試 験 報 告 書

4-ｸﾛﾛ-o-ｸﾚｿﾞｰﾙの細菌を用いる復帰突然変異試験

（試験番号：４Ｌ４２５）

株式会社三菱化学安全科学研究所

目　次

頁

要　約 …… 7

材料及び方法

1．試験物質 …… 8

2．テスト菌株 …… 8

3．培　地 …… 9

4．Ｓ９Mix …… 10

5．試験方法 …… 10

結果及び結論 …… 11

参考文献 …… 12

補足資料 …… 12

別表 …… 13

図 …… 16

要 約

4-クロロ-o-クレゾール について，*Salmonella typhimurium* TA98，TA100，TA1535，TA1537 及び *Escherichia coli* WP2 *uvrA*⁻ の５菌株を指標とする復帰突然変異試験を実施した．

予備試験を 5000，2500，1250，625，313，156，78.1，39.1μg/プレートの濃度で実施したところ，Ｓ９Mix 非共存下についてはすべての菌株の 625μg/プレート以上で，Ｓ９Mix 共存下についてはWP2 *uvrA*⁻ の1250μg/プレート以上及び他の菌株の 625μg/プレート以上でそれぞれ抗菌性が認められた．ただし，Ｓ９Mix 非共存下におけるWP2 *uvrA*⁻ の 625μg/プレートでの抗菌性は他の菌株に比べ弱いものであった．従って，本試験ではＳ９Mix 非共存下のWP2 *uvrA*⁻ について 1250，625，313，156，78.1，39.1μg/プレートの６濃度を，その他の菌株については 625，313，156，78.1，39.1，19.5μg/プレートの６濃度を設定した．Ｓ９Mix 共存下についてはすべての菌株について 1250，625，313，156，78.1，39.1μg/プレートの６濃度を設定した．本試験を実施した結果，被験物質により誘発された復帰変異コロニー数は，いずれのテスト菌株においても陰性対照値の２倍以上を示さなかった．

以上の結果から，4-クロロ-o-クレゾール の変異原性は陰性と結論した．

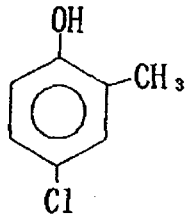
材料及び方法

1. 試験物質

1.1 被験物質

より入手した 4-ｸﾛﾛ-o-ｸﾚｿﾞｰﾙ（Lot No.　　純度93.9%）を使用した．被験物質は，融点40℃，沸点 220～225℃の白色結晶塊で，通常の取扱い条件では安定である．なお，本ロットについては実験開始前及び実験終了後に被験物質製造者が分析したデータを入手し，安定であることの確認を行った．

化学名：4-ｸﾛﾛ-o-ｸﾚｿﾞｰﾙ
化学式：C_7H_7ClO
構造式：



分子量：142.58
CAS No.：1570-64-5

1.2 対照物質

陰性対照物質及び陽性対照物質として下記のものを用いた．

使用目的	対照物質名	略称	入　手　先	ﾛｯﾄ 番号	純度(%)
陰性対照	ｼﾞﾒﾁﾙｽﾙﾎｷｼﾄﾞ	DMSO	関東化学株式会社	603E2089	99.7
陽性対照	2-(2-ﾌﾘﾙ)-3-(5-ﾆﾄﾛ-2-ﾌﾘﾙ)ｱｸﾘﾙｱﾐﾄﾞ	AF-2	和光純薬工業株式会社	PTQ1296	98.0
	ｱｼﾞ化ﾅﾄﾘｳﾑ	NaN_3	和光純薬工業株式会社	KWE6685	96.5
	N-ｴﾁﾙ-N'-ﾆﾄﾛ-N-ﾆﾄﾛｿｸｱﾆｼﾞﾝ	ENNG	Sigma Chemical Company	56F-3651	99.0
	9-ｱﾐﾉｱｸﾘｼﾞﾝ	9-AA	Sigma Chemical Company	80F-0186	99
	2-ｱﾐﾉｱﾝﾄﾗｾﾝ	2-AA	和光純薬工業株式会社	TWH2355	95.0

2. テスト菌株

2.1 テスト菌株 [1, 2]

より 1983 年 5月27日に入手した *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 及び　　より 1985年10月14日に入手した *Escherichia coli* WP2 *uvrA*⁻の５菌株を用いた．

これらの菌株の遺伝的特性は次表のとおりである．

菌　株	変異遺伝子	付帯突然変異			突然変異型
		修復	膜	R因子	
TA98	*his D*	*uvrB*	*rfa*	pKM 101	フレームシフト
TA100	*his G*	*uvrB*	*rfa*	pKM 101	塩基対置換
TA1535	*his G*	*uvrB*	*rfa*	—	塩基対置換
TA1537	*his C*	*uvrB*	*rfa*	—	フレームシフト
WP2 *uvrA*⁻	*trp E*	*uvrA*	+	—	塩基対置換

2.2 特性検査

各テスト菌株についてアミノ酸要求性，紫外線感受性，膜変異，薬剤耐性などの遺伝的特徴をロット毎に事前に調べ，これらの特性を備えた菌株を用いた．

2.3 保存方法

液体完全培地により 37 ℃で8時間振盪培養した4 mℓの各菌懸濁液に 0.35 mℓの割合で DMSO を加えて，ドライアイス・アセトン中で急速凍結後，超低温槽で－80℃以下に凍結保存した．

3. 培地

3.1 液体完全培地

ニュートリエントブロス（Oxoid Nutrient Broth No.2 ; Unipath 社，ﾛｯﾄ 番号 067 54134）25ｇを1 ℓの精製水に溶解し，オートクレーブ（121 ℃，15分間）で滅菌した．本培地は各テスト菌株の増菌用培地として用いた．

3.2 最少グルコース寒天平板培地

クリメディアAM-N培地（日清製粉株式会社，ﾛｯﾄ 番号 AN500JJ）を購入し，使用した．本培地は復帰変異菌の検出に用いた．

3.3 トップアガー

アミノ酸水溶液として，精製水を用いて D-ビオチン，L-ヒスチジン 及び L-トリプトファンの 0.5 mM 混合水溶液を調製し，これをマイクロフィルター（孔径 0.45 μm）でろ過滅菌後，冷蔵庫に保管した．

精製水 100mℓに対して，粉末寒天（Bacto-Agar ; Difco社，ﾛｯﾄ 番号 37430AJA）0.6 g，塩化ナトリウム0.5 gの割合で加え，オートクレーブで滅菌し完全に溶解させる．その後，上記のアミノ酸水溶液を 1/10 量加えて混和し，約 45 ℃に保温した．本培地は菌懸濁液，被験物質溶液及びＳ９Mix と混合後，最少グルコース寒天平板培地に

重層するために用いた.

4. S 9Mix

4.1 S 9

購入したS 9（キッコーマン株式会社 ; 1994 年10月 6日製造, ﾛｯﾄ 番号 RAA-316）を使用した. このS 9は, 7週齢の雄のSD系ラットにフェノバルビタールを30mg/kgで1回, 60mg/kgで3回, 24時間間隔で腹腔内投与し, 5,6-ベンゾフラボン80mg/kgをフェノバルビタールの第3回投与時に1回併用投与して作製した肝ホモジネートの9000×g 遠心上清分画である. S 9は−80℃以下で保存した.

