

Studies on the Mechanism and Modifiers of Nitrile Toxicity

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Tanii, Hideji メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7807

ニトリル類の毒性機序と修飾因子

金沢大学医学部衛生学講座 (主任: 橋本和夫教授)

谷 井 秀 治

(昭和60年6月26日受付)

ニトリル類の急性毒性及びこれに及ぼす代謝修飾因子の影響をニトリル類の化学構造との関連でマウスを用いて調べた。ベンゾニトリルを除くすべてのニトリル類は *in vivo* 及び *in vitro* でシアンを遊離した。しかしこのシアンの遊離の程度及びマウスを四塩化炭素で前処理した際の致死率はニトリルにより異っていた。このことからニトリル類を仮に3つのグループに分類した。グループ1では四塩化炭素前処理により急性毒性は大きく減少し、グループ2では急性毒性は有意に変化しないかあるいは若干強まった、グループ3はベンゾニトリルのみで急性毒性は明らかに強まった。グループ1のニトリル類を投与したマウスの死亡時の脳のシアン量は高く、その量はシアン化カリウムで死亡したマウスのそれと差がなかった。Log (1/LD₅₀) はグループ1では *n*-オクタノール-水分配係数 (log P) の2次関数として表わされ、グループ2では1次関数として表わされた。ニトリル類よりのシアンの遊離は、マウス肝ミクロソームを含む *in vitro* の代謝系においても見られた。この系に2-diethylaminoethyl-2, 2-diphenylvalerate HCl (SKF-525A) を添加あるいは一酸化炭素を通気した場合及び四塩化炭素前処理したマウス肝から得たミクロソームでは、この遊離は多くのニトリル化合物について阻害が認められた。マウスをエタノールで処理すると、対照と比較してニトリル類の代謝促進が認められた。しかし、エタノールを代謝反応系に直接添加した場合にはニトリルの代謝を阻害した。

Key words nitriles, carbon tetrachloride, ethanol, acute toxicity, metabolism.

脂肪族及び芳香族ニトリルは、プラスチック、溶剤、合成中間体として広く工業的に使用されている。人間や実験動物がこれらニトリルに急性暴露されると、中枢神経系、肝、心臓血管系、腎、胃腸管に障害が引き起こされる¹⁾。このような毒性は主として生体内でニトリルより遊離するシアンによるものと考えられているが²⁾、シアン遊離のメカニズムや遊離の程度はニトリルの種類、動物種及び投与経路により異なっている³⁾⁻⁵⁾。又、アクリロニトリルの研究から、遊離したシアンの他、それ自体の分子構造も毒作用に関与していることが示唆されている⁶⁾⁻⁹⁾。しかし、これらニトリル化合物の急性毒性機序をその化学構造との関連で明らかにした研究は充分におこなわれていない。このため現在この種化合物の急性中毒の有効な予防ないし治療法が確立されないままとなっている。また急性毒性に及ぼす各種化学的修飾因子の影響についても不明な点

が少なくない。本研究は、ニトリル類急性毒性とその化学構造との関連についての一般的法則を得ることを目的として計画された。このため、各種ニトリル化合物を用いて、急性投与時におけるシアンの遊離と致死効果及びこれらに及ぼす薬物代謝酵素の代表的阻害剤である四塩化炭素とSKF-525A、一酸化炭素、エタノールなど同上酵素の修飾剤の影響を動物実験により観察した。又上記結果とニトリル類の物理化学的特性による、構造-活性相関を解析した。化学物質による急性毒性のごとき生物活性はその物理化学的特性に大きく依存していると考えられる。Silver ら¹⁰⁾はニトリルからのシアン遊離に構造因子が大きく影響することを示した。本研究ではニトリル類の毒作用機序を明らかにするため、ニトリル類の急性毒性と一般に化学物質の生物活性を決める上で重要と考えられている疎水性との相関を調べた。この結果ニトリル類の急性毒性

Abbreviations: LD₅₀, median lethal dose; Log P, log (n-octanol-water partition coefficient); NADP, nicotinamide adenine dinucleotide; SKF-525A, 2-diethylaminoethyl-2, 2-diphenylvalerate hydrochloride.

は疎水性と相関することが明らかとなり、その毒作用は疎水性との関連で考察した。

なお薬物代謝酵素はアルコールの慢性^{10)~14)}及び急性¹⁵⁾投与でその活性が上昇することが知られている。このことはニトリル類に暴露される工場作業者に飲酒の習慣があれば、非飲酒者に比べ有害な影響の及ぶ可能性を示唆している。事実、ラットにエタノールを急性あるいは慢性投与すると炭化水素類の代謝が促進することが報告されている¹⁴⁾¹⁵⁾。本研究では種々のニトリル類の *in vivo* と *in vitro* での代謝へのアルコールの影響をマウスについて調べた成績も報告する。

材料および方法

I. 試 薬

Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) と glucose-6-phosphate dehydrogenase は P-L Biochemicals 社、2-diethylaminoethyl-2, 2-diphenylvalerate HCl (SKF-525A) は Smith Kline & French Labs, D-glucose-6-phosphate と牛血清アルブミンはシグマ社、カプリロニトリルはアルドリッチ社、メタクリロニトリル、フェニルアセトニトリル、sodium p-toluenesulfoncholoramide trihydrate (Chloramine T), bis-(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone), 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, その他一般試薬(特級)は和光純薬工業、上記以外のニトリルは東京化成工業から入手した。用いたニトリル類中の遊離シアンの混在度をあらかじめ調べ、本研究の目的にかなう純度であることを確かめた。この結果は表1の右端欄に示した。

II. n-オクタノール-水分分配係数 (log P)

既に報告した方法¹⁶⁾により求めた。

III. 実験動物と処理

ddY strain の雄マウス、体重約 25 g を用いた。LD₅₀ は Weil の方法¹⁷⁾に従って求めた。

1. 四塩化炭素処理

Willhite ら⁹⁾の方法に従って、マウスの腹腔内に 20%四塩化炭素(オリーブ油)を 25 g 体重当り 0.16 ml 投与した。対照マウスには同量のオリーブ油を投与した。

2. エタノール処理

エタノールは 0.17, 0.25, 0.33, 0.42 g/kg 水溶液を経口で 25 g 体重当り 0.3 ml 投与した。対照マウスにはグルコースをそれぞれエタノールと等カロリー投与した。即ち、0.29, 0.44, 0.58, 0.73 g/ml 水溶液を経口で同様に投与した。

IV. シアンの定量

シアンの定量は Bruce ら¹⁸⁾の方法と Epstein¹⁹⁾の方法を組み合わせで行った。空気導入装置はそれぞれ、

25 ml の 20%NaOH, 5 ml の 20%トリクロロ酢酸及び 0.5 ml の 0.1 N NaOH を含む試験管からなるものを用いた。1 ml のサンプルをトリクロロ酢酸を含む試験管に加えた後、空気を 600 ml/min の流速で 10 分間ミニポンプで導入した。0.1 N NaOH を含む試験管から一定量取り出して 1 N 酢酸で中和した後シアンを分析した。

V. 大脳内のシアンの測定

ニトリル投与後の脳のシアン濃度を測定するため、あらかじめ 5.5 時間以内に大半が死亡する量を求めてマウスに投与した。死後直ちに大脳をとりだし、冷 50 mM リン酸緩衝液 (1.15%KCl, pH7.4) で洗い、同じ緩衝液中でポリトロンを用いてホモジェナイズした。遠心後 1 ml の上清中のシアン濃度を上記の方法で測定した。動物が生存した場合は 5.5 時間後に頸椎脱臼により屠殺して同様にシアン濃度を求めた。

