

肝デヒドロゲナーゼを介する  
カルボキシルエステラーゼの  
リン酸化機構に関する研究

1985年

梶山 静 優

# 目 次

緒 言	1
第 1 編 有機リン化合物によるカルボキシルエステラーゼ阻害 と肝可溶性画分添加の影響	6
第 1 章 種々の前処理ラット肝可溶性画分添加の影響	
1-1-1 絶食、非絶食ラットの肝可溶性画分添加の検討	7
1-1-2 NADおよびその類似体投与ラットの肝可溶性画分 添加の検討	11
1-1-3 NADおよびその類似体添加時のカルボキシルエス テラーゼ活性の検討	12
第 2 章 肝可溶性画分添加によるカルボキシルエステラーゼ の有機リン化合物による阻害の増強作用に対する薬 物代謝酵素系の関与	
1-2-1 ラット肝可溶性画分中のピリジンヌクレオチド量の 検討	14
1-2-2 可溶性画分添加時の肝ミクロゾーム薬物代謝酵素活 性の検討	15
1-2-3 可溶性画分添加時のEPNoxon生成の検討	18
第 3 章 考 察	20
第 2 編 6-アミノニコチンアミドの肝ミクロゾーム薬物代謝 への影響	23
第 1 章 アミノピリンおよびヘキソバルビタール代謝におよ ぼす6-アミノニコチンアミドの影響	
2-1-1 アミノピリンの血中濃度に関する検討	24

2-1-2	ヘキソバルビタールの血中濃度に関する検討	29
2-1-3	ヘキソバルビタールの睡眠時間に関する検討	32
第 2 章	6-アミノニコチンアミド投与ラット肝ミクロゾーム 薬物代謝酵素系の検討	
2-2-1	薬物代謝酵素活性の検討	34
2-2-2	ミクロゾーム電子伝達系への影響の検討	35
2-2-3	アミノピリンの代謝反応速度に関する検討	37
第 3 章	考 察	39
第 3 編	有機リン化合物によるカルボキシルエステラーゼ阻害 と NAD 添加の影響	42
第 1 章	NAD 添加時にみられる有機リン化合物によるカル ボキシルエステラーゼの阻害増強作用	
3-1-1	カルボキシルエステラーゼとコリンエステラーゼの 有機リン化合物、EPN による阻害と NAD 添加の 影響	43
3-1-2	種々の有機リン化合物によるカルボキシルエステラ ーゼ阻害と NAD 添加の影響	45
3-1-3	精製カルボキシルエステラーゼに関する検討	50
第 2 章	EPN によるカルボキシルエステラーゼ阻害の NAD による増強作用におよぼす肝ミクロゾーム前処理の 影響	
3-2-1	加熱の影響	51
3-2-2	コール酸による可溶化の影響	52
3-2-3	透析の影響	53
3-2-4	NADase 添加の影響	54
3-2-5	セリン酵素阻害剤の影響	56
3-2-6	SH 基阻害剤による影響	57

第 3 章	EPN <sub>oxon</sub> の生成およびカルボキシルエステラーゼ と EPN あるいは NAD との結合	
3-3-1	NAD 添加による EPN <sub>oxon</sub> 生成の検討	60
3-3-2	カルボキシルエステラーゼと EPN との結合におよぼ す NAD (P) 添加の検討	61
3-3-3	カルボキシルエステラーゼと EPN との結合におよぼ す SH 基阻害剤添加の検討	63
3-3-4	カルボキシルエステラーゼと NAD との結合の検討	64
第 4 章	考 察	66
第 4 編	有機リン化合物によるカルボキシルエステラーゼ阻害 の NAD による阻害増強作用 (“NAD-効果”) に関 する作用機序の検討	69
第 1 章	肝ミクロゾーム内在性デヒドロゲナーゼの関与	
4-1-1	NAD 類似体による “NAD-効果” とそれらの補酵 素能との関連性	70
4-1-2	NEM によるデヒドロゲナーゼ阻害と “NAD-効果” および EPN <sub>oxon</sub> 生成との関係	73
4-1-3	ジスルフィラム添加の “NAD-効果” に与える影響	75
4-1-4	NAD (H) によるカルボキシルエステラーゼ阻害増強 作用におよぼすデヒドロゲナーゼの基質添加の影響	76
第 2 章	“NAD-効果” への肝ミクロゾームチトクローム P-450 の関与	
4-2-1	SKF 525-A 添加の検討	77
4-2-2	KSCN によるチトクローム P-450 量の減少と “NAD-効果” との関係	78
4-2-3	NAD (H) および NADP (H) 添加による EPN <sub>oxon</sub> 生成の検討	80

第 3 章 考 察.....	81
総 括.....	85
謝 辞.....	86
掲載雑誌目録.....	87
参考文献 .....	89

## 結 言

近年、エステル結合 ( $-CO-O-$ ) およびアミド結合 ( $-CO-NH-$ ) を有する薬物 (医薬、農薬など)、例えばプロドラックの開発が活発となり当該物質の代謝、薬効、毒性などを評価する上で、エステラーゼは重要な役割を演じている。エステラーゼの関与する薬物代謝の研究として、古くはプロカイン (Kisch et al., 1943)、数種のカルボン酸アミドのカルバミルグループ (Bay et al., 1949)、抗うつ薬であるインカルボキサジド (ISOC) (Schwartz, 1960; 1961a; 1961b) などがあり、最近ではアセトアニリド (Haugen and Sutti, 1974; Arndt et al., 1978)、オキサゼパムエステル類 (Maksay et al., 1978)、ステロイドホルモン (Oshima et al., 1980)、クロラムフェニコール (Vining, 1975; Kuhn and Heymann, 1982)、および脂質代謝 (Mentlein et al., 1984)、などに関する報告がある。これらの薬物は代謝される事により、例えばアトロピン (Moog and Krisch, 1974; Ammon, 1977) や、プロカイン (Cohen and Orzech, 1976; 1977; Satoh and Moroi, 1977) はその薬理活性を失い、一方フェナセチン (Bernhammer and Krisch, 1965)、ISOC (Schwartz, 1961a; 1961b; Green, 1964) は活性化される。これらの加水分解反応の結果として、多くの薬物は解毒、排泄への代謝となるものの、フェナセチンではメトヘモグロビン血症の増加 (Heymann et al., 1969)、プロカインではアレルギー反応の発生 (Heymann, 1982) となる事も知られている。またプロドラックであるピバアンピシリンはアンピシリンに加水分解 (Heymann, 1982) され薬効を発し、更に、種々の炭素鎖によりエステル化したサリチル酸誘導体を、サリチル酸のプロドラックとする研究 (Inoue et al., 1979b) もエステラーゼとの関連で行われている。

薬物のエステル結合とアミド結合を区別してそれぞれ特異的に加水分解する酵素は極めて少なく、今日、エステラーゼとアミダーゼの間では厳密な区別がなされていない。従って、本研究においてもエステラーゼ/アミダーゼとして両者を包括し、非特異的エステラーゼとして扱う事とした。基質特異

性の低いこのエステラーゼは、その局在部位および基質特異性に基づいて、コリンエステラーゼ (ChE) とカルボキシルエステラーゼ (CEase) の2つに大別される。Aldridge (1953) は、このエステラーゼを有機リン化合物であるパラオキソンによる阻害に基づき、有機リン化合物を基質とし加水分解するA-エステラーゼと、有機リン化合物により顕著に阻害されるB-エステラーゼに分類し、その後、Bergmann et al. (1957) は、有機リン化合物を加水分解せず、阻害もされないC-エステラーゼを追加した (Table 1)。

Table 1 エステラーゼのタイプの分類の基準

エステラーゼのタイプ	paraoxon との関係	4-chloromercuribenzoate またはHg <sup>2+</sup>	基質選好性
A-エステラーゼ (アシルエステラーゼ、aryl- esterases)	基質	阻害剤	芳香族エステル
B-エステラーゼ (カルボキシルエステラーゼ、 carboxylesterases)	阻害剤	影響なし	脂肪族エステル
C-エステラーゼ (アセチルエステラーゼ、acetyl- esterases)	影響なし	活性化剤	アセチルエステル

本研究で扱うカルボキシルエステル、カルボキシルアミドおよびカルボキシルチオエステルの加水分解を触媒する非特異的CEase (E. C. 3. 1. 1. 1) (Heymann, 1982) は、この分類におけるB-エステラーゼの総称であり、多くの哺乳類の組織に分布している。中でも肝臓における活性が最も高く (Junge and Krisch, 1975; Moroi and Satoh, 1975; Moroi and Kuga, 1980)、その他、腎臓 (Krisch, 1971; Ecobichon, 1973; Böcking et

al., 1976)、腸管(Kamat and Pore, 1972; Fukuda et al., 1978; Inoue et al., 1979)および脂肪組織(Tsujita et al., 1982)、更に、脳(Eto and Suzuki, 1973)および血清(Choudhury, 1976)にも存在する。また、肝細胞内の分布は主にミクロゾーム(Ms)膜結合の状態が存在し、以下、ミトコンドリア、リソゾーム、核の順に多く、可溶性画分(Cytosol)にはほとんど存在しない(Moroi and Satoh, 1975; Böcking et al., 1976; Fukuda et al., 1978; Moroi and Kuga, 1980)。CEaseはその活性中心にリン酸化されるセリンを有する酵素の1つであり(Augnstejn et al., 1969; Krisch, 1971; Dudman and Zerner, 1976; Heymann, 1980; Mentlein et al., 1984)、その分子量は18万(Junge et al., 1974)~21万(Satoh and Moroi, 1972)であると報告されている。肝Msに存在するCEaseが、フェノバルビタール(Satoh and Moroi, 1973a; Raftell et al., 1977)やDDT(Sonawane and Knowles, 1972)により酵素誘導される事、および3-メチルコランスレン(Raftell et al., 1977)では誘導されない事はすでに知られている事であるが、最近、Nousiainen et al. (1984)は、発癌物質であるベンツ(a)アントラセン、ベンツ(a)ピレンおよび3-メチルコランスレンが、肝Msではなく、肝Cytosolにわずかに存在するCEaseを誘導し、その誘導が発癌性の強さに相関するとも報告しており、この分野におけるCEaseの役割も興味深い。

一方、有機リン化合物がChEの強力な阻害剤である事は周知の事であるが、このChEよりCEaseは有機リン化合物に対してさらに感受性が高く(DuBois et al., 1968; Su et al., 1971; Chen et al., 1972; Murphy and Cheever, 1972; Satoh, 1973; Satoh and Moroi, 1973b; Moroi and Kuga, 1982)、有機リン化合物がChEと反応する前にCEaseは有機リン化合物と非可逆的に結合し、スカベンジャーとして作用し、それらを取除く(Fonnum and Sterri, 1981)薬物結合蛋白としての役割りのある事も知られている。この事実は、エステル結合を含む異物の毒性を検索する上でCEase活性を指標とする事の有用性を示している。

本研究は、エステラーゼの生化学並びに薬理学研究の一環として実施され



たもので、肝 Ms CEase の有機リン化合物による阻害と、その阻害におよぼす肝 Cytosol や NAD を主とする種々の補酵素添加の影響、およびその作用発現の詳細な機序を知る事を目的として実施したものである。

ここで行った研究内容は、次の 5 項目に要約する事が出来る。

1) 有機リン化合物の 1 種である O-エチル O-パラ-ニトロフェニル フェニルフォスフォノチオエイト (EPN) による CEase 阻害に対する肝 Cytosol 添加の影響、およびその影響の作用機序を知る目的で、絶食並びに非絶食ラット肝 Cytosol や、種々のピリジンヌクレオチド類似体を投与したラット肝 Cytosol 添加の影響を検討した。

また、Cytosol 中のピリジンヌクレオチド量、Ms 薬物代謝酵素活性、更に、インキュベーション混液中での EPN oxon 生成量なども検討した。

2) ピリジンヌクレオチド拮抗物質として知られている 6-アミノニコチンアミド (6-AN) 投与のラット肝 Cytosol 添加により CEase の EPN による阻害が増強された事から、6-AN の薬物代謝酵素系への影響を知る目的で、6-AN 投与時のアミノピリンおよびヘキソバルビタールのラット血中濃度および肝薬物代謝酵素活性の変動などを検討した。

3) 次に、有機リン化合物による CEase 阻害に対する NAD の作用に注目し、まず種々の有機リン化合物による CEase と ChE 阻害の構造活性相関を検討し、更に、NAD 添加の影響、Oxon 体の生成などについても検討を加えた。

4) その結果、CEase の有機リン化合物による阻害が NAD 添加により増強された事から、更に、CEase と EPN との結合、および SH 基阻害剤添加の影響などについて検討し、また、酵素材料として用いた Ms に対する種々の前処理の影響についても検討を加えた。

5) NAD 添加時に見られる CEase の有機リン化合物による阻害の増強に、肝 Ms 内在性デヒドロゲナーゼの関与が考えられた。そこで、種々のピリジンヌクレオチド類似体のデヒドロゲナーゼに対する補酵素能および Oxon 体の生成、チトクローム P-450 の関与などについて検討を加え、最後に、EPN の CEase 阻害に対する NAD による阻害増強作用について

の作用機序を検討した。

# 第1編 有機リン化合物によるカルボキシエステラーゼ阻害と肝可溶性画分添加の影響

既述の通り、カルボキシエステラーゼ (CEase) (E.C.3.1.1.1) は、エステル結合やアミド結合を加水分解する基質特異性の低い酵素である。本酵素の基質としては、緒言で述べた化合物以外にトリアセチン (Murphy and Cheever, 1972)、プロパニド (Junge and Krisch, 1975)、 $\alpha$  ( $\beta$ )-ナフチルアミド (Kaneko et al., 1979)、なども広く用いられている。本編では、モノアミノオキシダーゼの阻害剤であり、その主代謝物であるベンジルヒドラジン (BZH) が母化合物より更に強い薬理活性を有するイソカルボキサジド (ISOC) (Randall and Bagdon, 1959; Schwartz, 1961a; 1961b; Koechlin et al., 1962; Green, 1964) を、CEase の基質として用いた。

ISOC (1-ベンジル-2-[5-メチル-3-イソキサゾリルカルボニル]ヒドラジン, Marplan<sup>®</sup>) は、イプロニアジド (Marsilid<sup>®</sup>) より強いモノアミノオキシダーゼ阻害剤として Hoffmann La Roche 社より発売された抗うつ薬で、狭心症の管理にも用いられている (Schwartz, 1960; 1961a; 1961b; Koechlin et al., 1962)。Fig. 1-1 に ISOC と、その代謝物 BZH の構造式を示す。

