

## 環境汚染物質の生体への影響

— アルコールによるベンゼンの毒性の増強作用について —

中島民江\*・奥山周作\*・村山忍三\*・佐藤章夫\*\*

Effects of chronic ethanol consumption on benzene-induced hematotoxicity

Tamie NAKAJIMA\*, Shusaku OKUYAMA\*, Ninzo MURAYAMA\* and Akio SATO\*\*

アルコールとフェノバルビタール (PB) の長期投与がベンゼンの代謝と毒性に与える影響を検討した。アルコールはベンゼン単一暴露後の血中ベンゼン消失速度および尿中への総フェノールの排泄速度を速めるが、PBはこれらに大きな影響を与えなかった。ベンゼン反復暴露において、PBは血中からのベンゼン消失速度および尿中への総フェノール排泄量ともに単一暴露時と同様の傾向を示した。しかしアルコールは尿中への総フェノールの排泄を徐々に減少させた。さらにベンゼンの反復暴露は血中からのアルコールの消失を著しく遅延させた。

アルコールはベンゼン反復暴露による末梢血の血球数の減少を増強させ、体重の増加の遅延および肝/体重比を増加させた。しかしPBにはこのような作用は認められなかった。これらの結果は、アルコールがベンゼンのhematotoxicityを増強させることを示唆するものであろう。

アルコールとベンゼン反復暴露の組合せは、アルコールによる肝薬物代謝酵素の誘導を増大させるが、PBとの組合せではこのような現象は認められなかった。

### 緒言

ベンゼン ( $C_6H_6$ ) は石油留分の分離生成油、改質油および石炭の乾留で生成するガスおよびタール中に存在する。常温、常圧下では無色透明の液体である。その主な用途は各種化学製品 (シクロヘキサン, エチルベンゼン, スチレン, クロロベンゼン, アニリン, ニトロベンゼンなど) の原料である<sup>1)</sup>。かつてはペイント, ワニス, ラッカーの希釈剤, 油脂, ろう, 樹脂などの溶剤などとして使用されたが<sup>1)</sup>、今から約25年前、大阪生野区のビニール履物製造者の間で慢性ベンゼン中毒 (慢性造血機能障害) が多発し<sup>2)</sup>、大きな社会問題となって以来、これらの用途は微々たるものとなった。

一方わが国ではかつて直留ガソリンを使用していたが、近年これが改質ガソリンに代ってきた。この両者の組成を比較すると、前者は芳香族化合物を2~7%含有するが、後者は45~50%も含有するという。しかもその中には1~5 mol %のベンゼンが含まれるという<sup>3)</sup>。これらの事実は、自動車の排ガスにより我々ヒトを取り囲む環

境がベンゼンで汚染される可能性を示唆するものであろう。さらに排ガス中のベンゼン濃度が数十ppmにも及ぶことを考えると興味深い。

先にも述べたようにベンゼンによる慢性骨髄機能障害は疫学的に知られているが、この機序に関しては今だ解明されていない。ベンゼンの毒性発現は (これは化学物質全体にわたりいえることであるが) その究極物質 (ultimate toxicants; ベンゼンあるいはその代謝物) の作用点での濃度に依存する。この濃度を支配しているのは、ベンゼンの吸収, 分布, 代謝, 排泄といった一連の体内動態である。したがってこのような物質収支に影響を与える因子はベンゼンの毒性をも修飾するであろう。

体内に吸収されたベンゼンはその約60%がおもに肝で代謝されるといわれている<sup>4)</sup>。この代謝を触媒する酵素に薬物代謝酵素 (mixed-function oxidases: MFOあるいはmonooxygenaseなどと呼ばれている) がある。この酵素はベンゼンなど外来の化学物質の不活性化 (解毒化), あるいは活性化 (毒性化) を触媒することにより化学物質の毒性発現を左右する重要な酵素である。この酵素の活性は外来の環境の影響を受け易い。アルコールおよびフェノバルビタール (PB: バルビツール系の抗てんかん薬) はともに肝薬物代謝酵素の誘導剤として知られて

\* 信州大学医学部 Shinshu University School of Medicine.

\*\* 山梨医科大学 Medical University of Yamanashi.

