

흰쥐 간의 microsomal enzymes의 유도에 있어서 benzene, toluene과 xylene의 복합적인 영향과 그들의 대사산물

김기웅 · 박상신 · 김태균 · 문영한 · 장성근*

한국산업안전공단 산업보건연구원, *순천향대학교 자연대 화학과

Combinatory Effects of Benzene, Toluene and Xylene on the Induction of Rat Liver Microsomal Enzymes and Their Metabolites

Ki-Woong Kim, Sang Shin Park, Tae-Kyun Kim, Young Hahn Moon and Sung-Keun Chang*

Industrial Health Research Institute, 34-6 Kusan-dong, Pupeong-Ku, Incheon 403-120, Korea

*Dept. Chemistry, College of Natural Science, Soonchunhyang Univ., Chungnam, 336-745, Korea

(Received April 12, 1996)

(Accepted May 4, 1996)

ABSTRACT : We studied the effects of a single, combined and mixed exposure of benzene, toluene and xylene on the activities of rat liver microsomal AHH, ADH and ALDH, and the excretion of their metabolites in urine. The AHH activities of the rats treated in combination and mixture were slightly higher and/or similar to those rats treated with single solvent, while the reverse effects were observed for ADH and ALDH. Similar effects were observed when the metabolites were examined in urine ($p < 0.01$). These results suggest that each solvent might interfere the induction and action of ADH and ALDH, and decrease the excretion of their metabolites into urine.

Key Words : Benzene, Toluene, Xylene, Cytochrome P-450 dependent aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH), Alcohol dehydrogenase, Aldehyde dehydrogenase, Metabolites

I. 서 론

벤젠(benzene), 톨루엔(toluene)과 크실렌(xylene)들은 하나의 고리를 가진 방향족 탄화수소(monocyclic aromatic hydrocarbons, MAH)계에 속하며, 이들 물질은 페인트, 플라스틱, 고무제조, 세정제 및 희석제 등 산업체 전반에 걸쳐서 널리 사용되는 물질로 알려져 있다(Arlien- Soborg, 1992).

이들 MAH계 유기용제에 대한 대사기전이 밝혀지면서 이들 물질은 망상조직 소포체의 microsome에 존재하는 cytochrome P-450 의존성 monooxygenase에 의하여 대사되며, 이 효소에 의해서 이들 유기용제가 친수성물질로 변화되어 phase II 효소에 의하여 복합물로 되어 체외로 배설된다는 것이 알려졌다(Parke와 Williams, 1953; Cohr와 Stockholm, 1979).

따라서 혈액과 뇨 등의 체액에서 이들 물질의 폭로에 따른 생물학적 폭로지표(biological exposure index, BEI)로는 폭로물질과 대사산물의 배설량을 각각 측정

하여 지표로 평가한다(ACGIH, 1986). 그러나 뇨중 대사산물의 농도만을 가지고 체내의 독성현상을 평가하기에는 다소의 어려움이 있으며, 혼합물의 경우에는 흡수 물질간의 상호작용 및 대사에 관여하는 효소의 특이성과 중복성에 따른 효소작용의 상승 및 억제현상 등으로 인하여 폭로물질의 대사산물 배설량만을 가지고 폭로지표로 사용하기에는 어려운 점이 있다(Ikeda, 1974; ACGIH, 1976).

특히, 산업체에서 사용되는 MAH계 유기용제 뿐만 아니라 대부분의 유기용제는 정제기술의 차이에 의한 순도(purity)와 사용목적 등에 따라서 이들 물질의 사용시 폭로되는 형태는 단일물질에 의한 폭로 보다는 복합된 형태의 유기용제에 폭로가 대부분이라고 할 수 있다. 그렇기 때문에 많은 연구자들에 의해서 복합물질에 대한 독성발현과 생체내 대사과정의 상호작용 등에 관한 연구가 이루어지고 있으나(Ikeda 등, 1972; Sato와 Nakajima, 1979; WHO, 1985; Okino 등, 1991; Rana와 Kumar, 1993; 김 등, 1995) MAH계 유기용제의 폭로형태에 따른

이들 물질의 대사효소 활성도와 대사산물의 배설량에 대한 상관성을 본 연구는 그다지 많지 않다.