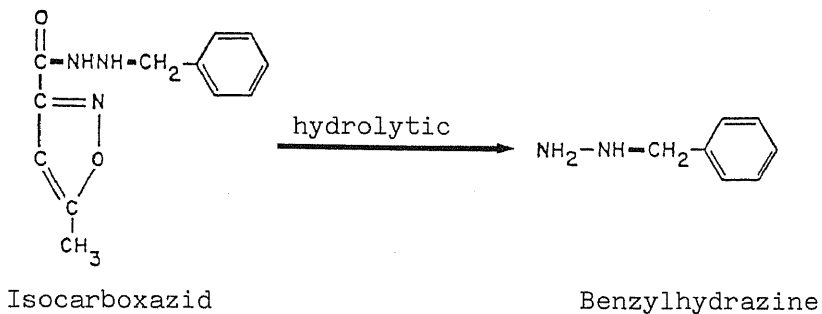


Fig. 1-1 Chemical structure of isocarboxazid and its metabolite

本編では、有機リン系殺虫剤の1つであるO-エチル O-パラ-ニトロフェニル フェニルフォスフォノチオエイト (EPN) (Durham et al., 1956 ; Hoffman and Sileo, 1984) (Fig. 1-2) によるミクロゾーム (Ms) CEase 活性阻害について、肝可溶性画分 (Cytosol) の影響を知る目的で、供餌条件の異なったラットを用いて検討した。また6-アミノニコチンアミド (6-AN) など、種々のピリジンヌクレオチド類似体投与による影響についても検討を加えた。

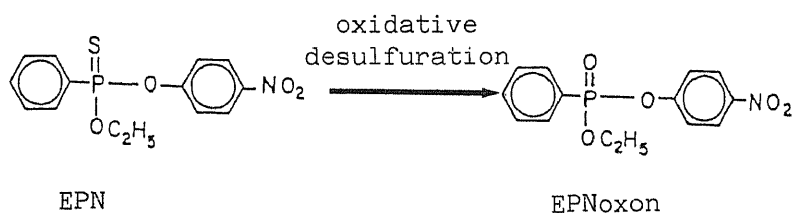


Fig. 1-2 Chemical structure of EPN and EPNoxon

## 第1章 種々の前処理ラット肝可溶性画分添加の影響

### 1-1-1 絶食、非絶食ラットの肝可溶性画分添加の影響

#### <実験方法>

本実験では、体重200-250gのWistar系雄性ラットを使用した。飼料はオリエンタル酵母製、MFを与え、飲料水は水道水を摂取させた。絶食は実験前日夕方より16時間とし、水は自由摂取とした。飼育は23~25℃、定時照明(8:00-19:00)の恒温室内で行い、少なくとも1週間の予備飼育の後、実験に供した。

肝MsおよびCytosolの調製は、ラットを頸動脈切断にて瀉血し、開腹後速やかに下大静脈にカニューレを挿入し、1.15%KCl溶液で肝臓を灌流脱血し、摘出した。肝臓は2倍量の冷1.15%KCl溶液を加え、テフロンベスツ

ル付ポッター型ホモジナイザーでホモジナイズした。得られたホモジネートを、 $9,000 \times g$ 、 $4^\circ\text{C}$ 、20分間遠心分離し、上清画分をさらに  $105,000 \times g$ 、 $4^\circ\text{C}$ 、60分間超遠心分離を行った。得られた上清 (Cytosol) は直ちに  $-70^\circ\text{C}$  に保存し、Ms はグリコーゲンペレットと分離した後、冷 1.15% KCl 溶液にて洗浄し、再遠心分離後、適当量の 1.15% KCl 溶液に懸濁し、 $-70^\circ\text{C}$  に保存した。Ms および Cytosol は、調製後 6 日以内に使用する事とした。

Ms および Cytosol の蛋白定量は、牛血清アルブミンを標準品とし、Lowry et al. (1951) の方法に従って行った。

Ms CEase 活性測定は、Sato and Moroi (1970; 1975) の方法に従い、基質である ISOC (Hoffmann La Roche) より生成した BZH をエールリッヒ試薬で発色後、分光光度計 ( $495\text{ nm}$ ) にて行った。また活性測定用混液は、Ms 懸濁液 (蛋白量約  $3\text{ mg}$ )  $0.5\text{ ml}$ 、EPN 溶液 (最終濃度  $1 \times 10^{-5}\text{ M}$ ) (和光純薬) または  $0.2\text{ M}$  トリス-塩酸 緩衝液 ( $\text{pH } 8.0$ )  $0.25\text{ ml}$  および Cytosol (蛋白量約  $10\text{ mg}$ ) または 1.15% KCl 溶液  $0.5\text{ ml}$  であり、 $37^\circ\text{C}$ 、10分間プレインキュベーションし、その後、基質として ISOC (最終濃度  $1\text{ mM}$ )  $0.25\text{ ml}$  を加え全量  $1.5\text{ ml}$  とし、 $37^\circ\text{C}$ 、30分間反応を続けた。以上の CEase 活性測定法を、Fig. 1-3 にまとめた。

有機リン化合物として用いた EPN は、エタノール：プロピレングリコール (1:8) にて  $10\text{ mM}$  溶液とし、用時  $0.2\text{ M}$  トリス-塩酸 緩衝液 ( $\text{pH } 8.0$ ) にて希釈して用いた。

Table 1-1 に、予試験として実施した EPN による CEase の阻害率を示す。この結果より本研究における EPN 添加濃度は、今後、特に記載しない限り最終濃度  $1 \times 10^{-5}\text{ M}$  とした。

Incubation mixture		
Microsomes in 1.15% KCl soln.	0.5 ml	(1-3 mg prot.)
EPN or Buffer*	0.25 ml	( $1 \times 10^{-5}$ M )
Cytosol or 1.15% KCl soln.	0.25 ml	(10 mg prot.)
Preincubation 37°C, 10 min.		
Isocarboxazid in buffer*	0.5 ml	(1 mM )
Incubation 37°C, 30 min.		

\*0.2 M Tris-HCl buffer (pH 8.0)      -15% Metaphosphoric acid 2 ml

Sup. 2 ml      ppt.

p-Dimethylaminobenzaldehyde 1.5 ml  
(Ehrlich reagent)

Stand for 30 min at room temp.

Measured on spectrophotometer at 495 nm.

Carboxylesterase activity was shown as nmoles benzylhydrazine (BZH) formed/mg protein/30 min.

Fig. 1-3 Assay procedure of carboxylesterase activity

Table 1-1

Effect of EPN on rat liver microsomal carboxylesterase activity in vitro

EPN Conc. (M)	Carboxylesterase activity (nmoles BZH/mg protein/30 min)	% of control
None	46.4 ± 4.8	100
$5 \times 10^{-6}$	44.6 ± 5.2	96.1
$1 \times 10^{-5}$	44.0 ± 4.9	94.8
$5 \times 10^{-5}$	36.9 ± 4.2	79.5
$1 \times 10^{-4}$	28.9 ± 3.8	62.3
$5 \times 10^{-4}$	6.9 ± 1.4	14.9
$1 \times 10^{-3}$	4.9 ± 0.6	10.6

The incubation mixture consisting of 3-5 mg protein of the microsomal pellet,  $5 \times 10^{-6}$ M -  $1 \times 10^{-3}$  M of EPN and 1 mM of isocarboxazid as a substrate in 0.2 M Tris-HCl buffer (pH8.0) was incubated at 37°C for 30 min. Each value is the mean ± S.E. from three experiments.

<実験結果>

Table 1-2 は、EPN による CEase 活性阻害に対する絶食、非絶食ラット肝 Cytosol 添加の影響を示している。

EPN ( $1 \times 10^{-5}$  M) 添加で、正常活性の約 89 % となった CEase は、それに非絶食 Cytosol を添加する事により約 9 % の活性値となり、EPN による CEase 活性阻害が著るしく増強された。一方、絶食 Cytosol 添加では、この阻害増強作用は認められなかった。

Table 1-2

Effects of rat liver cytosol on EPN-induced inhibition of liver microsomal carboxylesterase		
EPN	Cytosol added	Carboxylesterase activity
-	—	63.7 ± 3.5
+	—	56.6 ± 3.5
-	non-treated, fed	66.9 ± 11.8
+	non-treated, fed	5.8 ± 0.5*
+	non-treated, starved <sup>1)</sup>	62.0 ± 3.5

Carboxylesterase activity is shown as nmoles benzyhydrazine formed/mg protein/30 min. 1) Rats were starved for 16 hr prior to sacrifice, and cytosol was prepared. The incubation mixture consisting of 2-3 mg protein of the microsomal pellet,  $1 \times 10^{-5}$  M of EPN, 0.5 ml of cytosol (protein approx. 10 mg) and 1 mM of isocarboxazid as substrate in 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) was incubated at 37°C for 30 min following 10 min-preincubation in the absence of isocarboxazid. Each value is the mean ± S.E. from 7-8 experiments. \*P < 0.01 vs. the EPN alone group.

## 1-1-2 NAD およびその類似体投与ラットの肝可溶性画分添加の検討

### <実験方法>

使用動物、飼育法、Ms および Cytosol 調製法、CEase 活性測定法は、1-1-1 に従って行った。6-AN (Sigma) は生理食塩水に加熱溶解し、ニコチンアミド (N.A、和光純薬) および  $\beta$ -NAD (NAD、Sigma) は生理食塩水に溶解し、それぞれ等モルとなる様、即ち、15 mg/kg、60 mg/kg および 73 mg/kg を、いずれも犠殺 16 時間前 (絶食開始時) に腹腔内注射した。

### <実験結果>

Table 1-3 は、EPN による CEase 活性阻害に対する NAD およびその類似体投与ラット肝 Cytosol 添加の影響を示している。

1-1-1 で示した絶食ラット肝 Cytosol 添加では認められなかった CEase 活性の阻害増強作用は、6-AN 投与絶食ラット肝 Cytosol の添加により、正常値の約 9% の活性となり阻害増強が認められた。一方、その増強は NAD および N.A 投与では見られなかった。



Table 1-3  
Effects of liver cytosol of rat administered N.A,  
6-AN and NAD on EPN-induced inhibition of liver  
microsomal carboxylesterase

Addition	Carboxylesterase Activity
None	63.7 ± 3.5
+ EPN	56.6 ± 3.5
+ EPN + Starved Cytosol (N.A.)	70.2 ± 2.0
+ EPN + Starved Cytosol (6-AN.)	5.6 ± 0.4*
+ EPN + Starved Cytosol (NAD)	72.6 ± 9.4

Carboxylesterase activity was shown as nmoles BZH formed/mg protein/30 min. N.A:nicotinamide(60 mg/kg, i.p.), 6-AN:6-aminonicotinamide(15 mg/kg, i.p.), NAD(73 mg/kg, i.p.). Each value is the mean ± S.E. from five experiments. \*p < 0.01 vs. the none addition group.

### 1-1-3 NADおよびその類似体添加時のカルボキシルエステラーゼ活性の検討

#### <実験方法>

使用動物、飼育法、Ms 調製法およびCEase 活性測定方法は、1-1-1に従って行った。CEase 活性測定用混液は、1-1-1におけるCytosolの代わりにNADおよびその類似体 0.5 mlを添加した。NAD、6-AN、N.A、ATP(和光純薬)およびD-リボース-5-リン酸(Sigma)は、所定の濃度となる様に水に溶解し、活性測定用混液にプレインキュベーション時に添加した。

#### <実験結果>

Fig. 1-4は、EPNによるCEase 活性阻害に対するNADおよびその類似体添加の影響を示している。

NADの $5 \times 10^{-6}$  M添加でCEaseの阻害増強が認められ、 $1 \times 10^{-4}$  Mではプラトーとなった。一方、6-AN、N.A、ATPおよびD-リボース-5-リン酸の添加ではその作用は認められず、特にNADと6-ANの結果は、1-1-2の成績と異なっていた。

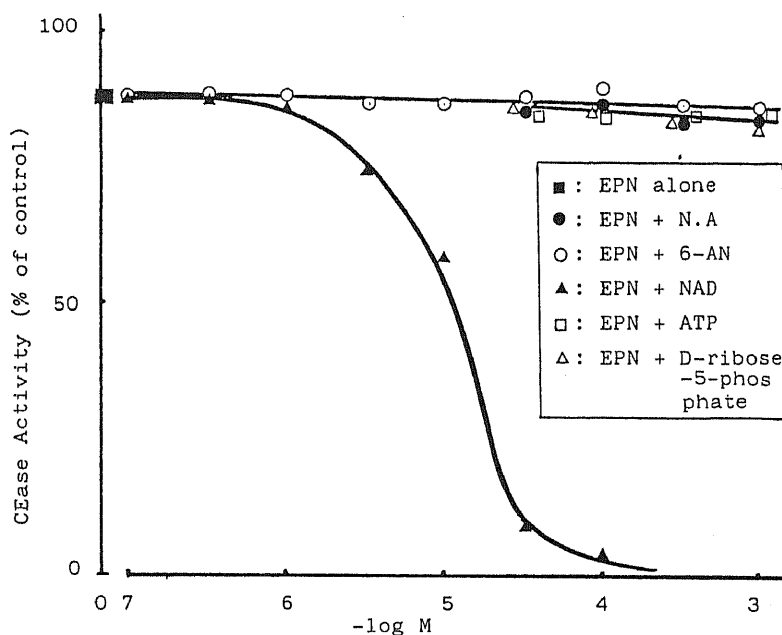


Fig. 1-4 Concentrations of N.A, 6-AN, NAD, ATP and D-ribose-5-phosphate

Effects of N.A, 6-AN, NAD, ATP and D-ribose-5-phosphate on EPN-induced inhibition of liver microsomal carboxylesterase activity

The incubation mixture consisting of 3 mg protein of the microsomal pellet,  $1 \times 10^{-5}$  M of EPN,  $1 \times 10^{-7}$  M -  $1 \times 10^{-3}$  M of nicotinamide(N.A), 6-aminonicotinamide (6-AN), NAD ATP and D-ribose-5-phosphate and 1 mM of isocarboxazid as substrate in 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) was incubated at 37°C for 30 min following 10 min-preincubation in the absence of substrate.

## 第2章 肝可溶性画分添加によるカルボキシルエステラーゼの有機リン化合物による阻害の増強作用に対する薬物代謝酵素系の関与

### 1-2-1 ラット肝可溶性画分中のピリジンヌクレオチド量の検討

#### <実験方法>

使用動物およびCytosol調製法は、1-1-1に従って行った。NAD、6-ANおよびN.Aの投与は1-1-2と同様に行い、絶食は犠殺前16時間とした。Cytosol中のピリジンヌクレオチドの抽出および測定は、Klingenberg(1974)の方法で行った。即ち、NAD(P)はHClO<sub>4</sub>抽出し、NAD(P)Hはアルコール/KOH抽出し、NADはエタノールを、NADPはグルコース-6-リン酸(オリエンタル酵母)を基質とし、いずれも340nmにおけるNAD(P)Hの生成量を測定した。また、NAD(P)Hは、グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(Boehringer Mannheim)あるいは、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(Boehringer Mannheim)にて酸化型とした後、NAD(P)と同様に測定した。

#### <実験結果>

Table 1-4は、絶食あるいは非絶食ラット肝Cytosol中のピリジンヌクレオチド量と、N.A、6-ANおよびNAD投与の影響を示している。

肝Cytosol中のピリジンヌクレオチドの内、絶食により減少を認めたのはNADHとNADPHであり、特にNADPHの減少は顕著であった。この減少は6-ANの投与により抑制され、6-ANを投与しない絶食群に比べ約2倍の値を示した。N.AおよびNAD投与では変化はなく、この結果は1-1-2の成績と一致した。

Table 1-4

Effects of nicotinamide, 6-aminonicotinamide and NAD on pyridine nucleotide contents in rat liver cytosol

Pre-treatment	Pyridine nucleotide contents			
	NAD	NADP	NADH	NADPH
None(fed)	8.4 ± 1.2	7.1 ± 1.1	1.8 ± 1.3	22.4 ± 2.7
None(starved)	7.0 ± 0.9	4.8 ± 0.5	0.2 ± 0.2	4.2 ± 0.6**
N.A(starved)	7.0 ± 1.3	3.6 ± 0.8*	0.8 ± 0.4	3.9 ± 1.3**
6-AN(starved)	5.4 ± 0.6*	5.7 ± 1.1	0.5 ± 0.4	9.0 ± 1.6**#
NAD(starved)	6.1 ± 0.6	6.2 ± 0.9	1.1 ± 0.8	6.1 ± 1.3**

Rats were starved and concurrently administered intraperitoneally 60 mg/kg of nicotinamide(N.A), 15 mg/kg of 6-aminonicotinamide (6-AN) and 73 mg/kg of NAD, 16 hr before sacrifice, respectively. Each value is the mean ± S.E. from 7-10 animals. \*p<0.05 and \*\*p<0.01 vs. the non-treated, fed group. #p<0.05 vs. the non-treated, starved group. Pyridine nucleotide contents were shown as nmoles/ml of cytosol.

