11	0.99 ± 0.08	1.02 ± 0.08	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.06	0.96 ± 0.05
Thymus (g)	0.50 ± 0.04	0.51 ± 0.07	0.55 ± 0.09	0.55 ± 0.09	0.45 ± 0.07	0.48 ± 0.14
Liver (g)	6.58 ± 0.72	6.29 ± 0.77	6.66 ± 0.32	6.74 ± 0.27	6.69 ± 0.60	6.43 ± 0.83
Spleen (g)	0.50 ± 0.09	0.44 ± 0.06	0.54 ± 0.05	0.50 ± 0.06	0.50 ± 0.07	0.47 ± 0.04
Kidneys (g)	1.60 ± 0.17	1.60 ± 0.19	1.65 ± 0.12	1.72 ± 0.16	1.67 ± 0.06	1.66 ± 0.10
Adrenals (mg)	69.7 ± 3.2	68.1 ± 6.9	67.5 ± 5.5	69.4 ± 6.5	71.6 ± 3.3	70.1 ± 7.1
Ovaries (mg)	87.6 ± 9.1	85.6 ± 10.8	86.2 ± 13.2	88.5 ± 10.9	97.9 ± 23.1	82.8 ± 18.9
Relative organ weight						
Brain (g/100 gB.W.)	0.87 ± 0.05	0.89 ± 0.04	0.87 ± 0.07	0.89 ± 0.04	0.83 ± 0.05	0.85 ± 0.08
Heart (g/100 gB.W.)	0.42 ± 0.03	0.38 ± 0.01**	0.39 ± 0.02*	0.39 ± 0.02*	0.35 ± 0.03	0.36 ± 0.01
Lungs (g/100 gB.W.)	0.47 ± 0.03	0.47 ± 0.01	0.46 ± 0.02	0.46 ± 0.04	0.43 ± 0.02	0.43 ± 0.03
Thymus (g/100 gB.W.)	0.22 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.25 ± 0.03	0.25 ± 0.03	0.19 ± 0.03	0.21 ± 0.05
Liver (g/100 gB.W.)	2.97 ± 0.13	2.98 ± 0.16	3.03 ± 0.08	3.08 ± 0.09	2.85 ± 0.17	2.82 ± 0.11
Spleen (g/100 gB.W.)	0.23 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.21 ± 0.03	0.21 ± 0.01
Kidneys (g/100 gB.W.)	0.73 ± 0.04	0.76 ± 0.06	0.75 ± 0.05	0.79 ± 0.06	0.72 ± 0.04	0.73 ± 0.03
Adrenals (mg/100 gB.W.)	31.6 ± 1.6	32.2 ± 1.1	30.7 ± 2.3	31.7 ± 2.3	30.6 ± 1.5	30.8 ± 1.5
Ovaries (mg/100 gB.W.)	39.8 ± 4.5	40.5 ± 3.1	39.1 ± 5.0	40.6 ± 6.2	41.4 ± 6.8	36.0 ± 4.5

*: P<0.05, **: P<0.01 (significantly different from control)

Values are mean ± S.D.

な変動であり、投与量と変化の程度に一定の傾向がないことから、投与とは関連のない偶発的な変動と考えられた。

回復期間終了時には、1000 mg/kg群の雄で肺の絶対重量の増加および心臓の相対重量の減少がみられた。

5.剖検および病理組織学検査

投与期間終了時の剖検では、1000 mg/kg群の雄1例で右腎臓に単発性の灰白色斑および軽度の腎盂拡張が認められた。右腎臓の同程度の腎盂拡張は250 mg/kg群の雄2例でもみられ、このうち1例には左精巣の軽度萎縮も認められた。これらの病理組織学検査では、腎臓に腎盂拡張がみられ、このうち1000 mg/kg群の雄1例には限局性の近位尿細管上皮の好塩基性化、遠位尿細管の拡張および間質へのリンパ球浸潤、並びに乳頭部の石灰沈着も認められた。また、精巣は病理組織学検査でも萎縮が確認された。これらの変化は、正常ラットでしばしば観察される変化であり、その出現頻度にも投与量との関連がなかったことから、いずれも自然発生の変化と考えられた。このほかには投与期間終了時に肉眼的および病理組織学的変化は観察されなかった。

回復期間終了時の剖検では、変化はみられなかった。

以上のことから、7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸投与に起因した変化はいずれの検査においてもみられず、本試験条件下での無影響量は雌雄ともに1000 mg/kg/dayと考えられた。

文 献

- 1) H. Greim, et al., *Chemosphere*, 28, 2203, (1994).