5) 最近筆者らはアルコールはベンゼンの代謝を著しく亢進させるが、<sup>6) 7)</sup> P Bはベンゼンの代謝にはほとんど影響を与えない<sup>8)</sup>ことを報告した。この結果はアルコールがベンゼンの毒性(慢性骨髄機能障害)にも影響を与える可能性のあることを示唆するものであろう。

このような観点から、本報はアルコール(飲酒)およびP Bがベンゼンの慢性毒性にどのような影響を与えるか検討したものである。

## 方 法

### 1. 実験動物

Wistar系雄性ラット(10週令、静岡実験動物所より購入)はステンレス製の飼育ケージで約2週間飼育した。この部屋は恒温室(20±2℃)で12時間毎の明(6am~6pm)、暗(6pm~6am)サイクルにしてある。この間ラットには市販の固型飼料(日本クレア、CE2)と水を自由に与えた。ラットが12週令に達したところで、市販の固型飼料から3種類の実験用液体飼料に切り換えた。すなわち基準食(casein 3.47g; oil 2.79g, sucrose 9.72g; L-cystine 41mg; DL-methionine 25mg; ethyl linoleate 212mg; Vitamine mixture 813mg; carragheenan 212mgを80mlの液体食中に含む<sup>9)</sup>), アルコール食(基準食のsucroseを1.74gに減らし、エタノールを2.0g添加した餌)、およびP B食(基準食に20mgのフェノバルビタールを添加した餌)である。ラットにこれらの餌を80mlずつ、毎日午後4時に与えた。

### 2. 単一暴露実験

ラット15尾を3群に分け、それぞれに基準食、アルコール食およびP B食を与えた。約3週間これらの餌で馴化飼育した後、500ppmのベンゼンを2時間(10~12am)前報の暴露装置<sup>10)</sup>を用いて暴露した。暴露終了後、ベンゼンの血中濃度をsyringe-平衡法<sup>11)</sup>で、尿中に排泄されるベンゼンの代謝物(総フェノール)をIkedaの比色法<sup>12)</sup>でそれぞれ測定した。

### 3. 反復暴露実験

ラット30尾を3群に分け、それぞれに基準食、アルコール食(反復暴露実験ではエタノールを1.8g添加したものを使用した。なぜなら、2.0g添加のアルコール食でベンゼン暴露を反復していくと、アルコール食の摂取量が減少してしまうためである)およびP B食を与えた。約2週間の馴化飼育後、各群5尾ずつのラットに500ppmのベンゼンを(Exposed groups)、残りの5尾ずつのラットにはベンゼンを含まない空気を(Non-exposed

groups)、1日2時間(10~12am)、連日暴露した。あらかじめ定められた間隔で、ラットの尾静脈より血液を採取(4pm)して、ベンゼンの血中濃度を前述の方法で、赤血球と白血球数をトーアの自動血球計算機で測定した。同時に暴露開始から6時間および24時間に尿中に排泄された総フェノール量をIkedaの比色法<sup>12)</sup>で測定した。アルコール食摂取ラットの血中アルコール濃度はベンゼン暴露の直前(9:30am)に前述のsyringe-平衡法で測定した。

### 3. 肝薬物代謝酵素の活性

500ppmのベンゼンを3週間反復暴露したところでラットを解剖(10am)し、1.15% KCl-0.01 M Na/Kリン酸緩衝液、pH 7.4、で10% (W/V)の粗homogenateを調製した。これを10000×gで10分間遠心し、その上清0.5~1.0mlを酵素源として使用した。ベンゼン、トルエンおよびトリクロロエチレンそれぞれ5μlを100mlの蒸留水に溶かし、その0.2mlを基質として用いた。酵素、補酵素(NADP 0.5 μmoles, glucose 6-phosphate 10 μmoles, MgCl<sub>2</sub> 25 μmolesを0.1 Mリン酸緩衝液、pH 7.4、2mlに溶解させたもの)および基質を気密性の保たれたvialに入れ、37℃で10分間incubateした。酵素活性はSato and Nakajimaの方法<sup>13)</sup>にしたがって、基質の減少速度から算出した。

10000×g上清をさらに105000×gで60分間遠心分離を行い、ミクロソーム分画を調製した。ミクロソーム蛋白はLowry<sup>14)</sup>らの方法をMillerが改良した比色定量法<sup>15)</sup>により、チトクロームP-450含量はOmura and Sato<sup>16)</sup>の方法で測定した。

## 結 果

### 1. 単一暴露実験

500ppmのベンゼンを単一暴露し、その後のベンゼン血中濃度の推移と尿中総フェノールの累積をそれぞれ図1、2に示す。アルコール食は明らかに血中からのベンゼンの消失速度を速めた。しかしP B食摂取ラットのベンゼン血中濃度は基準食摂取ラットのそれより低いが、暴露終了8時間後には両者の間に差は認められなかった。