4.2 S 9Mix

S 9Mix 1 mlあたり以下の組成で調製し, 使用時まで氷中に保存した.

S 9	0.1	ml
塩化マグネシウム六水塩	8	μmol
塩化カリウム	33	μmol
D-グルコース 6-リン酸	5	μmol
β-NADPH	4	μmol
β-NADH	4	μmol
ナトリウム-リン酸緩衝液（pH 7.4）	100	μmol
滅菌精製水	残量	

5. 試験方法 [3)]

5.1 被験物質溶液及び陽性対照物質溶液の調製

被験物質を所定濃度で DMSO に溶解し, これを同じ溶媒を用いて希釈し, 各濃度の被験物質溶液を調製した. 調製に際して, 純度換算（93.9%)を実施した.

陽性対照物質の NaN_3 は, 注射用水（株式会社大塚製薬工場）に, その他は DMSO に溶解した.

5.2 被験物質濃度

予備試験を 5000, 2500, 1250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1μg/ﾌﾟﾚｰﾄの濃度で実施したところ, S 9Mix 非共存下についてはすべての菌株の 625μg/ﾌﾟﾚｰﾄ以上で, S 9Mix 共存下については WP2 *uvrA*⁻ の1250μg/ﾌﾟﾚｰﾄ以上及び他の菌株の 625μg/ﾌﾟﾚｰﾄ以上でそれぞれ抗菌性が認められた. ただし, S 9Mix 非共存下におけるWP2 *uvrA*⁻ の625μg/ﾌﾟﾚｰﾄでの抗菌性は他の菌株に比べ弱いものであった. 従って, 本試験では S 9Mix 非共存下の WP2 *uvrA*⁻ について 1250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1μg/ﾌﾟﾚｰﾄの6濃度を, その他の菌株については 625, 313, 156, 78.1, 39.1, 19.5μg/ﾌﾟﾚｰﾄの

6濃度を設定した．S9Mix 共存下についてはすべての菌株について 1250，625，313，156，78.1，39.1 μg/ﾌﾟﾚｰﾄの6濃度を設定した．

5.3 被験物質溶液の濃度確認

本試験1回目に用いた最高及び最低濃度の被験物質溶液について濃度分析を実施し，いずれも所定濃度の100±5％以内であることを確認した（12頁，補足資料参照）．

5.4 復帰突然変異試験

試験はプレインキュベーション法で実施した．

凍結保存された各種の菌懸濁液20μℓを液体完全培地10mℓに接種し，37℃で8時間振盪培養した．菌懸濁液は菌濃度を測定した後，試験に使用した．滅菌した試験管に被験物質溶液 0.1mℓを分注し，S9Mix 0.5mℓと菌懸濁液 0.1mℓを加え，37℃で 20 分間振盪し，プレインキュベーションを行った．S9Mix を共存させない場合には，S9Mix の代わりに 0.1M ナトリウムーリン酸緩衝液（pH 7.4）0.5 mℓを加えた．プレインキュベーション後，トップアガー2mℓを上記の試験管に加えて混和し，最少グルコース寒天平板培地に重層した．重層したトップアガーが凝固した後，37℃で48時間培養し，復帰変異コロニー数を数えた．計測は自動コロニーカウンターで行った．同時に実体顕微鏡を用いてバックグランドの菌の生育を観察し，被験物質の抗菌性の有無を調べた．予備試験は各濃度あたり1枚のプレートを使用した．本試験は各濃度あたり3枚のプレートを用い，2回実施した．

5.5 試験結果の判定基準

被験物質処理プレートにおける復帰変異コロニー数（平均値）が陰性対照値の2倍以上を示し，明確な用量相関性及び再現性が認められる場合に陽性と判定する．

結果及び結論

結果を別表1～3及び図1～10に示す．

本試験1回目及び2回目における被験物質により誘発されたテスト菌株の復帰変異コロニー数は，S9Mix 非共存下及び共存下のいずれにおいても，陰性（溶媒）対照値の2倍以上を示さなかった．

すべてのテスト菌株のS9Mix 非共存下及び共存下において抗菌性が認められた．

以上の結果から，4-ｸﾛﾛ-o-ｸﾚｿﾞｰﾙ の変異原性は陰性と結論した．

参考文献

1) Maron, D.M. and Ames, B.N.; Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, Mutat. Res., *113*, 173-215 (1983)

2) Green, M.H.L., Muriel, W.J.; Mutagen testing using trp $^{+}$ reversion in Escherichia coli, Mutat. Res., *38* 3-32 (1976)

3) 労働省安全衛生部化学物質調査課（編），“安衛法における変異原性試験”，中央労働災害防止協会，東京（1991）

補足資料

本試験１回目に調製した最高及び最低濃度の被験物質溶液を分析した．その結果を下表に示す．

単位：mg/ml

	濃度設定	12.5	0.195
分析結果		12.4 12.4	0.192 0.195
	MEAN	12.4(99)	0.194(99)

かっこ内は設定濃度に対する割合(%)を示す．

別　表　1

予備試験結果表

被験物質の名称　：　4-クロロ-o-クレゾール　(No. 4L425)

S9Mix	被験物質濃度 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート) 塩基対置換型 TA100	TA1535	WP2 uvrA	フレームシフト型 TA98	TA1537
−	溶媒対照	69 (±69)	4 (±4)	44 (±44)	14 (±14)	5 (±5)
	39.1	74 (±74)	5 (±5)	38 (±38)	15 (±15)	4 (±4)
	78.1	69 (±69)	7 (±7)	53 (±53)	9 (±9)	4 (±4)
	156	68 (±68)	9 (±9)	45 (±45)	14 (±14)	5 (±5)
	313	44 (±44)	10 (±10)	50 (±50)	11 (±11)	7 (±7)
	625	0* (±0)	0* (±0)	9* (±9)	0* (±0)	0* (±0)
	1250	0* (±0)	0* (±0)	0* (±0)	0* (±0)	0* (±0)
	2500	0* (±0)	0* (±0)	0* (±0)	0* (±0)	0* (±0)
	5000	0* (±0)	0* (±0)	0* (±0)	0* (±0)	0* (±0)
+	溶媒対照	69 (±69)	14 (±14)	52 (±52)	27 (±27)	13 (±13)
	39.1	108 (±108)	9 (±9)	43 (±43)	24 (±24)	7 (±7)
	78.1	92 (±92)	13 (±13)	53 (±53)	22 (±22)	6 (±6)
	156	91 (±91)	16 (±16)	58 (±58)	12 (±12)	5 (±5)
	313	81 (±81)	3 (±3)	43 (±43)	20 (±20)	11 (±11)
	625	24* (±24)	2* (±2)	24 (±24)	19 (±19)	3* (±3)
	1250	0* (±0)	0* (±0)	0* (±0)	0* (±0)	0* (±0)
	2500	0* (±0)	0* (±0)	0* (±0)	0* (±0)	0* (±0)
	5000	0*C (±0)	0*C (±0)	0*C (±0)	0*C (±0)	0*C (±0)
−	陽性対照					
	濃度 (μg/プレート)					
	コロニー数/プレート	( )	( )	( )	( )	( )
+	陽性対照					
	濃度 (μg/プレート)					
	コロニー数/プレート	( )	( )	( )	( )	( )

(備　考)　*：抗菌性が認められた.　　(　平　均　値　)
C：沈殿物が認められた.