## 1-2-2 可溶性画分添加時の肝ミクロゾーム薬物代謝酵素活性の検討

### <実験方法>

使用動物、Ms および Cytosol 調製法は、1-1-1 に従って行った。薬物代謝酵素活性は、基質としてアミノピリン (AM, Aldrich Chemical)、エチルモルヒネ (EM、和光純薬) およびアニリン (AN、和光純薬) を用いた。AM および EM N-脱メチル化酵素活性は、酸化的脱メチル化によって生成したホルムアルデヒドを Nash (1953) の方法により、また、AN 水酸化酵素活性は生成した p-アミノフェノールを、Imai et al. (1966) の方法により、それぞれ測定した。これらの活性測定用混液は、Ms 懸濁液 (蛋白量 2-3 mg) 0.1 ml、EPN 溶液 (最終濃度  $1 \times 10^{-5}$  M) 0.25 ml、非絶食ラット肝 Cytosol (蛋白量約 4 mg) または 1.15% KCl 溶液 0.3 ml、SKF 525-A (最終濃度 1 mM) (Smith Kline & French) または水 0.1 ml を、0.2

Mトリス-塩酸 緩衝液 (pH 8.0) にて 0.9 ml とし、37 °C、10 分間 プレイン キュベーションした。その後、各基質 (最終濃度 1 mM) 0.1 ml を加え、全量 1 ml とし、37 °C、15 分間反応させた。なお、本実験は CEase 活性におよぼす Cytosol 添加の影響を、薬物代謝酵素活性の面から検討する事を目的とする事から、至適 pH、緩衝液など、一部同酵素活性測定法 (Nash, 1953; Imai et al., 1966) とは異っている。NADPH-generating system も、比較対照群を除いて加えていない。

### <実験結果>

Table 1-5 は、CEase 活性測定条件下における Ms 薬物代謝酵素活性におよぼす EPN、Cytosol および SKF 525-A 添加の影響を示している。

対照群における AM および EM N-脱メチル化酵素活性および AN 水酸化酵素活性は、それぞれ 0.5、0.6 および 0.0 nmoles / mg protein / 30 min で、いずれも従来報告されている NADPH-generating system が加えられている成績 (Pessayre et al., 1982; Kawabata et al., 1983; Matsubara et al., 1983; Horie et al., 1984) より低い値であった。EPN 添加によるこれら 3 種の酵素活性は変化せず、一方、非絶食ラット肝 Cytosol 添加では、AM N-脱メチル化酵素活性が約 5 倍に増加し、EM N-脱メチル化酵素活性も増加傾向を示した。また、薬物代謝酵素系の阻害剤である SKF 525-A (Matsubara and Touchi, 1977; Lasker et al., 1982) を添加すると、Cytosol 添加時に認められた酵素活性の上昇は消失した。

Table 1-5

Drug metabolizing enzyme activities in the presence or absence of EPN, cytosol, SKF 525-A and NADPH-generating system

Addition	Aminopyrine N-demethylase <sup>1)</sup>	Ethylmorphine <sup>1)</sup> N-demethylase <sup>2)</sup>	Aniline hydroxylase <sup>2)</sup>
None	0.5 ± 0.3	0.6 ± 0.3	0.0 ± 0.0
EPN alone	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.3	0.0 ± 0.0
EPN + Cytosol	1.9 ± 0.3*	1.1 ± 1.0	0.1 ± 0.1
EPN + SKF 525-A	0.6 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0
EPN + Cytosol + SKF 525-A	0.8 ± 0.3	0.2 ± 0.2	0.0 ± 0.0
Complete system <sup>3)</sup>	58.9 ± 6.4**	60.5 ± 8.3**	16.6 ± 2.0**

Concentrations of EPN and SKF 525-A added were  $1 \times 10^{-5}M$  and 1 mM, respectively. Protein content of cytosol added was 3-5 mg per incubation mixture. 1) nmoles formaldehyde formed/mg protein/30 min. 2) nmoles p-aminophenol formed/mg protein/30 min. 3) Complete system consists of components usually used for assay of drug metabolizing enzyme activities, including the NADPH-generating system. Each value is the mean ± S.E. from 3-5 experiments. \*p < 0.05 and \*\*p < 0.01 vs. the EPN alone group.

### 1-2-3 可溶性画分添加時のEPNoxon生成の検討

#### <実験方法>

使用動物、Ms および Cytosol 調製法は、1-1-1 に従って行った。6-AN の投与法、絶食法などは、1-1-2 に従って行った。O-エチル O-パラニトロフェニル フェニルフォスフォネート (EPNoxon) 生成量測定用混液は、1-1-1 で述べた CEase 活性測定用混液を準用したが、定量感度の関係から5倍のスケールとし、EPNの濃度は  $1.5 \times 10^{-5} \text{ M}$  とした。反応は10分間とした。

EPNoxon の定量は、インキュベーション後の混液を直ちに氷冷し、同時に内部標準物質スクアレン (関東化学) を含有するエチルエーテル 5 ml を加え、振とう、遠心分離 (4 °C) を2回繰り返す。無水硫酸ナトリウムにて脱水後、一定量のエーテル層を分取し、約 30 °C の水浴上で窒素ガスを吹き込む事により乾固した。その残渣に 100  $\mu\text{l}$  のクロロホルムを加えて溶解し、その 1  $\mu\text{l}$  をガスクロマトグラフィ/質量分析計 (GC/MS) に注入し、マスフラグメントグラフィ (MF) を行った。GC/MS/MF の測定条件および MF の典型的なクロマトグラムを、Fig. 1-5 に示す。なお、EPNoxon の標準品は、Neal and DuBois (1965) の方法を若干改良し、EPN のエタノール溶液に飽和ブロム水を加え酸化し、n-ヘキサン抽出、薄層クロマトグラフィ (TLC) による精製を繰り返す事により得た。TLC 上 (Fig. 1-5) における Rf 値は、EPN 0.69、EPNoxon 0.44 (展開溶媒 ; n-ヘキサン : クロロホルム : メタノール = 7 : 3 : 1、Kieselgel 60 F<sub>254</sub>、Merck、室温) であり、純度は、99.85% (エスエス製薬で分析) である。

Apparatus: Shimadzu-LKB 9000B GC/MS  
 Shimadzu-PAC 500 MID  
 Column: 3% OV-17 Chromosorb W HP  
 (80-100 mesh), glass column  
 (3 mm x 1 m)  
 Column temperature: 240°C  
 Injection temperature: 240°C  
 Separator temperature: 245°C  
 Ion source temperature: 290°C  
 Electron energy: 70 eV  
 Acceleration voltage: 3.5 kV  
 Trap current: 60 μA  
 Carrier gas: He (30 ml/min)  
 Ionization: electron impact

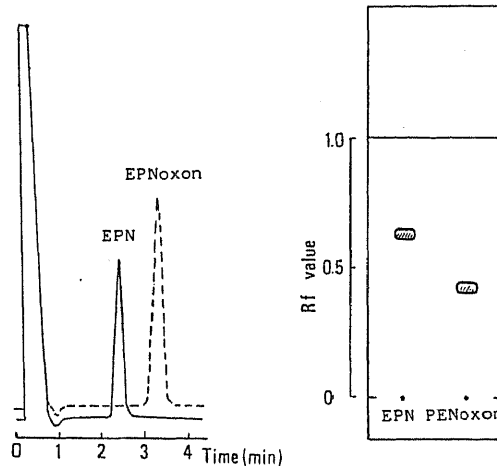


Fig. 1-5

GC/MS/MF conditions, typical chromatogram of EPN and EPNoxon and thin layer chromatogram

### < 実験結果 >

Table 1-6 は、絶食および非絶食ラットの肝Ms を酵素材料とし、6-AN 投与を行ったラット肝 Cytosol 添加時のインキュベーション混液中での EPNoxon 生成量を示している。

非絶食ラット Ms を用いた実験において、EPN 添加のみでは EPNoxon の生成は認められず、それに非絶食ラット肝 Cytosol を添加する事により、添加した EPN に対して約 19 % の EPNoxon 生成を認めた。また、絶食ラット肝 Cytosol の添加では、約 4 % と少ない生成量であった。一方、この絶食ラットに 6-AN を投与すると、EPNoxon 生成量は約 13 % となり、それは SKF 525-A の添加により定量限界以下となった。これらの成績は、絶食ラット Ms を酵素材料とした実験においても同様であったが、全体的に低い値を示した。



Table 1-6

Effects of liver cytosol on the enzymatic formation of EPN=O from EPN added to fed or starved microsomes of rat liver in vitro

Ms	EPN	Cytosol added	EPN=O formed ( $\times 10^{-6}$ M)	% (EPN=O / EPN added)
Fed	+	—	N.D.	<0.1
	+	non-treated, fed	2.80 $\pm$ 0.55	18.7
	+	non-treated, starved <sup>1)</sup>	0.64 $\pm$ 0.40*	4.3
	+	6-AN-treated, starved <sup>2)</sup>	1.99 $\pm$ 0.88	13.3
	+	6-AN-treated, starved+SKF 525-A	N.D.	<0.1
Starved	+	—	N.D.	<0.1
	+	non-treated, fed	1.99 $\pm$ 0.26	13.3
	+	non-treated, starved <sup>1)</sup>	0.23 $\pm$ 0.02**	1.5
	+	6-AN-treated, starved <sup>2)</sup>	0.83 $\pm$ 0.26*	5.5
	+	6-AN-treated, starved+SKF 525-A	N.D.	<0.1

The initial concentration of EPN added here was  $1.5 \times 10^{-5}$  M. The concentrations of cytosol and SKF 525-A used were 6-9 mg protein in 1 ml of incubation mixture and 1 mM, respectively. <sup>1)</sup> Rats were starved for 16 hr prior to sacrifice, and cytosol was prepared. <sup>2)</sup> 6-Aminonicotinamide (6-AN) was administered intraperitoneally to rats at a dose of 15 mg/kg 16 hr before sacrifice. Each value is the mean $\pm$ S.E. from 3 experiments. N.D.: less than  $0.13 \times 10^{-7}$  M. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  vs. the non-treated, fed-group.

### 第3章 考 察

有機リン化合物の1つであるEPNにより肝Ms CEase が阻害される事はすでに緒言でも述べたが、ここでは本研究におけるEPNの使用濃度を決定する為の予試験を実施した (Table 1-1)。その結果から、Cytosol の影響が認められやすいCEase 活性をわずかに阻害する  $1 \times 10^{-5}$  M を、EPN の使用濃度とした。

Table 1-2 は、本研究の端緒となった成績である。即ち、EPN により約 10 % 阻害されるラット肝Ms CEase は、非絶食ラットの肝Cytosol添加により著るしく (約 91 %) 阻害され、絶食したCytosol では、その阻害増強が認められなかった。この事から、ラット肝Cytosol中の常在成分が、CEase 活性阻害増強に関与する可能性が示唆された。この阻害増強因子は、食餌由来であり、EPNの代謝的活性化機構 (Johnson and Dahn, 1966 ; Nomeir and Dauterman, 1979 ; Nomeir et al., 1980 ; Lasker et al.,

1982) の可能性などを併せ考えた結果、ピリジヌクレオチドをその候補物質と推定した。そこで、NAD とその類似体を絶食ラットに投与し、その Cytosol を CEase 活性測定用混液に添加した。その結果 (Table 1-3)、NAD および N. A 投与ではなんら影響を認めなかったが、6-AN 投与では CEase の阻害増強を認めた。この 6-AN の作用は、Fig. 1-4 に示した様に CEase 活性測定用混液に、*in vitro* で添加した時には認められず、ラットに投与した場合にのみ、6-AN の作用が認められた訳である。

一方、*in vitro* で阻害増強作用が認められた NAD の作用については、第 3 編および第 4 編にて詳述する事とし、ここでは 6-AN の作用につき以下に述べる。

6-AN を投与した絶食ラット肝 Cytosol 中のピリジヌクレオチド量を、非投与—非絶食群、非投与—絶食群および NAD 投与—絶食群と比較してみた (Table 1-4)。絶食により 4 種のピリジヌクレオチドの内、NADPH が著しく減少し、それは 6-AN 投与により有意に増加した。この増加のみで NADPH 依存性チトクローム P-450 (Cyt. P-450) 系による EPN の酸化的脱硫化反応 (EPN<sub>oxon</sub> の生成) (Johnson and Dahn, 1966; Nomeir and Dauterman, 1977; Nomeir et al., 1980; Lasker et al., 1982) を、すべて説明する事には多少難点が見られたので、次に Ms 薬物代謝系について検討を加えた。

Table 1-5 は、肝 Ms 薬物代謝酵素活性に対する Cytosol 添加の影響を示したもので、AM N-脱メチル化酵素活性の増加や、Table 1-6 に示した EPN<sub>oxon</sub> 生成量におよぼす Cytosol 添加の影響、更に、それらに対する SKF 525-A 添加の結果、などは、いずれも EPN による CEase 阻害に対する Cytosol の作用が、Ms 薬物代謝酵素系の関与する EPN の代謝的活性化反応の結果であることを示唆した。

以上の成績および考察により、EPN による CEase 活性阻害に対する肝 Cytosol 添加による阻害増強作用の機序としては、Cytosol 中のピリジヌクレオチド、特に、EPN の酸化的脱硫化反応に関与する Ms Cyt. P-450 (Casida, 1961; Neal and DuBois, 1965; Yang et al., 1969;

1971; Hitchcock and Murphy, 1971; Wolcott and Neal, 1972; Lasker et al., 1982) の電子供与体である NADPH が、その未知因子の本体であり、その NADPH の増加が CEase の EPN による阻害を増強させたと結論した。

一方、6-AN 投与ラット肝 Cytosol 添加による CEase 活性の阻害増強に対する作用機序は、結果として Cytosol 中の NADPH 量の増加、EPN<sub>oxon</sub> 生成量の増加および SKF 525-A によるその消失を認めたものの、薬物代謝系への作用は明確にはされていない。