アルコール食摂取ラットの尿中に排泄された総フェノール量は基準食摂取ラットより多く、この傾向は暴露中に最も顕著に認められた。一方暴露中におけるP B食摂取ラットの総フェノール量は基準食摂取ラットより多いが、24時間に排泄された総フェノール量は両者の間に差は認められなかった。これらの結果は、アルコールはin vivoにおいてもベンゼンの代謝を亢進させることを示唆するものであろう。

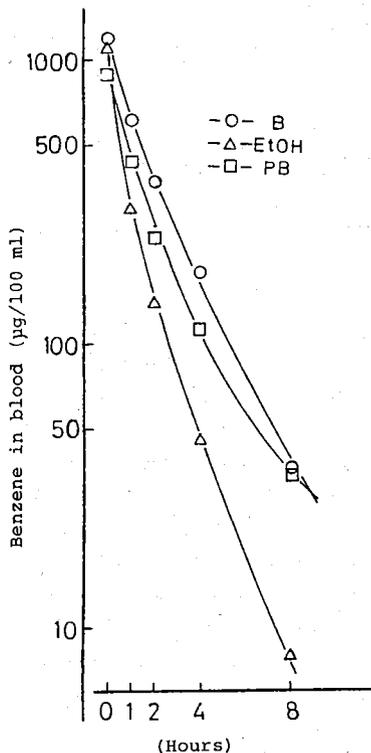


図1. ベンゼン単一暴露後の血中ベンゼン濃度の推移

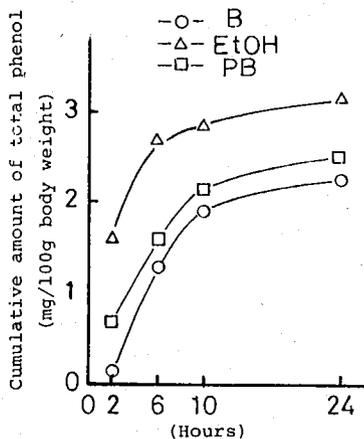


図2. ベンゼン単一暴露後の尿中総フェノールの累積

## 2. 反復暴露実験

500ppmのベンゼンを反復暴露していく過程で、ベンゼンの血中濃度、尿中総フェノール量、末梢血球数およびアルコールの血中濃度を測定した。

アルコール食およびPB食摂食ラットのベンゼン血中濃度は基準食ラットより常に低く、とくにアルコール食

摂食ラットにおいて著明な低下が観察された(図3)。これらの事実は図1で示された単一暴露実験の結果とよく一致する。

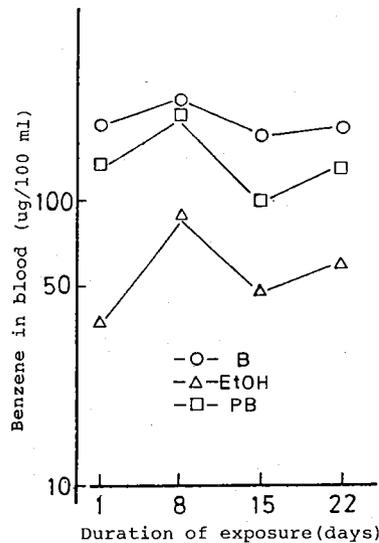


図3. ベンゼン反復暴露がベンゼンの血中濃度に与える影響

ベンゼン暴露開始から6時間尿中に排泄される総フェノールは暴露1日目はアルコール食摂食ラットが最も多く、PB食摂食ラットも基準食摂食ラットより多かった。この結果は図2で示した単一暴露実験の結果と一致する。ところが、ベンゼン暴露を反復していくにつれ、アルコール食摂食ラットの血中ベンゼン濃度は基準食およびPB食摂食ラットよりも低いにもかかわらず、尿中へのフェノール排泄量は徐々に減少し、PB食摂食ラットよりも少なくなった。24時間の総フェノール排泄量で見ると、ベンゼン暴露初日においては、アルコール食と基準食摂食ラットの間で差は認められなかった。しかしベンゼン暴露を繰返すにつれ、アルコール食摂食ラットの尿中フェノール排泄量は徐々に減少し、基準食摂食ラットよりも少なくなった。これらの事実は単一暴露実験の結果と矛盾する。一方PB食摂食ラットと基準食摂食ラットの間には尿中フェノール量の差は認められなかった(図4)。これらの結果は、ベンゼン反復暴露におけるアルコール食摂食ラットの尿中フェノール排泄の動態は単一暴露時と異なることを示唆するものであろう。