別　表　2

試験結果表（本試験1）

被験物質の名称　：　4-クロロ-o-クレゾール　(No. 4L425)

S9Mix	被験物質濃度 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート) 塩基対置換型 TA100	TA1535	WP2 uvrA	フレームシフト型 TA98	TA1537
−	溶媒対照	86 75 (84) 90 (±8)	11 7 (9) 8 (±2)	30 27 (33) 42 (±8)	12 22 (16) 15 (±5)	3 7 (6) 8 (±3)
	19.5	71 79 (77) 81 (±5)	7 11 (7) 4 (±4)	( )	14 9 (13) 16 (±4)	3 3 (3) 4 (±1)
	39.1	84 81 (79) 71 (±7)	11 7 (9) 10 (±2)	28 36 (35) 41 (±7)	18 18 (16) 11 (±4)	2 9 (5) 5 (±4)
	78.1	79 92 (85) 85 (±7)	3 7 (6) 8 (±3)	33 39 (38) 43 (±5)	24 12 (16) 12 (±7)	4 7 (6) 6 (±2)
	156	75 83 (83) 91 (±8)	16 7 (10) 8 (±5)	25 27 (29) 36 (±6)	9 15 (13) 15 (±3)	5 3 (5) 7 (±2)
	313	66 68 (65) 61 (±4)	13 7 (10) 10 (±3)	28 31 (31) 33 (±3)	9 11 (9) 7 (±2)	6 6 (5) 4 (±1)
	625	0* 0* (0) 0* (±0)	0* 0* (0) 0* (±0)	12* 4* (8) 7* (±4)	0* 0* (0) 0* (±0)	0* 0* (0) 0* (±0)
	1250	( )	( )	0* 0* (0) 0* (±0)	( )	( )
+	溶媒対照	84 74 (84) 95 (±11)	9 9 (10) 11 (±1)	28 28 (33) 42 (±8)	24 28 (22) 15 (±7)	13 8 (10) 8 (±3)
	39.1	102 85 (92) 89 (±9)	7 8 (8) 10 (±2)	53 28 (39) 35 (±13)	14 20 (21) 28 (±7)	3 7 (5) 6 (±2)
	78.1	103 95 (104) 115 (±10)	9 6 (7) 7 (±2)	36 45 (35) 25 (±10)	19 19 (18) 17 (±1)	9 11 (8) 4 (±4)
	156	86 91 (91) 96 (±5)	13 5 (9) 10 (±4)	39 22 (36) 47 (±13)	27 21 (25) 26 (±3)	7 10 (8) 7 (±2)
	313	76 96 (88) 92 (±11)	10 14 (11) 9 (±3)	36 43 (39) 37 (±4)	27 15 (20) 19 (±6)	11 4 (6) 4 (±4)
	625	53* 41* (41) 30* (±12)	6 8 (6) 5 (±2)	27 26 (26) 25 (±1)	21* 10* (15) 13* (±6)	4* 2* (3) 2* (±1)
	1250	0* 0* (0) 0* (±0)	0* 0* (0) 0* (±0)	0* 0* (0) 0* (±0)	0* 0* (0) 0* (±0)	0* 0* (0) 0* (±0)
−	陽性対照	AF-2	NaN_3	ENNG	AF-2	9-AA
	濃度 (μg/プレート)	0.01	0.5	2	0.1	80
	コロニー数/プレート	508 411 (455) 446 (±49)	307 264 (293) 307 (±25)	467 471 (491) 536 (±39)	426 472 (449) 448 (±23)	814 716 (753) 729 (±53)
+	陽性対照	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	濃度 (μg/プレート)	1	2	10	0.5	2
	コロニー数/プレート	893 829 (838) 792 (±51)	316 312 (304) 283 (±18)	764 788 (784) 799 (±18)	334 387 (364) 371 (±27)	173 155 (159) 150 (±12)

（備考）　*：抗菌性が認められた．　（平均値）（±標準偏差）

AF-2 ： 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド，　NaN_3 ： アジ化ナトリウム，
ENNG ： N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン，　9-AA ： 9-アミノアクリジン，　2-AA ： 2-アミノアントラセン

別　表　3

試験結果表（本試験2）

被験物質の名称　：　4-クロロ-o-クレゾール　(No. 4L425)

S9Mix	被験物質 濃度 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート) 塩基対置換型 TA100	TA1535	WP2 uvrA	フレームシフト型 TA98	TA1537
−	溶媒対照	87 77 (80) 76 (± 6)	13 9 (11) 12 (± 2)	20 32 (26) 25 (± 6)	9 11 (11) 14 (± 3)	3 4 (5) 7 (± 2)
	19.5	73 80 (75) 73 (± 4)	7 9 (8) 8 (± 1)	( ) ( )	16 12 (14) 14 (± 2)	4 3 (4) 5 (± 1)
	39.1	80 77 (79) 80 (± 2)	11 13 (11) 8 (± 3)	29 17 (27) 36 (± 10)	15 15 (14) 13 (± 1)	3 3 (3) 2 (± 1)
	78.1	85 81 (78) 69 (± 8)	10 9 (9) 8 (± 1)	18 26 (21) 19 (± 4)	13 21 (14) 8 (± 7)	6 9 (6) 2 (± 4)
	156	74 76 (78) 85 (± 6)	10 9 (8) 6 (± 2)	28 25 (25) 21 (± 4)	13 15 (13) 11 (± 2)	4 2 (4) 5 (± 2)
	313	72 79 (73) 68 (± 6)	10 8 (9) 9 (± 1)	22 23 (21) 19 (± 2)	8 10 (9) 9 (± 1)	4 7 (5) 4 (± 2)
	625	0* 0* (0) 0* (± 0)	0* 0* (0) 0* (± 0)	10* 5* (6) 4* (± 3)	0* 0* (0) 0* (± 0)	0* 0* (0) 0* (± 0)
	1250	( ) ( )	( ) ( )	0* 0* (0) 0* (± 0)	( ) ( )	( ) ( )
+	溶媒対照	84 84 (85) 86 (± 1)	15 11 (12) 9 (± 3)	23 26 (25) 25 (± 2)	17 17 (20) 26 (± 5)	8 8 (7) 4 (± 2)
	39.1	83 86 (90) 101 (± 10)	10 9 (9) 8 (± 1)	36 28 (30) 25 (± 6)	16 19 (18) 20 (± 2)	5 10 (6) 3 (± 4)
	78.1	95 92 (97) 103 (± 6)	9 9 (8) 7 (± 1)	32 24 (31) 37 (± 7)	20 33 (26) 24 (± 7)	4 6 (6) 8 (± 2)
	156	97 92 (93) 91 (± 3)	8 15 (10) 8 (± 4)	32 25 (26) 21 (± 6)	26 16 (19) 14 (± 6)	11 9 (11) 12 (± 2)
	313	112 96 (106) 109 (± 9)	9 8 (8) 7 (± 1)	28 35 (30) 28 (± 4)	20 18 (22) 27 (± 5)	10 6 (8) 8 (± 2)
	625	13* 13* (12) 9* (± 2)	2* 1* (2) 2* (± 1)	27 12 (19) 17 (± 8)	4* 4* (3) 2* (± 1)	0* 0* (0) 0* (± 0)
	1250	0* 0* (0) 0* (± 0)	0* 0* (0) 0* (± 0)	0* 0* (0) 0* (± 0)	0* 0* (0) 0* (± 0)	0* 0* (0) 0* (± 0)
−	陽性対照	AF-2	NaN_3	ENNG	AF-2	9-AA
	濃度 (μg/プレート)	0.01	0.5	2	0.1	80
	コロニー数/プレート	578 513 (535) 513 (± 38)	326 352 (344) 353 (± 15)	539 519 (510) 473 (± 34)	460 390 (417) 402 (± 37)	467 501 (456) 399 (± 52)
+	陽性対照	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	濃度 (μg/プレート)	1	2	10	0.5	2
	コロニー数/プレート	1088 1098 (1048) 959 (± 78)	424 450 (454) 488 (± 32)	647 712 (704) 753 (± 53)	388 334 (374) 401 (± 36)	161 154 (152) 140 (± 11)