連絡先

試験責任者：浜村 政夫

試験担当者：大塚辰雄, 古川浩美, 幸 邦憲,
永井憲児, 一鬼 勉, 鋏先恵美子,
津崎慎二

(株)パナファーム・ラボラトリーズ 安全性研究所
〒869-04 熊本県宇土市栗崎町1285
Tel 0964-23-5111 Fax 0964-23-2282

Correspondence

Authors: Masao Hamamura (Study director)
Tatsuo Otsuka, Hiromi Furukawa,
Kuninori Yuki, Kenji Nagai,
Tutomu Ichiki, Emiko Kuwasaki,
Shinji Tsusaki

Panapharm Laboratories Co., Ltd., Safety
Assessment Laboratory
1285 Kurisaki-machi, Uto-shi, Kumamoto, 869-04,
Japan
Tel +81-964-23-5111 Fax +81-964-23-2282

7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid on Bacteria

要約

既存化学物質安全性点検作業の一環として、7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸の変異原性について遺伝子突然変異誘発性を検討するため、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100, TA98, TA1535およびTA1537株ならびに大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2 *uvrA*株を用いる復帰突然変異試験を行った。予備的な試験の結果を基に、試験用量を設定した。すなわち、直接法(-S9 mix)ならびに代謝活性化法(+S9 mix)の各菌株についてそれぞれ、156~5000 μg /プレートの6用量を設定し試験した。その結果、代謝活性化法のネズミチフス菌4菌株で用量に依存した復帰突然変異コロニー数の増加傾向が認められ、再現性も確認された。特にTA98では溶媒対照に比較し90倍程度の増加を示した。直接法では、溶媒対照に比べ復帰突然変異コロニー数の明確な増加は認められなかった。一方、各系での陽性対照物質は、それぞれの試験菌株に対し明確な突然変異誘発作用を示した。従って、本試験条件下において、7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸は微生物に対し遺伝子突然変異を誘起するものと判断した。

材料および方法

1. 試験菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験に広く使用されていることから、試験菌株としてヒスチジン要求性の *Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA1535およびTA1537²⁾ならびにトリプトファン要求性の *Escherichia coli* WP2 *uvrA*²⁾の5種類の菌株を選択した。

ネズミチフス菌は昭和58年9月9日にカリフォルニア大学のB. N. Ames教授から、また、大腸菌については昭和58年3月16日に国立衛生試験所から分与を受けた。平成6年9月5日に菌株の特性検査を実施し、本試験に用いた菌株が規定の特性を保持していることを確認した。各菌株の菌懸濁液はジメチルスルホキシド(DMSO: MERCK社)を添加した後、凍結保存用チューブに0.2 mlずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結し、超低温フリーザーに-80℃で保存した。

2. 培地の調製

1) 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

日清製粉(株)製のテスメディアAN培地を購入し、試験に用いた。本プレートは、Vogel-Bonnerの最少培地Eを

含む水溶液(0.02%硫酸マグネシウム・7水塩, 0.2%クエン酸・1水塩, 1%リン酸二カリウム・無水塩, 0.192%リン酸一アンモニウム, 0.066%水酸化ナトリウム [いずれも最終濃度])に2%のグルコース(和光純薬工業(株))と1.5%の寒天(OXOID社:No.1)を加え、30mlをシャーレに分注したものである。

2) トップアガー(軟寒天)

Bacto-agar(DIFCO社)0.6%を含む0.5%塩化ナトリウム水溶液10容量に対し、ネズミチフス菌を用いる試験の場合、0.5 mM L-ヒスチジン(関東化学(株))-0.5 mM D-ビオチン(関東化学(株))水溶液を1容量加え、大腸菌を用いる試験の場合、0.5 mM L-トリプトファン(関東化学(株))水溶液を同じく1容量加え用いた。

3. 前培養条件

内容量200 mlの円筒容器(ストレージボトル: Corning Costar社)に2.5%ニュートリエントブロス(OXOID社)溶液を25 ml分注し、これに融解した菌懸濁液を50 μl 接種した。ウォーターバスシェーカー(MM-10:タイテック(株))を用い、37℃で8時間振盪(往復振盪:120回/分)培養し、試験に使用した。

4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコーマン(株)製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中のS9は誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。S9 mixの組成を以下に示す。