ベンゼン反復暴露が末梢血液中赤血球と白血球数に与える影響を図5に示す。基準食およびPB食摂食ラットにおいては赤血球数の減少は認められないが、アルコー

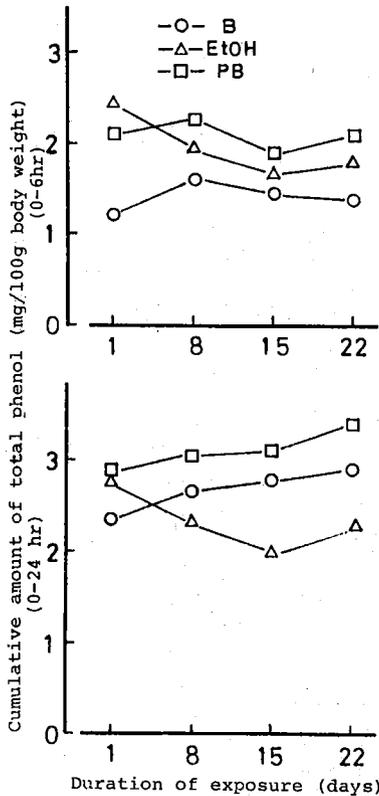


図4. ベンゼン反復暴露が尿中総フェノール量に与える影響

ル食摂食ラットの赤血球数は減少した。ベンゼンの反復暴露は基準食およびアルコール食摂食ラットの白血球数を減少させるが、その程度はアルコール食摂食ラットの方が大きかった。さらに、ベンゼン暴露はPB食摂食ラットの白血球数を初期にやや増加させるが、2週間目頃からは基準食摂食ラットとほぼ同程度に減少させた。したがってアルコールはベンゼン暴露による末梢血の血球数の減少を強めるといえる。

ベンゼン反復暴露開始から一定の間隔において、アルコール食摂食ラットの血液中アルコール濃度を測定した(図6)。ベンゼン暴露開始直前ではベンゼン暴露群も非暴露群もアルコールは血中にわずかに検出されるのみで、両者の間に差は認められなかった。しかしベンゼン暴露を開始すると、ベンゼン暴露群の血中アルコール濃度は非暴露群より極めて高くなり、この傾向はベンゼン暴露を反復していくにつれ高くなった。これはベンゼン暴露がアルコールの血中からの消失を著しく抑制することを示唆する。しかしこの機序に関しては今のところ明らかでない。