6-AN の薬物代謝酵素系への関与に関しては報告が少なく (Ackerman and Libman, 1977; Chawalit et al., 1982)、未だ、未知の分野であると考えられる。そこで本研究では、第 2 編において 6-AN のラット肝 Ms 薬物代謝酵素系への影響を検討し、その後、新編に於ける 6-AN 投与ラット肝 Cytosol 添加の影響について考察を行う。

## 第2編 6-アミノニコチンアミドの肝ミクロゾーム薬物代謝系 への影響

第1編にて、6-アミノニコチンアミド(6-AN)がラット肝可溶性画分(Cytosol)中のNADPH量を増加させ、それによりEPNoxon生成量を増加させる事などを報告した。6-ANはピリジンヌクレオチド生合成の拮抗物質であり、また、前駆物質でもある(Johnson and McColl, 1956; Dietrich et al., 1958; Ammon and Steinke, 1972; Prakash and Baouer, 1981)。即ち、6-ANは生体内で肝小胞体のグリコヒドロゲナーゼによりNAD(P)に取込まれ、6-アミノNAD(P)となり(Kaplan, 1954; Brunneinan et al., 1964; Herken, 1971; Kolbe et al., 1971; Ammon and Steinke, 1972; Ammon et al., 1973)、NAD(P)と競合的反応を生じる事(Brunneinan et al., 1964; Coper and Neubert, 1964; Coper et al., 1966; Ammon and Steinke, 1972)、更に、この非生理的NAD(P)は、電子供与体としての作用を有さない事(Brunneinan et al., 1964; Schlauder, 1971; Prakash and Baouer, 1981)などが知られている。

一方、6-ANの薬物代謝系についての報告は少なく、Ackerman and Leibman(1977)およびChawalit et al.(1982)は、6-ANが肝ミクロゾーム(Ms)のチトクロームP-450(Cyt. P-450)量に影響を与えない事、ヘキソバルビタール(HX)の睡眠時間を延長させる事、さらにアミノピリン(AM) N-脱メチル化酵素活性をわずかに低下させる事などを報告しているものの、未だこの分野における研究は明確でない部分が多い。

本編では、第1編にて推測した6-ANの作用機序を一層明確なものとする目的で、6-ANのMs薬物代謝系におよぼす影響についてAMおよびHXのラット血中濃度、およびMs薬物代謝酵素活性の面などから検討を行った。

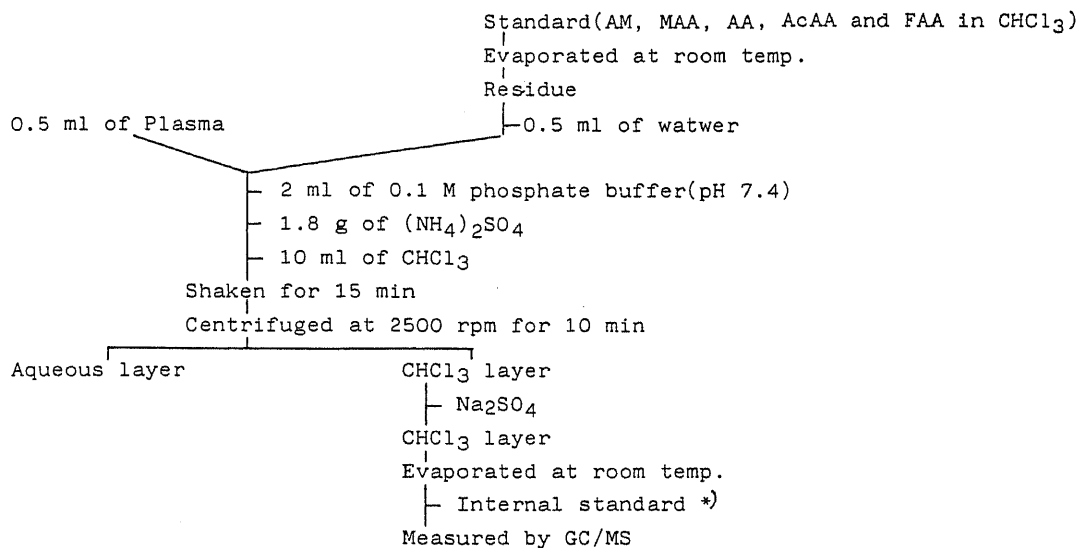
# 第1章 アミノピリンおよびヘキソバルビタールの代謝におよぼす 6-アミノニコチンアミドの影響

## 2-1-1 アミノピリンの血中濃度に関する検討

### <実験方法>

本実験では、体重 170-220 g の Wistar 系雄性ラットを使用した。AM およびその代謝物である 4-モノメチルアミノアンチピリン (MAA, Goromaru et al., 1976 の方法にて合成) は 50 mg/kg、また、6-AN は 20 mg/kg を AM (MAA) 投与の 15 時間前に、いずれも生理食塩水に溶解し腹腔内注射した。採血は所定の時間ごとにラットをエーテル軽麻酔下で眼窩静脈叢よりヘパリン添加毛細管にて行い、遠心分離後の血漿を、AM およびその代謝物の定量に供した。血漿中 AM およびその代謝物の定量法は、Matsuyama et al. (1981a) の方法に従い、GC/MS にて行った。その測定方法を、Fig. 2-1 に図式し、また、AM の代謝経路 (Goromaru et al., 1981) を Fig. 2-2 に示す。

薬物動態パラメーターである血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) は、0-180 分の血漿中濃度より台形法 (Gibaldi and Perrier, 1975) にて求めた。



\*Methyl linolate for AM and MAA assay; Dicyclohexyl phthalate for AA and AcAA assay; Dotriacontane for FAA assay.

Fig. 2-1

Assay procedure for aminopyrine and its metabolites in plasma

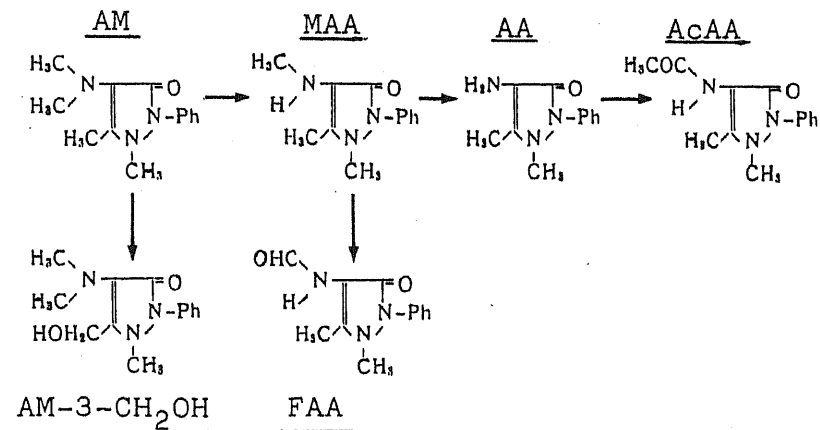


Fig. 2-2 Metabolic Pathways of Aminopyrine in Rats

<実験結果>

Fig. 2-3、Fig. 2-4 および Table 2-1 は、AM および MAA 投与後の AM、MAA およびその代謝物のラット血漿中濃度および AUC におよぼす 6-AN 投与の影響を示している。

AM 投与 (Fig. 2-3) 後の AM および MAA の血漿中濃度は、6-AN 投与により AUC で 25% および 15% 減少し、更に、4-ホルミルアミノアンチピリン (FAA) の AUC も 53% 減少した。

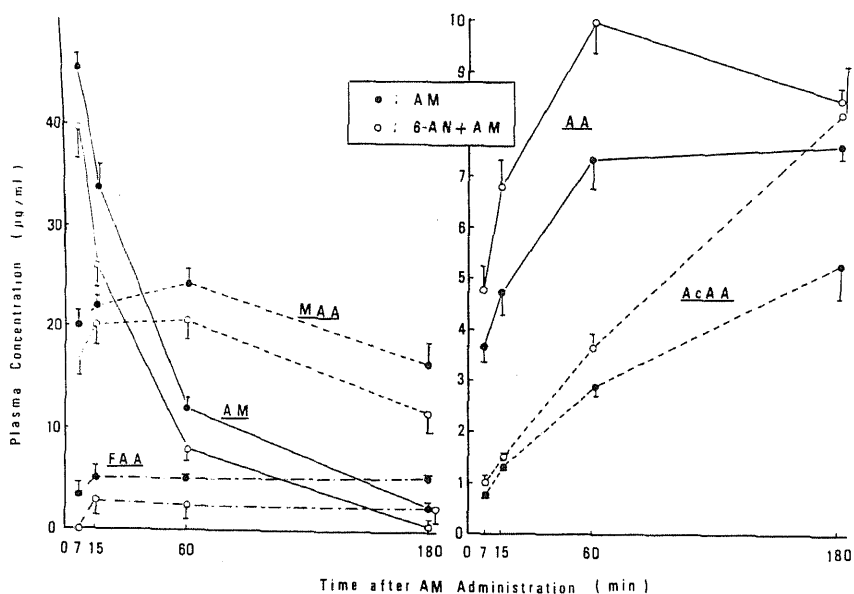


Fig. 2-3 Effects of 6-AN on the plasma levels of AM and its metabolites in rats after intraperitoneal injection of AM. Rats were pretreated with 6-AN (20 mg/kg, i.p.) 15 hr prior to AM (50 mg/kg, i.p.) administration. Vertical lines represent S.E. from at least 4 experiments.

一方、4-アミノアンチピリン (AA) および 4-アセチルアミノアンチピリン (AcAA) 濃度は、それぞれ AUC で 26% および 40% 増加した。

MAA 投与 (Fig. 2-4) 後の AA の AUC も、6-AN 投与により 23% 増加し、FAA では 20% 減少した。

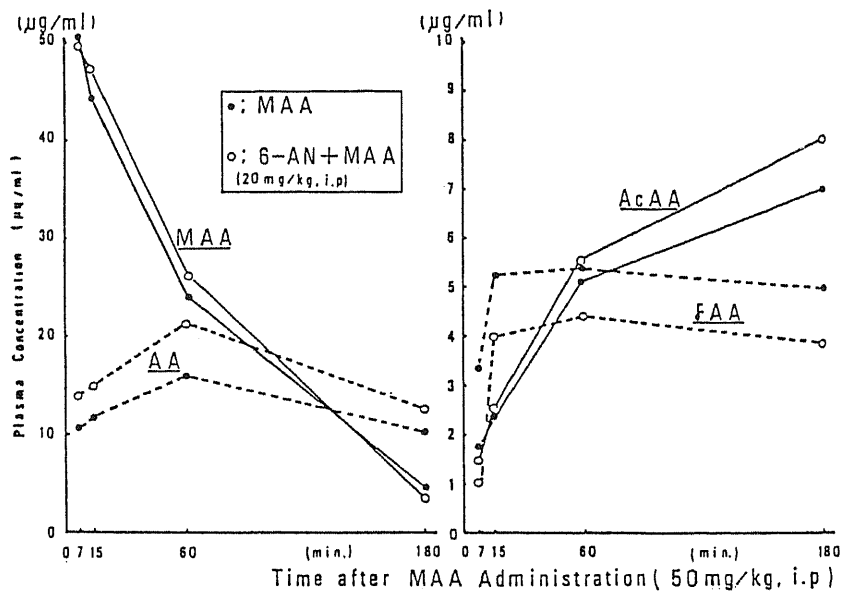


Fig. 2-4 Effects of 6-AN on the plasma levels of MAA and its metabolites in rats after intraperitoneal injection of MAA



Table 2-1 AUC of AM, MAA, AA, AcAA and FAA after injection of AM or MAA in rats

Drug	6-AN	AUC ( $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{hr}$ )					
		AM	MAA	AA	AcAA	FAA	
AM	-	38.6 $\pm$ 2.9	61.0 $\pm$ 4.4	20.4 $\pm$ 2.1	9.9 $\pm$ 1.3	14.6 $\pm$ 1.0	
	+	29.0 $\pm$ 2.6 (1)	51.8 $\pm$ 4.9	25.7 $\pm$ 1.5	13.9 $\pm$ 2.4	6.9 $\pm$ 4.0	
MAA	-	-	61.9 $\pm$ 6.7	39.4 $\pm$ 2.8	15.3 $\pm$ 1.5	14.9 $\pm$ 3.8	
	+	-	68.0 $\pm$ 6.3	48.3 $\pm$ 1.6 (1)	16.9 $\pm$ 1.3	11.9 $\pm$ 4.9	

AM and MAA were administered intraperitoneally to rats at a dose of 50 mg/kg.

AUC was calculated by the trapezoidal rule from time zero to 3 hr. Each value is the mean  $\pm$  S.E. from 4-8 animals. (1): Significantly different from AM or MAA alone group ( $p < 0.05$ ).

## 2-1-2 ヘキソバルビタールの血中濃度に関する検討

### <実験方法>

使用動物、6-ANの投与方法および採血法は、2-1-1 に従って行った。HX（帝国化学）は、適当量の1N NaOHに溶解した後、生理食塩水で希釈し100 mg/kg腹腔内注射した。血漿中HXおよびその代謝物の定量は、Fig. 2-5 に示した操作法に従い、血漿からの酢酸エチル抽出、メチル誘導体化などの前処理を行い、Fig. 2-6 に示したGC/MS/MFの条件で定量した。MFの典型的なクロマトグラムをFig. 2-6 に示し、また、HXの代謝経路（Toki et al., 1962）を、Fig. 2-7 に示す。

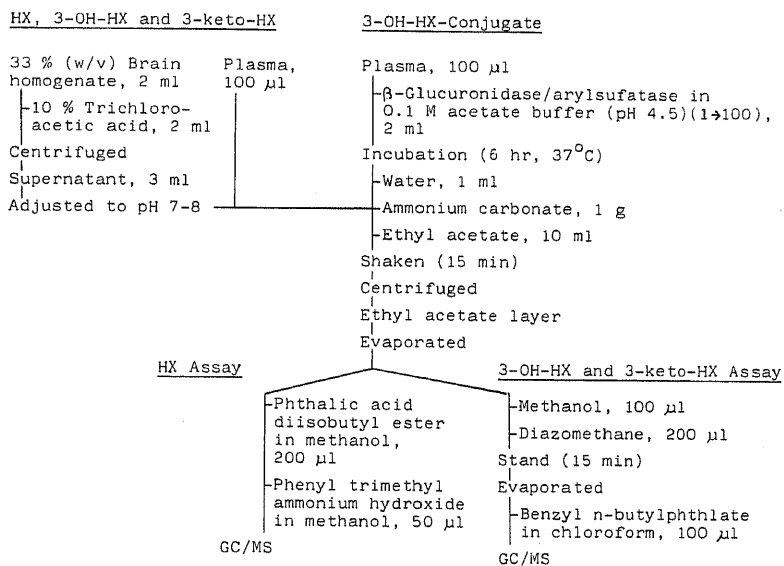


Fig. 2-5 Assay procedure for HX, 3-OH-HX, 3-OH-HX conjugate and 3-keto-HX in brain and plasma of rat by GC/MS.

