



BOZO RESEARCH
CENTER INC.

原
本

最 終 報 告 書

1,3-ジブロモプロパンの
哺乳類の培養細胞を用いた染色体異常試験

M-1104

株式会社 **ボソリサーチセンター**

東京本部	〒151-0065	東京都渋谷区大山町36-7
本社・東京研究所	〒156-0042	東京都世田谷区羽根木1-3-11
御殿場研究所	〒412-0039	静岡県御殿場市かまど1284
函南研究所	〒419-0101	静岡県田方郡函南町桑原三本松1308-125

目 次

	頁
目 次	1
要 約	7
緒 言	8
試験材料及び方法	
1. 被験物質及び媒体	9
1) 被験物質	9
2) 媒体	9
2. 被験液の調製	10
1) 調製方法	10
2) 保存方法	10
3) 安定性	10
3. 対照物質	10
1) 溶媒対照（陰性対照）	10
2) 陽性対照	10
4. 使用細胞株	11
1) 供試哺乳類培養細胞	11
2) 入手先及び入手年月日	11
3) 細胞の選択理由	12
4) 染色体構成	12
5) 増殖様式	12
6) 培養液	12

7) 培養条件	12
8) 細胞の保存	12
5. 試薬	12
1) S9 mix	12
2) 細胞培養液	13
6. 試験方法	14
1) 識別方法	14
2) 細胞培養条件	15
3) 細胞増殖抑制試験	15
4) 染色体異常試験	16
5) 標本の観察	17
6) 染色体異常の分類	17
7) 判定基準	17
試験結果	
1. 細胞増殖抑制試験	19
1) 短時間処理法	19
2) 連続処理法	19
2. 染色体異常試験	20
1) 被験物質処理終了時の観察	20
2) 染色体構造異常	20
3) 倍数性細胞	20
考察	21
参考文献	22

Figures and Tables

Fig. 1-1 Cell growth in cell growth inhibition test treated with 1, 3-dibromopropane [short-term treatment: +S9 mix]	25
---	----

頁

Fig. 1-2	Cell growth and number of aberration in chromosome aberration test treated with 1, 3-dibromopropane [short-term treatment: +S9 mix] ..	25
Fig. 2-1	Cell growth in cell growth inhibition test treated with 1, 3-dibromopropane [short-term treatment: -S9 mix]	26
Fig. 2-2	Cell growth and number of aberration in chromosome aberration test treated with 1, 3-dibromopropane [short-term treatment: -S9 mix] ..	26
Fig. 3	Cell growth in cell growth inhibition test treated with 1, 3-dibromopropane [continuous treatment: 24 hr]	27
Fig. 4	Cell growth in cell growth inhibition test treated with 1, 3-dibromopropane [continuous treatment: 48 hr]	28
Table 1-1	Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with 1, 3-dibromopropane [short-term treatment: +S9 mix]	29
Table 1-2	Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with 1, 3-dibromopropane [short-term treatment: -S9 mix]	30
Table 1-3	Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with 1, 3-dibromopropane [continuous treatment: 24 hr]	31
Table 1-4	Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with 1, 3-dibromopropane [continuous treatment: 48 hr]	32
Table 2-1	Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with 1, 3-dibromopropane [short-term treatment: +S9 mix]	33
Table 2-2	Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with 1, 3-dibromopropane [short-term treatment: -S9 mix]	34

要 約

1,3-ジブロモプロパンの染色体異常誘発能の有無を検討するため、チャイニーズハムスター培養細胞（CHL/IU）を用いて染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験を行った結果、短時間処理法では、代謝活性化系及び非代謝活性化系ともに約 140 $\mu\text{g/mL}$ で 50%抑制率を示した。したがって、染色体異常試験における用量を両系ともに 60、80、100、120、140、160 及び 180 $\mu\text{g/mL}$ の 7 用量を設定した。被験物質を 6 時間処理後培養液を交換し、更に 18 時間培養した後に染色体標本を作製し、染色体異常誘発性を検討した。

染色体異常試験の結果、代謝活性化系では 60 $\mu\text{g/mL}$ 以上、非代謝活性化系では 100 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で明らかに陽性を示し、その出現率に用量依存性がみられた。染色体の構造異常の出現率は、ラット S9 mix による代謝活性化によって高まる傾向を示した。SD₂₀ 値（構造異常）は 0.066、TR 値は 290 であった。いずれの場合も、倍数性細胞の出現率は増加しなかった。

一方、陽性対照群では、染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。

なお、1,3-ジブロモプロパンは短時間処理法で明らかに陽性を示したため、連続処理法は実施しなかった。

以上の結果から、1,3-ジブロモプロパンは本試験条件下において染色体異常誘発能を有するものと判定した。

緒 言

厚生労働省医薬局審査管理課 化学物質安全対策室の依頼により、1,3-ジブロモプロパンの安全性試験の一環として、哺乳類の培養細胞（CHL/IU）を用いた染色体異常試験を実施したので、その成績を報告する。なお、本試験は以下の基準及びガイドラインに遵守又は準拠して実施した。

試験材料及び方法

1. 被験物質及び媒体

1) 被験物質

供給者 : 厚生労働省医薬局審査管理課 化学物質安全対策室

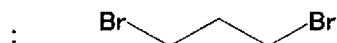
製造者 :

名称 : 1,3-ジブロモプロパン

1,3-dibromopropane

CAS 番号 : 109-64-8

構造式又は示性式



ロット番号 :

純度 : 99.8%

性状 : 無色透明の液体

分子量 : 201.89

比重 : 1.9818

融点 : -36.2℃

沸点 : 165℃

保存方法 : 室温・遮光・気密

安定性 : 実験終了後の被験物質を で分析した結果、品質に問題はなく、実験期間中は安定であった。

取り扱い上の注意

: 変異原性が認められた化学物質であり、皮膚、気道あるいは粘膜に対して刺激作用があるため直接触れたり吸入しないよう注意すること。

保存場所 : 御殿場研究所 被験物質保存室及び変異原性試験室（秤量室）

返却 : 被験物質の残量はすべて試験委託者に返却した。

2) 媒体

名称 : ジメチルスルホキシド（以下 DMSO と略記する）

ロット番号 : SEG4422

製造元 : 和光純薬工業株式会社

保存方法 : 室温

保存場所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

媒体の選択理由

: 被験物質は DMSO に溶解し、また、発泡、発熱、吸熱及び変色等の変化も認められなかったため、DMSO を媒体として選択した。

2. 被験液の調製

1) 調製方法

(1) 細胞増殖抑制試験

無菌的操作により比重換算した 1,3-ジブロモプロパンを採取し、500 mg/mL (培地中の最終濃度: 5000 µg/mL) を最高用量として DMSO により溶解し、以下公比 2 で 8 段階希釈した計 9 濃度 (①1.95、②3.91、③7.81、④15.6、⑤31.3、⑥62.5、⑦125、⑧250 及び⑨500 mg/mL) を調製した。

(2) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験の結果、18.0 mg/mL を最高用量として DMSO に溶解し、以下公差 2 mg/mL で 6 段階希釈した計 7 濃度 (①6.0、②8.0、③10.0、④12.0、⑤14.0、⑥16.0 及び⑦18.0 mg/mL) を調製した。

2) 保存方法

被験液は用時調製とし、保存しなかった。

3) 安定性

1,3-ジブロモプロパンに DMSO を添加した際に、発泡、発熱、吸熱及び着色等の変化は認められなかった。

3. 対照物質

1) 溶媒対照 (陰性対照)