### 3. 肝薬物代謝酵素の活性

上段：  
ベンゼン暴露開始から6時間に排泄された総フェノール  
下段：  
ベンゼン暴露開始から24時間に排泄された総フェノール

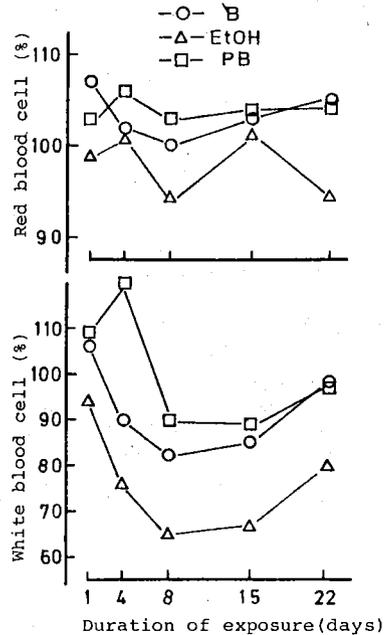


図5. ベンゼン反復暴露が赤血球および白血球数に与える影響。それぞれのベンゼン非暴露群に対する比率で示した。

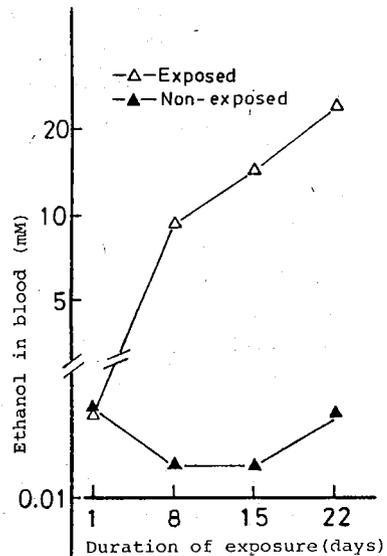


図6. ベンゼン反復暴露が血中エタノール濃度に与える影響

		Body weight change (w/w, %)	Liver weight (g)	Liver/body (w/w, %)	Microsomal protein (mg/g liver)	Cytochrome P-450 (nmoles/mg protein)
B	Exposed	106±3	12.4±0.7	3.91±0.18	21.3±0.9	0.78±0.08
	Non-exposed	105±2	11.9±0.6	3.67±0.15	21.7±0.6	0.78±0.04
EtOH	Exposed	98±4*	8.3±0.4	3.23±0.03*	27.6±1.3*	1.15±0.10*
	Non-exposed	105±1	8.8±0.2	3.04±0.07	24.5±1.1	0.97±0.05
PB	Exposed	105±1	17.4±0.7	5.47±0.25	27.7±1.7	1.69±0.09
	Non-exposed	108±3	17.3±0.6	5.22±0.12	27.5±2.3	1.62±0.11

\*Significantly different (p<0.05) from non-exposed rats.

表 1. ベンゼン反復暴露が肝薬物代謝酵素系に与える影響

		Metabolic rates (nmoles/g liver/min)		
		Benzene	Toluene	Trichloro-ethylene
B	Exposed	7.4±1.0	9.7±0.6	10.2±2.0
	Non-exposed	6.9±1.8	11.0±2.7	12.5±1.3
EtOH	Exposed	72.5±5.0*	76.3±10.1*	112.1±18.7*
	Non-exposed	30.6±3.1	33.9±3.4	41.9±7.5
PB	Exposed	10.5±1.2	83.9±8.5	28.9±2.2
	Non-exposed	9.9±1.7	82.0±8.0	25.7±2.1

\*Significantly different (p<0.05) from non-exposed rats.

表 2. ベンゼン反復暴露が炭化水素の代謝に与える影響

表 1 はベンゼン反復暴露が体重の増加, 肝重量, ミクロソーム蛋白およびチトクローム P-450 含量に与える影響を示したものである。基準食と PB 食摂取ラットにおいてベンゼン暴露群と非暴露群の間に体重の増加, 肝/体重比, ミクロソーム蛋白およびチトクローム P-450 含量の差は認められなかった。しかしアルコール食摂取ラットにおいては, ベンゼン暴露群は非暴露群より体重の増加が遅延し, 肝/体重比, ミクロソーム蛋白およびチトクローム P-450 の含量は増加した。

ベンゼン反復暴露が, *in vitro* におけるベンゼン, トルエン, およびトリクロロエチレン代謝に与える影響を表 2 に示す。ベンゼン非暴露群ではアルコール食は, ベンゼン, トルエンおよびトリクロロエチレンの代謝を著

しく亢進させ, PB 食はトルエンとトリクロロエチレンの代謝を亢進させた。ベンゼン暴露群では PB 食摂取ラットにトルエンとトリクロロエチレンの代謝亢進が見られたが, その程度は非暴露群と同程度であった。しかしアルコール摂取ラットのベンゼン, トルエンおよびトリクロロエチレンの代謝速度はベンゼン非暴露群に比べ 2~3 倍亢進した。すなわちベンゼンとアルコールの組合せは肝薬物代謝酵素の活性を著明に増大させ, 基準食と比較すると 10 倍もの活性亢進を示した。

#### 考 察

アルコールはベンゼンによる体重の増加の遅延と赤血

球および白血球数の減少を増強させた。この事実はアルコールによりベンゼンの hematotoxicity が増大するという Snyder<sup>17)</sup>らや Baarson<sup>18)</sup>らのマウスを用いた実験結果と一致する。しかし一般に、PB はベンゼンの hematotoxicity を軽減させる (Gill<sup>19)</sup>ら、Ikeda と Ohtsuji<sup>20)</sup>といわれているが、本実験ではこのような現象は認められなかった。