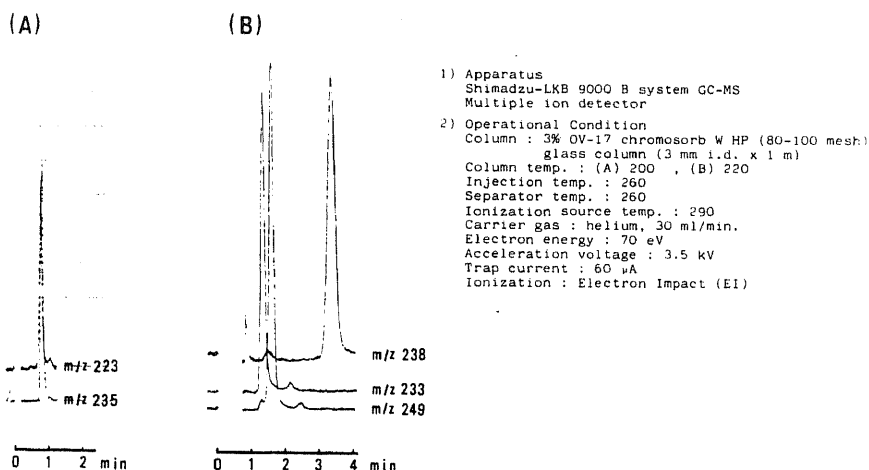


Fig. 2-6 Typical mass fragmentograms of HX and its metabolites obtained by GC/MS after intraperitoneal injection of HX into a rat.

(A) N-methyl-HX (m/z 235) and phthalic acid diisobutylester (m/z 223). HX concentration in plasma was 16.4  $\mu$ g/ml.

(B) N-methyl-3-OH-HX (m/z 233), N-methyl-3-keto-HX (m/z 249) and benzyl n-butyl phthalate (m/z 238). 3-OH-HX and 3-keto-HX concentrations in plasma were 50.7  $\mu$ g/ml and 43.2  $\mu$ g/ml, respectively.

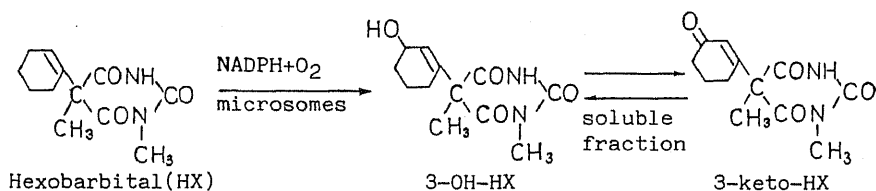


Fig. 2-7 Metabolic pathways of hexobarbital

### < 実験結果 >

Fig. 2-8 および Table 2-2 は、HX 投与後の HX およびその代謝物のラット血漿中濃度および AUC におよぼす 6-AN 投与の影響を示している。

6-AN 投与により血漿中 HX 濃度は AUC で約 40% 減少し、一方、3-ヒドロキシヘキソバルビタール (3-OH-HX)、3-OH-HX 抱合体 (3-OH-HX Conj.) および 3-ケトヘキソバルビタール (3-Keto-HX) 濃

度は、6-AN投与により、それぞれ7%、30%および5%増加した。

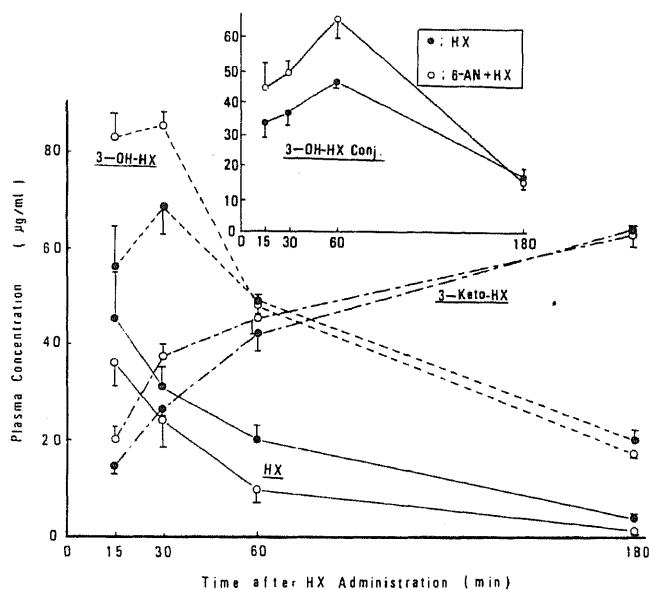


Fig. 2-8 Time course studies on alteration of HX metabolism by 6-AN treatment in rats. Rats were pretreated with 6-AN (20 mg/kg, i.p.) 15 hr prior to HX (100 mg/kg, i.p.) administration. Plasma levels of HX and its metabolites were determined by GC/MS.

Table 2-2 AUC of HX, 3-OH-HX, 3-OH-HX-Conjugate and 3-keto-HX after injection of HX in rats

6-AN	AUC ( $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{hr}$ )			
	HX	3-OH-HX	3-OH-HX Conjugate	3-keto-HX
-	50.9 $\pm$ 6.1	121.5 $\pm$ 4.4	99.2 $\pm$ 4.5	131.0 $\pm$ 5.3
+	32.7 $\pm$ 7.1	130.1 $\pm$ 4.5	131.0 $\pm$ 11.9 (!)	138.0 $\pm$ 8.3

HX was administered intraperitoneally to rats at a dose of 100 mg/kg. AUC was calculated by the trapezoidal rule from time zero to 3 hr. Each value is the mean  $\pm$  S.E. from 5 animals. (!): Significantly different from HX alone group ( $p < 0.05$ ).

### 2-1-3 ヘキソバルビタールの睡眠時間に関する検討

#### <実験方法>

使用動物および6-ANの投与方法は、2-1-1に、HXの投与方法および脳内、血漿中HX濃度の測定方法は、2-1-2と同じである。6-ANの投与量は、Ackerman and Leibman (1977)に従い35 mg/kgも行った。また、睡眠時間は正向反射の消失から回復までの時間を測定して求めた。

#### <実験結果>

Table 2-3は、HXによるラットの睡眠時間および覚醒時の脳内、血漿中HX濃度におよぼす6-AN投与の影響を示している。

HXによる睡眠時間が25.4分であるのに対して、6-AN 20 mg/kg投与では32.3分、また、35 mg/kg投与では42.6分と、いずれも6-ANにより睡眠時間の延長が認められた。また、覚醒時における脳内および血漿中HXおよびその代謝物濃度は、6-AN投与による影響を示さなかった。

Table 2-3 *Effects of 6-AN on hexobarbital sleeping time and hexobarbital and metabolites levels in brain and plasma of rats*

Group	N	Sleeping time (min)	Brain level ( $\mu\text{g}/\text{brain}$ )			Plasma level ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		
			HX	3-OH-HX	3-keto-HX	HX	3-OH-HX	3-keto-HX
Control	10	25.4 $\pm$ 1.7	30.2 $\pm$ 3.0	3.99 $\pm$ 0.28	0.25 $\pm$ 0.02	37.2 $\pm$ 3.4	76.0 $\pm$ 2.7	23.1 $\pm$ 1.5
6-AN <sup>(1)</sup>	10	32.3 $\pm$ 2.7 <sup>(3)</sup>	26.8 $\pm$ 1.8	3.91 $\pm$ 0.40	0.30 $\pm$ 0.04	37.6 $\pm$ 4.6	68.1 $\pm$ 7.3	24.3 $\pm$ 3.5
6-AN <sup>(2)</sup>	5	42.6 $\pm$ 4.1 <sup>(4)</sup>	—	—	—	—	—	—

Hexobarbital (HX) was administered 15 hr after injection of 6-AN (20 mg/kg, i.p.); <sup>(1)</sup>.

HX was administered 24 hr after injection of 6-AN (35 mg/kg, i.p.) according to the experimental conditions of Ackerman and Leibman (1977); <sup>(2)</sup>. Each value is the mean  $\pm$  S.E. <sup>(3)</sup>: Significantly different from the control ( $p < 0.05$ ). <sup>(4)</sup>: Significantly different from the control ( $p < 0.01$ ).

## 第2章 6-アミノニコチンアミド投与ラット肝ミクロゾーム薬物代謝 酵素系の検討

### 2-2-1 薬物代謝酵素活性の検討

#### <実験方法>

使用動物および6-ANの投与方法は、2-1-1に、Ms調製法および薬物代謝酵素活性測定法は、第1編に従って行った。本実験では、AMおよびMAA N-脱メチル化酵素活性を、2-1-1に述べたGC/MS法によっても測定した。活性測定用混液の組成は、Ms懸濁液(蛋白量約2mg) 0.4 ml、0.2 Mリン酸緩衝液(pH 7.4) 0.3 ml(添加実験では6-ANを含む)、EDTA(最終濃度1 mM) 0.1 ml、NADPH-generating system 0.1 mlおよび基質(最終濃度1 mM) 0.1 mlを含んでいる。

#### <実験結果>

Table 2-4は、1 mMの6-ANを活性測定用混液に添加した時の、Ms AM N-脱メチル化酵素活性およびAN水酸化酵素活性を示している。

6-ANは、*in vitro*実験においては、いずれの酵素活性にも影響を与えなかった。

Table 2-4

*In vitro* effects of 6-AN on hepatic microsomal drug metabolizing enzyme activities in rats

Addition	Aminopyrine N-demethylase (HCHO nmole/mg prot/min)	Aniline hydroxylase (p-aminophenol nmole/mg prot/min)
None	3.39 ± 0.18	0.73 ± 0.07
6-AN(1 mM)	3.36 ± 0.21	0.78 ± 0.09

AM and MAA were used in a concentration of  $1 \times 10^{-3}$  M.  
Figures represent the mean ± S.E. from 4 experiments.

Table 2-5 は、6-ANを投与したラット肝Msを用いた場合の各薬物代謝酵素活性について、正常ラット肝Msのそれらとの比較を示している。

6-ANの投与により、AM N-脱メチル化酵素活性は、15-16% (GC/MS法による結果も含む)、MAA N-脱メチル化酵素活性は、28-38% (同)と、いずれも上昇した。なお、AN水酸化酵素活性は、6-AN投与の影響をほとんど受けなかった。

Table 2-5 *Effects of 6-AN treatment of rats on hepatic microsomal drug-metabolizing enzyme activities in vitro*

Enzyme	Control	N	6-AN	N
Aminopyrine N-demethylase <sup>(?)</sup> (HCHO nmoles/mg protein/min)	3.47 ± 0.13	14	4.02 ± 0.20 <sup>(4)</sup> 4.09 ± 0.28 <sup>(4) (1)</sup>	9 6
Aminopyrine N-demethylase <sup>(3)</sup> (MAA nmoles/mg protein/min)	2.35 ± 0.14	6	2.71 ± 0.15	6
MAA N-demethylase <sup>(?)</sup> (HCHO nmoles/mg protein/min)	3.27 ± 0.24	10	4.18 ± 0.17 <sup>(4)</sup>	8
MAA N-demethylase <sup>(3)</sup> (AA nmoles/mg protein/min)	2.72 ± 0.22	6	3.74 ± 0.16 <sup>(5)</sup>	6
Aniline hydroxylase (p-aminophenol nmoles/mg protein/min)	0.67 ± 0.03	10	0.76 ± 0.06	7

Rats were sacrificed 15 hr after injection of 6-AN (20 mg/kg, i.p.). Each value is the mean ± S.E., and N is the number of animals used. (1): In this case, rats were sacrificed 24 hr after injection of 6-AN (35 mg/kg, i.p.) according to Ackerman and Liebman (1977). (?): Determined by Nash's method. (3): Determined by GC/MS. (4): Significantly different from the control (p < 0.05). (5): Significantly different from the control (p < 0.01).

Abbreviations: MAA, 4-monomethylaminoantipyrine; AA, 4-aminoantipyrine.

## 2-2-2 ミクロゾーム電子伝達系への影響の検討

### <実験方法>

使用動物および6-ANの投与方法は、2-1-1に従って行った。Cyt. P-450量の測定はOmura and Sato (1964)の方法、Cyt. b<sub>5</sub>量の測定はTakesue and Omura (1970)の方法に従って行い、それぞれの分子吸光係



数として  $91 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  および  $185 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  を用いて算出した。  
 NADPH Cyt. c 還元酵素活性は Phillips and Langdon (1962) の方法に従い、活性測定用混液は、0.05 M Cyt. c (Sigma)、1 mM KCN、50  $\mu\text{M}$  NADPH (オリエンタル酵母) および Ms (蛋白量約 50  $\mu\text{g}$ ) を含み、0.34 M リン酸一カリウム緩衝液 (pH 7.6) にて全量を 2.0 ml とし、550 nm における吸光度を測定して求めた。NADH-フェリシアナイド (Cyt.  $b_5$ ) 還元酵素活性は Mihara and Sato (1972) の方法に従い、1 mM フェリシアニ化カリウム (和光純薬)、0.3 mM NADH (オリエンタル酵母)、Ms (蛋白量約 50  $\mu\text{g}$ ) を含み、全量を 0.1 M リン酸一カリウム緩衝液 (pH 7.5) にて 2.0 ml とし、420 nm における吸光度を測定して求めた。

### <実験結果>

Table 2-6 は、ラット肝 Ms 電子伝達系におよぼす 6-AN 投与の影響を示している。

Cyt. P-450 量は、6-AN 投与により対照群に対して 14% 増加が見られたが、Cyt.  $b_5$  量、NADPH-Cyt. c 還元酵素活性および NADH-フェリシアナイド還元酵素活性は変化しなかった。

Table 2-6 *Effects of 6-AN on hepatic microsomal electron transfer system in rats*

Item	N	Control	6-AN
Cytochrome P-450 (nmoles/mg protein)	11	0.74 $\pm$ 0.03	0.84 $\pm$ 0.02 (1)
Cytochrome $b_5$ (nmoles/mg protein)	6	0.25 $\pm$ 0.04	0.25 $\pm$ 0.03
NADPH-Cytochrome c reductase ( $\mu\text{moles/mg protein/min}$ )	6	0.12 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.01
NADH-ferricyanide reductase ( $\mu\text{moles/mg protein/min}$ )	6	1.93 $\pm$ 0.16	2.06 $\pm$ 0.27

Rats were sacrificed 15 hr after injection of 6-AN (20 mg/kg, i.p.).  
 Each value is the mean  $\pm$  S.E., and N is the number of animals used.  
 (1): Significantly different from the control ( $p < 0.05$ ).

### 2-2-3 アミノピリンの代謝反応速度に関する検討

#### <実験方法>

使用動物および6-ANの投与方法は、2-1-1に、AMおよびMAA N-脱メチル化酵素活性測定法は2-2-1に従って行った。KmおよびVmax値の算出は、Lineweaver-Burkプロット(Lineweaver and Burk, 1934)にて行った。

#### <実験結果>

Table 2-7は、AMまたはMAAを基質とした時のN-脱メチル化反応におけるKm値およびVmax値に対する6-AN投与あるいは添加の影響を示している。

6-AN投与により、AMのKm値は0.81 mMが0.64 mMと約30%減少し、MAAを基質にした場合も約半分のKm値であった。Vmax値は、いずれの基質においても大きな変動を示さなかった。

一方、0.1 mMおよび1 mMの6-AN添加では、いずれの基質におけるKm値およびVmax値も変化を認めず、この*in vitro*での結果は、2-2-1における6-ANの作用と一致していた。

Table 2-7 Kinetic studies on AM and MAA N-demethylase in control and 6-AN-treated rats

Pretreatment	AM			MAA		
	Km(mM)	Vmax (°)	Vmax/Km	Km(mM)	Vmax (°)	Vmax/Km
<i>In vivo</i>						
None	0.81	4.56	5.6	1.34	4.88	3.6
6-AN	0.64	4.09	6.4	0.76	5.39	7.1
<i>In vitro</i>						
6-AN (0.1 mM) (°)	0.87	4.55	5.2	1.40	5.47	3.9
6-AN (1.0 mM) (°)	0.80	4.41	5.5	1.36	5.30	3.9

Km and Vmax values are calculated from Lineweaver-Burk plots based on AM or MAA concentrations between 0.125-1.0 mM and 0.25-2.5 mM, respectively.