名 称 : DMSO

ロット番号 : SEG4422

製造元 : 和光純薬工業株式会社

保存方法 : 室温

保存場所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

2) 陽性対照

(1) 短時間処理法

陽性対照物質として、代謝活性化系ではシクロフォスファミドを、非代謝活性化系ではマイトマイシンCを用いた。

名 称： シクロフォスファミド（以下 CP と略記する）

ロット番号： LEE7264

製 造 元： 和光純薬工業株式会社

純 度： 和光特級（97.0%以上）

保 存 方 法： 冷蔵、遮光

保 存 場 所： 御殿場研究所 変異原性試験室

名 称： マイトマイシン C（以下 MMC と略記する）

ロット番号： 319AJD

製 造 元： 協和醗酵工業株式会社

力 価： 2mg（力価）/瓶

保 存 方 法： 室温、遮光

保 存 場 所： 御殿場研究所 変異原性試験室

(2) 調製方法

CP は 0.75mg/mL(培地中の最終濃度：15 µg/mL)、MMC は 0.0025mg/mL(培地中の最終濃度：0.05 µg/mL)となるようにそれぞれ生理食塩液（日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、Lot No. 9K85N、0B87N^注）に溶解して調製した。なお、調製は用時とした。

注)：ロット番号は、試験計画書では 0G86N としていたが誤って上記ロットを用いた。

(3) 陽性対照物質の選択理由

当該陽性対照物質は、前記毒性試験のガイドラインに挙げられている物質であり、かつ、水溶性で調製が比較的容易であることから選択した。

4. 使用細胞株

1) 供試哺乳類培養細胞

細胞は、チャイニーズハムスターの肺由来線維芽細胞（CHL/IU）を用いた。なお、試験に際して、入手後液体窒素で凍結保存していた細胞を解凍して用いた。

2) 入手先及び入手年月日

細胞は、1997 年 10 月 22 日にヒューマンサイエンス研究資源バンクから入手した。入

手時の情報でマイコプラズマ陰性であることを確認した。

3) 細胞の選択理由

自然発生の染色体異常発現率が低く、種々の化学物質に対して感受性が高いことから選択した。

4) 染色体構成

試験に使用した細胞の染色体数のモードは 25 本 ($n=20$ 、85%の細胞が 25 本) であり、適切であった。

5) 増殖様式

試験に用いた細胞は、プレート上で単層状に増殖し、使用細胞の倍加時間は 17.9 時間であった。これらは入手時の特性 (単層状に増殖、倍加時間 17.6 時間) と同様に適切な増殖様式であった。なお、試験には細胞増殖抑制試験で 8 継代目、染色体異常試験で 10 継代目の細胞を用いた。

6) 培養液

培養液は、Eagle's MEM を用いた。

7) 培養条件

炭酸ガス培養装置を用い、CO₂ 濃度 5%、温度 37℃の高湿度条件下で培養し、3~4 日ごとに継代した。

8) 細胞の保存

液体窒素タンク (−196℃理論値) 中で保存した。保存に際しては培養液に DMSO (JIS 規格試薬特級 99%以上、和光純薬工業株式会社) を 10%を加えた。

5. 試薬

1) S9 mix

S9 及び補酵素 (S-9/コファクターC セット、Lot No. C010831061、オリエンタル酵母工業株式会社) を混合し、S9 mix を調製した。調製は用時に行った。

(1) S9

名 称 : S-9

ロット番号 : 01083106

製造元 : オリエンタル酵母工業株式会社

製造日 : 2001 年 8 月 31 日

購入日 : 2001 年 10 月 26 日

種 ・ 系 統 : ラット・SD系

性 : 雄

週 齢 : 7週齢

体 重 : 212.9 ± 9.1 g

誘 導 物 質 : フェノバルビタール (PB) & 5,6-ベンゾフラボン (BF)

投 与 法 : 腹腔内投与

投与期間及び投与量

: PB 4日間 30+60+60+60mg/kg body weight

BF 1日間 80mg/kg body weight

保 存 方 法 : 冷凍保存 (約 -80°C)

保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

(2) Cofactor

名 称 : Cofactor

ロ ッ ト 番 号 : C01082406

製 造 元 : オリエンタル酵母工業株式会社

保 存 方 法 : 冷凍保存 (約 -80°C)

保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

(3) S9 mix の組成

S9 2 mL

Cofactor	4.7 mL	20mM HEPES 緩衝液(pH 7.2)	1.34 mL
		50mM 塩化マグネシウム水溶液	0.67 mL
		330mM 塩化カリウム水溶液	0.67 mL
		50mM グルコース-6-リン酸水溶液	0.67 mL
		40mM 酸化型ニコチンアミド-アデニン	
		ジヌクレオチドリリン酸(NADP)水溶液	0.67 mL
		精製水	0.67 mL

2) 細胞培養液

培養液は、Eagle's MEM を溶解し、これに炭酸水素ナトリウムを 2.2 g/L 加えてフィルター (径 0.22 μm) 滅菌した後、(非働化 (56 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分) した仔牛血清を 10%添加して調製した。調製後の培養液の保存は冷蔵とした。

(1) MEM

名 称 : Minimum Essential Medium(MEM), powder

ロット番号 : 1084659 ^{注)}

製 造 元 : Life Technologies inc.

保 存 方 法 : 冷蔵保存

保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

(2) 仔牛血清

名 称 : Calf serum

ロット番号 : 1081295 ^{注)}

製 造 元 : Life Technologies inc.

保 存 方 法 : 冷凍保存

保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

注): MEM 及び仔牛血清のロット番号は、試験計画書ではそれぞれ 1055692 及び 1026097 としていたが記載誤りであったため上記ロットを用いた。

6. 試験方法 ¹⁻⁷⁾

試験は以下のステージ順に実施した。

1. 細胞増殖抑制試験	短時間処理法・連続処理法	
2. 染色体異常試験	短時間処理法	代謝活性化 非代謝活性化
連続処理法は、短時間処理法において明らかな陽性結果を得たので実施しなかった。		

1) 識別方法

(1) 細胞増殖抑制試験

短時間処理法では代謝活性化系を「+」、非代謝活性化系を「-」とし、連続処理法では 24 時間処理を「24-」、48 時間処理を「48-」とした。更にこれに続けて溶媒対照群を「SC」、非処理群を「NT」、被験物質処理群を濃度の低い方から「1」、「2」、「3」、…の番号を明記したラベルで識別した。

(2) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験と同様に番号を明記したラベルで識別した。ただし、陽性対照群は「PC」とした。染色体標本は、試験番号と処理内容をコード化した「01」～「99」までの 2 桁の番号及びスライド枝番号を明記したラベルで識別した。

2) 細胞培養条件

被験物質の揮発により処理群間に影響が及ぶ可能性を考慮し、各試験とも被験物質処理時間中は、シャーレを各被験液濃度ごと弗化ビニール樹脂製の袋（テドラーバッグ）に入れた。また、溶媒対照群及び非処理群についても同様の条件で処理した。

シャーレは、被験物質が腐食性を有することから、プラスチック製ではなくすべてガラス製（直径 60mm、Fine 社製、型式 60）を用いた。

3) 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験における被験物質の処理濃度を設定するための予備試験（細胞増殖抑制試験）として実施した。用量は、いずれの処理群においても最高用量を 5000 $\mu\text{g/mL}$ とし、以下公比 2 で 2500、1250、625、313、156、78.1、39.1 及び 19.5 $\mu\text{g/mL}$ の計 9 用量とし、これに溶媒対照群及び非処理群を設けた。また、短時間処理法では代謝活性化系を用いる群と用いない群を設けた。