（備考）　*：抗菌性が認められた.　　（平均値）（±標準偏差）

AF-2 ： 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド，　NaN_3 ： アジ化ナトリウム，
ENNG ： N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン，　9-AA ： 9-アミノアクリジン，　2-AA ： 2-アミノアントラセン

図 1 (本 試 験 1)

被験物質名：4－クロロ－o－クレゾール　　No. 4L425

量－反応曲線　　(TA100)

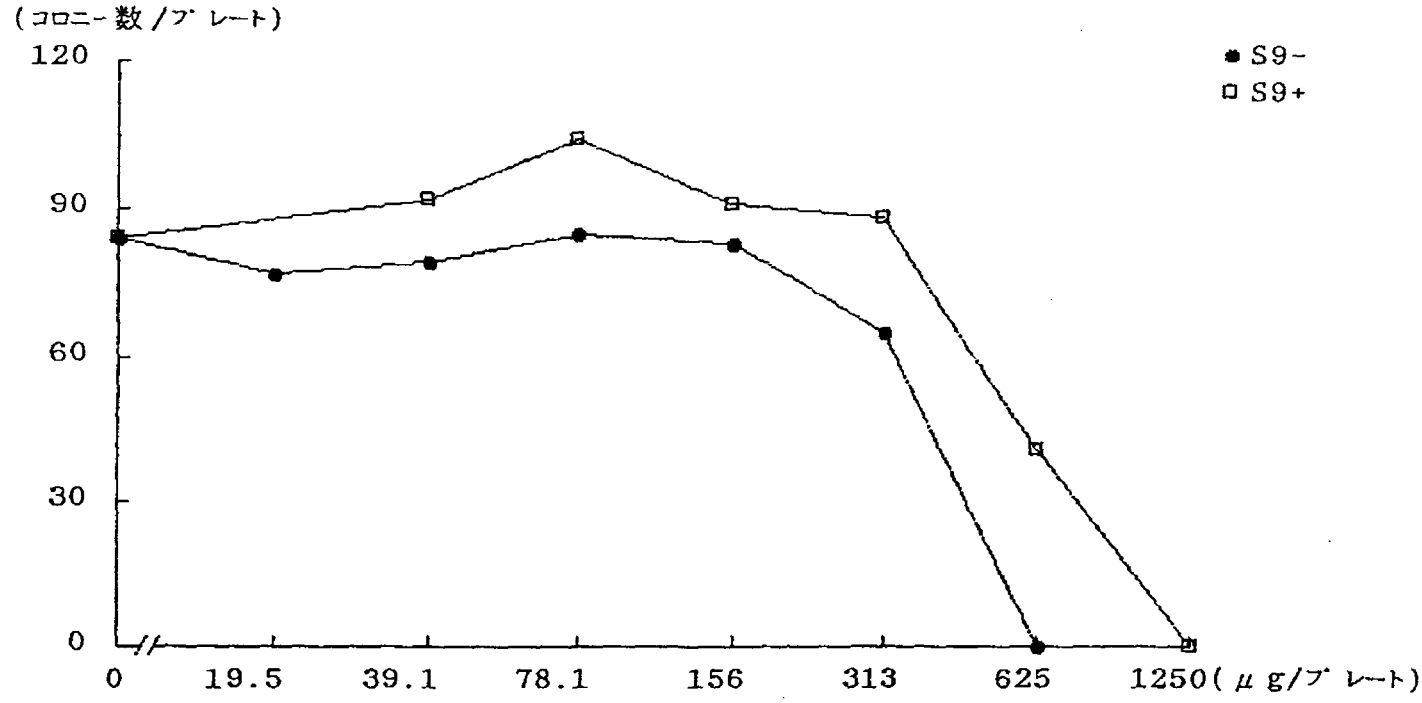


図 2 (本 試 験 1)

被験物質名：4－クロロ－o－クレゾール　　No. 4L425

量－反応曲線　　(TA1535)