VI. 四塩化炭素による前処理のニトリル類急性毒性への影響

四塩化炭素あるいはオリーブ油投与 24 時間後、マウスにニトリル、オリーブ油あるいは水を経口投与した。死亡率は一週間で評価した。

VII. ミクロソームの調製と反応条件

肝ミクロソームは既に報告した方法²⁰⁾により調整した。反応液の組成は、0.375 ml の酵素液、ニトリル、3.75 μ mol glucose-6-phosphate, 3.75 μ mol NADP, 9.4 μ mol MgCl₂, 1.2 U glucose-6-phosphate dehydrogenase, 50 mM リン酸緩衝液 (pH7.4) で全量 1.5 ml であった。修飾因子のニトリル代謝への影響を調べる際は、上記組成に更に因子が含まれる。すなわち、SKF-525A は終濃度 0.5 mM で添加し、一酸化炭素はニトリルを加える前に反応液に 2 分間通気した。四塩化炭素の影響は、Willhite らの条件⁹⁾で前処理したマウスの肝ミクロソームを酵素液とすることにより調べた。反応は 37°C で行い、15 分後に 1 ml の反応液をとって 20%トリクロロ酢酸を含む試験管に加え、IV で述べた方法によりシアンを測定した。

VIII. エタノールによる前処理

エタノールによる肝薬物代謝酵素活性化の最適条件を求めるため、アクリロニトリル、プロピオニトリル、イソブチロニトリルを試験化合物に選んだ。まずエタノール投与の最適時間を求めるため、4 g/kg のエタノールをマウスに経口投与し、0, 4, 8, 13, 18, 24 時間後に屠殺して肝よりミクロソームを調製してニトリルの代謝速度を求めた。次に、0, 2, 3, 4, 5 g/kg のエタノールをマウスに経口投与し、先に求めた時間で屠殺して同様に各ニトリルの代謝速度を求めることにより、エタノールの最適投与量を決めた。対

照マウスにはそれぞれエタノールと等カロリーのグルコースを投与した。

IX. エタノール前処理マウスの肝ミクロソームでのニトリルの代謝

VIIIで求めた条件でエタノールあるいはグルコース処理したマウスから肝ミクロソームを調整し、それを用いてすべてのニトリルの代謝速度を求めた。グルコースとエタノール処理した場合の代謝速度を比較することによりエタノールの代謝活性化を調べた。

X. エタノール前処理マウスでのニトリル用量—遊離シアン関係

4 g/kg エタノールあるいは 7 g/kg グルコース投与 13 時間後 (VIIIの条件) にニトリル (アクリロニトリル, プロピオニトリル, イソブチロニトリル) を種々の量で経口投与した。各ニトリル投与後の肝シアン濃度の最大値を与える時間は予備実験で求め (アクリロニ

トリルは 6 分, プロピオニトリルは 1 時間, イソブチロニトリルは 6 分), その時間にマウスを屠殺して約 0.5 g の肝をとりだし, 2 ml の冷 50 mM リン酸緩衝液 (1.15% KCl, pH 7.4) でポリトロンを用いてホモジェナイズした。遠心後の上清 1 ml あたりのシアン濃度を IV で述べた方法で測定した。

XI. チトクロム P-450 の定量

4 g/kg エタノールあるいは 7 g/kg グルコース投与 13 時間後にマウスを屠殺して肝をとりだし, Omura らの方法²¹⁾に従ってチトクロム P-450 量を求めた。

XII. 蛋白定量

用いた酵素液の蛋白量は牛血清アルブミンを標準として Lowry らの方法²²⁾で求めた。

XIII. 統計的方法

四塩化炭素前処理とオリーブ油前処理群間の致死率の差は Fisher's exact test for a four-fold table²³⁾を

Table 1. Sytstructure, LD₅₀, log P and free CN concentrations in nitrile preparations

Compound	Structure	Oral LD ₅₀ ^a (mmol/kg)	Log P ^b	Free ^c CN % (w/w)
Potassium cyanide	KCN	0.2072 (0.1640–0.2621)	— ^e	— ^e
Acetonitrile	CH ₃ CN	6.550 (4.918–8.726)	–0.54	0.000
Propionitrile	CH ₃ CH ₂ CN	0.6498 (0.4880–0.8654)	–0.10	0.000
3-Hydroxypropionitrile	OH(CH ₂) ₂ CN	48.71 (36.63–64.97)	–0.94	0.001
3-Chloropropionitrile	Cl(CH ₂) ₂ CN	0.5661 (0.4622–0.6932)	0.18	0.000
Acrylonitrile	CH ₂ =CHCN	0.7286 (0.5347–0.9929)	0.09	0.000
Methacrylonitrile	CH ₂ =C(CH ₃)CN	0.2553 (0.2085–0.3126)	0.68	0.002
n-Butyronitrile	CH ₃ (CH ₂) ₂ CN	0.5637 (0.4233–0.7509)	0.53	0.000
Isobutyronitrile	(CH ₃) ₂ CHCN	0.3652 (0.3652) ^d	0.46	0.000
Allylnitrile	CH ₂ =CHCH ₂ CN	0.9953 (0.7877–1.258)	0.40	0.016
4-Chlorobutyronitrile	Cl(CH ₂) ₃ CN	0.5155 (0.3871–0.6866)	0.56	0.000
2-Methylbutyronitrile	CH ₃ CH ₂ CH(CH ₃)CN	0.2867 (0.21530.3818)	1.05	0.002
Phenylacetonitrile	⌡ CH ₂ CN	0.3886 (0.2916–0.5172)	1.61	0.000
3-Phenylpropionitrile	⌡ (CH ₂) ₂ CN	0.8870 (0.8870) ^d	1.70	0.000
Chloroacetonitrile	ClCH ₂ CN	1.841 (1.351–2.509)	0.23	0.002
n-Valeronitrile	CH ₃ (CH ₂) ₃ CN	2.297 (1.725–3.059)	0.94	0.000
Isovaleronitrile	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ CN	2.797 (2.797) ^d	0.85	0.000
n-Capronitrile	CH ₃ (CH ₂) ₄ CN	4.763 (4.763) ^d	1.66	0.000
Isocapronitrile	(CH ₃) ₂ CH(CH ₂) ₂ CN	5.020 (4.097–6.145)	1.54	0.041
Caprylonitrile	CH ₃ (CH ₂) ₆ CN	14.09 (11.52–17.26)	2.75	0.000
Pelargononitrile	CH ₃ (CH ₂) ₇ CN	14.79 (9.696–22.56)	3.12	0.000
Benzonitrile	⌡ CN	9.416 (9.416) ^d	1.56	0.000

^a Acute oral LD₅₀ was determined by the method of Weil¹⁷⁾ and expressed as the mean (95% confidence interval).

^b Log (n-octanol-water partition coefficient). Values are the mean of three determinations.

^c Free cyanide concentrations in the test nitriles were assayed. An aliquot of nitrile was directly added to the tube containing 20% trichloroacetic acid, and following procedures were the same as cyanide determination in Materials and Methods.

^d $\sigma_T = 0.0000$.

^e Not determined.