成分	S9 mix 1ml中の量
S9	0.1 ml
MgCl ₂	8 μmol
KCl	33 μmol
G-6-P	5 μmol
NADPH	4 μmol
NADH	4 μmol
リン酸緩衝Na-液(pH 7.4)	100 μmol

5. 被験物質

被験物質の7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸(ロット番号:0901, CAS No.:87-02-5)は分子式C₁₀H₉NO₄S, 分子量239.25, 純度91.8%(不純物として硫酸ナトリウム分2.0 wt%および水分3.5 wt%を含む)の粉末で、水、アセトンにほとんど溶けない。本試験にはス

ガイ化学工業(株)から提供された被験物質を使用した。試験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

なお、本被験物質の純度は95%未満であるため秤量に際して換算した。

6. 被験物質溶液の調製

DMSOに被験物質を溶解して調製原液とした。調製原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った(用時調製)。

7. 試験用量の設定

8.00, 40.0, 200, 1000および5000 μg /プレートの用量を用いて予備的な試験を実施した。その結果、直接法ならびに代謝活性化法のいずれの菌株においても試験菌株に対する生育阻害作用は観察されなかった。また、代謝活性化法の5000 μg /プレートにおいてすべての試験菌株で溶媒対照に比較し復帰突然変異コロニー数の増加傾向が認められた。

従って、本試験においては直接法ならびに代謝活性化法の各菌株について5000 μg /プレートを最高用量とし、それぞれ6用量(公比2)を設定した。

8. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記に示した物質を使用した。これらの陽性対照物質は、DMSOを用いて溶解し、少量ずつ分注した後凍結保存(-20℃)した。

2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
(AF-2: 和光純薬工業(株))

アジ化ナトリウム(NaN_3 : 和光純薬工業(株))

9-アミノアクリジン(ACR:ALDRICH社)

2-アミノアントラセン(2-AA: 和光純薬工業(株))

9. 試験方法

Amesらの原法の改良法であるプレインキュベーション法¹⁾に準じて、直接法および代謝活性化法それぞれについて試験を実施した。試験管に、使用溶媒、被験物質溶液あるいは陽性対照物質溶液を100 μl 、次いで直接法の場合、0.1 Mナトリウム・リン酸緩衝液(pH 7.4)を500 μl 、代謝活性化法の場合、S9 mixを500 μl および試験菌液100 μl を加え、37℃で20分間振盪培養(プレインキュベーション)した。培養終了後、トップアガーを2 μl 添加し、混合液をプレート上に重層した。37℃の条件で48時間各プレートを培養した後、被験物質の試験菌株に対する生育阻害作用を確認するため、実体顕微鏡($\times 60$)を用いてプレート上の試験菌株の生育状態を観察した。次いで、復帰突然変異により生じたコロニーを計数した。計測に際してはコロニーアナライザー(CA-11: システムサイエンス(株))を用いた。独立して試験を2回実施した。

10. 結果の解析

復帰突然変異コロニー数が溶媒対照のほぼ2倍以上に

増加し、かつ、再現性あるいは被験物質の用量に依存性が認められた場合に、陽性と判定した。

なお、統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

また陽性結果を示した菌株については、当該用量における誘発コロニー数(当該用量のコロニー数-溶媒対照でのコロニー数)を試験用量(mg /プレート)で除すことにより比活性を算出した。

結果および考察

試験結果を Table 1~4に示した。直接法(-S9 mix)ならびに代謝活性化法(+S9 mix)のいずれとも、7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフトレンスルホン酸による生育阻害作用は観察されなかった。また、復帰突然変異コロニー数については、代謝活性化法のネズミチフス菌4菌株で用量反応相関性を伴った明確な増加傾向が観察された。特に、TA98で顕著な増加が認められ、変異原性の強さに関する相対的比較値である比変異活性は498を示した。さらに、大腸菌についても溶媒対照の2倍を超えることはなかったが、復帰突然変異コロニーの増加傾向が認められた。直接法については、いずれの菌株においても溶媒対照と同等の値であり、増加傾向は認められなかった。一方、陽性対照物質はそれぞれの菌株において、溶媒対照群の2倍以上の復帰突然変異コロニーを誘発した。なお、試験中析出等の特筆すべき変化は観察されなかった。以上の試験結果から、本試験条件下において7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフトレンスルホン酸の微生物に対する遺伝子突然変異に関し、陽性と判定した。