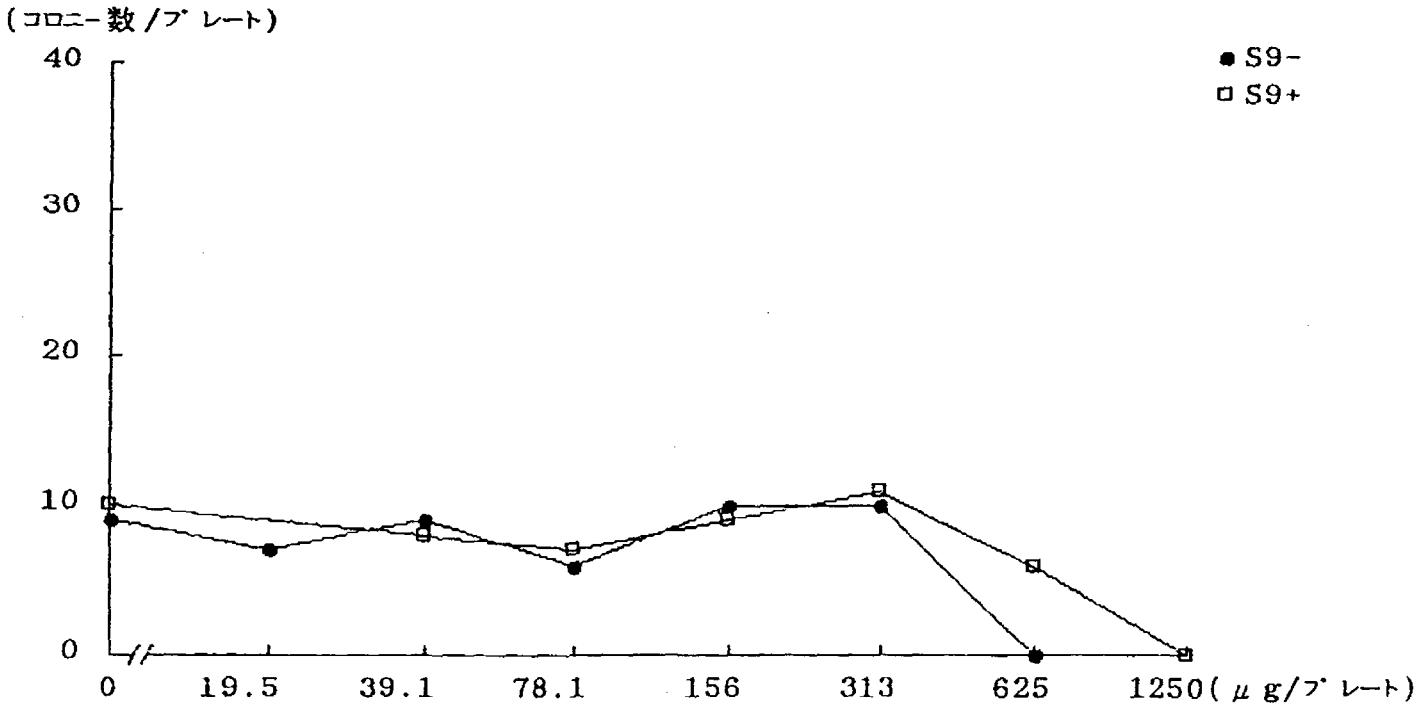


図 3 (本 試 験 1)

被験物質名：4－クロロ－o－クレゾール　　No. 4L425

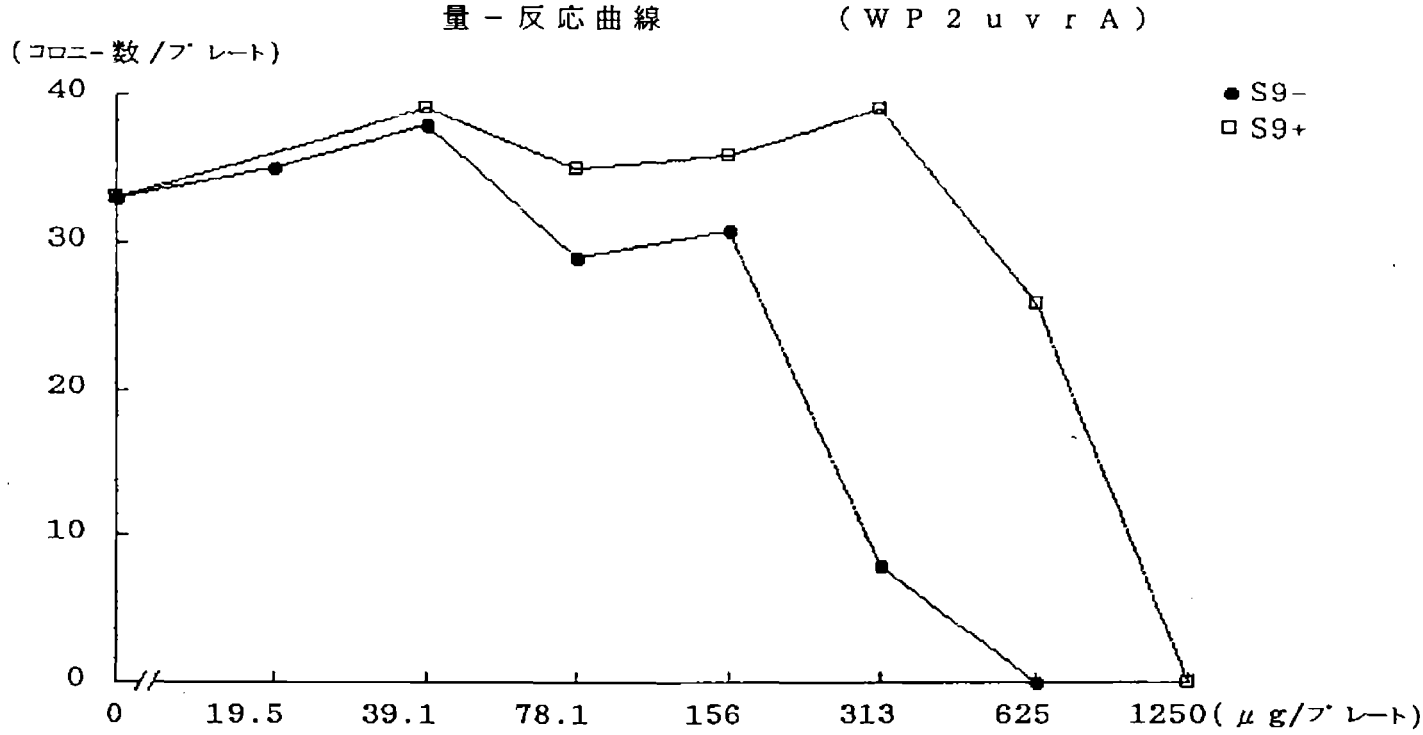


図 4 (本 試 験 1)