ベンゼンの hematotoxicity の発現機序に関してはいろいろの説がある。Ikeda と Ohtsuji<sup>20)</sup>は PB がベンゼンの hematotoxicity を軽減させることから、ベンゼンそれ自身が毒性を発揮するだろうとした。一方 Andrews<sup>21)</sup>らはベンゼンの hematotoxicity はトルエンが共存することにより軽減することから、ベンゼンの代謝物が起因するだろうとした。Snyder と Kocsis<sup>22)</sup>、Laskin と Goldstein<sup>23)</sup>はベンゼンの毒性発現には代謝的活性化が必要であると報告した。さらに、Tunek<sup>24)</sup>ら (1978)、Greenlee<sup>25)</sup>ら、および Tunek<sup>26)</sup>らはベンゼンの代謝物であるフェノールあるいはヒドロキノン<sup>27)</sup>の代謝物がベンゼンの hematotoxicity の原因であることを示唆し、Gill<sup>19)</sup>もフェノール以外の代謝物の可能性を強調し、ベンゼンからフェノールへの代謝速度はベンゼンの毒性発現には関係ないことを報告した。このようなベンゼンの代謝物による hematotoxic effect の可能性は培養細胞を用いて、Morimoto と Wolft<sup>27)</sup>、Diaz<sup>28)</sup>および Harrison と Randall<sup>29)</sup>の実験結果からも示唆された。一方 Baarson<sup>18)</sup>は、アルコールがベンゼンの毒性を増強させ、PB や 3-メチルコラントレンは逆に軽減させることから、アルコールで誘導された cytochrome P-450 による代謝を受けて生成した脂溶性の hematotoxin に起因するだろうとした。このように現在、ベンゼンの hematotoxicity はベンゼンの代謝物に起因するとする説がほとんどであるが、一方ではこれらのどの代謝物を投与しても、ベンゼンと同程度の hematotoxic effect を引き起こすことが出来ないことが知られている (Mitchell<sup>30)</sup>、Nomiyama<sup>31)</sup>、Tunek<sup>32)</sup>)。このような観点から、最近になって Tunek<sup>33)</sup>はヒドロキノンはベンゼンの hematotoxic metabolite の1つであるが、他の代謝物、あるいはベンゼン自身も毒性発現に関与している可能性のあることを示した。

アルコールがベンゼンの代謝を著しく亢進させることは *in vitro*<sup>6) 7)</sup> の代謝実験からも *in vivo* の代謝実験からも明らかであり、この亢進はベンゼン反復暴露によりさらに増大した (表2)。しかしこの事実に対して、ベンゼンの血中からの消失速度はベンゼンの反復暴露により促進されないし (図3)、尿中に排泄されるフェノール量はかえって減少の傾向 (図4) を示した。このような結果の1つの原因は、ラットはベンゼンが体内に残

存している時 (4 pm) にアルコール食を摂取し始めるため、この時点以降のベンゼンの代謝はアルコールにより阻害され、一方ベンゼン暴露群のアルコールは翌朝まで大量残存する (図6) ため、ベンゼン暴露開始初期のベンゼン代謝がアルコールによって阻害するためであろう。なぜならベンゼン代謝に対するアルコールの阻害定数 ( $K_i$ ) は 0.11 ~ 0.16 mM であり<sup>7)</sup>、図6に示された血中アルコールの濃度はベンゼン代謝の阻害が可能と思われる濃度である。しかしこのようにアルコールによる阻害ということだけで説明できるか否か疑問である。PB は一般にベンゼンの代謝を亢進させる (Snyder<sup>34)</sup>、Gut<sup>35)</sup>、Ikeda と Ohtsuji<sup>20)</sup>) といわれているが、本実験で使用したラットではこのような現象は認められなかった。図2あるいは図4でPB食摂取ラットの尿中フェノール量が基準食摂取ラットより多いのは、肝の著明な肥大に起因するものと思われる。すなわち尿中総フェノール量を肝単位/当りで表現すると両者の間に差は認められないが、全肝当り、あるいは個体当りのフェノール排泄量で比較すると、PB食摂取ラットは基準食摂取ラットよりも多く、ベンゼンの代謝が亢進しているようにみえる。このように考えていくと、アルコールが何故ベンゼンの hematotoxicity を増強させるのか、今のところ不明である。ここで本実験に使用したアルコールによるベンゼンの hematotoxicity の増強作用は低炭水化物食とアルコールの混合作用である可能性もあるだろう。