用いて検定した。エタノール前処理とグルコース前処理群間のニトリル代謝速度、シアン量及びチトクロム P-450 量の差は Student's t-test により検定した。LD₅₀ と n-オクタノール-水分配係数の相関分析は Hansch らの方法²⁴⁾に従った。

成 績

I. LD₅₀と分配係数

本研究に用いたニトリル類の化学構造、LD₅₀、分配係数及び各試薬中の遊離シアンの定量値をまとめて表 1 に示す。ニトリル類は LD₅₀ 値からもわかるように急性毒性の差が大きく、分配係数も疎水性の最も高い 3.12 から最も低い -0.94 までと広範囲であった。

II. 四塩化炭素前処理によるニトリル類致死率への影響

ある種のニトリルは生体内で代謝されて遊離シアンとなり、これが急性毒性の原因となっていることが示されている。その際肝薬物代謝酵素が重要な役割をしている⁹⁾。四塩化炭素はこの酵素活性を強く阻害する^{25)~27)}ので、ここでは種々のニトリルの急性毒性に与える四塩化炭素の影響をみた。この結果、表 2 に示すようにその影響の差異からニトリル類は 3 つのグループに大別出来ることが分った。すなわち No.1~13 は四塩化炭素前処理により致死率が激減し (グループ 1)、No.14~20 は致死率が有意に変わらないか若干高くなった (グループ 2)。又、ベンズニトリルのみ (グ

Table 2. Effect of carbon tetrachloride pretreatment on mortality produced by nitrile in mice

No. Compound	Dose ^a		Pretreatment (number dead/number dosed)	
	Vehicle	mmol/kg body weight	Olive oil ^c	Carbon tetrachloride ^d
Water ^b	Water		0/10	0/10
Olive oil ^b	Olive oil		0/10	0/10
1 Acetonitrile	Water	9.96	8/10	0/10 ^e
2 Propionitrile	Water	0.80	10/10	0/10 ^e
3 3-Hydroxypropionitrile	None	66.47	7/10	1/10 ^e
4 3-Chloropropionitrile	Water	0.67	10/10	0/10 ^e
5 Acrylonitrile	Olive oil	1.13	8/10	1/10 ^e
6 Methacrylonitrile	Olive oil	0.30	9/10	1/10 ^e
7 n-Butyronitrile	Olive oil	0.93	9/10	1/10 ^e
8 Isobutyronitrile	Olive oil	0.42	9/10	1/10 ^e
9 Allylnitrile	Olive oil	1.25	9/10	1/10 ^e
10 4-Chlorobutyronitrile	Olive oil	0.73	8/10	0/10 ^e
11 2-Methylbutyronitrile	Olive oil	0.40	10/10	0/10 ^e
12 Phenylacetonitrile	Olive oil	0.48	10/10	3/10 ^e
13 3-Phenylpropionitrile	Olive oil	0.91	9/10	0/10 ^e
14 Chloroacetonitrile	Olive oil	2.19	3/10	10/10 ^e
15 n-Valeronitrile	Olive oil	3.75	9/10	6/10
16 Isovaleronitrile	Olive oil	2.62	7/10	3/10
17 n-Capronitrile	Olive oil	6.67	5/10	5/10
18 Isocapronitrile	Olive oil	6.18	6/10	10/10
19 Caprylonitrile	Olive oil	14.995	7/10	10/10
20 Pelargononitrile	Olive oil	16.66	7/10	5/10
21 Benzonitrile	Olive oil	8.78	0/10	10/10

^a Mice were orally dosed with test compounds in a volume of 4.0 ml/kg. Exception was 3-hydroxypropionitrile which was given in a volume of 4.5 ml original solution per kg body weight.

^b Dosed in a volume of 4.5 ml/kg.

^c Mice were dosed intraperitoneally with olive oil in a volume of 6.4 ml/kg 24 hr prior to nitrile challenge.

^d Mice were dosed intraperitoneally with carbon tetrachloride in a volume of 6.4 ml/kg 24 hr prior to nitrile challenge.

^e Differs significantly from the olive oil-given group ($P < 0.01$).

Table 3. Cyanide concentration in brains of mice 5.5 hr after dosing with nitriles or at death within 5.5 hr

Compound	Dose level ^a (mmol/kg)	Brain cyanide level (μ g cyanide/g tissue) ^b			
		Olive oil ^c		CCl ₄ ^d	
		Survived	Dead	Survived	Dead
Potassium cyanide	0.21	— ^e	0.86 $\pm$ 0.14 (8)	—	0.83 $\pm$ 0.18 (8)
Group 1					
Propionitrile	0.80	—	0.72 $\pm$ 0.13 (8)	0.07 $\pm$ 0.04 (8)	—
Acrylonitrile	1.13	—	0.68 $\pm$ 0.12 (8)	0.03 $\pm$ 0.04 (8)	—
Isobutyronitrile	0.42	0.25 (1)	0.77 $\pm$ 0.27 (7)	0.02 $\pm$ 0.02 (8)	—
Group 2					
Chloroacetonitrile	3.62	—	0.80 $\pm$ 0.05 (8)	—	0.04 $\pm$ 0.04 (8)
n-Valeronitrile	6.00	0.25 $\pm$ 0.05 (7)	0.13 (1)	0.12 $\pm$ 0.05 (7)	0.01 (1)
n-Capronitrile	10.7	0.24 $\pm$ 0.02 (6)	0.07, 0.32 (2)	0.03 $\pm$ 0.02 (3)	0.04 $\pm$ 0.04 (5)

^a Orally.^b Data are expressed as mean $\pm$ S.D. (n), where n is the number of animals.^c Mice were dosed intraperitoneally with olive oil 24 hr prior to nitrile dosing.^d Animals were dosed intraperitoneally with CCl₄ 24 hr prior to nitrile.^e No animals.

Table 4. Effect of carbon tetrachloride, SKF-525A and carbon monoxide on microsomal metabolism of nitriles to cyanide