被験物質名：4－クロロ－o－クレゾール　　No. 4L425

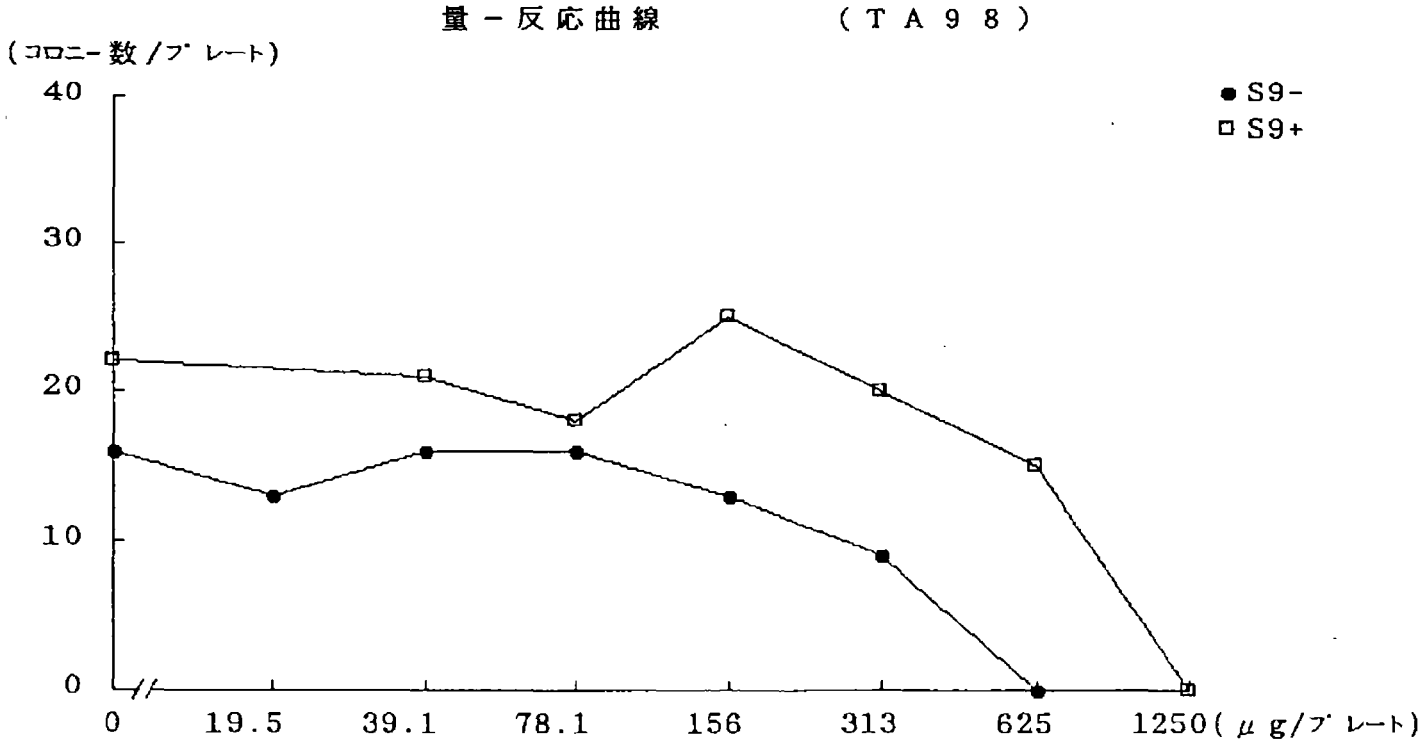


図 5 (本 試 験 1)

被験物質名：4－クロロ－o－クレゾール　　No. 4L425

量－反応曲線　　(TA1537)

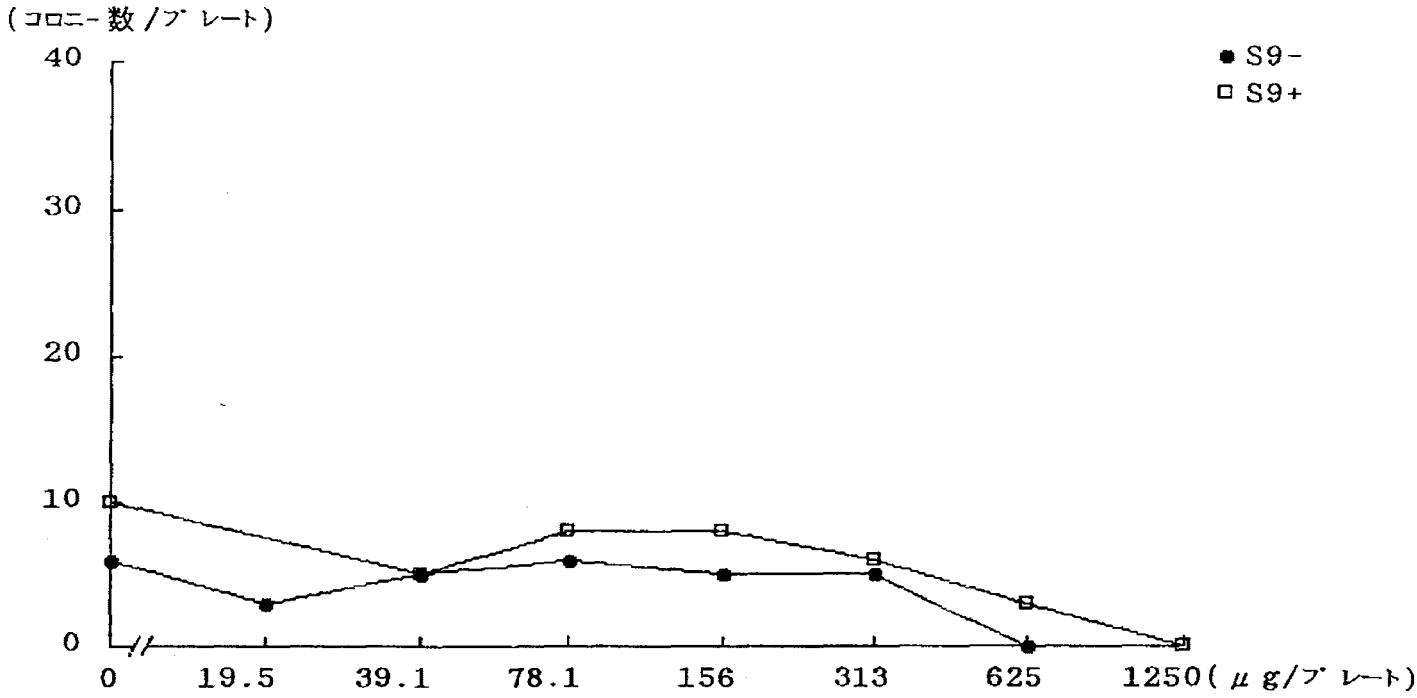


図 6 (本 試 験 2)

被験物質名：4－クロロ－o－クレゾール　　No. 4L425

量－反応曲線　　(TA100)

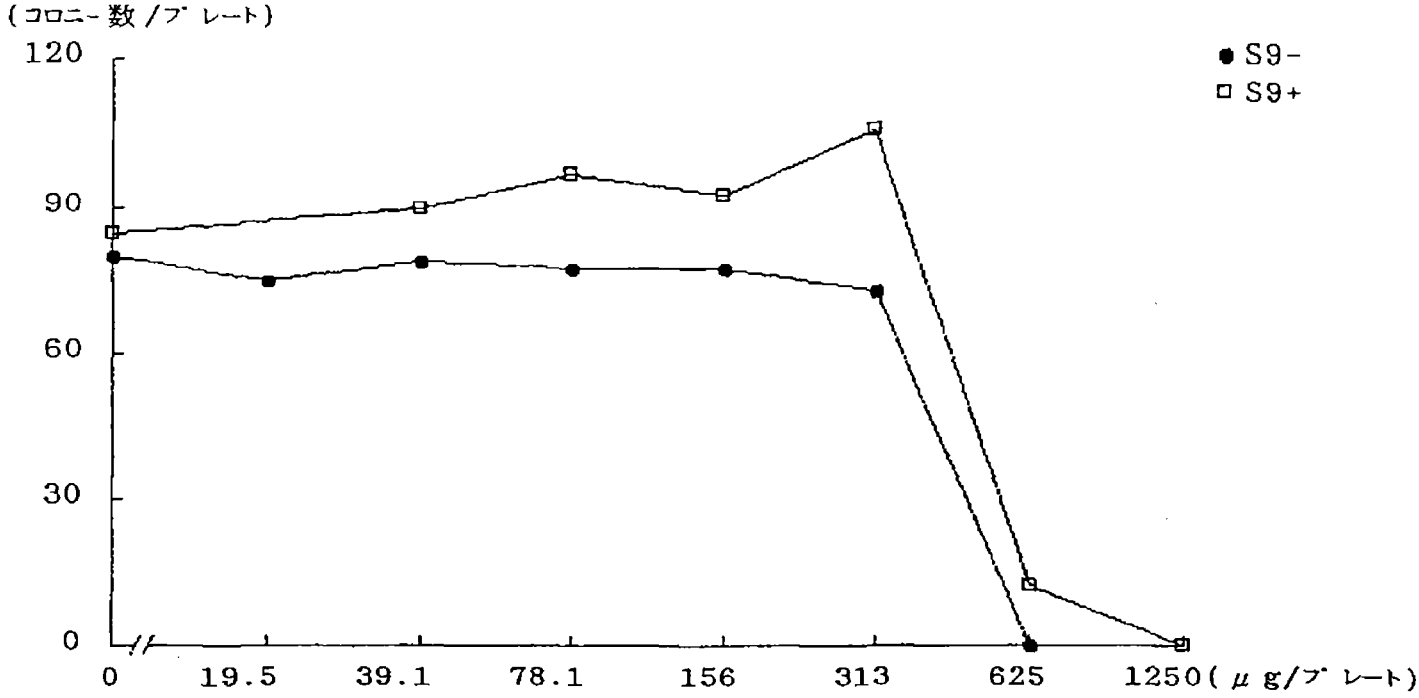


図 7 (本 試 験 2)