그러므로 benzene, toluene 및 xylene 등이 단일, 병합, 혼합된 형태로 체내에 흡수될 때, 간장의 이물질(xenobiotic) 대사효소인 cytochrome P-450 의존성 monooxygenase의 활성도와 탈수소효소(dehydrogenases)의 활성도 변화를 뇨중 대사산물과 연관하여 관찰하고 이 결과를 MAH계 유기용제 폭로에 따른 생물학적 폭로지표 평가에 활용하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

본 연구는 국립보건안전연구원으로부터 분양받은 Sprague Dawley계 6주령된 웅성 흰쥐를 실험동물로 하여 대조군, benzene(B), toluene(T), xylene(X) 단독투여군(3개군)과 B+T, B+X, T+X의 병합투여군(3개군), B+T+X(M)의 혼합투여군(1개군)으로 하여 총 8개군으로 분류하였다.

각각의 유기용제는 corn oil에 용해시켜 투여용량이 1 mol/체중 kg으로 하여 1일 1회씩 2일간 연속하여 복강주사 하였으며 각각의 실험군은 5마리로 하였다.

간의 microsomes 분획의 분리는 차등원심분리 방법(Park과 Kim, 1984)에 의해서 분리하였으며, 분획된 microsomes은 -70°C에서 냉동보관 하여 단백질, cytochrome P-450 monooxygenase 활성도 및 탈수소효소의 활성도를 측정하였다.

Microsomal 단백질의 함량은 Lowry 등(1951)의 방법에 따라 측정하였으며, cytochrome P-450 함량은 Omura와 Sato 방법(1964)에 의해서 함량을 측정 하였다. Aryl hydrocarbon hydroxylase(AHH)의 활성도는 Nebert와 Gelboin(1968) 방법에 의해서 측정하였으며, 탈수소효소인 alcohol dehydrogenase(ADH)와 aldehyde dehydrogenase (ALDH)의 활성도는 Bonnichen과 Brink(1955)의 방법과 Tottmar 등(1973)의 방법을 다소 변형하여 측정하였다.

Benzene의 뇨중 대사산물인 phenol량은 Baselt의 방법(1980)으로 배설량을 측정하였으며, toluene과 xylene의 뇨중 대사산물인 마노산과 메틸 마노산의 배설량은 Ogata 등(1977)의 방법에 따라서 측정하였다. 실험에서 얻은 측정성적은 PC/SAS 프로그램을 사용하여 자료의 특성에 따라 t-test, 분산분석(ANOVA)을 실시하였다.

III. 결 과

1. 단백질 함량

웅성 흰쥐를 실험동물로 하여 MAH계 유기용제인 benzene, toluene 및 xylene을 단독, 병합, 혼합투여한 후 간의 microsomes에 있어서 단백질 및 cytochrome P-450의 함량을 측정된 결과 Table 1의 결과를 얻었다.

Microsomal 단백질의 함량은 투여물질과 투여형태에 따라서 함량의 차이를 보이는데($p < 0.01$), B군에서만 대조군과 통계학적인 유의한 차이를 보이지 않았다($p > 0.01$).

Cytochrome P-450의 함량은 동물의 종(species)은 물론 처리물질의 종류에 따라서도 많은 차이를 보이는데(Nebert와 Gonzalez, 1987), 금번 연구에서 나타난 결과를 보면, 대조군과 투여군간의 비교시 투여군 모두에 있어서 대조군(0.744 nmo/mg)보다 증가된 함량의 측정치를 보였으나, B군(0.784 nmol/mg)과 T군(0.855 nmol/mg)을 제외한 기타의 투여군에서만 통계학적인 유의한 증가를 보였($p < 0.01$).

2. Cytochrome P-450 의존성 AHH 및 탈수소효소(dehydrogenase) 활성도 변화

투여물질과 투여형태에 따라 AHH, ADH 및 ALDH의 활성도를 측정된 결과 Table 2의 성적을 얻었다.