(1) 短時間処理法

シャーレは 2 枚とし、シャーレ 1 枚当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種し 3 日間培養した後、倒立位相差顕微鏡で細胞に異常のないことを確認してから、新たな培養液 5.0 mL に交換した。次いで代謝活性化系による場合は培養液 0.883 mL を取り除き、各濃度の S9 mix 0.833 mL 及び被験液 0.05 mL を加えた。非処理群については、培養液 0.833 mL を除き S9 mix 0.833 mL を加えた。代謝活性化系によらない場合は、培養液 0.05 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.05 mL を加えた。非処理群については、培養液交換後は何も処置しなかった。更に 6 時間培養した後、細胞を生理食塩液で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加えて更に 18 時間培養した。培養終了後、培養液を除き生理食塩液で細胞を洗浄して 10%ホルマリン液で固定し、0.1%クリスタルバイオレット溶液で染色した。単層培養細胞密度計（モノセレータ、オリンパス光学工業株式会社）を用いて細胞の染色の濃淡から細胞密度を測定し、溶媒対照を 100%とした 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。また、6 時間の被験物質処理終了時及び 18 時間の培養終了時に、肉眼で析出の有無及び培養液の色を、倒立位相差顕微鏡で細胞の状態を確認した（培養終了時の結果は、参考データとした）。

(2) 連続処理法

短時間処理法と同様に細胞を播種し 3 日間培養した後、倒立位相差顕微鏡で細胞に異常のないことを確認してから、新たな培養液 5.0 mL に交換した。次いで培養液 0.05 mL を除き、各濃度の被験液 0.05 mL を加え、24 時間あるいは 48 時間培養を続けた。培養

終了後、短時間処理法と同様に培養液の色、細胞の状態及び析出の有無を観察した後に、固定・染色し、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。

4) 染色体異常試験

(1) 用量設定の根拠

細胞増殖抑制試験で得られた 50%細胞増殖抑制濃度を基に用量を設定した。細胞増殖抑制は、代謝活性化系の有無にかかわらず 156 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で認められ、50%抑制濃度は約 140 $\mu\text{g/mL}$ と推定された。このことから、用量は 50%細胞増殖抑制用量の前後が含まれ、かつ 3 用量以上の染色体観察が可能となることを考慮して、180 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量とし、以下公差 20 $\mu\text{g/mL}$ で 160、140、120、100、80 及び 60 $\mu\text{g/mL}$ の計 7 用量を設定した。また、これに非処理群、溶媒対照群及び陽性対照群を設けた。

(2) 短時間処理法

① 代謝活性化系

直径 60mm のシャーレ 1 枚当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0mL）を播種し 3 日間培養した後、倒立位相差顕微鏡で細胞に異常のないことを確認してから、新たな培養液 5.0mL に交換した。その後、代謝活性化系では培養液 0.883 mL を除き、溶媒対照群については S9 mix 0.833 mL 及び溶媒 0.05 mL を、被験物質処理群については S9 mix 0.833 mL 及び各濃度の被験液 0.05 mL を加えた。また、非処理群については培養液 0.833 mL を除き S9 mix 0.833 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.933 mL を除き、S9 mix 0.833 mL 及び CP 0.1 mL を加えて 6 時間培養した。非代謝活性化系では、培養液 0.05 mL を除き、溶媒対照群については溶媒 0.05 mL を、被験物質処理群については各濃度の被験液 0.05 mL を加えた。非処理群については培養液の交換後は何も処置しなかった。陽性対照群については培養液 0.1 mL を除き、MMC 0.1 mL を加えて 6 時間培養した。6 時間の培養後、培養液を除き生理食塩液で細胞を洗浄し、新たな培養液 5.0 mL を加えて更に 18 時間培養した。なお、染色体観察用のスライドガラス標本作製に際しては、細胞分裂を分裂中期で停止させるため標本作製約 2 時間前にコルセミド 0.1 mL（最終濃度：0.2 $\mu\text{g/mL}$ ）を加えた。培養終了後、0.25%トリプシン溶液で単離した細胞を遠心分離し、0.075M 塩化カリウム溶液で低張処理し、メチルアルコール・酢酸液（3:1）で固定した。その細胞をスライドガラス 1 枚につき 2 箇所点滴下し、空気乾燥後 2%ギムザ液で染色標本作製した。スライド標本は、1 枚のシャーレから 2 枚作製した。各処理群で残る 2 枚のシャーレは、細胞増殖抑制試験に準じ固定・染色し、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を測定

した。また、6時間の被験物質処理終了時及び18時間の培養終了時に、細胞増殖抑制試験と同様、析出の有無、培養液の色及び細胞の状態を確認した。

5) 標本の観察

各濃度当たり200個（シャーレ当たり100個）のよく広がった分裂中期像について構造異常の種類と異常を持つ細胞の数を記録した。同時に倍数体の数も記録した（3倍体を含めた染色体数37本以上を倍数体とした）。なお、客観的な観察を行うため染色体標本はすべて盲検法により観察した。

6) 染色体異常の分類

染色体異常の種類は以下のように分類した。ただし、ギャップとは染色体又は染色分体の同軸上に断片があるもの（非染色部分が染色分体の同軸上にある）であって、その長さが染色分体の幅以下で明瞭な非染色部位が認められるものと定義した。断片が染色分体の同軸上よりはずれている場合、非染色部位が染色分体の同軸上にあってもその長さが染色分体の幅以上に離れている場合は切断と定義した。

(1) 構造異常

ギャップ	染色分体型(ctg)、染色体型(csg)を含む(g)
染色分体型切断	(ctb)
染色分体型交換	(cte)、四放射状交換など
染色体型切断	(csb)
染色体型交換	(cse)、二動原体染色体、環状染色体など
その他	断片化(frg)、他

(2) 数的異常

倍数体	polyploid (endoreduplication を含む)
-----	-----------------------------------

7) 判定基準

2枚のシャーレ間で異常細胞の出現頻度に著しいばらつきがないこと、溶媒対照群で異常細胞の出現頻度が5%未満であること、陽性対照群でギャップ以外の異常細胞の出現頻度が10%以上であること、被験物質処理群の3用量以上における染色体標本の評価が可能であること及び培養条件等試験環境に異常が認められないことを本試験の成立条件とした。

石館らの判定基準^{1,4,6)}に従い、各実験群の異常細胞の出現率に対して以下のような判定基準を設けた。

異常細胞の出現率	判定基準
5% 未満	陰 性 (－)
5% 以上 10% 未満	疑陽性 (±)
10% 以上	陽 性 (+)

染色体構造異常を有する細胞の出現率はギャップを含む場合(TAG)と含まない場合(TA)について集計し、ギャップを含まない場合について判定した。異常細胞の出現に用量依存性又は再現性が認められた場合を染色体異常誘発能陽性と判定した^{2,4,6)}。なお、陽性と判定されたため、構造異常を持つ細胞が20%出現する推定被験物質濃度であるSD₂₀値(構造異常のD₂₀値を意味する)、並びに単位用量(mg/mL)当たりの染色分体交換又は染色体交換をもつ細胞の出現頻度の比較値であるTR値を算出した。

なお、判定に際しては統計学的手法を用いなかった。

染色体の正常例及び異常例を撮影した。

試験結果

1. 細胞増殖抑制試験

1) 短時間処理法

短時間処理法における代謝活性化系の結果を Fig. 1-1 及び Table 1-1 に、非代謝活性化系の結果を Fig. 2-1 及び Table 1-2 に示した。

(1) 50%細胞増殖抑制濃度

細胞増殖抑制は、代謝活性化系の有無にかかわらず 156 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で認められ、50%抑制濃度は約 140 $\mu\text{g/mL}$ と推定された。

(2) 被験物質処理終了時の観察結果

代謝活性化系の有無にかかわらず、2500 及び 5000 $\mu\text{g/mL}$ 群でシャーレ底面に被験物質様の析出が観察された。また、用量群の細胞の状態を溶媒対照群と比較すると 156 $\mu\text{g/mL}$ 以上の群で不連続となり、625 $\mu\text{g/mL}$ 以上の群では剥離・死滅した細胞も認められた。なお、培養液の色調の変化はいずれの用量にもみられなかった。

2) 連続処理法

連続処理法における 24 時間処理の結果を Fig. 3 及び Table 1-3 に、48 時間処理の結果を Fig. 4 及び Table 1-4 に示した。