被験物質名：4－クロロ－o－クレゾール　　No. 4L425

量－反応曲線　　(TA1535)

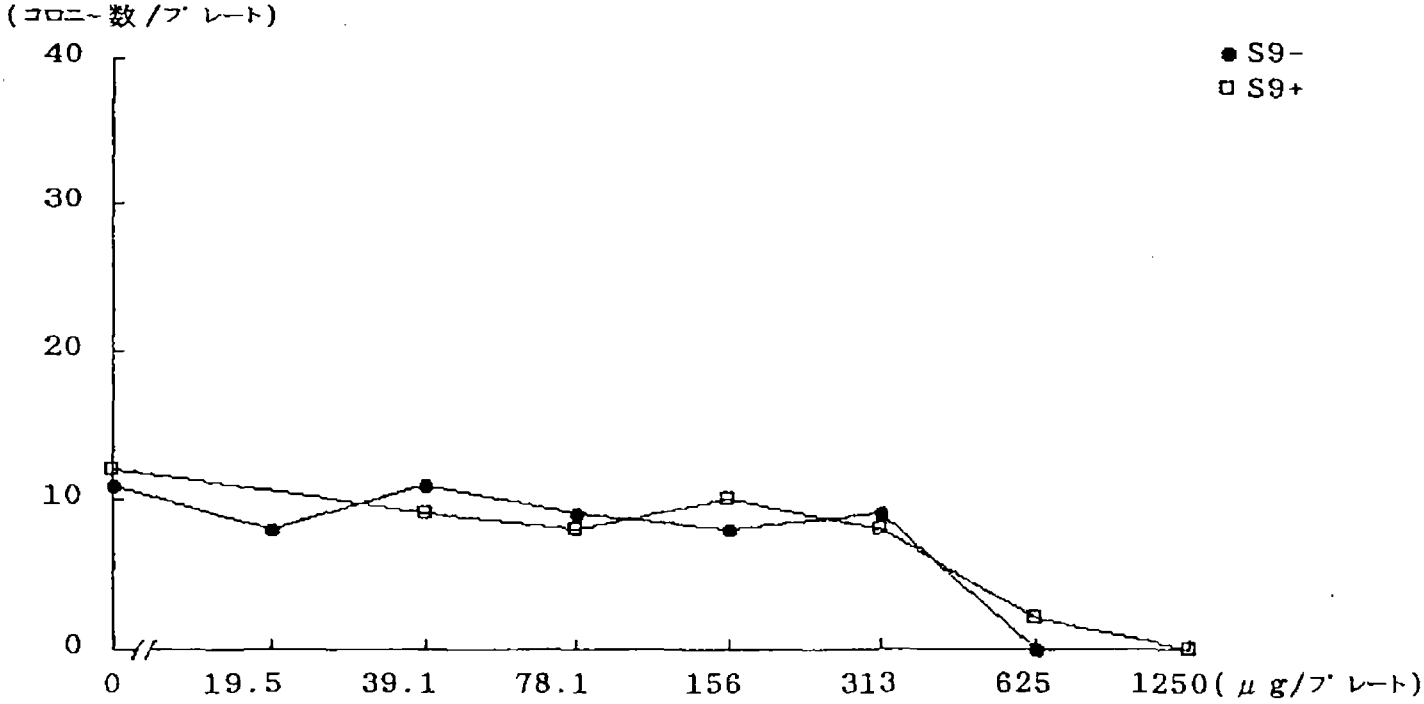


図 8 (本 試 験 2)

被験物質名：4－クロロ－o－クレゾール　　No. 4L425

量－反応曲線　　(WP2 uvrA)

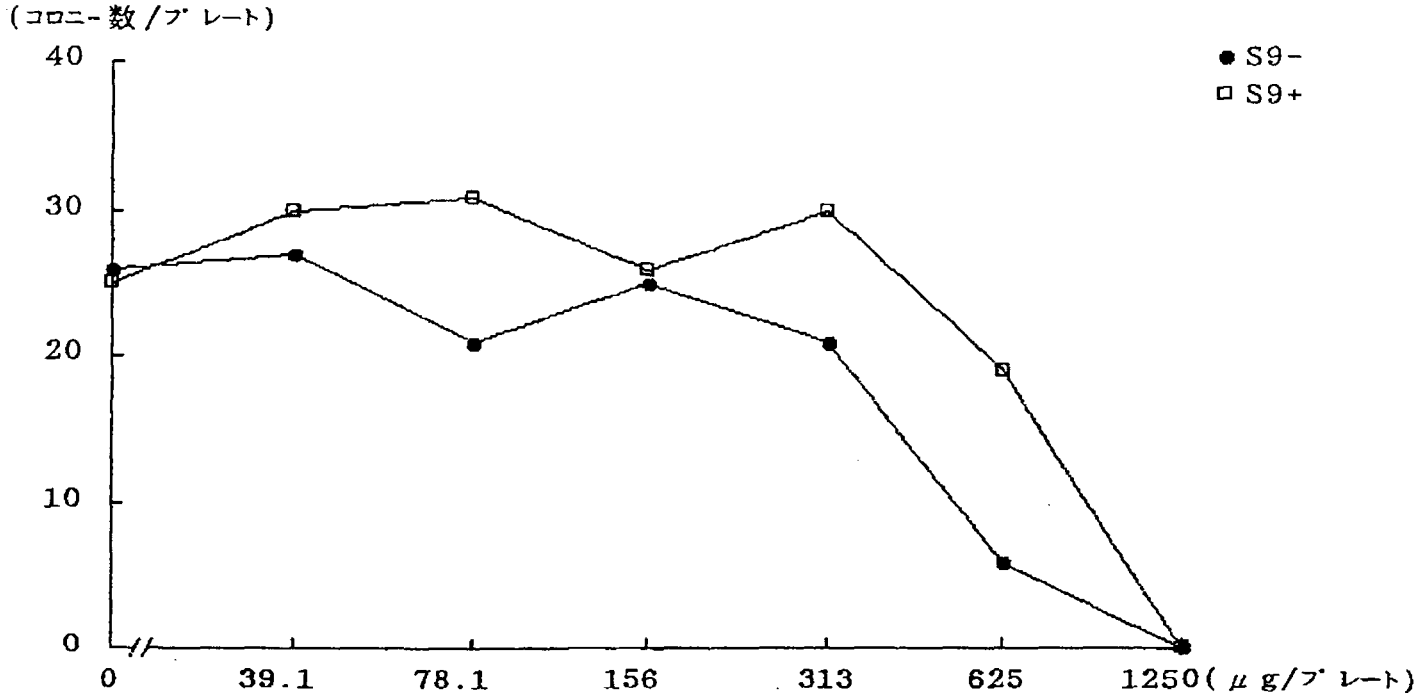


図 9 (本 試 験 2)