Poly aromatic hydrocarbon(PAH)계 물질에 의해서 선택적인 유도가 일어나는 cytochrome P-450(P450IA) 동위효소에 의해서 주로 활성를 나타내는 AHH의 활성도는 대조군과 투여군간의 비교시 투여군 모두에 있어서 증가된 활성도를 나타냈는데($p < 0.01$), 단지 B군에서만 통계학적인 유의한 차이가 없었다($p > 0.01$). 투여군간에 있어서 X군과 병합투여군(BT, BX, TX)간은 통계학적인 차이를 보이지 않았으나 혼합투여군(M)에

Table 1. Effects of benzene, toluene and xylene on the contents of hepatic protein

Organic solvents (mol/kg)	Quantities of Protein	
	Microsomal Protein (mg/g liver)	Cytochrome P-450 (nmol/mg of protein)
Control	16.48 ^c ± 0.56	0.744 ^d ± 0.0253
B	17.32 ^{bc} ± 0.37	0.784 ^{cd} ± 0.0317
T	19.24 ^{ab} ± 1.10	0.855 ^{cd} ± 0.0224
X	20.68 ^a ± 1.40	0.922 ^{ab} ± 0.0381
BT	18.80 ^{ab} ± 1.38	0.898 ^{abc} ± 0.0637
BX	19.05 ^{ab} ± 0.67	0.905 ^{ab} ± 0.0341
TX	20.36 ^a ± 0.47	0.981 ^a ± 0.0394
M	19.96 ^{ab} ± 1.48	0.870 ^{abc} ± 0.0204
F-values	4.19**	4.31**

** : $p < 0.01$.

Values represent mean ± S.D. for five rats.

Upper letters (a,b,c,d): The same letter are not significantly different.

Table 2. Activities of AHH, ADH and ALDH in liver microsomes from rats treated with organic solvents

Organic solvents (mol/kg)	AHH* (Unit)	ADH (U/mg)	ALDH (U/mg)
Control	3.318 ^d ± 0.0597	0.0128 ^d ± 0.00396	0.0340 ^d ± 0.00337
B	3.659 ^{cd} ± 0.0870	0.0157 ^d ± 0.00371	0.0390 ^d ± 0.00577
T	4.329 ^{bc} ± 0.2950	0.0159 ^d ± 0.00144	0.0410 ^d ± 0.00770
X	4.703 ^{ab} ± 0.2048	0.0149 ^d ± 0.00107	0.0358 ^d ± 0.00330
BT	4.967 ^{ab} ± 0.2274	0.0079 ^{bc} ± 0.00106	0.0193 ^c ± 0.00457
BX	4.580 ^{ab} ± 0.1757	0.0066 ^{bc} ± 0.00059	0.0200 ^c ± 0.00424
TX	4.865 ^{ab} ± 0.5124	0.0091 ^b ± 0.00132	0.0223 ^c ± 0.00457
M	5.228 ^a ± 0.2015	0.0048 ^c ± 0.00058	0.0158 ^c ± 0.00386
F-values	6.62**	17.13**	17.08**

** : $p < 0.01$.

Values represent mean ± S.D. for five rats.

Upper letters (a, b, c, d): The same letter are not significantly different.

*: 1 unit corresponds to 18 pmol 3-OH benzo(a)pyrene/mg protein/min.

서의 활성도가 5.228로 가장 높은 활성도를 보였다. Alcohol 기를 aldehyde로 전환시키는 ADH와 aldehyde를 acetate로 변화시키는 ALDH의 활성도를 측정 한 결과, ADH의 경우 대조군과 투여군간의 비교시 B, T, X의 단독투여군은 대조군 보다 다소 증가된 측정치를 보였으나 통계학적인 유의한 차이는 없었다($p > 0.01$). 그러나 병합 및 혼합투여군은 대조군보다 현저한 감소를 보였다($p < 0.01$).

ALDH와 ADH의 활성도 변화는 서로 유사한 경향의 결과를 얻었다.

3. Benzene, toluene과 xylene의 뇨중 대사산물 배설량

1) 뇨중 phenol 배설량

Phenol은 benzene의 대사산물로서 유기용제를 투여하지 않은 흰쥐의 정상뇨에서 phenol의 농도는 7.93 g/g creatinine이었으며 benzene 단독 투여군에서는 32.51, 병합 투여군인 B+T 그리고 B+X 투여군에서는 각각 25.42, 28.71 g/g creatinine의 측정결과를 보였으며, 혼합 투여군에서는 18.95 g/g creatinine으로 측정되었다(Fig. 1).