(1) 50%細胞増殖抑制濃度

細胞増殖抑制は、24 時間処理で 156 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で認められ、50%抑制濃度は約 130 $\mu\text{g/mL}$ 、48 時間処理で 39.1 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で認められ、50%抑制濃度は約 80 $\mu\text{g/mL}$ と推定された。

(2) 被験物質処理終了時の観察結果

24 時間及び 48 時間処理とも、2500 及び 5000 $\mu\text{g/mL}$ 群でシャーレ底面に被験物質様の析出が観察された。また、用量群の細胞の状態を溶媒対照群と比較すると 24 時間処理では 156 $\mu\text{g/mL}$ 以上の群で不連続となり、313 $\mu\text{g/mL}$ 以上では剥離・死滅した細胞も認められた。48 時間処理では 39.1 $\mu\text{g/mL}$ 以上の群で不連続となり、156 $\mu\text{g/mL}$ 以上では剥離・死滅した細胞も認められた。なお、培養液の色調の変化はいずれの用量にもみられなかった。

2. 染色体異常試験

短時間処理法の結果を Fig. 1-2、2-2、Table 1-1、1-2、2-1 及び 2-2 に、染色体の正常例及び異常例をそれぞれ Photo. 1 及び Photo. 2 に示した。

1) 被験物質処理終了時の観察

用量群の細胞の状態は、対照群と比較し不連続となったのは代謝活性化で 80 $\mu\text{g/mL}$ 以上の群、非代謝活性化系で 120 $\mu\text{g/mL}$ 以上の群であった。また、剥離・死滅した細胞がそれぞれ 120 $\mu\text{g/mL}$ 以上の群及び 160 $\mu\text{g/mL}$ 以上の群に観察された。なお、析出及び培養液の色調の変化はいずれの用量にもみられなかった。

2) 染色体構造異常

染色体構造異常の出現頻度は、代謝活性化系では 60 $\mu\text{g/mL}$ 群で 11.0%、80 $\mu\text{g/mL}$ 群で 27.5% 及び 100 $\mu\text{g/mL}$ 群で 32.5% と用量依存的に増加し、かついずれの群も陽性を示した。また、非代謝活性化系においても、60 $\mu\text{g/mL}$ 群で 5.0%、80 $\mu\text{g/mL}$ 群で 9.5%、100 $\mu\text{g/mL}$ 群で 12.0% 及び 120 $\mu\text{g/mL}$ 群で 11.0% となり、代謝活性化系と比較し弱い出現頻度ではあったが、用量依存的に擬陽性から陽性を示した。なお、代謝活性化系で 120 $\mu\text{g/mL}$ 以上の群、非代謝活性化系で 140 $\mu\text{g/mL}$ 以上の群については、被験物質の毒性により染色体の観察ができなかった。

SD₂₀ 値は 0.066 (mg/mL)、TR 値は 290 であった。

3) 倍数性細胞

いずれの用量群にも 5% を越える倍数性細胞の出現頻度の増加は認められなかった。

考 察

染色体異常試験において、構造異常は S9 非存在下でも陽性となったが、S9 の存在によってより高くなった。したがって、1,3-ジブロモプロパンは代謝活性化によって変異原性が高まることが示唆された。また、染色体異常誘発性の強さは、変異原性の強さに関する構造異常の相対的比較値である SD₂₀ 値が 0.066 であること、切断型よりも交換型がより多く出現していることから、比較的強いものと思われる。

一方、陰性対照群及び無処置対照群における染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、5%未満であった。陽性対照物質の CP あるいは MMC を処理した細胞では、染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。また、2 枚のシャーレ間における染色体異常細胞の出現頻度に著しい差はなく、培養条件等の試験環境の異常も認められなかった。これらのことから、試験は適切に実施されたものと考えられた。

なお、本被験物質については Ames 試験及び染色体異常試験で陽性との報告⁸⁾がある。また、類縁体の 1-bromo-3-chloropropane⁹⁾、2,4,6-tribromophenol¹⁰⁾及び chloropentabromocyclohexane¹¹⁾は染色体異常試験で陽性との報告があった。

以上の結果から、1,3-ジブロモプロパンは、本試験条件下において染色体異常誘発能を有するものと判定した。

参考文献

- 1) Ishidate, M. Jr. and Odashima, S.: Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro – A screening for chemical carcinogens, *Mutation Res.*, 48, 337-354(1977)
- 2) Matsuoka, A., et al.: Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix in vitro, *Mutation Res.*, 66, 277-290(1979)
- 3) 石館 基：哺乳動物細胞を用いる検索と問題点(Screening Trial to Detect Possible Chemical Mutagens and/or Carcinogens in the Environment - Mammalian Cell Systems), *日本香粧品科学会誌*, 6, 31-43(1982)
- 4) 石館基監修：染色体異常試験データ集, 株式会社エル・アイ・シー (1987)
- 5) M. Ishidate, Jr., Edited by G. Obe and A. T. Natarajan: Chromosomal Aberrations Basic and Applied Aspects, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 260-271(1989)
- 6) 日本製薬工業協会・医薬品評価委員会・基礎研究部会 変異原性試験検討グループ編集：厚生省医薬品毒性試験法ガイドラインに基づく変異原性試験 Q&A、サイエンティスト社、1992
- 7) Toshio Sofuni: *IN VITRO DETECTION OF CHROMOSOMAL ABERRATIONS*, *In Vitro Methods of Toxicology*, CRC Press, 203-216(1992)
- 8) 労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課監修：労働安全衛生法に基づく既存化学物質変異原性試験データ集、日本化学物質安全・情報センター (1996)
- 9) 厚生労働省医薬局審査管理課化学物質安全対策室監修：化学物質毒性試験報告、化学物質点検推進連絡協議会、Vol. 8 (1)、506-510 (2001)

- 10) 厚生労働省医薬局審査管理課化学物質安全対策室監修：化学物質毒性試験報告、化学物質点検推進連絡協議会、Vol. 7、418-421 (1999)
- 11) 厚生労働省医薬局審査管理課化学物質安全対策室監修：化学物質毒性試験報告、化学物質点検推進連絡協議会、Vol. 4、91-93 (1996)