No. Compound	Concentration ^a (mM)	Cyanide formation (ng cyanide/min/mg protein)			
		Control ^b	CCl ₄ ^c	SKF-525 ^{b,d}	CO ^{b,e}
1 Acetonitrile	21	0.14 $\pm$ 0.05	n.d. ^f	0.03 $\pm$ 0.05	0.02 $\pm$ 0.00
2 propionitrile	0.74	1.44 $\pm$ 0.22	n.d.	0.65 $\pm$ 0.09	0.55 $\pm$ 0.17
3 3-Hydroxypropionitrile	150	2.89 $\pm$ 0.04	n.d.	1.44 $\pm$ 0.09	1.34 $\pm$ 0.14
4 3-Chloropropionitrile	0.64	9.24 $\pm$ 0.45	n.d.	4.64 $\pm$ 0.46	3.63 $\pm$ 1.38
5 Acrylonitrile	0.29	4.07 $\pm$ 1.07	n.d.	2.41 $\pm$ 0.46	1.56 $\pm$ 0.27
6 Methacrylonitrile	0.67	15.3 $\pm$ 0.62	n.d.	5.24 $\pm$ 0.65	4.39 $\pm$ 0.81
7 n-Butyronitrile	0.20	1.88 $\pm$ 0.25	n.d.	0.60 $\pm$ 0.11	0.057 $\pm$ 0.11
8 Isobutyronitrile	0.25	9.68 $\pm$ 0.24	n.d.	4.03 $\pm$ 0.55	2.79 $\pm$ 0.58
9 Allylnitrile	0.96	5.98 $\pm$ 0.24	0.06 $\pm$ 0.06	2.32 $\pm$ 0.88	3.01 $\pm$ 0.40
10 4-Chlorobutyronitrile	0.47	3.15 $\pm$ 0.07	0.02 $\pm$ 0.04	1.33 $\pm$ 0.27	0.92 $\pm$ 0.11
11 2-Methylbutyronitrile	1.2	16.8 $\pm$ 2.03	0.04 $\pm$ 0.02	7.93 $\pm$ 0.90	12.3 $\pm$ 0.83
12 Phenylacetoneitrile	1.6	27.1 $\pm$ 5.52	2.00 $\pm$ 0.79	12.7 $\pm$ 1.24	19.1 $\pm$ 1.95
13 3-Phenylpropionitrile	0.68	3.95 $\pm$ 0.98	0.44 $\pm$ 0.35	1.82 $\pm$ 0.55	2.85 $\pm$ 0.61
14 Chloroacetonitrile	1.0	11.4 $\pm$ 0.64	0.07 $\pm$ 0.04	5.37 $\pm$ 0.82	6.21 $\pm$ 0.88
15 n-Valeronitrile	0.06	1.88 $\pm$ 0.22	n.d.	0.15 $\pm$ 0.05	0.48 $\pm$ 0.04
16 Isovaleronitrile	2.7	2.41 $\pm$ 0.10	n.d.	0.62 $\pm$ 0.25	1.91 $\pm$ 0.43
17 n-Capronitrile	0.02	1.44 $\pm$ 0.52	n.d.	0.29 $\pm$ 0.04	0.71 $\pm$ 0.28
18 Isocapronitrile	0.07	0.70 $\pm$ 0.06	n.d.	0.20 $\pm$ 0.20	0.25 $\pm$ 0.01
19 Caprylonitrile	—	0.37 $\pm$ 0.07	n.d.	0.05 $\pm$ 0.03	0.20 $\pm$ 0.03
20 Pelargononitrile	—	0.12 $\pm$ 0.05	n.d.	0.05 $\pm$ 0.04	0.07 $\pm$ 0.04

^a Substrate concentration in the incubation mixture was 5 times K_m for compounds 1—13. For compounds 14—18 the concentrations were selected to exhibit maximal activity, since double-reciprocal plots of the enzyme activity revealed a non-linear relationship. For compounds 19 and 20 the incubation mixture contained a substrate at 45% (v/v) of saturated solution.^b Microsomes were prepared from livers of mice pretreated with olive oil only.^c Microsomes were prepared from livers of mice pretreated with CCl₄.^d Final concentration was 0.5 mM.^e Flushed with CO gas before addition of the substrate.^f Not detectable.

ループ3)では致死率が明らかに高くなった。

III. 大脳内シアン濃度と四塩化炭素の影響

表3に6種のニトリル投与後の大脳内シアン濃度を示す。オリーブ油で前処理したマウスは、プロピオニトリル、アクリロニトリル、イソブチロニトリル(グループ1)の投与後5.5時間以内にほとんど死亡し、その時点での大脳内シアン濃度はシアン化カリウムで死亡したマウスのそれと差がなかった。一方四塩化炭素で前処理したマウスはすべてニトリルを投与して5.5時間後まで生存し、その時点での大脳内シアン濃度は激減していた。グループ2については、クロロアセトニトリルを投与した場合、オリーブ油あるいは四塩化炭素で前処理したマウスはすべて5.5時間以内に死亡したが、高濃度のシアンは前者だけに認められた。n-バレロニトリルの場合、大半のマウスは前処理に関係なく生存した。死亡したマウスのシアン濃度は低かった。n-カプロニトリルの場合、n-バレロニトリルとほぼ同じ結果が得られたが、四塩化炭素前処理マウスではn-バレロニトリルに比べ高い致死率を示した。

IV. ミクロソームによるニトリル類の代謝と修飾因子

ニトリル類は肝ミクロソームで代謝されると考えられるので、*in vitro*でその活性とこれに及ぼす修飾因子の影響を調べた(表4)。各ニトリルの濃度をKm値の5倍あるいは最大活性を示すようにしてニトリルからのシアンの遊離速度を求めたところ、0.12~27.1 ng cyanide/min/mg/proteinと各ニトリルにより異なっていた。四塩化炭素はいずれのニトリルの代謝もほぼ完全に阻害した。薬物代謝酵素の阻害剤として知られるSKF-525Aと一酸化炭素は四塩化炭素ほどではないが、つよくニトリルの代謝を阻害した。その阻害の強さはニトリルにより異なるがSKF-525Aの場合は41~92%阻害、一酸化炭素の場合は21~83%阻害であった。

V. LD₅₀と分配係数の相関関係

すべてのニトリルについてlog(1/LD₅₀)とlog Pの関係を図1に示した。成績Iで分類されたグループ1と2のニトリルはここでも明らかに2つの別のグループに分れることが示された。すなわちグループ1は双曲線上に、グループ2は直線上に適合するよう思われた。これら2つのグループに対する回帰式は次のように計算された。

$$\begin{aligned} \text{グループ1, } \log(1/\text{LD}_{50}) &= -0.5996(\log P)^2 \\ &\quad + 1.127 \log P - 0.017 \\ &\quad (n=13, r=0.964, s=0.184) \\ \text{グループ2, } \log(1/\text{LD}_{50}) &= -0.343 \log P - 0.138 \\ &\quad (n=7, r=0.987, s=0.064) \end{aligned}$$

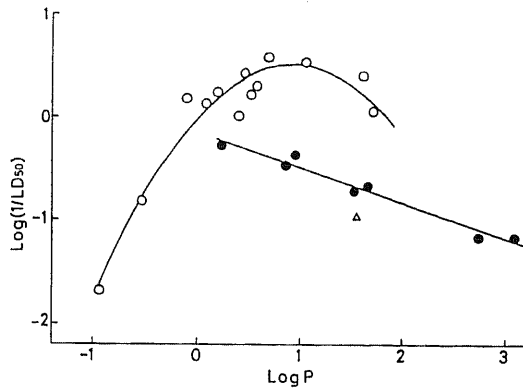


Fig. 1. $\log(1/\text{LD}_{50})$ vs $\log P$ for nitriles. Nitriles in group 1 are expressed in open circles and those in group 2 in closed circles. Benzonitrile is represented by the open triangle. The curves were obtained from the equations in the text.

ここでnは分析に用いたニトリルの数、rは相関係数、sは標準偏差を示す。両方の式は有意($P < 0.01$)であった。ベンゾニトリル(グループ3)は肝薬物代謝系でシアン遊離が全くみられなかったので分析から除いた。

VI. エタノールによる薬物代謝酵素活性化の条件

エタノールは肝薬物代謝酵素を活性化することは知られているが、ニトリルを基質とした場合にも活性化が認められるかを調べた。図2はエタノール4 g/kgをマウスに投与したときのニトリル代謝活性と投与後の時間との関係を示す。対照としてエタノールと等カロリーのグルコース(7 g/kg)を投与したマウスを用いた。この際、代謝速度を求めるための基質濃度はKm値の5倍とした。即ち、プロピオニトリルは0.74 mM、アクリロニトリルは0.28 mM、イソブチロニトリルは0.25 mMであった。いずれのニトリルを基質とした場合でも代謝活性化はエタノール投与8~13時間後に認められた。しかし、イソブチロニトリルの場合、エタノール投与4時間後では対照に比べて有意($P < 0.05$)に代謝活性は低かった。以後エタノール投与13時間後を酵素活性化の時間条件とした。次にエタノールを2, 3, 4, 5 g/kgで投与し、13時間後のニトリル代謝活性を同様に調べた(図3)。対照マウスには、実験群で用いたエタノールとそれぞれ等カロリーのグルコースを0, 3.5, 5.3, 7.0, 8.8 g/kgで投与した。いずれのニトリルを基質とした場合でも、エタノール量が4及び5 g/kgのときに対照に比べて有意($P < 0.05$)の代謝活性化が認められた。以後エタノール4 g/kgを投与量の条件とした。