MAA and AA concentrations formed were determined by the GC/MS method. Each value is the mean of 2-3 experiments. 6-AN was added to the incubation mixture containing microsomes from normal rats, an NADPH-generating system and the substrate in Tris-HCl buffer (pH 7.4); (°). Vmax values are shown in terms of MAA formed nmoles/mg protein/min for AM N-demethylase and AA formed nmoles/mg protein/min for MAA N-demethylase; (°).

### 第3章 考 察

6-ANは抗ニコチン酸および抗ニコチンアミド作用を有し (Johnson and McColl, 1956; Ammon and Steinke, 1972; Bielicki and Krieglstein, 1976)、また、短肢症、口蓋裂などの催奇型惹起物質 (Landauer 1957; Chamberlain and Goldyne, 1970; Kröger et al., 1980; McLachlan, 1980; Chamberlain, 1982) としても知られている物質である。6-ANの毒性は比較的強く、予試験として行ったラットのLD<sub>50</sub> 値 (Wistar系雄、腹腔内注射、7日目算出) は、10.3 mg/kg (信頼限界 8.7—12.2 mg/kg, P < 0.05) であった。しかしながら、本研究における投与後15—16時間目での死亡は、15 mg/kg投与では認められず、20 mg/kgで1/8が死亡した程度であり、多くの死亡例が3日目～7日目に認められるいわゆる遅延性の毒性であった。本研究における6-ANの投与量 (15—20 mg/kg) に関しては、Ackerman and Leibman (1977) が、35 mg/kgの投与量を用いている事もあり過剰量ではあるものの、特に問題とはならないと判断した。

Fig. 2-3、Fig. 2-4 および Table 2-1 において、AMおよびMAAのラット血漿中濃度が6-ANにより減少し、一方、AA、AcAAが増加を示した事から、6-ANは、Ms Cyt. P-450に依存するAM→MAA、MAA→AAの代謝 (Bast and Noordhoek, 1981) を促進する事が示唆された。同様の成績は、Fig. 2-8、Table 2-2に示したHXを用いた血漿中濃度実験でも認められ、6-ANは、Ms Cyt. P-450の関与するHX→3-OH-HXの代謝 (Toki et al., 1962) を促進したものと考えられた。Matsuyama et al. (1981a; 1981b) は、バルビタールナトリウムを投与した所、ラット血中AM濃度は低下し、MAA濃度は増加し、更に、AA、AcAA、FAAの各濃度は変化しない事を報告しており、6-ANの作用とバルビタールの作用とは、多少異なる様である。そこで、薬物代謝系におよぼす6-ANの作用を検討した成績が、Table 2-4、Table 2-5 および Table 2-6 である。6-ANは、ラット肝MsのAMおよびAN代謝に対して、それが *in vitro* で添加された時には作用を示さず、6-ANの作用が直接的な作用ではなく

すでに糖代謝の面などから知られている様に、生体内で6-アミノNAD(P) (Kaplan et al., 1954; Dietrich et al., 1958; Brunne-man et al., 1964; Coper and Neubert, 1964; Ammon and Steinke, 1972; Ammon et al., 1973; Prakash and Baouer, 1981) に生合成された結果の作用である事を示唆した。即ち、Brunne-man et al. (1964) は、6-ANを投与したラット肝において6-アミノNAD(P)の生合成は6~8時間でピークに達し、18時間後には6-アミノNAD量はNADの20%、6-アミノNADP量はNADPの40~80%を占める事を報告している。

一方、6-ANのMs薬物代謝酵素活性への作用の特徴は、Table 2-5に示したAMおよびMAAを基質としたN-脱メチル化酵素活性の成績およびTable 2-7におけるAM代謝のKm値などから、AM→MAAの代謝よりMAA→AAの代謝に、より強く関与している事である。この事はIguchi (1981) およびMatsuyama et al. (1981a; 1981b) のバルビタールによるAM→MAAへの代謝のKm値、Vmax値は変化したものの、MAA→AAに関しては影響を受けなかったとする成績、Gram et al. (1968) によるフェノバルビタール前投与でAM→AAのVmax値が3-4倍になり、Km値は変化しなかったとの報告とも異なる成績であった。AM N-脱メチル化酵素には、2種類のアイソザイムがあり、2つのKm値を持っているとの報告 (Pederson and Aust, 1970)、またアイソザイムは3種であり、その内の2種はDDTで誘導されるが、他の1種はディルドリンでわずかに誘導されるとの報告 (Aust and Stevens, 1971) もある。6-ANのMs薬物代謝酵素系への関与は、いずれにしてもこれらのバルビタール類により誘導される酵素とは異なったアイソザイムが関与しているものと思われる。この6-ANの作用について更に検討を加えたのが、Table 2-3 に示したラットにおけるHXによる睡眠時間におよぼす6-ANの影響である。一般にバルビタール類による薬物代謝酵素誘導の結果、HXの睡眠時間や、HXの生物学的半減期が短縮する事は周知の事であるが、6-ANの投与によるHXの睡眠時間は延長し、一般的な薬物代謝酵素誘導の結果とは異なった成績であった。この事は、Ackerman and Leibman (1977) およびChawalit et

al. (1982) の成績と一致しており、Coper et al. (1966) が述べている様に、HX に対する脳の感受性が 6-AN により高められた結果であり、HX の代謝が抑制された事によるものではないと考えられた。

以上の結果および考察により、6-AN は肝 Ms の薬物代謝系に対して、バルビタール類とは異なった機序にて酵素活性などを高める事が明らかとなった。6-AN の作用機序については、例えば 6-アミノ NAD(P) を用いるなどの更に詳細な検討を行う必要があるが、本化合物の合成(入手)が困難である事から、これ以上の検討は現段階では不可能である。

さて、第 1 編にて認められた EPN による肝 Ms CEase 活性阻害に対する 6-AN 投与肝 Cytosol 添加による阻害増強は、本編の結果より肝 Ms 薬物代謝系、特に AM N-脱メチル化反応を上昇させるある種の Cyt. P-450 量を NADPH の増加の結果として 6-AN が上昇させ、その結果 EPN → EPN oxon の反応が促進され、CEase の阻害増強作用が発現したものと結論を得た。

### 第3編 有機リン化合物によるカルボキシルエステラーゼ阻害とNAD添加の影響

有機リン系殺虫剤の1つであるO-エチル O-パラ-ニトロフェニル フェニルフォスフォノチオエイト (EPN) によるカルボキシルエステラーゼ (CEase) 阻害が、飽食および6-アミノニコチンアミド (6-AN) 投与絶食ラットの肝可溶性画分 (Cytosol) 添加により増強され、その機序として Cytosol 中のNADPHが作用発現因子である事、そのNADPHを電子供与体とする肝ミクロゾーム (Ms) チトクローム P-450 (Cyt. P-450) が、EPNの酸化的脱硫化反応を触媒し、それによりEPNoxonの生成が促進する事などを第1編および第2編にて述べた。その結果、6-AN投与Cytosol添加で認められたEPNによるCEase阻害の増強作用が、NAD投与Cytosolでは見られなかった事、NADを添加した場合にはその増強作用が見られた事、更に、NADの類似体ではその作用が見られなかった事、などからNADの作用に注目した。

周知のごとく、NADはMs Cyt. P-450系に対する電子供与体としての作用はなく、電子供与体としてはNADPHとNADHが知られている (Sato et al., 1965; Oshino et al., 1966; 1971; Hildebrandt and Estabrook, 1971; Iyanagi et al., 1981; Hodgson and Dauterman, 1980; Reinke et al., 1981)。有機リン化合物は、NADPHと分子状酸素の存在下、Ms Cyt. P-450により代謝的活性化反応を受け、チオノ (P=S) 型からフォスフェート (Oxon) 型に代謝され毒性 (殺虫力) を発する (Murphy and DuBois, 1957; 1958; O'Brien, 1959; Neal, 1967a; 1967b)。このOxon型有機リン化合物はP=S型より $P^{+\delta}$ の求電子性が強く、コリンエステラーゼ (ChE) の活性中心と結合しやすく (西沢ら, 1972) 母化合物より強い唯一の活性代謝物である (Nomeir and Dauterman, 1979; Abou-Donia et al., 1983) 事なども知られている。

これらの事より本編では、有機リン化合物によるCEase阻害に対するNAD添加の影響およびその作用機序を知る事を目的とし、種々の有機リン

化合物の構造とNADの作用との関係、CEase材料である肝Msの種々の前処理の影響およびCEaseと有機リン化合物との結合などについて検討を行った。

## 第1章 NAD添加時にみられる有機リン化合物によるカルボキシルエステラーゼの阻害増強作用

### 3-1-1 カルボキシルエステラーゼとコリンエステラーゼの有機リン化合物、EPNによる阻害とNAD添加の影響

#### <実験方法>

本実験では、体重200-230gのWistar系雄性ラットを使用した。飼育法およびMs調製法は第1編に従って行った。Ms CEase活性測定は、イソカルボキサジド (ISOC) を基質としたISOC水解酵素 (ISOCase) とプロカイン (PROC, Sigma) を基質としたPROCエステラーゼ (PROCcase) について行い、ISOCcaseは第1編の方法に従って測定し、PROCcaseは、PROCの水解により生成するp-アミノ安息香酸 (PABA) を測定するTing et al. (1949) の方法を若干改良したSato and Moroi (1977) の方法に従って行った。これらのCEase活性測定用混液の組成は、Ms懸濁液 (蛋白量約3mg) 0.25 ml、EPN溶液 (最終濃度  $1 \times 10^{-5}$  M) または0.2 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) 0.25 ml、およびNADまたは水0.25 mlを、0.2 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) にて全量1 mlとし、37℃、10分間プレインキュベーションし、その後、基質 (最終濃度 1mM) 0.5 mlを加え、更に30分間反応させた。

コリンエステラーゼ (ChE) 活性は、Voss and Sachsse (1977) の方法に若干改良を加えたMoroi et al. (1976) の方法に従い、生成したチオコリンを5, 5'-ジチオビス-2-ニトロ安息香酸 (DTNB) 試薬 (Ellman et al., 1961) で発色後、412 nmにて吸光度を測定して求めた。なお、用



いたNADの最終濃度は、 $1 \times 10^{-7} \text{ M} - 5 \times 10^{-4} \text{ M}$ である。

<実験結果>

Fig. 3-1は、EPNによるCEase 活性およびChE 活性の阻害に対するNAD添加の影響を示している。

ISOCase と PROCase のEPNによる阻害 (EPN非添加時の約6%) は、 $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ のNADにより増強され、 $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ でプラトーに達した。ISOCase と PROCase に対するNADの作用は近似していた。一方、ChE 活性は $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ のNADでも非添加時の約25%の阻害増強に留まり、CEase と ChE とではNADによる阻害増強作用に差が見られた。

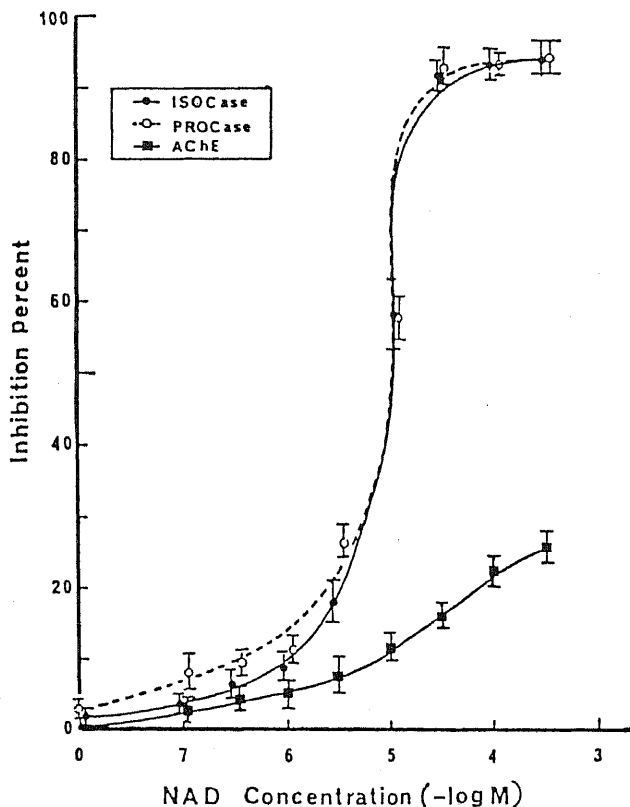



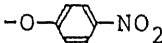

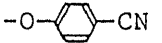
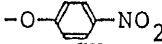
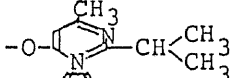
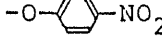
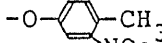

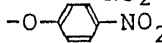
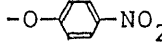
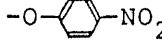
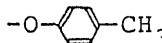
Fig. 3-1 Changes in the liver microsomal carboxylesterase and acetylcholinesterase activities as a function of NAD concentrations  
Concentration of NAD added was ranging from  $1 \times 10^{-7} \text{ M}$  to  $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ . Carboxylesterase and acetylcholinesterase activities were shown as percent of control. Vertical lines in each point is the mean  $\pm$  S.E. from four or more experiments.