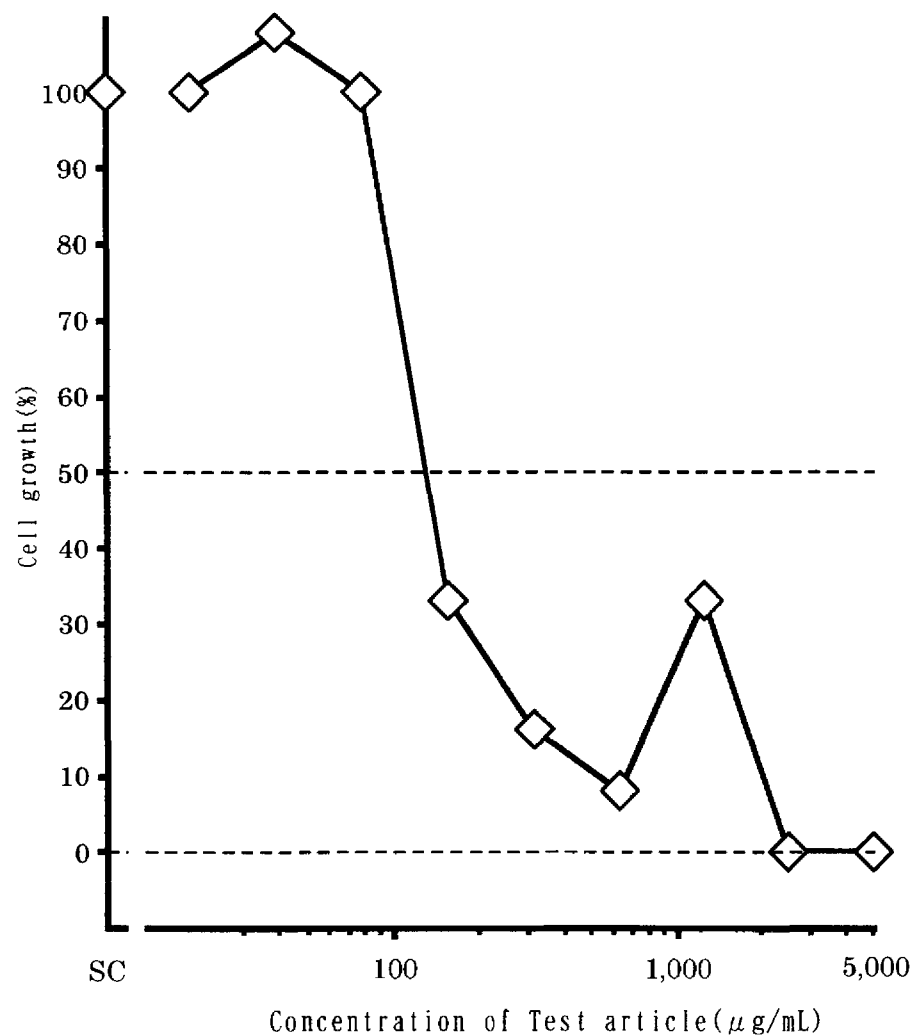


Fig. 1-1 Cell growth in cell growth inhibition test treated with 1,3-dibromopropane [short-term treatment: +S9 mix]

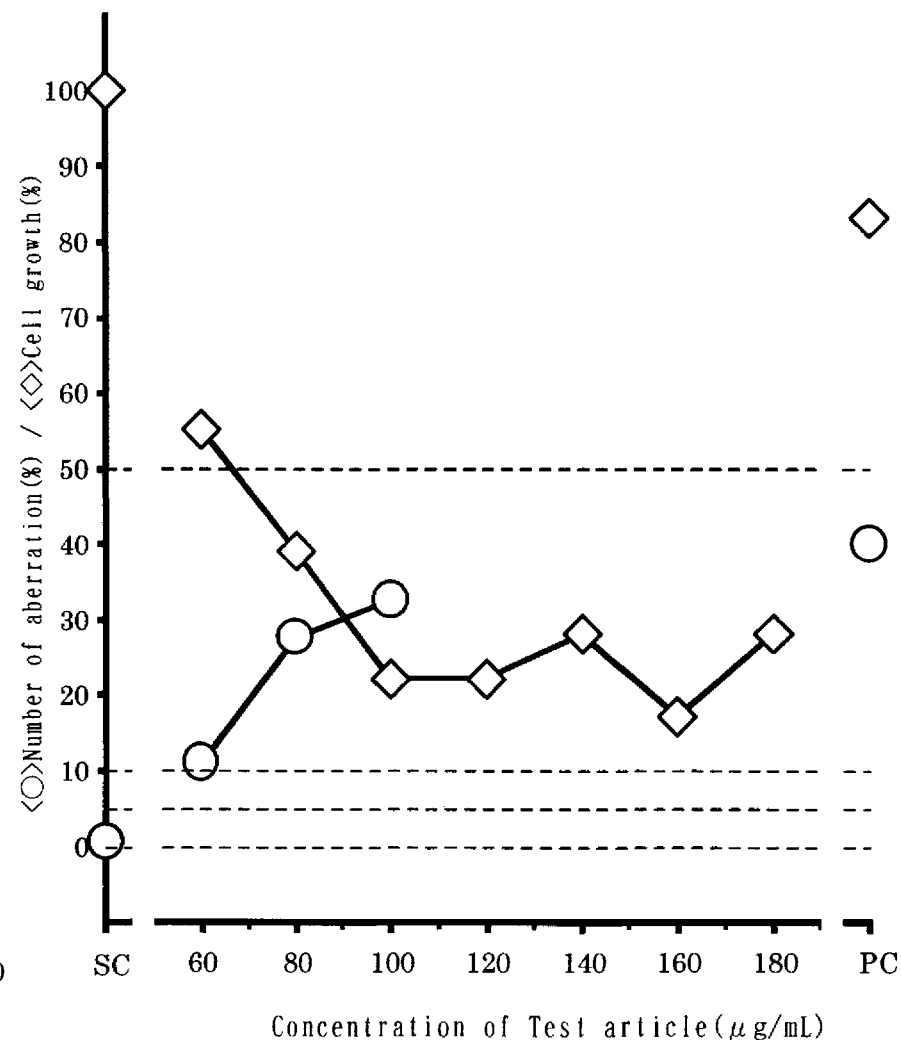


Fig. 1-2 Cell growth and number of aberration in chromosome aberration test treated with 1,3-dibromopropane [short-term treatment: +S9 mix]

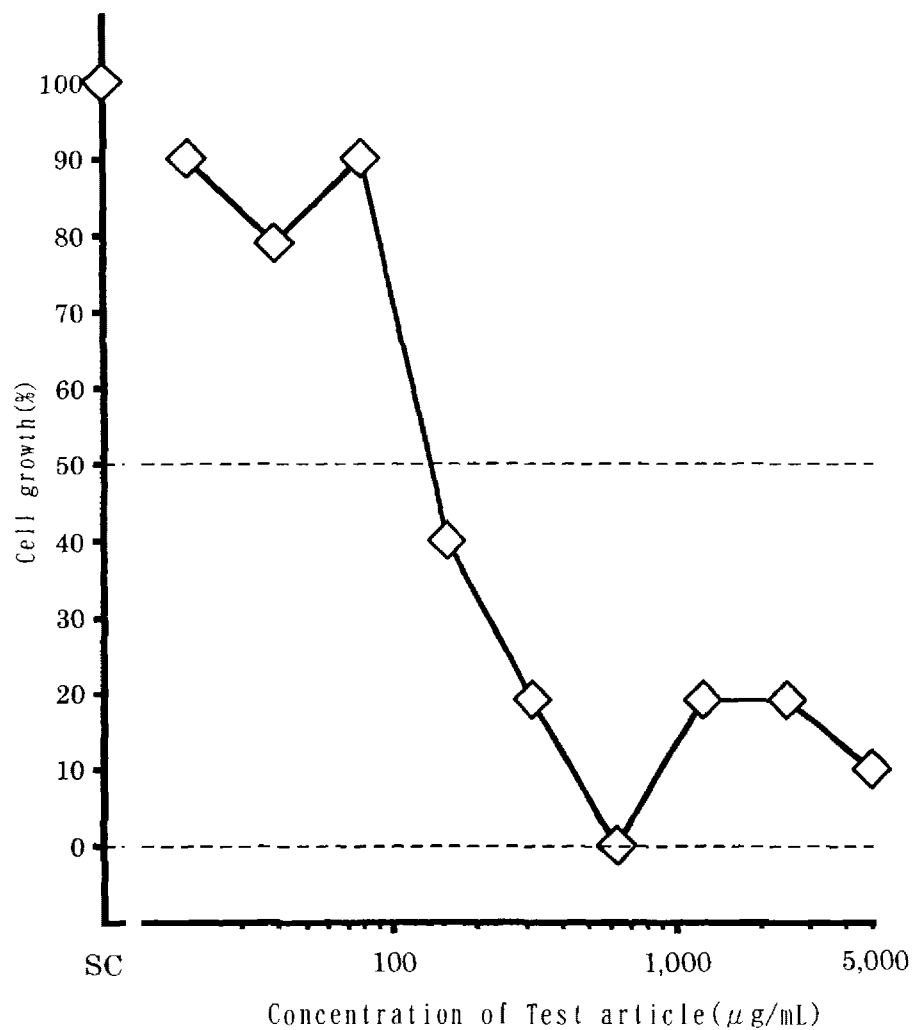


Fig. 2-1 Cell growth in cell growth inhibition test treated with 1,3-dibromopropane [short-term treatment: -S9 mix]