ベンゼンの反復暴露は肝薬物代謝酵素を誘導すると報告されている (Gonasun<sup>36)</sup>ら、Snyder<sup>34)</sup>)。しかし本実験のような 500 ppm × 2 時間、3 週間の反復暴露ではこのような現象は認められなかった。前述したようにアルコールは肝薬物代謝酵素の活性を亢進させるが、このアルコール飲用ラットにベンゼンを反復暴露すると、この酵素活性はさらに 2 ~ 3 倍も亢進した。この場合血中からのアルコールの消失はベンゼン暴露をうけることにより著しく抑制され、翌朝まで大量のアルコールが体内に残存した。一方アルコール食摂取ラットの血中からのベンゼンの消失は、この餌の摂取開始 (4 pm) 後、アルコールにより抑制され、遅延した。すなわち、アルコール食摂取ラットはベンゼンとアルコールの両者を長時間体内に残留させた。このことがアルコールとベンゼンの組合せでみられた肝薬物代謝酵素の活性の著しい増大の一因であろう。しかし同じ肝薬物代謝酵素の誘導剤でも、PB による肝薬物代謝酵素の誘導はベンゼンの反復暴露の影響は受けなかった。

## 文 献

- 1) 浅原昭三, 戸倉仁一郎, 大河原信, 熊野 従, 妹尾  
学編: 溶剤ハンドブック 177-181, 講談社  
1976.
- 2) 池田正之: 有機溶剤中毒——今日における問題点——  
医学のあゆみ 87: 494-507. 1973.
- 3) 加藤竜夫: 大気汚染のガスクロマトグラフ技術  
202-212. 三共出版. 1975.
- 4) Parke, D.V. and Williams, R.T.: Studies  
in detoxication 49. The metabolism of  
benzene containing ( $^{14}C_1$ )benzene. *Biochem.  
J.* 54, 231-238 1953
- 5) Conney, A.H.: Pharmacological implication  
of microsomal enzyme induction. *Pharmacol.  
Rev.* 19, 317-366 1967
- 6) Sato, A., Nakajima, T. and Koyama, Y.:  
Effects of chronic ethanol consumption on  
hepatic metabolism of aromatic and  
chlorinated hydrocarbons in rats. *Brit. J.  
Ind. Med.* 37, 382-386 1980
- 7) Sato, A., Nakajima, T. and Koyama, Y.:  
Dose-related effects of a single dose of  
ethanol on the metabolism in rat liver of  
some aromatic and chlorinated hydrocarbons.  
*Toxicol. Appl. Pharmacol.* 60, 8-15 1981
- 8) Nakajima, T. and Sato, A.: Effect of  
carbohydrate intake on phenobarbital-,  
polychlorobiphenyl- and 3-methyl-  
cholanthrene-induced enhancement of drug  
oxidation and conjugation in rat liver.  
( in press)
- 9) Nakajima, T., Koyama, Y. and Sato, A.:  
Dietary modification of metabolism and  
toxicity of chemical substances—with  
special reference to carbohydrate. *Biochem.  
Pharmacol.* 31, 1005-1011 1982
- 10) Sato, A., Nakajima, T., Fujiwara, Y. and  
Murayama, N.: Kinetic studies on sex  
difference in susceptibility to chronic  
benzene intoxication—with special reference  
to body fat content. *Brit. J. Ind. Med.* 32,  
321-328 1975
- 11) Sato, A., Nakajima, T. and Fujiwara, Y.:  
Determination of benzene and toluene in  
blood by means of a syringe-equilibration  
method using a small amount of blood. *Brit.  
J. Ind. Med.* 32, 210-214 1975
- 12) Ikada, M.: Enzymatic studies on benzene  
intoxication. *J. Biochem.(tokyo)* 55, 231-  
243 1964
- 13) Sato, A. and Nakajima, T.: A vial-equili-  
bration method to evaluate the drug-  
metabolizing enzyme activity for volatile  
hydrocarbons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*  
47, 41-46 1979
- 14) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L.  
and Randall, R.J.: Protein measurement  
with the Folin phenol reagent. *J. Biol.  
Chem.* 193, 265-275 1951
- 15) Miller, G.L.: Protein determination for  
large numbers of samples. *Anal. Chem.* 31,  
964 1959
- 16) Omura, T. and Sato, R.: The carbon  
monoxide-binding pigment of liver  
microsomes. 1. Evidence for its hemoprotein  
nature. *J. Biol. Chem.* 239, 2370-2378 1964
- 17) Snyder, C.A., Baarson, K.A., Goldstein,  
B.D. and Albert, R.E.: Ingestion of  
ethanol increases the hematotoxicity of  
inhaled benzene in C57BL mice. *Bull.  
Environm. Contam. Toxicol.* 27, 175-180  
1981
- 18) Baarson, K.A., Snyder, C.A., Green, J.D.,  
Sellakumar, A., Goldstein, B.D. and  
Albert, R.E.: The hematotoxic effects of  
inhaled benzene on peripheral blood, bone  
marrow, and spleen cells are increased  
by ingested ethanol. *Toxicol. Appl.  
Pharmacol.* 64, 393-404 1982
- 19) Gill, D.P., Kempen, R.R., Nash J.B. and  
Ellis, S.: Modifications of benzene  
myelotoxicity and metabolism by pheno-  
barbital, SKF-525A and 3-methylcholanthrene.  
*Life Sci.* 25, 1633-1640 1979
- 20) Ikeda, M. and Ohtsujii, H.: Phenobarbital-  
induced protection against toxicity of  
toluene and benzene in the rats. *Toxicol.  
Appl. Pharmacol.* 20, 39-43 1971
- 21) Andrews, L.S., Lee, E.W., Witmer, C.M.,  
Kocsis, J.J. and Snyder, R.: Effects of  
toluene on the metabolism, disposition  
and hemopoietic toxicity of (H)benzene.  
*Biochem. Pharmacol.* 26, 293-300 1977
- 22) Snyder, R. and Kocsis, J.J.: Current  
concepts of chronic benzene toxicity. *CRC  
Crit. Rev. Toxicol.* 3, 265-288 1975
- 23) Laskin, S. and Goldstein, B.D.: Benzene  
toxicity: a critical evaluation. *J. Tox.  
Environ. Health Suppl* 2 1977
- 24) Tunek, A., Platt, K.L., Bentley, P.P. and  
Oesch, F.: Microsomal metabolism of  
benzene to species irreversibly binding  
to microsomal protein and effects of  
modifications of this metabolism. *Mol.  
Pharmacol.* 14, 920-929 1978
- 25) Greenlee, W.F., Sun, J.D. and Bus, J.S.:  
A proposed mechanism of benzene toxicity:  
Formation of reactive intermediates from  
polyphenol metabolites. *Toxicol. Appl.  
Pharmacol.* 59, 187-195 1981
- 26) Tunek, A., Platt, K.L., Przybylski, M.  
and Oesch, F.: Multi-step metabolic  
activation of benzene. Effect of super-  
oxide dismutase on covalent binding to  
microsomal macromolecules, and identifi-  
cation of glutathione conjugates using  
high pressure liquid chromatography and  
field desorption mass spectrometry. *Chem.  
-Biol. Interactions.* 33, 1-17 1980
- 27) Morimoto, K. and Wolff, S.: Increase of  
sister chromatid exchanges and pertur-  
bations of cell division kinetics in  
human lymphocytes by benzene metabolites.  
*Cancer Res.* 40, 1189-1193 1980
- 28) Diaz, M., Fijtman, N., Carricarte, V.,  
Braier, L and Diez, J.: Effect of benzene  
and its metabolites on sister chromatid  
exchanges in human lymphocyte cultures,  
in vitro. 15, 172 1979
- 29) Harrison, K. and Randoll, F.W.: An  
application of bone marrow culture to