3-1-2 種々の有機リン化合物によるカルボキシルエステラーゼ阻害と NAD 添加の影響

< 実験方法 >

使用動物、Ms CEase (ISOCCase および PROCCase) および ChE 活性測定法は、3-1-1 に従って行った。但し、NAD の最終濃度は  $5 \times 10^{-5} M$  とした。用いた有機リン化合物名とその構造式を、Fig. 3-2 に示す。

Fig. 3-2  
Chemical structure of organophosphorus compounds

Organophosphorus compound	Structure			
	$R_1$	$R_2$	$R_3$	X
EPN	$C_2H_5O$			S
Surecide	$C_2H_5O$			S
Parathion	$C_2H_5O$	$C_2H_5O$		S
Diazinon	$C_2H_5O$	$C_2H_5O$		S
Methyl-parathion	$CH_3O$	$CH_3O$		S
Fenitrothion	$CH_3O$	$CH_3O$		S
EPNoxon	$C_2H_5O$			O
Paraoxon	$C_2H_5O$	$C_2H_5O$		O
Methyl-paraoxon	$CH_3O$	$CH_3O$		O
Fenitroxon	$CH_3O$	$CH_3O$		O
DDVP	$CH_3O$	$CH_3O$	$-O-CH=C-Cl_2$	O

### < 実験結果 >

Table 3-1は、P=S型有機リン化合物による2種のCEaseとChE活性阻害に対するNADの影響を示している。

ISOCaseでのNAD添加による阻害増強作用は、EPN、シュアサイド、パラチオンで顕著に見られ、メチルパラチオン、フェニトロチオンおよびダイアジノンでは、それが小さかった。PROCaseにおけるNADの作用は、ダイアジノンを除いてISOCaseでの作用に近似しており、CEaseの基質によるNADの作用の違いはほとんど見られなかった。

一方、ChEでのNADの作用は、ダイアジノンを除いて全体的にCEaseほど顕著には認められず、CEaseとChEとではNADの作用発現に差が見られた。

Fig. 3-3は、EPNおよびEPNoxonによるCEase (ISOCase) 阻害に対するNADの影響を示し、Table 3-2は、EPNoxon以外のOxon型有機リン化合物に対するNADの作用を示している。

Table 3-1 Relationship between the NAD-induced potentiation of anti-carboxylesterase and anti-acetylcholinesterase action and chemical structure of organophosphorothioate insecticides

Organophosphorothioate	Carboxylesterase <sup>a)</sup>						Acetylcholinesterase <sup>a)</sup>			
	ISOCASE			PROCASE			Without NAD		With NAD	
	Without NAD	With NAD		Without NAD	With NAD		Without NAD	With NAD	Without NAD	With NAD
Control	100.0			100.0			100.0			
EPN (1 x 10 <sup>-5</sup> M)	85.3 ± 2.3	5.5 ± 0.7**		91.8 ± 4.0	11.5 ± 1.3**		88.2 ± 5.0	79.4 ± 6.5		
Surecide (1 x 10 <sup>-5</sup> M)	86.7 ± 4.0	2.6 ± 0.7**		87.9 ± 4.9	16.7 ± 2.0**		90.1 ± 6.8	82.8 ± 4.7		
Parathion (5 x 10 <sup>-6</sup> M)	69.7 ± 2.8	5.3 ± 0.8**		73.5 ± 5.7	12.2 ± 0.9**		39.2 ± 4.3	13.4 ± 1.9*		
Methylparathion (1 x 10 <sup>-5</sup> M)	90.5 ± 2.3	56.6 ± 2.2**		88.3 ± 4.3	39.4 ± 5.0**		86.3 ± 2.3	72.6 ± 4.2*		
Fenitrothion (5 x 10 <sup>-5</sup> M)	73.6 ± 4.3	37.1 ± 4.1**		51.3 ± 4.4	18.4 ± 1.5**		71.2 ± 1.6	35.9 ± 1.8*		
Diazinon (5 x 10 <sup>-5</sup> M)	80.9 ± 2.2	34.1 ± 2.8**		78.5 ± 3.1	12.8 ± 1.1**		81.9 ± 2.2	18.4 ± 1.9*		

<sup>a)</sup>Percent activity was calculated from the respective control in each column. The control activities of ISOCASE, PROCASE and AChE were 58.8 ± 4.1 nmoles BZH formed/mg protein/30 min, 23.9 ± 1.5 nmoles PABA formed/mg protein/30 min, 0.17 ± 0.01 delta E/mg protein/30 min, respectively. Each value is the mean ± S.E. from five experiments. Numbers in parentheses represent concentrations of each organophosphorothioates used. The concentration of NAD used was 5 x 10<sup>-5</sup>M. \*p<0.05 and \*\*p<0.01 were statistically significant from without NAD in each organophosphorothioate.

EPNでは顕著に認められたNADによる阻害増強作用は、EPNoxonでは全く認められず (Fig. 3-3)、また、他のOxon型有機リン化合物においても、NADの作用は、CEase およびChEのいずれにおいても認められなかった (Table 3-2)。

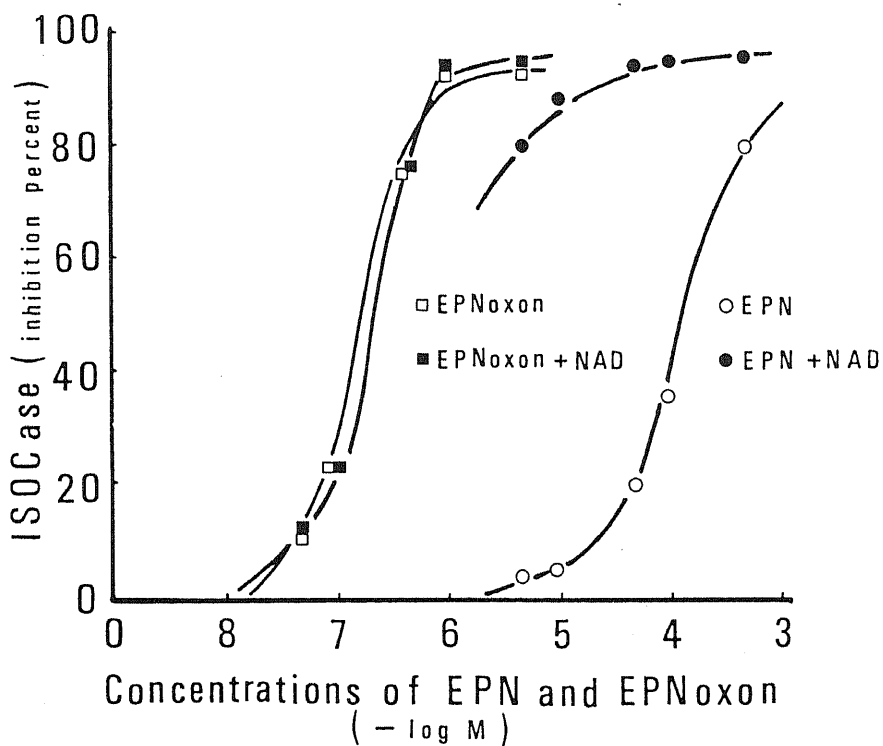


Fig. 3-3 Effect of NAD on the inhibition of liver microsomal ISOCase activity as a function of EPN or EPNoxon concentrations  
Concentration of NAD added was  $5 \times 10^{-5}M$ . Each point is the mean of three experiments.

Table 3-2 Relationship between the NAD-induced potentiation of anti-carboxylesterase and anti-acetylcholinesterase action and chemical structure of organophosphate insecticides

Organo-phosphate	Carboxylesterase				Acetylcholinesterase			
	ISOCASE		PROCASE		Without NAD		With NAD	
	Without NAD	With NAD	Without NAD	With NAD	Without NAD	With NAD	Without NAD	With NAD
Control	100.0		100.0		100.0			
Paraoxon <sub>7</sub> ( $1 \times 10^{-7}$ M)	74.9 ± 2.9	71.0 ± 2.9	70.4 ± 5.0	68.2 ± 3.3	11.2 ± 0.9	8.8 ± 0.9	77.2 <sup>#</sup>	66.1 <sup>#</sup>
Methylparaoxon ( $1 \times 10^{-7}$ M)	89.5 ± 1.7	90.1 ± 0.7	81.6 ± 3.5	80.3 ± 4.2	44.0 ± 1.2	42.2 ± 1.3		
Fenitroxon ( $5 \times 10^{-7}$ M)	81.3 ± 6.6	77.6 ± 6.0	73.2 ± 3.7	70.5 ± 3.4	33.3 ± 0.5	25.8 ± 2.2		
DDVP ( $5 \times 10^{-8}$ M)	89.6 ± 3.0	92.7 ± 2.9	80.4 ± 5.0	76.4 ± 3.5	91.4 ± 3.2	81.2 ± 4.3		

Numbers in parentheses represent the concentrations of each organophosphate used. <sup>#</sup>Mean value of two experiments at a concentration of  $1 \times 10^{-8}$ M of paraoxon. For further details, see the legend to Table 3-1.

### 3-1-3 精製カルボキシエステラーゼに関する検討

#### <実験方法>

使用動物およびCEase（今後の本研究は、すべてISOCaseを表わす）活性測定法は、3-1-1に従って行った。本実験では、酵素材料としてラット肝Msと精製エステラーゼ（カルボキシエステル水解酵素、E.C.

3.1.1.1、豚肝臓、Boehringer Mannheim）を用いた。

#### <実験結果>

Table 3-3は、ラット肝Msおよび精製エステラーゼのEPNによる阻害と、NAD添加の影響を示している。

Msを用いた場合に認められたNADの阻害増強作用は、精製エステラーゼでは全く認められず、NADの作用は酵素材料としてMsを用いた場合にのみ認められる現象である事が明らかとなった。

Table 3-3

Effects of NAD on EPN-induced inhibition of rat liver microsomal carboxylesterase and pure esterase in vitro

Addition	CEase activity	Pure esterase activity
None	65.7±2.8	122.1±6.3
EPN	61.0±3.3	100.1±4.1
EPN+NAD	9.2±4.6*	101.0±4.6

Activities of microsomal carboxylesterase (CEase) and pure esterase (from hog liver microsomes, E.C. 3.1.1.1) were shown as nmoles BZH formed/mg protein/30 min. The concentrations of EPN and NAD were  $1 \times 10^{-5}$  M and  $5 \times 10^{-5}$  M, respectively. Each value is the mean±S.E. from three experiments. \*P<0.01: statistically significant difference from the EPN addition group.

## 第2章 EPNによるカルボキシエステラーゼ阻害のNADによる 増強作用におよぼす肝ミクロソーム前処理の影響

### 3-2-1 加熱の影響

#### <実験方法>

使用動物およびCEase活性測定法は、3-1-1に従って行った。加熱処理は、Msを活性測定用混液に添加する前に40℃および80℃で、5分間前処理した。なお、80℃ではMs CEase活性そのものが失活する事が予試験で知られている為、この系には活性測定時に精製エステラーゼ(E. C. 3. 1. 1. 1)を、0.083 U/Tube 添加した。

#### <実験結果>

Fig. 3-4は、加熱処理Msを用いた場合の、EPNによるCEase阻害に対するNADの作用を示している。

40℃前処理MsにおけるNADの作用は非処理Msと比べて同等であったが、80℃前処理によりその作用は消失した。



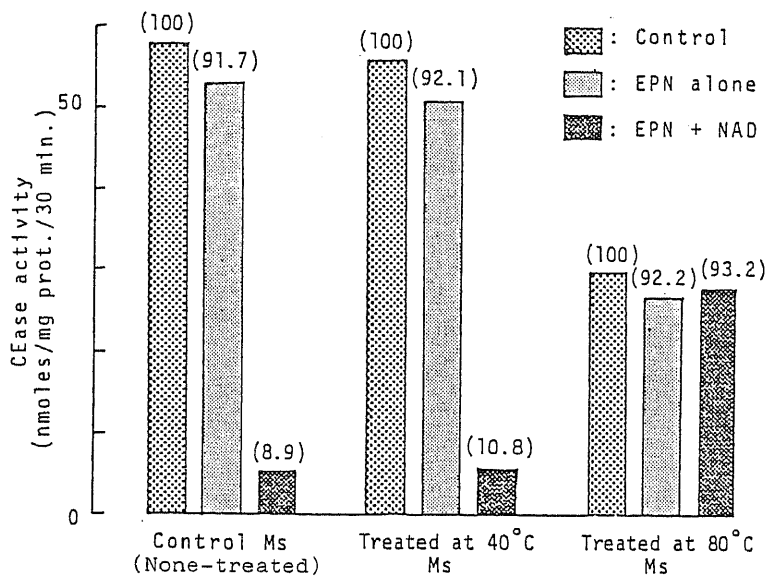


Fig. 3-4 Effect of pretreatment of liver microsomes by heating on the NAD-induced potentiation of anti-carboxylesterase action of EPN  
 Rat liver microsomes were pretreated at 40° and 80° for 5 min. The concentrations of EPN and NAD used were  $1 \times 10^{-5}M$  and  $5 \times 10^{-5}M$ , respectively.

### 3-2-2 コール酸による可溶化の影響

#### <実験方法>

使用動物およびCEase活性測定法は、3-1-1に従って行った。肝Msの可溶化はImai and Sato (1974)の方法を若干改良し、0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.6) 25 ml中に、Ms懸濁液 (蛋白量 約 2 mg)、1 mM EDTA、20%グリセロール、1 mMジチオスレイトールおよび所定量のコール酸ナトリウム (Sigma) を含む混液を調製し、0°C、30分間放置し、その後  $105,000 \times g$ 、0°C、60分超遠心分離し、ペレット (ppt) と上澄 (sup) を得た。

### < 実験結果 >

Table 3-4 は、コール酸により可溶化した Ms (ppt と sup) を酵素材料とし、その CEase 活性の EPN による阻害に対する NAD の作用を示している。ppt では、コール酸非処理および 0.05 mg 処理で、NAD による CEase 阻害増強作用が認められたが、0.2 mg および 1 mg のコール酸処理によりその作用は消失した。

一方、sup では 1 mg のコール酸処理により NAD の作用が見られ、NAD による CEase 阻害増強作用に関与する Ms 常在成分が、コール酸により可溶化される結果を得た。

Table 3-4

Effects of treatment of liver microsomes with cholate on the potentiation of EPN-induced inhibition of carboxylesterase by NAD

Cholate added (mg/mg protein)	Carboxylesterase activity (nmoles BZH formed/mg protein/30 min)					
	ppt.			sup.		
	Control	EPN	EPN+NAD	Control	EPN	EPN+NAD
None	52.2±3.3	48.6±2.5	12.0±1.4*	27.9± 9.8	18.5± 7.1	13.2± 2.5
0.05	50.5±2.6	46.8±2.3	11.6±1.7*	53.6± 1.6	33.5± 6.3	33.3± 6.9
0.2	40.1±8.8	37.4±8.1	28.1±5.8	103.3± 4.7	86.1± 3.5	82.1± 4.2
1.0	9.9±3.5	7.9±3.0	7.0±2.3	135.9±11.5	132.1±10.0	75.6±15.0*

The concentrations of EPN and NAD used were  $1 \times 10^{-6}$  M and  $5 \times 10^{-6}$  M, respectively. Each value is the mean±S.E. from five experiments. \* $P < 0.01$ , statistically significant difference from each EPN group.

### 3-2-3 透析の影響

#### < 実験方法 >

使用動物および CEase 活性測定法は、3-1-1 に従って行った。Ms の透析は 1.15% KCl 溶液に懸濁した Ms を シームレスセルローズチューブ (Union Carbide Corp.) に入れ、4 °C、18 時間透析した。

### < 実験結果 >

Table 3-5 は、非透析および透析Ms を用い、CEase 活性の EPN による阻害に対する NAD の作用を示している。

透析により CEase 活性そのものも約 30% 失活した。NAD による CEase 阻害増強作用は、非透析時 (7.3%) に比べてかなり減少 (67.2%) しているものの、その作用はなお残存しているものと思われた。

Table 3-5

Effect of dialysis on the NAD-mediated potentiation of anti-carboxylesterase action of EPN in vitro

Treatment	Addition	Carboxylesterase activity	%
None	None	70.2	100
	EPN	65.7	93.6
	EPN + NAD	5.1	7.3
Dialysis	None	47.5	100
	EPN	44.6	93.9
	EPN + NAD	31.9	67.2

Carboxylesterase activity was shown as nmoles BZH formed /mg protein/30 min. The concentrations of EPN and NAD used were  $1 \times 10^{-5}M$  and  $5 \times 10^{-5}M$ , respectively. Each value is the mean of two experiments.