Benzene 단독 투여군과 병합 및 혼합 투여군간의 뇨중 phenol양을 비교하면 병합 투여군인 B+T 투여군, B+X 투여군은 각각 22%, 12% 정도, 혼합 투여군은 42% 정도가 감소되는 결과를 나타냈다. 그러나 혼합 투여군에서만 통계학적으로 유의한 감소가 일어났다($p < 0.01$).

2) 뇨중 hippuric acid 배설량

Hippuric acid는 toluene의 대사산물로서 뇨중 hippuric acid 배설량의 측정 결과는 Fig. 2와 같다.

Toluene 단독 투여군의 뇨중 hippuric acid 농도는 3.26

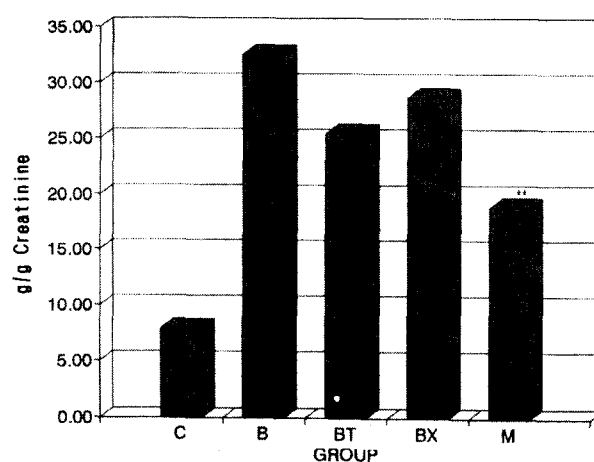


Fig. 1. Concentration of urinary phenol after organic solvents administration. The bar represents the mean value of five rats (C; control, B; benzene, X; xylene, BT; benzene+toluene, BX; benzene+xylene, M; benzene+toluene+xylene).

** : Significantly different from B ($p < 0.01$).

g/g creatinine이었으며, 병합 투여군인 B+T 그리고 T+X 투여군은 각각 2.56, 2.95 g/g creatinine, 혼합 투여군에서는 1.51 g/g creatinine으로 측정되었으며 대조군 보다 증가된 것을 볼 수 있었다. Toluene 단독 투여군과 병합 및 혼합 투여군간을 비교하여보면 병합과 혼합 투여군에서 감소된 경향을 보이며, 병합 투여군인 B+X, T+X은 11% 정도, 혼합 투여군에서는 약 50% 정도로 hippuric acid가 감소 되었으나 B+T 병합 투여군과 혼합 투여군에서만 통계학적인 유의성을 보였다($p < 0.01$).

3) 뇨중 methyl hippuric acid 배설량

유기용제를 투여하지 않은 흰쥐의 정상뇨에서는 xylene의 뇨중 대사산물인 methylhippuric acid가 측정되지 않았다(Fig. 3).

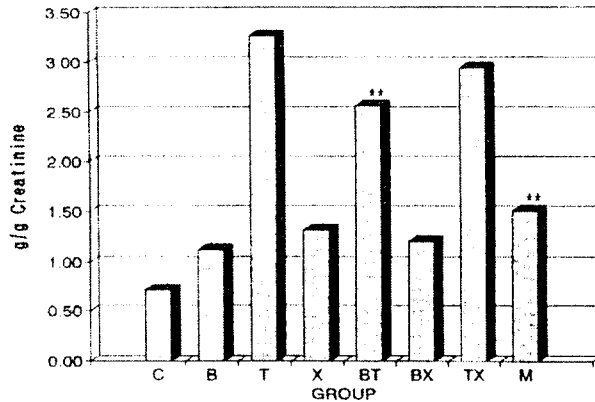


Fig. 2. Concentration of urinary hippuric acid after the administration of organic solvents. The bar represents the mean values for five rats (C, control; B, benzene; T, toluene; X, xylene; T, benzene+toluene; BX, benzene+xylene; TX, toluene+xylene; M, benzene+toluene+xylene).