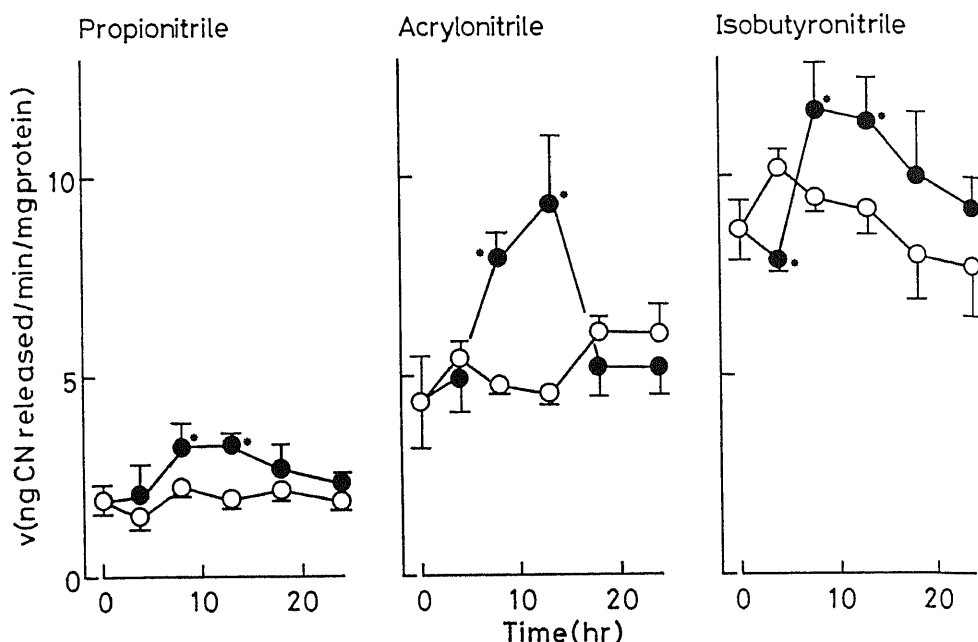


Fig. 2. Relationship between metabolic rate and time after ethanol dosing. Mice were dosed orally with either glucose (○), 7.0 g/kg, or ethanol (●), 4.0 g/kg. They were killed at indicated time and the microsomes from the livers were prepared. The metabolic rate (v) was determined in the assay mixture including either 0.74 mM propionitrile or 0.28 mM acrylonitrile or 0.25mM isobutyronitrile. Each value represents the mean $\pm$ S.D. of three animals. * $P < 0.05$ vs controls.

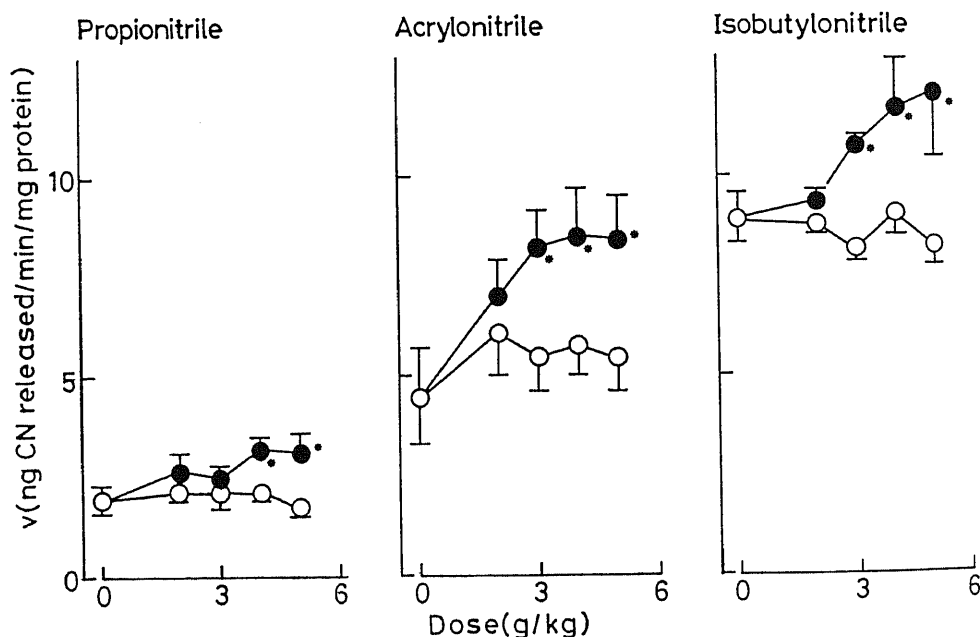


Fig. 3. Relationship between metabolic rate and nitrile dosing. Mice were dosed orally with either glucose (○) or ethanol (●). The dose was 2, 3, 4 and 5 g/kg for ethanol and 0, 3.5, 5.3, 7.0 and 8.8 g/kg for glucose. After 13 hr, animals were killed by cervical dislocation and the microsomes from the livers were prepared. The metabolic rate (v) was determined by the same way as in Fig. 2. Each value represents the mean $\pm$ S.D. of three animals. * $P < 0.05$ vs controls.

VII. エタノールによるニトリル代謝の活性化

VIで求めた条件でマウスをエタノールあるいはグルコースで処理したときの各種ニトリルの代謝活性化を *in vitro* で調べた (表5)。代謝反応系に NADPH 生成系を欠くときはほとんどのニトリルがシアンに代謝されない。一見して明らかなことはニトリルによって代謝速度が大きく異なることである。例えば対照としてのグルコース処理の場合、その速度は $0.11 \sim 22.91$ ng cyanide released/min/mg protein まで 10^2 の差があった。エタノールによる代謝活性化はほとんどのニトリルで認められ、その活性化率 (エタノール/グルコース) は $1.00 \sim 1.83$ までであった。

次に *in vivo* でのエタノールによる代謝活性化を3種のニトリルを用いて調べた (図4)。

マウスにエタノール (4 g/kg) あるいはグルコース (7 g/kg) を投与し13時間後に各ニトリルを種々の量で投与した。いずれのニトリルの場合でも調べた投与

量の範囲内で常にエタノール処理群の代謝活性が対照より高かったが、有意差が認められたのはアクリロニトリルの 0.36 mmol/kg 及びイソブチロニトリルの 0.18 と 0.42 mmol/kg 投与時においてのみであった。

VIII. エタノールによる *in vitro* でのニトリル代謝の阻害

エタノールそのものがニトリル代謝に影響するか調べるため、エタノールを *in vitro* の代謝反応系に直接加えた。表6は各種ニトリルの代謝反応に与えるエタノールの影響を阻害定数 (K_i) として示してある。 K_i は $0.5 \sim 22$ mM であった。アセトニトリルについては代謝速度が小さすぎて正確に K_i を求められなかった。フェニルアセトニトリル、3-フェニルプロピオニトリル及びイソカプロニトリルについてはエタノールを 80 mM まで添加しても阻害が認められなかった。カプリロニトリルとペラルゴノニトリルについてはエタノールを 80 mM まで添加したが、わずかの阻害が認