被験物質名：4－クロロ－o－クレゾール　　No. 4L425

量－反応曲線　　(TA98)

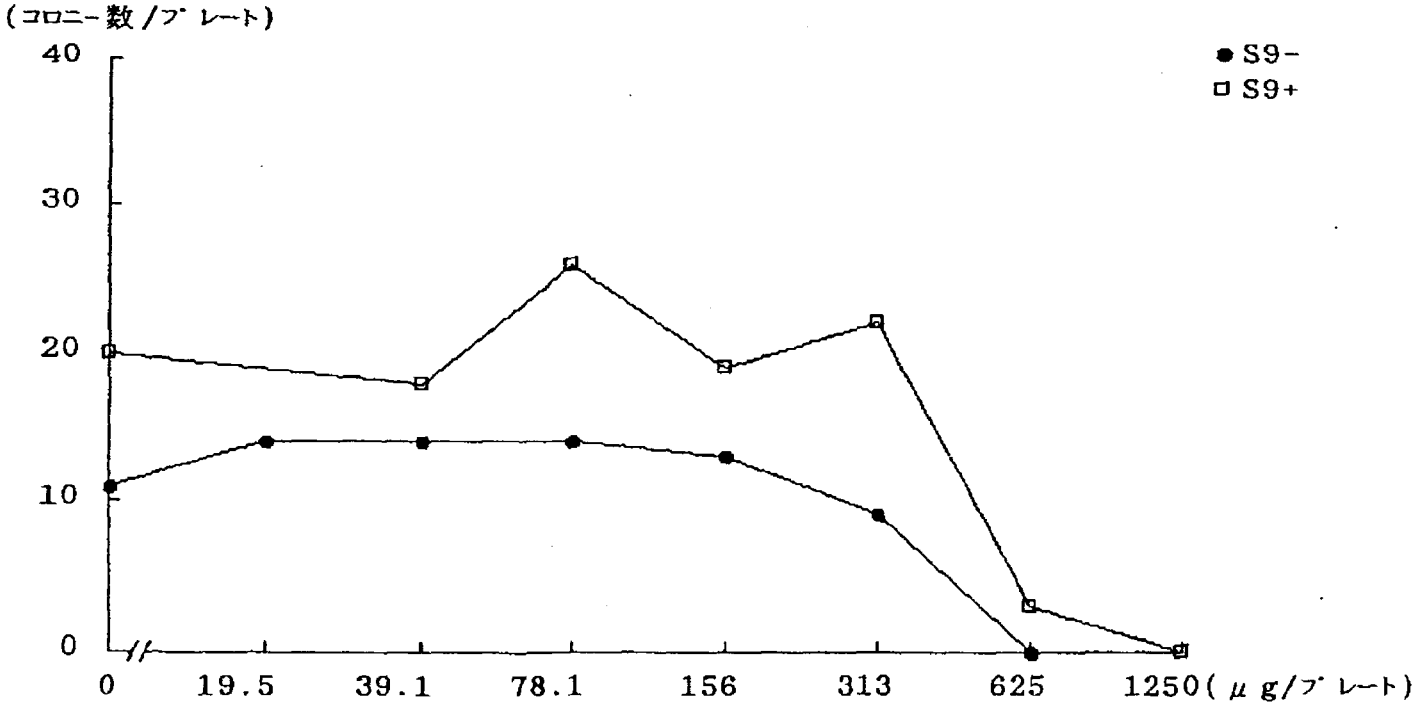
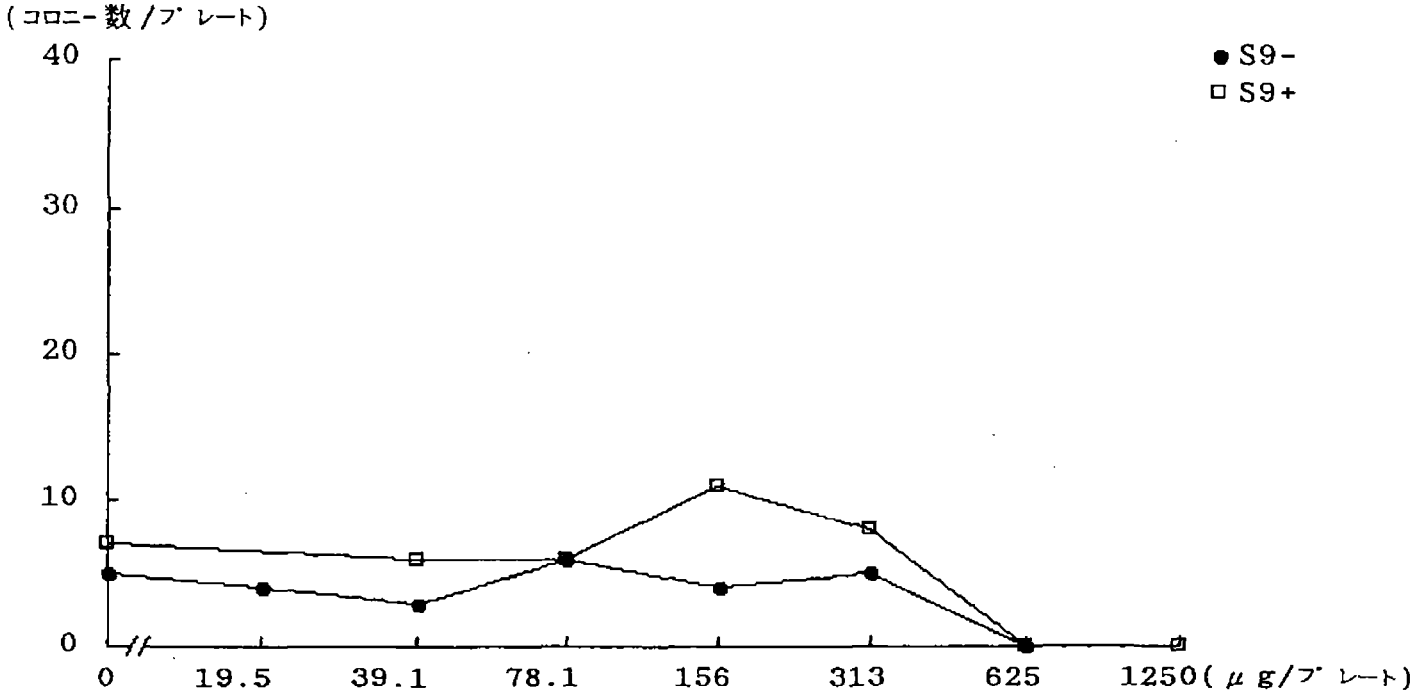


図 10 (本 試 験 2)

被験物質名：4－クロロ－o－クレゾール　　No. 4L425

量－反応曲線　　(TA1537)