** : Significantly different from T group ($p < 0.01$).

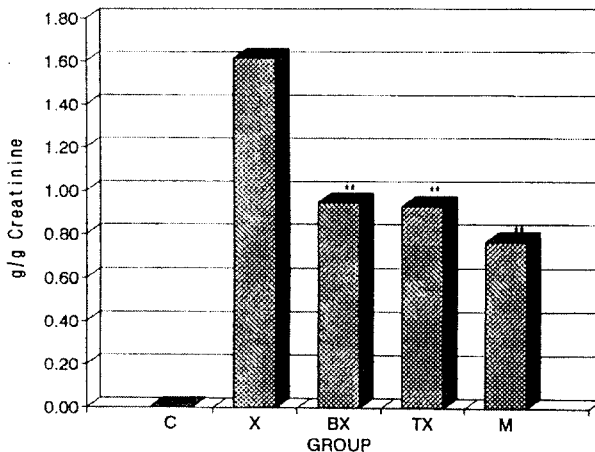


Fig. 3. Concentration of urinary methyl hippuric acid after organic solvents administration. The bar represents the mean values for five rats (X, xylene; BX, benzene+xylene; TX, toluene+xylene; M, benzene+toluene+xylene).

** : Significantly different from X group ($p < 0.01$).

Xylene을 단독 투여한 군에서는 1.62 g/g creatinine으로, 병합 투여군인 B+X, T+X 투여군에서는 0.95, 0.93 g/g creatinine으로 각각 측정되었다. 투여형태에 따라서 단독, 병합 및 혼합 투여군들을 각각 비교하였을 때 투여군간에 통계학적인 유의한 감소를 보였으며 ($p < 0.01$), 전체적으로는 약 40-53% 정도의 methylhippuric acid 배설량의 감소를 보였다.

IV. 고 찰

금번 연구는 산업체 및 실험실 등에서 널리 사용되는

benzene, toluene 및 xylene 등이 흡수형태 차이 즉, 단일, 병합 또는 혼합된 형태로 체내에 흡수될 경우 이들 유기용제의 대사에 관여하는 효소인 AHH 및 탈수소효소들의 활성도에 어떻게 변화되는가를 이들 유기용제의 노중 대사산물의 배설량과 관련하여 관찰하였다.

흡수된 이물질에 대한 대사기전과 독성현상을 연구하기 위해서는 흡수 물질에 대한 흡수, 분포, 대사 및 배설 등에 관한 pharmacokinetic 연구와 더불어서 역학적인 연구가 병행 되어야 한다(Sato와 Nakajima, 1979; Sabourin 등, 1989; Moretto와 Lotti, 1990; Chen 등, 1991; 김 등, 1994).

그러나 많은 연구자들에 의해서 수행되는 pharmacokinetic 연구는 단일물질에 대한 연구가 대부분이고 복합물질의 흡수에 대한 연구는 그다지 많지 않으며 더우기, 복합물질의 흡수에 따른 체내 독성발현에 대한 연구는 폭로농도, 폭로방법 및 종(spacies)에 따라서 연구자간에 이견을 보이고 있다(Sato와 Nakajima, 1979; Sabolainen, 1980; Tunek 등, 1981; Iregren 등, 1986; Nakajima 등, 1988; Okino 등, 1991). Ikeda 등 (1972)은 toluene이 benzene의 대사를 억제하여 benzene의 독성작용을 상승시킬 수 있다고 보고하였으며, Sato와 Nakajima(1979)는 Wistar계 female rats를 이용하여 benzene과 toluene의 농도를 달리하여 복강주사한 후 혈액에서 투여물질의 농도변화와 노중에서 대사산물의 배설량을 측정된 결과, benzene과 toluene을 단독으로 투여하였을 때 보다 병합투여시에 대사가 지연되는 것을 보고하였다. Riihimaki(1979)는 toluene과 xylene의 대사시 1차 변형된 후 형성되는 benzoic acid와 methylbenzoic acid가 병합투여시 감소되는 현상을 보였다고 하였으며, Iregren 등(1986)은 toluene과 alcohol을 복합투여한 연구에서 alcohol에 의한 영향은 보이지 않았다고 보고하였다. 또한 김 등(1995)은 benzene, toluene 및 xylene을 단독, 병합 및 혼합처리한 후에 이들 유기용제를 대사시키는 효소와 활성산소종의 생성량을 가지고 단독 및 혼합처리에 대한 독성현상의 연구결과를 보고 하였다. 이와같이 대부분의 연구는 용량-반응(dose-response)에 따른 연구로서 혈액중 흡수된 물질의 농도와 노중 대사산물의 배설량을 측정하여 독성현상을 파악하는 연구이며, 이들 물질의 대사에 관여하는 대사효소에 관한 연구는 아직 미흡한 상태이다.