文献

- 1) D. M. Maron and B. N. Ames, *Mutat. Res.*, 113, 173 (1983).
- 2) M. H. L. Green and W. J. Muriel, *Mutat. Res.*, 38, 3(1976)

連絡先

試験責任者: 中嶋 圓

試験担当者: 北沢倫世, 菊池正憲, 板倉真由実

(財)食品農医薬品安全性評価センター

〒437-12 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜582-2

Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Madoka Nakajima (Study director)

Michiyo Kitazawa, Masanori Kikuchi

Mayumi Itakura

Biosafety Research Center, Foods, Drugs and Pesticides (An-pyo Center)

582-2 Shioshinden Aza Arahama, Fukude-cho,

Iwata-gun, Shizuoka, 437-12, Japan

Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

Table 1. Results of the bacterial reversion test of 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid (1st trial)
[direct method:-S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
DMSO#	0	88	92	101	17	11	13	25	24	33	14	17	18	12	11	9
		[94 \pm 7]			[14 \pm 3]			[27 \pm 5]			[16 \pm 2]			[11 \pm 2]		
Test sub.	156	92	74	90	16	14	12	27	23	14	18	17	23	10	9	9
		[85 \pm 10]			[14 \pm 2]			[21 \pm 7]			[19 \pm 3]			[9 \pm 1]		
	313	114	95	123	13	14	14	18	23	21	26	23	26	14	8	11
		[111 \pm 14]			[14 \pm 1]			[21 \pm 3]			[25 \pm 2]			[11 \pm 3]		
	625	97	82	103	10	6	12	28	23	26	22	17	27	10	11	8
		[94 \pm 11]			[9 \pm 3]			[26 \pm 3]			[22 \pm 5]			[10 \pm 2]		
	1250	111	89	101	11	12	7	19	18	14	20	18	31	15	16	16
		[100 \pm 11]			[10 \pm 3]			[17 \pm 3]			[23 \pm 7]			[16 \pm 1]		
	2500	102	92	94	14	6	19	23	25	26	20	14	25	15	18	11
		[96 \pm 5]			[13 \pm 7]			[25 \pm 2]			[20 \pm 6]			[15 \pm 4]		
	5000	101	96	102	10	8	10	25	15	19	17	31	26	15	17	22
		[100 \pm 3]			[9 \pm 1]			[20 \pm 5]			[25 \pm 7]			[18 \pm 4]		
Positive control		512	497	481 ^{a)}	305	325	345 ^{b)}	152	117	125 ^{a)}	624	622	553 ^{a)}	405	448	445 ^{d)}
		[497 \pm 16]			[325 \pm 20]			[131 \pm 18]			[600 \pm 40]			[433 \pm 24]		

#: Solvent control

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b): NaN_3 ; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): ACR; 9-Aminoacridine, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$ Table 2. Results of the bacterial reversion test of 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid (1st trial)
[activation method: +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
DMSO#	0	90	83	90	12	12	17	28	29	29	27	34	22	15	11	10
		[88 \pm 4]			[14 \pm 3]			[29 \pm 1]			[28 \pm 6]			[12 \pm 3]		
Test sub.	156	154	145	137	15	17	14	28	25	31	35	41	41	13	20	22
		[145 \pm 9]			[15 \pm 2]			[28 \pm 3]			[39 \pm 3]			[18 \pm 5]		
	313	149	173	158	14	16	17	20	26	23	62	50	51	16	18	17
		[160 \pm 12]			[16 \pm 2]			[23 \pm 3]			[54 \pm 7]			[17 \pm 1]		
	625	202	222	224	14	19	17	19	27	23	116	90	97	25	27	29
		[216 \pm 12]			[17 \pm 3]			[23 \pm 4]			[101 \pm 13]			[27 \pm 2]		
	1250	399	455	385	28	28	29	23	22	23	289	308	239	62	82	60
		[413 \pm 37]			[28 \pm 1]			[23 \pm 1]			[279 \pm 36]			[68 \pm 12]		
	2500	996	788	858	37	57	51	30	25	33	844	874	994	182	164	174
		[881 \pm 106]			[48 \pm 10]			[29 \pm 4]			[904 \pm 79]			[173 \pm 9]		
	5000	1508	1273	1531	60	58	68	47	62	62	2480	2521	2545	426	501	482
		[1437 \pm 143]			[62 \pm 5]			[57 \pm 9]			[2515 \pm 33]			[470 \pm 39]		
Positive control		657	574	665 ^{a)}	346	343	319 ^{b)}	719	597	772 ^{c)}	325	332	363 ^{d)}	127	120	128 ^{b)}
		[632 \pm 50]			[336 \pm 15]			[696 \pm 90]			[340 \pm 20]			[125 \pm 4]		