Table 5. Effect of ethanol treatment on nitrile metabolism

Compound	v (ng CN released/min/mg protein)			EtOH /Glucose
	-NADPH ^a	Ethanol	Glucose	
Acetonitrile	n.d.	0.66 ± 0.04^b	0.36 ± 0.09	1.83
Propionitrile	n.d.	3.18 ± 0.18^b	1.96 ± 0.18	1.62
3-Hydroxypropionitrile	n.d.	2.96 ± 0.06^b	2.10 ± 0.11	1.41
3-Chloropropionitrile	n.d.	5.47 ± 0.61^b	3.68 ± 0.36	1.49
Acrylonitrile	n.d.	8.47 ± 1.35^b	4.62 ± 0.33	1.83
Methacrylonitrile	n.d.	18.78 ± 0.30^b	15.83 ± 1.53	1.19
n-Butyronitrile	n.d.	1.32 ± 0.13^b	0.91 ± 0.06	1.45
Isobutyronitrile	n.d.	11.64 ± 1.32^b	9.00 ± 0.52	1.29
Allylnitrile	n.d.	7.44 ± 0.25^b	6.18 ± 0.48	1.20
4-Chlorobutyronitrile	n.d.	5.50 ± 0.23^b	3.74 ± 0.52	1.47
2-Methylbutyronitrile	n.d.	16.18 ± 0.37^b	14.56 ± 0.26	1.11
Phenylacetonitrile	0.08	27.01 ± 4.21	22.91 ± 1.15	1.18
3-Phenylpropionitrile	n.d.	4.46 ± 0.18^b	3.60 ± 0.12	1.24
Chloroacetonitrile	0.02	8.20 ± 1.37^b	5.34 ± 0.18	1.54
n-Valeronitrile	n.d.	1.49 ± 0.30	1.18 ± 0.32	1.26
Isovaleronitrile	n.d.	2.73 ± 0.17^b	2.29 ± 0.09	1.19
n-Capronitrile	n.d.	1.21 ± 0.47	0.89 ± 0.17	1.36
Isocapronitrile	n.d.	0.38 ± 0.08	0.31 ± 0.02	1.22
Caprylonitrile	0.03	0.49 ± 0.01	0.47 ± 0.04	1.04
Pelargonitrile	0.02	0.11 ± 0.03	0.11 ± 0.08	1.00

Mice were dosed orally with either ethanol (4 g/kg) or glucose (7 g/kg). After 13 hr, animals were killed by cervical dislocation and the microsomes from the livers were prepared. The metabolic rate (v) was determined in the assay mixture including one of the nitriles. The concentration of the test chemicals were five times K_m or the concentration that revealed the maximum rate. Data are expressed as mean $\pm$ S.D. of three animals.

^a The incubation mixtures lack the NADPH generating system.

^b $P < 0.05$.

n.d., Not detectable.

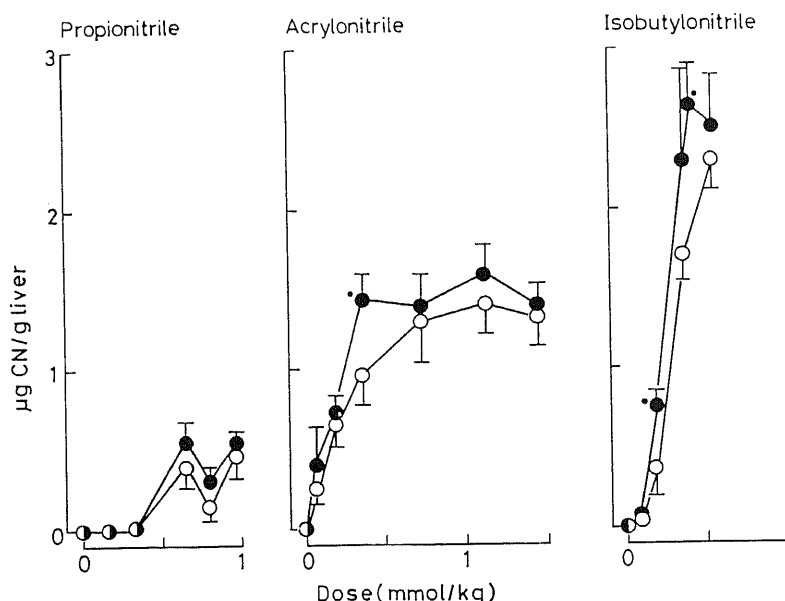


Fig. 4. Dose dependent cyanide liberation in the liver of mice after dosing with nitriles. Thirteen hours prior to nitrile dosing, mice were given orally either ethanol (●) or glucose (○), and they were orally dosed with the nitrile at the indicated level. Livers of animals were homogenized and assayed for cyanide concentration as described in Materials and Method. Each value represents the mean $\pm$ S.D. of three animals. * $P < 0.05$ vs controls.

Table 6. Inhibition constant of ethanol for the metabolism of the nitriles

Compound	Ki (mM)
Acetonitrile	— ^a
Propionitrile	0.5
3-Hydroxypropionitrile	2.1
3-Chloropropionitrile	2.5
Acrylonitrile	1.8
Methacrylonitrile	6.8
n-Butyronitrile	7.0
Isobutyronitrile	2.0
Allylnitrile	3.9
4-Chlorobutyronitrile	5.8
2-Methylbutyronitrile	9.0
Phenylacetoneitrile	Not inhibited
3-Phenylpropionitrile	Not inhibited
Chloroacetoneitrile	2.2
n-Valeronitrile	1.7
Isovaleronitrile	— ^b
n-Capronitrile	22
Isocapronitrile	Not inhibited
Caprylonitrile	Slightly inhibited
Pelargononitrile	Slightly inhibited

^a The metabolic rate was too small to be determined precisely.

^b The double-reciprocal plot with isovaleronitrile revealed a nonlinear relation.

められる程度であった。イソバレロニトリルについては、Dixon plotが直線を示さず基質を 0.4 mM とした場合、エタノールを 40 mM まで添加しても阻害されずむしろ酵素の活性化が認められた。

IX. エタノール投与による肝ミクロソームの P-450 の変動

エタノールによるニトリルの代謝活性化がミクロソームの P-450 の誘導によるものか明らかにするため、マウスにエタノール (4 g/kg) を投与して 13 時間後の P-450 量を対照と比較した。対照 (グルコース, 7 g/kg) では 0.955 ± 0.160 ($\bar{X} \pm \text{S.D.}$) ($n=4$) nmol/mg protein であったのに対し、エタノール処理した場合、 0.873 ± 0.094 ($n=4$) nmol/mg protein であり有意差はなかった。

考 察

今回用いたニトリルはベンゾニトリルを除いてすべてが肝薬物代謝酵素で代謝されシアンが遊離した。ニトリルからのシアン遊離の代謝経路についてはすでに 2~3 の仮説が提出されている⁵⁾²⁸⁾。それによれば飽和脂肪族ニトリルは α 炭素が酵素的に水酸化されてシアンヒドリンとなるが、この中間体は不安定なため非酵素的にアルデヒドとシアンに分解する。 α, β -飽和脂肪族ニトリルは酵素的に酸素添加されエポキシドとな