Cytochrome P-450의 함량은 종, 성별등에 따른 유전적인 요인과 환경에 의한 영향으로서 이물질 흡입에 의한 특정한 cytochrome P-450의 동위효소 유도에 따라서 많은 함량 차이를 보이는데(Nebert와 Gonzalez,

1987), 금번 연구에 있어서 benzene, toluene 및 xylene 처리시 이들 유기용제 종류와 투여방법에 따른 cytochrome P-450 함량 변화를 보면, 대조군에서 보다 투여군 모두에 있어서 함량의 증가를 보였으며($p < 0.01$), 투여물질의 종류에 따른 cytochrome P-450의 함량 변화는 benzene < toluene < xylene 순으로 나타났다. 이러한 현상은 Pathiratne 등(1986)의 연구에서도 보고한 바와 같이 유사한 결과로서 benzene ring에 붙어있는 결사슬의 길이와 종류에 따라서 함량의 차이를 보이는 것으로 생각된다. 또한 이들 유기용제 대사에 있어서 처음 단계인 수산화 및 epoxidation 단계에 작용하며, PAH계 물질의 폭로에 의해서 선택적으로 유도되는 cytochrome P-450(P450IA) 동위효소에 의해서 활성을 보이는 AHH의 활성도는 대조군에서 보다 투여군 모두에 있어서 활성도의 증가를 보였는데 benzene 단독 투여군을 제외한 기타의 투여군에서 통계학적인 유의한 증가를 보였다($p < 0.01$). 투여물질에 따른 AHH의 활성도 증가는 benzene < toluene < xylene < 병합 및 혼합투여군 순으로 나타났는데 이러한 결과는 유기용제의 입체적인 구조와 유도성의 차이로 인하여 나타난 결과로 보인다.

Ethanol과 acetaldehyde의 산화-환원 작용에 중요한 역할을 하는 ADH와 ALDH는 주로 간에 존재하는 nicotinamide 의존성 탈수소효소(dehydrogenase)이다 (Khanna와 Israel, 1980).

탈수소효소는 기질의 선택성과 반응성이 넓어서 ethanol 및 acetaldehyde 뿐만 아니라 유기용제, 환경오염물질 및 약물 등 많은 이물질 대사에 있어서 중요한 역할을 한다(Byngton과 Leibman, 1965; Lumeng 등 1978; Takagi 등, 1985; Roig 등, 1991; 김 등, 1994).

Toluene과 xylene는 대사과정에서 형성된 benzyl alcohol과 methylbenzyl alcohol을 ADH의 작용으로 aldehyde 형태로 변형되고, 다시 ALDH에 의해서 acid 형태(COOH)로 변형된 후 체내에 존재하는 glycine과 conjugation되어 체외로 배설된다(Arlien-Soborg, 1992; Nakajima 등, 1993).

그러므로 benzene, toluene 및 xylene을 투여한 후 간장의 microsome 분획의 ADH와 ALDH의 활성도를 측정할 결과, 대조군보다 benzene, toluene, xylene 단독투여군에서 다소 증가된 경향의 측정치를 보였으며($p > 0.01$), 병합 및 혼합투여군에서는 현저한 감소를 보여 주었다($p < 0.01$).

이러한 현상은 병합 및 혼합투여시 cytochrome P-450 의존성 효소의 유도 및 억제 작용에 의한 영향으로 탈수소효소인 ADH와 ALDH의 작용이 억제되어

전반적인 대사에 영향을 미치는 것으로 보인다. 이러한 결과는 대사산물의 배설량의 측정 결과와도 연관하여 생각할 수 있었다.