toxicology and therapeutics. Quart. J.  
Exp. Physiol. 74, 141- 1948

- 30) Mitchell, J.R.: Mechanism of benzene-induced aplastic anemia. Fed. Proc. 30, 2044 1971
- 31) Nomiyama, K.: Studies on poisoning by benzene and its homologues (7). Toxicity of benzene metabolites to hemopoiesis. Ind. Health 3, 53-57 1965
- 32) Tunek, A., Olofsson, T. and Berlin, M.: Toxic effects of benzene and benzene metabolites on granulopoietic stem cells and bone marrow cellularity in mice. Toxicol. Appl. Pharmacol. 59, 149-156 1981
- 33) Tunek, A., Högstedt, B. and Olofsson, T.: Mechanism of benzene toxicity. Effects of benzene and benzene metabolites on bone marrow cellularity, number of granulopoietic stem cells and frequency of micronuclei in mice. Chem. -Biol. Interactions. 39, 129-138 1982
- 34) Snyder, R., Uzuki, F., Gonasun, L., Bromfeld, E. and Wells, A.: The metabolism of benzene in vitro. Toxicol. Appl. Pharmacol. 11, 346-360 1967
- 35) Gut, I.: Effect of Phenobarbital pre-treatment on in vitro enzyme kinetics and in vivo biotransformation of benzene in the rat. Arch. Toxicol. 35, 195-206 1976
- 36) Gonasun, L.M., Witmer, C., Kocsis, J.J. and Snyder, R.: Benzene metabolism in mouse liver microsomes. Toxicol. Appl. Pharmacol. 26, 398-406 1973