り、シアンヒドリンを経由してシアンが遊離される。 β 、 γ -不飽和脂肪族ニトリルは α 炭素が水酸化されてシアンヒドリンとなり同様にしてシアンが遊離されるなどである。本研究に用いたニトリルにはこの他に芳香族があるが、フェニルアセトニトリルと3-フェニルプロピオニトリルはおそらく α 炭素が水酸化されて以後同様にしてシアンが遊離されると考えられる。ベンゾニトリルはベンゼン環とシアノ基の間に直鎖の炭素がないので水酸化、すなわちシアンヒドリン形成がないと考えられ、そのためにシアンが遊離しないものと考えられる。表2の結果から明かなように、四塩化炭素前処理の致死率への影響はニトリルにより異っていた。このことは毒作用機序がすべてのニトリルで同じではないことを示している。この結果からニトリル類を3つに分類した。Willhiteら⁹⁾が既に大脳内シアン量が中枢の呼吸停止の急性作用と深くかかわっていることを示しているので、ニトリルを投与したマウスの大脳内シアン量を死亡時と投与5.5時間後に測定した。高濃度のシアンがグループ1のニトリルを投与したマウスの死亡時に検出された。大脳内シアン量を四塩化炭素前処理により低く抑えると、動物は生存したままであった。一方グループ2のニトリルを投与したマウスの大脳内シアン量は動物の生死にかわりなく少なかった。しかしクロロアセトニトリルの場合、高濃度のシアンが検出された。クロロアセトニトリルを除いたグループ2のニトリルについては、グループ1ほど四塩化炭素による致死率軽減効果がなかった。これらの結果からニトリルの急性毒性には2つの機序が存在することが示唆される。つまり、グループ1にみられるように毒性が主としてニトリルから遊離したシアンにより発現される場合とn-パレロニトリルやn-カプロニトリルで代表されるグループ2でみられるように毒性が主にニトリル自体によって発現される場合である。クロロアセトニトリルの毒作用は上記2つの機序によると考えられる。このような違いが種々のニトリルを投与したマウスの致死率に反映するものと考えられる。

四塩化炭素は肝ミクロソームの薬物代謝酵素を阻害することはよく知られており²⁵⁾²⁷⁾、又、ラットの肝ミクロソームのポリペプチドを選択的に消失させる²⁹⁾。従って四塩化炭素の前処理によるニトリルの致死率の減少や大脳内シアン濃度の減少及び*in vitro*での代謝阻害等はこの物質の上記の薬物代謝酵素阻害作用によって説明できる。肝ミクロソームの薬物代謝酵素の阻害剤であるSKF-525Aと一酸化炭素も*in vitro*でのニトリル代謝を強く阻害した(表4)。これらの阻害剤の効果からもグループ1と2のニトリルはすべて肝

ミクロソームで代謝されることが明らかとなった。

Log (1/LD₅₀) と log P の関係をすべてのニトリルについて散布図として描いた場合、グループ1と2のニトリルは異なった2群にプロットされた(図1)。ニトリル類の物理化学的特性と生物活性との関係では、とくにニトリルの疎水性に注目し、本研究ではこの疎水性をn-オクタノール-水分配係数として表わした。Hanschらの構造活性相関のモデルは活性を分配係数の他に電子的及び立体的因子などで説明する²⁴⁾が、多くの生物活性は主として分配係数で説明されることが知られている³⁰⁾。本研究ではlog (1/LD₅₀) はグループ1に関してはlog Pの2次関数、グループ2についてはlog Pの1次関数として説明された。このことからグループ1ではlog Pは主としてニトリルのシアン遊離を介しての毒性を決定する因子として、グループ2では主にニトリル自体の毒性と関連していることを示している。

エタノール投与により肝薬物代謝酵素の活性が上昇することはすでに報告されている¹⁰⁾¹⁵⁾。それらの研究は主に人間とラットについてなされているが、マウスについては比較的少ない。本研究ではマウスを用いてエタノール1回投与のニトリル代謝への影響を調べた。既にエタノール処理には肝薬物代謝酵素に対して実験条件により、活性化効果又は阻害効果があると指摘¹⁰⁾されているので、まずエタノール投与条件を求めた。エタノール(4g/kg)を投与したとき最大酵素活性は13時間後に現われた(図2)。イソブチロニトリルに限ってはエタノール投与4時間後の酵素活性は対照より低かった。これは後でも述べるようににエタノールにニトリル代謝阻害作用も存在することを示している。エタノール投与量でみると4~5g/kgで最大酵素活性が得られ(図3)、ラットで用いられている量とほぼ等しかった。得られた条件で各ニトリルの*in vitro*での代謝活性化率をみると、各ニトリルで差はなく、1.00~1.83までであった(表5)。又、活性化がそれほど大きくないため、対照と比べて有意差のない場合もあった。しかし、今回の実験条件では少なくともニトリルはエタノール前処理により代謝活性化される傾向にあると判断された。次にエタノールによるニトリルの*in vivo*での代謝活性化を3種のニトリルについて調べた(図4)。各ニトリルとも各投与量と比較した場合、常にエタノール処理群で対照より肝内シアン濃度は高かったが、有意差は必ずしもすべてのニトリル投与量で生じなかった。一方、エタノールはニトリルの*in vitro*の代謝を阻害した(表6)が、阻害定数は0.5~22 mMであり、ほとんど阻害をうけないニトリルもあった。この阻害定数の大きさからエタノール

は特に強い阻害剤とは考えられない。事実、エタノール投与後のニトリル代謝の時間経過をみた実験(図2)でも、エタノールが肝内に残存していると考えられる4時間後でみると、イソプロチロニトリル以外はエタノール処理群と対照との間に差はなかった。このエタノールによる阻害は炭化水素を基質とした場合にも認められている¹⁵⁾ことから *in vitro* でのエタノールによる代謝阻害は他の生体異物にもみられるものと考えられる。

エタノールをラットあるいはマウスにくり返し投与すると肝ミクロソームのP-450量が增加することが報告されている³¹⁾が、ラットに1回投与した場合には変化が認められていない¹⁵⁾。マウスを用いた本研究でもエタノールの1回投与では対照と比較して差がなかった。一方エタノールを *in vivo* で投与した場合ニトリルの代謝活性化が認められたことから、何らかの活性化機構があると考えられた。Satoら¹⁴⁾が指摘しているように、エタノールは小胞体の膜環境を変えること、あるいは酵素にすでに結合していると考えられている抑制物質³²⁾を除くことによって酵素を活性化しているのかもしれない。本研究ではエタノールのくり返し投与は試みなかったが、肝ミクロソームのP-450量が増加することから、おそらくニトリルも他の物質同様にして代謝が促進されると考えられる。Waldronら³³⁾は作業中にトルエン暴露された人を調べ、飲酒の習慣のある人の血中トルエン濃度が非飲酒者より非常に低いことを示した。このことから彼らはアルコールのくり返し摂取が肝ミクロソームの薬物代謝酵素を誘導することによりトルエンの代謝を高めたとしている。このことから飲酒の習慣のある人は薬物あるいは毒物の代謝能が高まっていることが推定される。ニトリル類の場合、特にグループ1の急性毒性は生体内で遊離したシアンによるところが大きいので飲酒の習慣のある人が暴露された際に影響は大きいと考えられる。

本研究の結果から、今後毒性未知ニトリルの毒性予測の可能性がひらかれた。すなわち、あらかじめその疎水性(log P)を測定することにより、シアン遊離度の予測を立てることが可能となる。又急性中毒の救急処理法に関しても参考知見が得られた。グループ1に属する化合物については、従来から用いられている、シアン解毒法を中心に行う。グループ2については、シアン対策とともに、他の対症的処置が必要と考えられるが、その実際的方法については今後の研究課題となる。