Ikeda 등(1972)은 Wistar계 rat에 benzene과 toluene을 처리하여 상호작용을 연구한 결과, 단독 투여한 군에서 보다 병합투여한 군에서 benzene의 대사산물인 phenol의 배설량이 감소되었다고 보고 하였으며, Sato와 Nakajima(1979)는 Wistar계 female rat에 투여물질의 농도(0.31, 1.25, 5.0 mmol/kg)를 달리하여 복강주사한 후 뇨중 phenol량을 측정할 결과, 단독투여군에서 보다 병합투여군에서의 뇨중 phenol의 배설량이 감소되며 투여 농도가 증가할수록 현저한 차이를 보인다고 하였다. 금번 연구에 있어서 benzene, toluene, xylene을 단독, 병합 및 혼합투여한 결과, 단독투여군에서 보다 병합투여군과 혼합투여군에 있어서 뇨중 대사산물의 배설량이 현저한 감소를 보였다. 이러한 현상을 cytochrome P-450 의존성 AHH와 탈수소효소인 ADH와 ALDH를 상호 연관하여 보면 이들 유기용제의 대사에 있어서 대사속도 및 전반적인 대사를 결정하는 것은 cytochrome P-450 의존성 AHH의 유도성과 활성도에 의해서 이루어지는 것으로 보이나, AHH에 의해서 형성된 benzyl alcohol과 methylbenzyl alcohol을 aldehyde 형태로 전환시키는 ADH의 활성도는 병합 및 혼합투여시 유기용제간의 상호작용에 의한 영향으로 ADH와 ALDH의 작용이 억제되어 대사산물의 배설량이 차이를 보이는 것으로 생각된다.

참고문헌

- 김기웅, 강성규, 양정선, 박인정, 문영한 (1994): Trichloroethylene 처리한 흰쥐의 간 미크로솜 Alcohol dehydrogenase와 Aldehyde dehydrogenase 활성도에 관한 연구. 한국산업위생학회, **4**, 148-156.
- 김기웅, 강성규, 조영숙, 이세휘, 문영한, 최병순, 박상신 (1995): Ethanol이 Trichloroethylene 대사효소의 활성도와 유도성에 미치는 영향. 예방의학회지, **28**, 141-152.
- 김기웅, 장성근, 김양호, 문영한 (1995): Cytochrome P-450 의존성 radical 전달에 의한 Benzene, Toluene, Xylene의 대사가전 연구. 한국독성학회지, **11**, 205-213.
- ACGIH. (1986): Documentation of the threshold limit values and biological exposure indices. 5th., American Conference of Governmental Industrial Hygienists. Cincinnati, Ohio, 10-28.
- ACGIH. (1995): Threshold Limit Values (TLVs) for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices (BEIs). ACGIH, Cincinnati, Ohio, 55-69.
- Arlien-Soborg, P. (1992): Solvent neurotoxicity. CRC