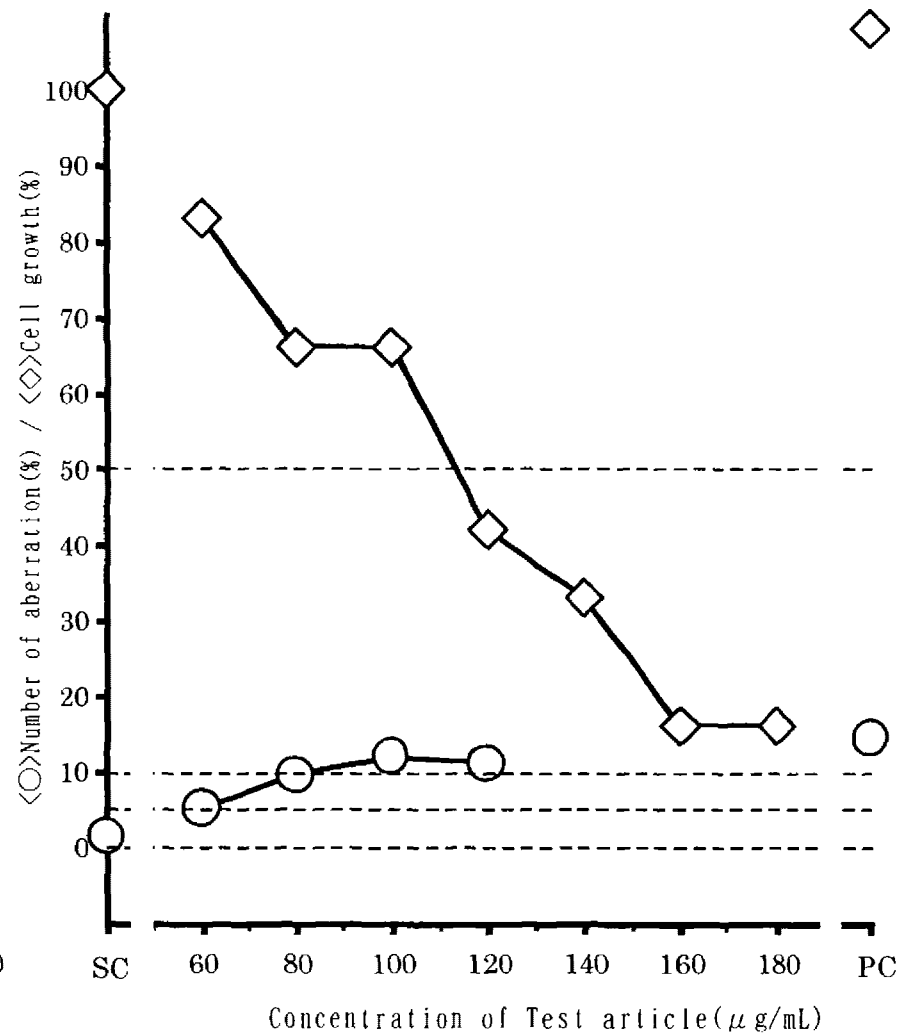


Fig. 2-2 Cell growth and number of aberration in chromosome aberration test treated with 1,3-dibromopropane [short-term treatment: -S9 mix]

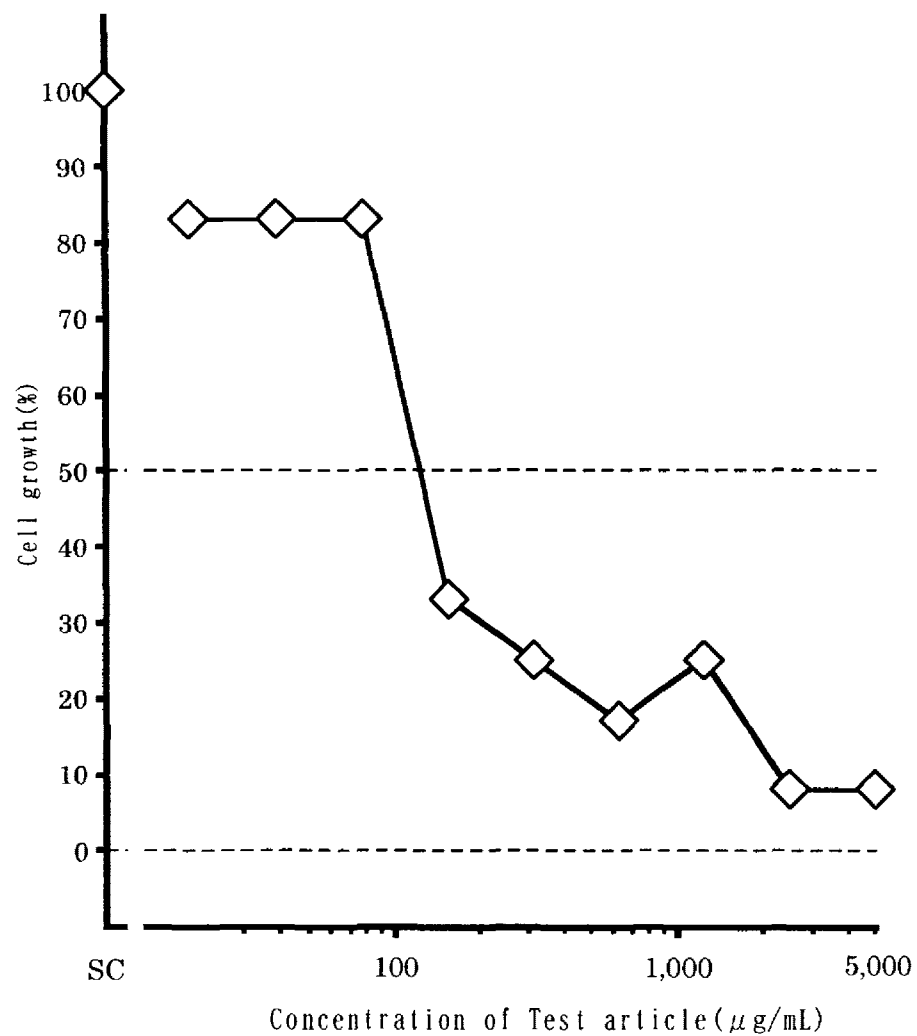


Fig. 3 Cell growth in cell growth inhibition test treated with 1,3-dibromopropane [continuous treatment: 24hr]