本研究ではマウスを用いたが、マウスはアクリロニトリルに最も感受性が高い動物種の1つであることが示されている³⁴⁾。しかし最近の研究によれば³⁵⁾、マウス

よりラットの方がシアン遊離の条件が人間に近いとされている。従ってマウスで得られた結果を人間について適用する際には、更に異なった動物種での研究を加えることがより望ましいと考えられる。

結 論

ニトリル類の毒性機序と修飾因子をマウスを用いて調べ、次の結果を得た。

1. ベンゾニトリル以外のすべてのニトリル類でシアンの遊離が認められたが、遊離の程度と四塩化炭素のマウス致死率に与える影響はニトリルにより異なっていた。このことからニトリル類を仮に3つのグループに分類した。グループ1では急性毒性が四塩化炭素処理によって大きく減少した。グループ2では急性毒性が有意に変わらないか若干高まった。グループ3はベンゾニトリルのみで、その急性毒性は明らかに高まった。

2. シアンの量はグループ1を投与したマウスの死亡時に高く、その量はシアン化カリウムで死亡したマウスのそれと差がなかった。

3. ニトリル類の *in vitro* での代謝反応は、肝薬物代謝酵素の阻害剤である四塩化炭素、SKF-525A及び一酸化炭素で阻害された。

4. Log (1/LD₅₀) はグループ1ではlog Pの2次関数として、グループ2では1次関数として表わせた。

5. マウスのニトリル代謝活性はエタノール(4g/kg)を投与して13時間後に最も高かった。

6. 5の条件でエタノール処理したマウスの肝ミクロソームを用いて *in vitro* でニトリル類の代謝速度をグルコース処理した対照と比較したところ、代謝活性化率は1.00~1.83までであった。

7. 5の条件でエタノール処理したマウスを用いて *in vivo* でニトリル類の代謝を調べたところ、3種のニトリル(プロピオニトリル、アクリロニトリル、イソプロチロニトリル)で代謝促進がみられたが対照と比べてその促進は必ずしも有意でない場合もあった。

8. エタノールを *in vitro* のニトリル代謝系に直接加えたところ阻害作用が認められた。その阻害定数は0.5~22 mMであり、ほとんど阻害されないニトリルもあった。

9. 5の条件でエタノール処理したマウスの肝ミクロソームP-450量を調べたが、対照と比較して有意差はなかった。

謝 辞

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました橋本和夫教授に深く感謝いたします。本論文の一部の要旨はSymposium

sium QSAR in Toxicology and Xenobiochemistry (Praha, September 12-14, 1984) において発表した。

文 献

- 1) Hartung, O. R. : Cyanides and nitriles, p4845-4900. In G. D. Clayton & F. E. Clayton (ed.), Patty's Industrial Hygiene and Toxicology, Wiley-Interscience Publication, New York, 1982.
- 2) Brieger, H., Rieders, F. & Hodes, W. A. : Acrylonitrile: Spectrophotometric determination, acute toxicity, and mechanism of action. Arch. Ind. Hyg., **6**, 128-140 (1952).
- 3) Zeller von H. & Hofmann, HTh. : Zur Toxizität der Nitrile. Zentralbl. Arbeitsmed. Arbeitsschuts. Prophyl., **19**, 225-238 (1969).
- 4) Gut, I., Nerudová, J., Kopecký, J. & Holecek, V. : Acrylonitrile biotransformation in rats, mice, and chinese hamsters as influenced by the route of administration and by phenobarbital, SKF-525A, cysteine, dimercaprol, or thiosulphate. Arch. Toxicol., **33**, 151-161 (1975).
- 5) Silver, E. H., Kuttub, S. H., Hasan, T. & Hassan, M. : Structural considerations in the metabolism of nitriles to cyanide in vivo. Drug Metab. Dispos., **10**, 495-498 (1982).
- 6) Paulet, G., Desnos, J. & Batting, J. : L'acrylonitrile, toxicité-mécanisme d'action, thérapeutique. Arch. Int. Pharmacodyn., **131**, 54-83 (1961).
- 7) Hashimoto, K. & Kanai, R. : Studies on the toxicology of acrylonitrile metabolism, mode of action and therapy. Ind. Health, **3**, 30-46 (1965).
- 8) NIOSH, National Institute for Occupational Safety and Health Criteria and recommended standard for nitriles, U. S. Dept. Health, Education and Welfare, Center for Disease Control, U. S. Govt. Printing Office, Washington DC, 1978.
- 9) Willhite, C. C. & Smith, R. P. : The role of cyanide liberation in the acute toxicity of aliphatic nitriles. Toxicol. Appl. Pharmacol., **59**, 589-602 (1981).
- 10) Rubin, E. & Lieber, C. S. : Hepatic microsomal enzymes in man and in rat: Induction and inhibition by ethanol. Science, **162**, 690-691 (1968).
- 11) Ariyoshi, T., Takabatake, E. & Remmer, H. : Drug metabolism in ethanol induced fatty liver. Life Sci., **9**, 361-369 (1970).
- 12) Ishii, H., Joly, J.-G. & Lieber, C. S. : Effect of ethanol on the amount and enzyme activities of hepatic rough and smooth microsomal membranes. Biochem. Biophys. Acta, **291**, 411-420 (1973).
- 13) Khanna, J. M., Kalant, H., Yee, Y., Chung, S. & Siemens, A. J. : Effect of chronic ethanol treatment on metabolism of drugs in vitro and in vivo. Biochem. Pharmacol., **25**, 329-335 (1976).
- 14) Sato, A., Nakajima, T. & 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).
- 15) Sato, A., Nakajima, T. & Koyama, T. : 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).
- 16) Tanii, H. & Hashimoto, K. : Structure-toxicity relationship of acrylates and methacrylates. Toxicol. Lett., **11**, 125-129 (1982).
- 17) Weil, C. S. : Tables for convenient calculation of median effective dose (LD_{50} or ED_{50}) and instructions in their use. Biometrics, **8**, 249-263 (1952).
- 18) Bruce, R. B., Howard, J. W. & Hanzal, R. F. : Determination of cyanide, thiocyanate, and alpha-hydroxynitriles in plasma or serum. Anal. Chem., **27**, 1346-1347 (1955).
- 19) Epstein, J. : Estimation of microquantities of cyanide. Anal. Chem., **19**, 272-274 (1947).
- 20) Tanii, H. & Hashimoto, K. : Studies on in vitro metabolism of acrylamide and related compounds. Arch. Toxicol., **48**, 157-166 (1981).
- 21) Omura, T. & Sato, R. : The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. J. Biol. Chem., **239**, 2370-2378 (1964).
- 22) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., **193**, 265-275 (1951).
- 23) Armitage, P. : Statistical methods in medical research. Blackwell Scientific Publ., Oxford Edinburgh, 1971.
- 24) Hansch, C. & Fujita, T. : ρ - σ - π -Analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure. J. Am. Chem. Soc., **86**, 1616-1626 (1969).

metabolism was inhibited when the incubation mixture contained either SKF-525A, carbon monoxide or microsomes from mice treated with carbon tetrachloride. When mice were dosed with ethanol, metabolic enhancement of nitriles was seen compared with the control. However, ethanol, when added to the incubation mixture, inhibited the *in vitro* metabolism of nitriles.