#: Solvent control

a): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b): 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): 2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 3. Results of the bacterial reversion test of 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid (2nd trial) [direct method: -S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
DMSO#	0	91	97	110	12	15	15	20	19	21	19	16	25	6	10	7
		[99 \pm 10]			[14 \pm 2]			[20 \pm 1]			[20 \pm 5]			[8 \pm 2]		
Test sub.	156	93	94	117	19	12	9	22	16	22	25	21	23	9	7	11
		[101 \pm 14]			[13 \pm 5]			[20 \pm 3]			[23 \pm 2]			[9 \pm 2]		
	313	101	99	101	9	7	9	19	18	12	25	21	19	8	11	10
		[100 \pm 1]			[8 \pm 1]			[16 \pm 4]			[22 \pm 3]			[10 \pm 2]		
	625	91	99	109	14	11	12	20	25	15	25	26	25	7	12	9
		[100 \pm 9]			[12 \pm 2]			[20 \pm 5]			[25 \pm 1]			[9 \pm 3]		
	1250	114	108	118	13	11	5	22	21	21	18	21	24	6	11	9
		[113 \pm 5]			[10 \pm 4]			[21 \pm 1]			[21 \pm 3]			[9 \pm 3]		
	2500	107	107	125	10	14	12	29	14	16	23	23	31	13	12	17
		[113 \pm 10]			[12 \pm 2]			[20 \pm 8]			[26 \pm 5]			[14 \pm 3]		
	5000	123	110	123	14	12	13	20	17	23	23	26	21	9	14	15
		[119 \pm 8]			[13 \pm 1]			[20 \pm 3]			[23 \pm 3]			[13 \pm 3]		
Positive control		424	421	499 ^{a)}	360	340	368 ^{b)}	126	152	117 ^{a)}	612	636	628 ^{c)}	492	427	462 ^{d)}
		[448 \pm 44]			[356 \pm 14]			[132 \pm 18]			[625 \pm 12]			[460 \pm 33]		

#: Solvent control

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b): NaN_3 ; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$

d): ACR; 9-Aminoacridine, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 4. Results of the bacterial reversion test of 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid (2nd trial) [activation method: +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
DMSO#	0	106	116	125	13	10	12	27	24	23	26	34	27	17	13	13
		[116 \pm 10]			[12 \pm 2]			[25 \pm 2]			[29 \pm 4]			[14 \pm 2]		
Test sub.	156	117	150	145	20	18	11	22	25	25	54	50	49	18	25	16
		[137 \pm 18]			[16 \pm 5]			[24 \pm 2]			[51 \pm 3]			[20 \pm 5]		
	313	149	181	138	19	24	18	22	30	21	74	50	68	21	18	18
		[156 \pm 22]			[20 \pm 3]			[24 \pm 5]			[64 \pm 12]			[19 \pm 2]		
	625	196	235	249	21	18	29	23	22	29	121	135	110	37	28	32
		[227 \pm 27]			[23 \pm 6]			[25 \pm 4]			[122 \pm 13]			[32 \pm 5]		
	1250	477	411	467	38	37	26	32	24	30	306	292	364	75	72	76
		[452 \pm 36]			[34 \pm 7]			[29 \pm 4]			[321 \pm 38]			[74 \pm 2]		
	2500	840	932	985	42	58	48	32	25	29	899	886	906	220	200	213
		[919 \pm 73]			[49 \pm 8]			[29 \pm 4]			[897 \pm 10]			[211 \pm 10]		
	5000	1578	1495	1224	87	57	81	48	42	41	2731	2365	2193	537	541	549
		[1432 \pm 185]			[75 \pm 16]			[44 \pm 4]			[2430 \pm 275]			[542 \pm 6]		
Positive control		675	675	641 ^{a)}	327	343	327 ^{b)}	571	774	781 ^{c)}	342	363	425 ^{d)}	145	104	123 ^{b)}
		[664 \pm 20]			[332 \pm 9]			[709 \pm 119]			[377 \pm 43]			[124 \pm 21]		

#: Solvent control

a): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b): 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): 2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$