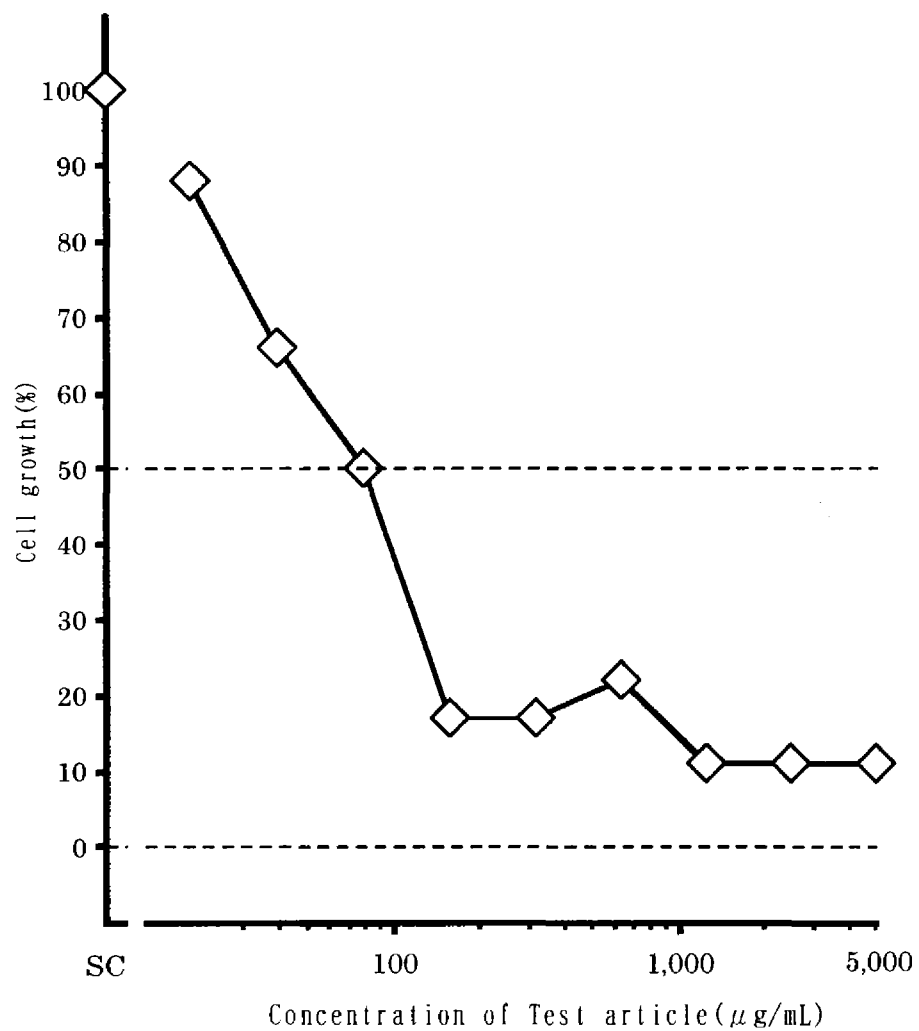


Fig. 4 Cell growth in cell growth inhibition test treated with 1,3-dibromopropane [continuous treatment: 48hr]

Table 1-1 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with 1,3-dibromopropane
[short-term treatment: +S9 mix]

Study type		Treatment and Concentration (μ g/mL)	Cell growth inhibition test					Treatment and Concentration (μ g/mL)	Chromosome aberration test							
S9 mix	Time (h)		Cell growth retio		Condition of cells ^(b)	Color of medium ^(c)	Precipitates /Crystals ^(d)		Cell growth retio		Condition of cells ^(b)	Color of medium ^(c)	Precipitates /Crystals ^(d)			
		Plate i and 2	Mean							Plate i and 2				Mean		
+	6-18	Test article	NT		116	108	—	Red	—	NT		133	117	—	Red	—
					100		—	Red	—			100		—	Red	—
			0 (SC)		100 ^{a)}	100	—	Red	—	0 (SC)		100 ^{a)}	100	—	Red	—
					100		—	Red	—			100		—	Red	—
			19.5		100	100	—	Red	—	60		55	55	—	Red	—
					100		—	Red	—			55		—	Red	—
			39.1		116	108	—	Red	—	80		33	39	+	Red	—
					100		—	Red	—			44		+	Red	—
			78.1		100	100	—	Red	—	100		22	22	++	Red	—
					100		—	Red	—			22		++	Red	—
			156		33	33	++	Red	—	120		22	22	TOX	Red	—
					33		++	Red	—			22		TOX	Red	—
			313		16	16	+++	Red	—	140		44	28	TOX	Red	—
					16		+++	Red	—			11		TOX	Red	—
			625		16	8	TOX	Red	—	160		0	17	TOX	Red	—
					0		TOX	Red	—			33		TOX	Red	—
			1250		33	33	TOX	Red	—	180		22	28	TOX	Red	—
					33		TOX	Red	—			33		TOX	Red	—
			2500		0	0	TOX	Red	+							
					0		TOX	Red	+							
			5000		0	0	TOX	Red	+							
					0		TOX	Red	+							
		PC					PC					66	83	—	Red	—
												100		—	Red	—

Concentration of 50% cell growth inhibition: about 140 μ g/mL

Concentration of 50% cell growth inhibition: about 140 μ g/mL

NT: Non-treatment

SC: Solvent control (DMSO)

PC: Positive control (Cyclophosphamide, 15 μ g/mL)

a): One plate in the solvent control group was regarded as a 100% growth.

b): Observation of plate at the end of treatment

—: Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

+: There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++: There was discontinuity among approximately half the surviving cells.

+++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.

TOX: Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.

c): Red was red to orange red.

d): —: Absence of precipitates/crystals.

+: Presence of precipitates.

Table 1-2 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with 1,3-dibromopropane
[short-term treatment: -S9 mix]

Study type		Treatment and Concentration (μ g/mL)	Cell growth inhibition test					Treatment and Concentration (μ g/mL)	Chromosome aberration test							
S9 mix	Time (h)		Cell growth ratio		Observation				Cell growth ratio		Observation					
			Plate 1 and 2	Mean	Condition of cells ^(b)	Color of medium ^(c)	Precipitates /Crystals ^(d)		Plate 1 and 2	Mean	Condition of cells ^(b)	Color of medium ^(c)	Precipitates /Crystals ^(d)			
—	6-18	Test article	NT		100	100	—	Red	—	NT		116	116	—	Red	—
					100	100	—	Red	—			116	116	—	Red	—
			0 (SC)		100 ^{a)}	100	—	Red	—	0 (SC)		100 ^{a)}	100	—	Red	—
					100	100	—	Red	—			99	99	—	Red	—
			19.5		100	90	—	Red	—	60		83	83	—	Red	—
					79	79	—	Red	—			83	83	—	Red	—
			39.1		79	79	—	Red	—	80		66	66	—	Red	—
					79	79	—	Red	—			66	66	—	Red	—
			78.1		100	90	—	Red	—	100		66	66	—	Red	—
					79	90	—	Red	—			66	66	—	Red	—
			156		40	40	+	Red	—	120		33	42	+	Red	—
					40	40	+	Red	—			50	50	+	Red	—
			313		19	19	+++	Red	—	140		33	33	+++	Red	—
					19	19	+++	Red	—			33	33	+++	Red	—
			625		0	0	TOX	Red	—	160		16	16	TOX	Red	—
					0	0	TOX	Red	—			16	16	TOX	Red	—
			1250		19	19	TOX	Red	—	180		16	16	TOX	Red	—
					19	19	TOX	Red	—			16	16	TOX	Red	—
			2500		19	19	TOX	Red	+							
					19	19	TOX	Red	+							
			5000		0	10	TOX	Red	+							
					19	10	TOX	Red	+							
PC							PC		99	108	—	Red	—			
									116	116	—	Red	—			

Concentration of 50% cell growth inhibition: about 140 μ g/mL

Concentration of 50% cell growth inhibition: about 140 μ g/mL

NT: Non-treatment

SC: Solvent control (DMSO)

PC: Positive control (Mitomycin C, 0.05 μ g/mL)

a): One plate in the solvent control group was regarded as a 100% growth.

b): Observation of plate at the end of treatment

—: Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

+: There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++: There was discontinuity among approximately half the surviving cells.

+++: There was discontinuity among most of the surviving cells.

TOX: Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.

c): Red was red to orange red.

d): —: Absence of precipitates/crystals.

+: Presence of precipitates.

Table 1-3 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with 1,3-dibromopropane
[continuous treatment: 24hr]

Study type		Treatment and Concentration (μ g/mL)	Cell growth inhibition test			
S9 mix	Time (h)		Cell growth ratio Plate 1 and 2	Mean	Condition of cells ^(b)	Observation Color of medium ^(c) Precipitates /Crystals ^(d)
-	24-0	Test article	NT	83	—	Red
				100	—	Red
			0 (SC)	100 ^{a)}	—	Red
				100	—	Red
			19.5	83	—	Red
				83	—	Red
			39.1	66	—	Red
				100	—	Red
			78.1	83	—	Red
				83	—	Red
			156	33	++	Red
				33	++	Red
			313	33	TOX	Red
				16	TOX	Red
			625	0	TOX	Red
				33	TOX	Red
			1250	33	TOX	Red
				16	TOX	Red
			2500	16	TOX	Red
				0	TOX	Red
			5000	16	TOX	Red
				0	TOX	Red
			PC			

Concentration of 50% cell growth inhibition: about 130 μ g/mL

NT: Non-treatment

SC: Solvent control (DMSO)

a): One plate in the solvent control group was regarded as a 100% growth.

b): Observation of plate at the end of treatment

—: Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

+: There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++: There was discontinuity among approximately half the surviving cells.