- Press Inc., Florida, 61-127
- Baselt, R.C. (1980): Biological monitoring methods for industrial chemicals. *Biomedical Publication, California*, 41-42.
- Bonnichsen, R.K., Brink, N.G. (1955): Liver alcohol dehydrogenase. *Methods in Enzymology.*, **78**, 495-500.
- Byngton, K.H., Leibman, K.C. (1965): Metabolism of trichloroethylene in liver microsome. II. Identification of the reaction products as chloral hydrate. *Mol. Pharmacol.*, **1**, 247-254.
- Chen, J.D., Wang, J.D., Jang J.P., Chen, Y.Y. (1991): Exposure to mixtures of solvents among paint workers and biochemical alterations of liver function. *J. Ind. Med.*, **48**, 696-701.
- Cohr, K.H., Stokholm, J. (1979) : Toluene. a toxicology review. *Scand. J. Work. Environ. Health.*, **5**, 71-90.
- Ikeda, M. (1974): Reciprocal metabolic inhibition of toluene and trichloroethylene in vivo and *in vitro*. *Int. Arch. Arbeitsmed.*, **33**, 125-130.
- Ikeda, M., Ohtsuji, H., Imamura, T. (1972): *In vivo* suppression of benzene and styrene oxidation by co-administered toluene in rats and effects of phenobarbital. *Xenobiotica*, **2**, 101-106.
- Iregren, A., Akerstedt, T., Olson, B.A. and Gamberale, F. (1986): Experimental exposure to toluene in combination with ethanol intake. *Scand. J. Work Environ. Health.*, **12**, 128-136.
- Khanna, J.M. and Israel, Y. (1980): Ethanol metabolism. *Int. Rev. Physiol.*, **21**, 275-315.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R. J. (1951): Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 401-404.
- Lumang, L., Bosron, W.F. and Li, T-K. (1978): Quantitative correlation of ethanol elimination rates *in vivo* with liver alcohol dehydrogenase activities in fed, fasted and food-restricted rats. *Biochem. Pharmacol.*, **28**, 1547-1551.
- Moretto, A., Lotti, M. (1990): Exposure to toluene increases the urinary excretion of D-glucaric acid. *Br. J. Ind. Med.*, **47**, 58-61.
- Nakajima, T., Okino, T., Okuyama, S., Kaneko, T., Yonekura, I. and Sato, A. (1988): Ethanol- induced enhancement of trichloroethylene metabolism and hepatotoxicity: Difference from the effect of phenobarbital. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **94**, 227-237.
- Nakajima, T., Wang, R-S. and Murayama, N. (1993): Immunochemical assesment of the influence of nutritional, physiological and environmental factors on the metabolism of toluene. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.*, **65**, S127-S130.
- Nebert, D.W., Gelboin, H.V. (1968): Substrate inducible microsomal aryl hydrocarbon hydroxylase in mammalian cell culture. I. Assay and properties of the induced enzymes. *J. Biol. Chem.*, **234**, 6242-6249.
- Nebert, D.W., Gonzalez, F.J. (1987): P450 Gene. Structure, evolution and regulation. *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, 945-993.
- Ogata, M., Sugihara, R., Kira, S. (1977): Quantitative determination of urinary HA and m- or p-xylene exposure by HPLC. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.*, **39**, 199-206.
- Okino, T., Nakajima, T., Nakano, M. (1991): Morphological and biochemical analyses of trichloroethylene hepatotoxicity: Differences in ethanol-, and phenobarbital- pretreated rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **108**, 379-389.
- Omura, T., Sato, R. (1964): The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370-2378.
- Park, K.H., Kim C.R. (1984): Induction of the different forms cytochrome P-450 isozymes and comparison of aryl hydrocarbon hydroxylase levels on rat tissues by chemical treatment. *Korean Biochem. J.*, **17**, 10-19.
- Park, D.V., Williams, R.T. (1953): Studies in detoxication. The metabolism of benzene containing 14C-benzene. *Biochem. J.*, **54**, 231-238.
- Pathiratne, A., Puyear, R.L., Brammer, J.D. (1988): A comparative study of the effects of benzene, toluene, and xylenes on their *in vivo* metabolism and drug-metabolizing enzymes in rat liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **82**, 272-280.
- Rana, S.V.C., Kumar, S. (1993): Liver function in rats treated individually and with a combination of xylene, toluene and methanol. *Toxicol. Ind. health.*, **9**, 479-484.
- Riihimaki, V. (1979): Conjugation and urinary excretion of toluene and m-xylene metabolites in a mam. *Scand. J. Work Environ. Health.*, **5**, 135-142.
- Roig, M.G., Bello, F., Burguillo, F.J., Cachaza, J.M. and Kennedy, J.F. (1991): *In vitro* interaction between psychotropic drugs and alcohol dehydrogenase activity. *J. Pharmaceut. Sci.*, **80**, 267-270.
- Sabourin, P.J., Bechtold, W.E., Griffith, W.C., Birnbaum, L.S., Lucier, G., Henderson, R.F. (1989): Effect of exposure concentrations, exposure rats, and route of administration on metabolism of benzene by F344 rats and B6C3F1 mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **99**, 421-444.
- Sato, A., Nakajima, T. (1979): Dose-dependent meta-

- bolic interaction between benzene and toluene *in vivo* and *in vitro*. *Toxicol. Appl. pharmacol.*, **48**, 249-256.
- Savolainen, K. (1980): Combined effects of xylene and alcohol on the central nervous system. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **46**, 366-372.
- Takagi, Y., Ito, A. and Omura, T. (1985): Biogenesis of microsomal aldehyde dehydrogenase. *J. Biochem.*, **98**, 1647-1652.
- Tottmar, S.O.C., Pettersson, H. and Kiessling, K-H. (1973): The Subcellular Distribution and Properties of Aldehyde Dehydrogenase in Rat Liver. *Biochem. J.*, **135**, 577-586.
- Tunek, A., Olofsson, T., Berlin, M. (1981): Toxic effects of benzene and benzene metabolites on granulopoietic stem cells and bone marrow cellularity in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **59**, 149-156.
- World Health Organization. (1985): International programme on chemical safety. *Environ. Health. Criteria.*, **52**, Toluene. WHO, Geneva.