+++: There was discontinuity among most of the surviving cells.

TOX: Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.

c): Red was red to orange red.

d): —: Absence of precipitates/crystals.

+: Presence of precipitates.

Table 1-4 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with 1,3-dibromopropane
[continuous treatment: 48hr]

Study type		Treatment and Concentration (μ g/mL)	Cell growth inhibition test						
S9 mix	Time (h)		Cell growth ratio		Observation				
			Plate 1 and 2	Mean	Condition of cells ^(b)	Color of medium ^(c)	Precipitates /Crystals ^(d)		
—	48-0	Test article	NT		100	106	—	Red	—
					111		—	Red	—
			0 (SC)		100 ^(a)	106	—	Red	—
					111		—	Red	—
			19.5		88	88	—	Red	—
					88		—	Red	—
			39.1		66	66	+	Red	—
					66		+	Red	—
			78.1		55	50	++	Red	—
					44		++	Red	—
			156		22	17	TOX	Red	—
					11		TOX	Red	—
			313		11	17	TOX	Red	—
					22		TOX	Red	—
			625		22	22	TOX	Red	—
					22		TOX	Red	—
			1250		11	11	TOX	Red	—
					11		TOX	Red	—
			2500		0	11	TOX	Red	+
					22		TOX	Red	+
			5000		11	11	TOX	Red	+
					11		TOX	Red	+
		PC							

Concentration of 50% cell growth inhibition: about 80 μ g/mL

Concentration of 50% cell growth inhibition: about 80 μ g/mL

NT: Non-treatment

SC: Solvent control (DMSO)

a): One plate in the solvent control group was regarded as a 100% growth.

b): Observation of plate at the end of treatment

—: Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

+: There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++: There was discontinuity among approximately half the surviving cells.

+++: There was discontinuity among most of the surviving cells.

TOX: Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.

c): Red was red to orange red.

d): —: Absence of precipitates/crystals.

+: Presence of precipitates.

Table 2-1 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with 1,3-dibromopropane [short-term treatment: +S9 mix]
Study Number : M-1104

S9 mix	Time(h)	Conc (μ g/mL)	Cells observed	Polyploidy cells (%)	Judge	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
+	6-18	NT	200	0.0		0	0	4	0	0	0	2.0	2.0		52-1 27-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(2)	(0)	(0)	(0)	(2)	(2)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(2)	(0)	(0)	(0)	(2)	(2)		
		SC	200	0.0		1	1	2	0	0	0	1.5	2.0		65-1 19-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(2)	(0)	(0)	(0)	(3)	(3)		
			(100)	(0)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
		60	200	2.0	-	0	7	15	0	1	0	11.0	11.0	+	75-1 70-1
			(100)	(1)		(0)	(4)	(9)	(0)	(1)	(0)	(13)	(13)		
			(100)	(3)		(0)	(3)	(6)	(0)	(0)	(0)	(9)	(9)		
		80	200	1.5	-	6	16	47	3	0	0	27.5	29.5	+	95-1 23-1
			(100)	(1)		(0)	(4)	(26)	(1)	(0)	(0)	(31)	(31)		
			(100)	(2)		(6)	(12)	(21)	(2)	(0)	(0)	(24)	(28)		
		100	200	0.0	-	6	26	50	2	0	0	32.5	35.5	+	34-1 07-1
			(100)	(0)		(0)	(9)	(30)	(1)	(0)	(0)	(38)	(38)		
			(100)	(0)		(6)	(17)	(20)	(1)	(0)	(0)	(27)	(33)		
		120	0	0.0	TOX	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	TOX	98-1 98-2 14-1 14-2
			(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)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		140	0	0.0	TOX	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	TOX	54-1 54-2 87-1 87-2
			(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)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		160	0	0.0	TOX	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	TOX	72-1 72-2 82-1 82-2
			(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)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		180	0	0.0	TOX	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	TOX	41-1 41-2 39-1 39-2
			(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)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		PC	200	1.0	-	0	12	70	1	4	0	40.0	40.0	+	62-1 13-1
			(100)	(0)		(0)	(7)	(43)	(1)	(2)	(0)	(50)	(50)		
			(100)	(2)		(0)	(5)	(27)	(0)	(2)	(0)	(30)	(30)		

(): Number of observed
g: chromosomal or chromatid gap
cse: chromosomal exchange

NT: Non-treatment
ctb: chromatid break
TA: number of cells without gap

SC: Solvent control
cte: chromatid exchange
TAG: number of cells with gap

PC: Positive control (Cyclophosphamide, 15 μ g/mL)
csb: chromosomal break
TOX: Cell toxicity was observed.

Table 2-2 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with 1,3-dibromopropane [short-term treatment: -S9 mix]
Study Number : M-1104

S9 mix	Time(h)	Conc (μ g/mL)	Cells observed	Polyploidy cells (%)	Judge	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
-	6-18	NT	200	0.0		0	1	0	0	0	0	0.5	0.5		26-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		48-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		SC	200	0.0		1	1	2	0	0	0	1.5	2.0		04-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(2)	(0)	(0)	(0)	(3)	(3)		71-1
			(100)	(0)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
		60	200	1.0	-	3	2	8	0	0	0	5.0	6.5	±	11-1
			(100)	(1)		(1)	(0)	(2)	(0)	(0)	(0)	(2)	(3)		25-1
			(100)	(1)		(2)	(2)	(6)	(0)	(0)	(0)	(8)	(10)		
		80	200	3.5	-	2	8	11	0	0	0	9.5	10.5	±	01-1
			(100)	(4)		(0)	(7)	(4)	(0)	(0)	(0)	(11)	(11)		15-1
			(100)	(3)		(2)	(1)	(7)	(0)	(0)	(0)	(8)	(10)		
		100	200	2.5	-	4	9	18	0	0	0	12.0	14.0	+	80-1
			(100)	(4)		(0)	(8)	(7)	(0)	(0)	(0)	(13)	(13)		47-1
			(100)	(1)		(4)	(1)	(11)	(0)	(0)	(0)	(11)	(15)		
		120	200	2.0	-	2	8	15	0	1	0	11.0	12.0	+	76-1
			(100)	(1)		(0)	(6)	(7)	(0)	(1)	(0)	(13)	(13)		78-1
			(100)	(3)		(2)	(2)	(8)	(0)	(0)	(0)	(9)	(11)		
		140	0	0.0	TOX	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	TOX	08-1
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		08-2
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		57-1
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		57-2
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		160	0	0.0	TOX	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	TOX	99-1
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		99-2
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		97-1
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		97-2
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		180	0	0.0	TOX	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	TOX	03-1
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		03-2
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		32-1
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		32-2
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		PC	200	0.0	-	6	14	14	1	0	0	14.5	17.0	+	74-1
			(100)	(0)		(2)	(9)	(7)	(0)	(0)	(0)	(16)	(18)		88-1
			(100)	(0)		(4)	(5)	(7)	(1)	(0)	(0)	(13)	(16)		

() : Number of observed
g: chromosomal or chromatid gap
cse: chromosomal exchange

NT: Non-treatment
ctb: chromatid break
TA: number of cells without gap

SC: Solvent control
cte: chromatid exchange
TAG: number of cells with gap

PC: Positive control (Mitomycin C, 0.05 μ g/mL)
csb: chromosomal break
TOX: Cell toxicity was observed.