### 3-2-4 NADase 添加の影響

#### < 実験方法 >

使用動物および CEase 活性測定法は、3-1-1 と同じである。NADase による前処理は、0.4 mM の NAD および 5-50  $\mu g$  の NADase (NAD ヌクレオンダーゼ、E. C. 3. 2. 2. 6、仔牛脾臓、Sigma) / 0.1 M リン酸 緩衝液 (pH 7.6) 0.5 ml を 37 °C、20 分間反応させた。その 0.5 ml を活性測定用混

液にNAD溶液として添加した。

<実験結果>

Table 3-6 は、CEaseのEPNによる阻害に対するNADase前処理 NAD添加の作用を示している。

NADの作用は、NADaseの添加量に比例して消失し、50 mgのNADase処理では82%のCEase活性まで回復した。この結果は、NADの類似体を活性測定用混液に添加した時NADの作用が認められず、NADでのみその作用が認められた第1編、1-1-3の成績を支持するものである。

Table 3-6 Effect of NAD nucleosidase on NAD-induced potentiation of CEase inhibition by EPN

NADase added (mg)	CEase*		Ratio**
	NAD(-)	NAD(+)	
0	55.49 ± 6.37	9.92 ± 0.84	0.179
5	54.48 ± 7.67	10.11 ± 0.93	0.186
10	55.40 ± 5.10	12.40 ± 1.11	0.224
50	58.74 ± 6.39	48.24 ± 3.00	0.821

Carboxylesterase (CEase) activity was assayed using ISOC as substrate. \* nmoles BZH formed/mg protein/30 min. Figures represent mean ± S.E. from five experiments. \*\* NAD(+)/NAD(-).

### 3-2-5 セリン酵素阻害剤の影響

#### <実験方法>

使用動物およびCEase活性測定法は、3-1-1と同じである。セリン酵素の阻害剤としてフッ化フェニルメチルスルホン酸(PMSF、Sigma) (Sultatos and Murphy, 1983)を用い、所定濃度となる様CEase活性測定用混液に、プレインキュベーション時に添加した。EPNおよびNADの最終濃度は、それぞれ $1 \times 10^{-5}$  M、 $5 \times 10^{-5}$  Mである。

#### <実験結果>

Fig. 3-5は、NADによるCEaseの阻害増強におよぼすPMSFの影響を示している。

CEase活性はPMSFの添加濃度に比例して失活したが、NADによる阻害増強作用に対しては、CEase活性がほとんど消失した $1 \times 10^{-4}$  Mにおいても全く影響を与えなかった。この事は、CEaseの失活とNADによる阻害増強作用とが無関係である事、およびMs中の阻害増強物質がセリン酵素ではない事を示唆していた。

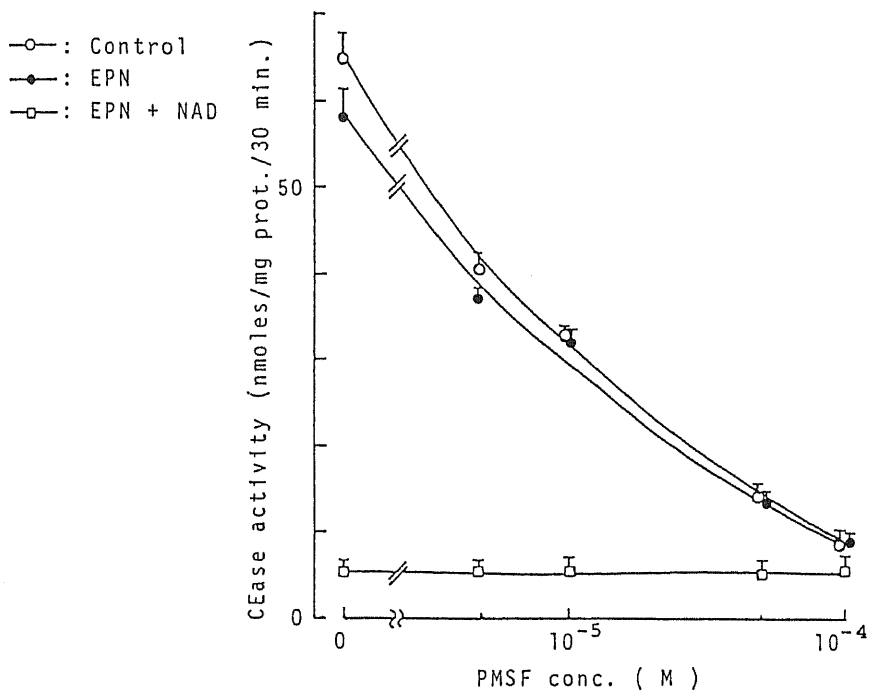


Fig. 3-5 Effect of PMSF on the NAD-induced potentiation of anti-carboxylesterase action of EPN

### 3-2-6 SH基阻害剤による影響

#### <実験方法>

使用動物およびCEase活性測定法は、3-1-1に従って行った。SH基阻害剤は、N-エチルマレイミド(NEM、半井化学)、パラクロロ安息香酸第2水銀(PCMB、和光純薬)およびモノヨード酢酸(IAA、和光純薬)を用い、いずれも0.2 M トリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)に所定量溶解し、プレインキュベーション時に添加した。また、MsのEPNあるいはSH基阻害剤による前処理の実験は、あらかじめMs(蛋白量約3mg)を、EPN(1 mM)あるいはSH基阻害剤(3 mM)と37℃、10分間反応させた後、3-2-3に従って透析し、これらの阻害剤を除去した。また、透析により失活し

た CEase 活性を補う為、精製エステラーゼ (E. C. 3. 1. 1. 1) を 0.125 U / Tube 活性測定時に添加した。

### <実験結果>

Table 3-7 は、NAD による CEase 阻害増強作用におよぼす NEM、PCMB および IAA 添加の影響を示している。

NAD 添加により、EPN 単独時の 52.2 の活性が 3.5 にまで阻害された CEase 活性は、1 mM の NEM で 34.2、0.1 mM の PCMB で 45.6 の活性にまで復し、NAD の作用は消失した。また、IAA は 1 mM 添加しても NAD の作用に影響を与えなかった。

Table 3-7

Effects of sulfhydryl reagents on the NAD-mediated potentiation of anti-carboxylesterase action of EPN in vitro

Addition	None	Sulfhydryl reagent					
		NEM		PCMB		IAA	
		0.1 mM	1 mM	0.01 mM	0.1 mM	0.1 mM	1 mM
Control	58.0±3.5	53.2±3.3	40.6±1.7	57.4±5.0	52.7±4.7	54.6±2.7	51.3±3.5
EPN	52.2±3.4	49.1±3.2	38.6±1.4	52.3±4.7	47.9±4.7	49.8±3.0	46.5±2.8
EPN+NAD	3.5±0.5*	3.8±0.4*	34.2±1.7	6.9±2.7*	45.6±5.4	3.3±0.5*	3.3±0.6*

Carboxylesterase activity was shown as nmoles BZH formed/mg protein/30 min. The concentrations of EPN and NAD used were  $1 \times 10^{-5}$  M and  $5 \times 10^{-5}$  M, respectively. Each value is the mean±S.E. from 3-5 experiments. NEM: N-ethylmaleimide. PCMB: p-chloromercurbenzoic acid. IAA: iodoacetic acid. \*P<0.01; statistically significant difference from the EPN alone group.

Table 3-8 は、EPN および SH 基阻害剤で前処理した Ms を用いた場合の CEase 活性に対する NAD の作用を示している。

EPN および EPN + IAA による前処理で、NAD による阻害増強作用は Table 3-7 よりは減少したものの、なお認められた。一方、EPN + NEM と EPN + PCMB による前処理では、Table 3-7 の成績と同様に NAD の作用は消失した。即ち、EPN による前処理 (CEase の阻害) は NAD の作用に影響を受えない事、NEM および PCMB は影響を与える事が示された。

Table 3-8

Effects of pretreatment of liver microsomes with EPN and sulfhydryl reagents on the NAD-effect

Pretreatment	Carboxylesterase activity (% of control)		
	Control	EPN	EPN+NAD
EPN	100.0	95.6±5.6	35.0±11.2**
EPN+NEM	100.0	92.8±13.3	93.4±13.3
EPN+PCMB	100.0	92.2±27.3	92.9±26.6
EPN+IAA	100.0	96.0±5.9	71.1±8.9*

The microsomes were pretreated with EPN and sulfhydryl reagents for 10 min at 37°C. The concentrations of EPN and sulfhydryl reagents used in the pretreatment were 1 mM and 3 mM, respectively. After dialysis, 0.125 U of pure esterase (E.C.3.1.1.1) was added in the incubation mixture of these experiments. The concentrations of EPN and NAD used in the assay mixture were  $1 \times 10^{-6}$  M and  $5 \times 10^{-5}$  M, respectively. Each value is the mean  $\pm$  S.E. from three experiments. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ : statistically significant difference from each control group.

尚、Ms CEase に対する NEM による阻害は非競合的であり、IAA によるそれは、競合的なものであり (Fig. 3-6)、両者の阻害形式は異なっていた。

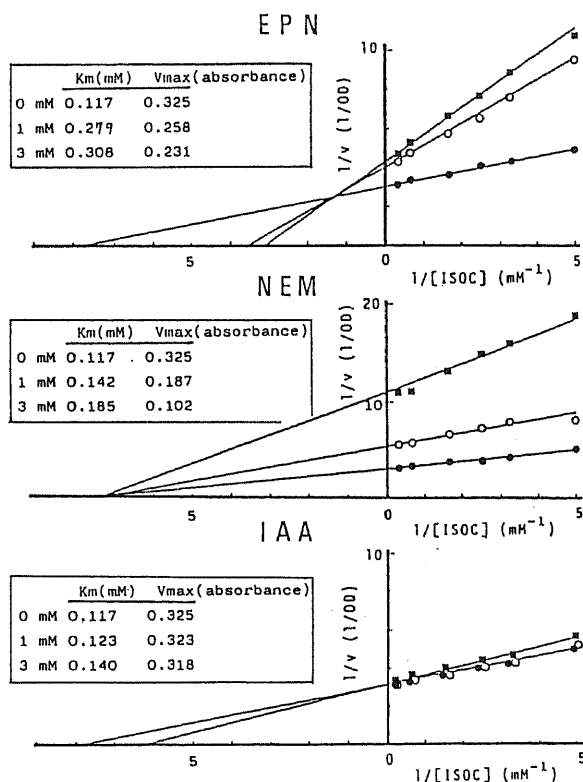


Fig. 3-6 Inhibition profile of carboxylesterase by EPN and sulfhydryl reagents

Pure esterase (E.C.3.1.1.1) was used as an enzyme source. Incubation mixture was incubated at 37°C for 30 min with inhibitors. Values on the ordinate are shown as absorbance of BZH at 495 nm.



### 第3章 EPNoxonの生成およびカルボキシエステラーゼと EPNあるいはNADとの結合

#### 3-3-1 NAD添加によるEPNoxon生成の検討

##### <実験方法>

使用動物およびCEase活性測定法は、3-1-1にて、EPNoxonの定量法は、第1編に従って行った。EPNoxonはMs中のフォスファターゼなどのA-エステラーゼ(Aldridge, 1953)により一部分解され(Lasker et al., 1982; Abou-Donia et al., 1983)、また、一部はCEaseのセリン残基と結合する為に、生成したEPNoxon量を正確に定量する目的で本実験では、CEaseのセリン残基をマスクするPMSF(最終濃度1 mM)とA-エステラーゼの阻害剤であるEDTA(最終濃度 $4.5 \times 10^{-5}$  M、同仁薬化学研)(Shishido et al., 1972; Sultatos and Murphy, 1983)を、反応混液に添加する実験も加えた。

##### <実験結果>

Table 3-9は、CEase活性測定用混液中でのEPNoxon生成におよぼすNAD添加の影響と、その時のCEase活性を示している。

EPNのみでは、反応中におけるEPNoxon生成量は定量限界以下であったのに対して、NADを添加すると添加EPNの2.3% EPNoxonが生成した。その時のCEase活性は13.3%に低下した。PMSFとEDTAの添加は、EPNoxon生成量を3.1%と若干多くした。

Table 3-9

Effects of NAD on the enzymatic formation of EPNoxon from EPN and carboxylesterase activity

Addition	EPNoxon (M)	% (EPNoxon/EPN)	Carboxylesterase (% of control)
None	—	—	100.0
EPN	N.D.	—	85.9
EPN+NAD	$3.5 \times 10^{-7}$	2.3	13.3
EPN+NAD+PMSF+EDTA	$4.7 \times 10^{-7}$	3.1	—

The concentrations of EPN added were  $1.5 \times 10^{-5}$  M in 10 ml of incubation mixture for the EPNoxon assay and  $1 \times 10^{-5}$  M in 1.5 ml of incubation mixture for the carboxylesterase assay, respectively. The concentrations of NAD used were  $7.5 \times 10^{-5}$  M for the EPNoxon assay and  $5 \times 10^{-5}$  M for the carboxylesterase assay, respectively. PMSF and EDTA added were 1 mM and  $4.5 \times 10^{-5}$  M, respectively. N.D.: less than  $0.5 \times 10^{-7}$  M. Each value is the mean of two experiments. EPNoxon was determined by the GC-MS method.

### 3-3-2 カルボキシエステラーゼと EPN との結合におよぼす NAD (P) 添加の検討

#### <実験方法>

使用動物および CEase 活性測定法は、3-1-1 に従って行った。本実験ではピリジヌクレオチドとして NAD の他に NADP (オリエンタル酵母) も使用し、最終濃度はいずれも  $1 \times 10^{-6}$  M -  $1 \times 10^{-4}$  M とした。

EPN と CEase との結合はフェニル- $^{14}$ C-標識 EPN ( $^{14}$ C-EPN) を用い、CEase 活性測定用混液の EPN でおおよそ 10,000 d.p.m. に希釈して使用した。結合量の測定は CEase 活性測定用反応混液を 37 °C、10 分間インキュベーションし、ISOC (基質) を添加せず直ちに 15% メタリン酸 2 ml で反応を停止した。3,000 r.p.m. 10 分間遠心分離後、沈澱物に再び同試薬を加え、振とう、遠心分離後、その沈澱物にメタノール 2 ml を加えた。このメタノールでの洗滌、遠心分離を 5 回繰り返し、メタノール層の放射能が認められなくなるまで洗滌して得られた沈澱物を、1 N NaOH 1 ml で 80 °C 加熱溶解した。その 0.5 ml に水 1 ml およびアクアゾル (New England Nuclear) 10 ml を加え、液体シンチレーションカウンター (Beckman, model SL-100C) にて放射能を測定した。

<実験結果>

Fig. 3-7Aは、EPNによるCEase 活性阻害におよぼすNADおよびNADPの作用を示し、Fig. 3-7Bは、CEaseと $^{14}\text{C}$ -EPN(oxon)との結合量におよぼすNADおよびNADPの影響を示している。

EPNによるCEase 活性阻害は、NADPによっても増強されたが、その程度はNADに比べ $1/3$ に留まった。

一方、CEaseと $^{14}\text{C}$ -EPN(oxon)との結合量は、NADではその添加量の増加に比例して増加する事を認めたが、NADPでの増加はCEase 活性の阻害増強と同様に少なかった。

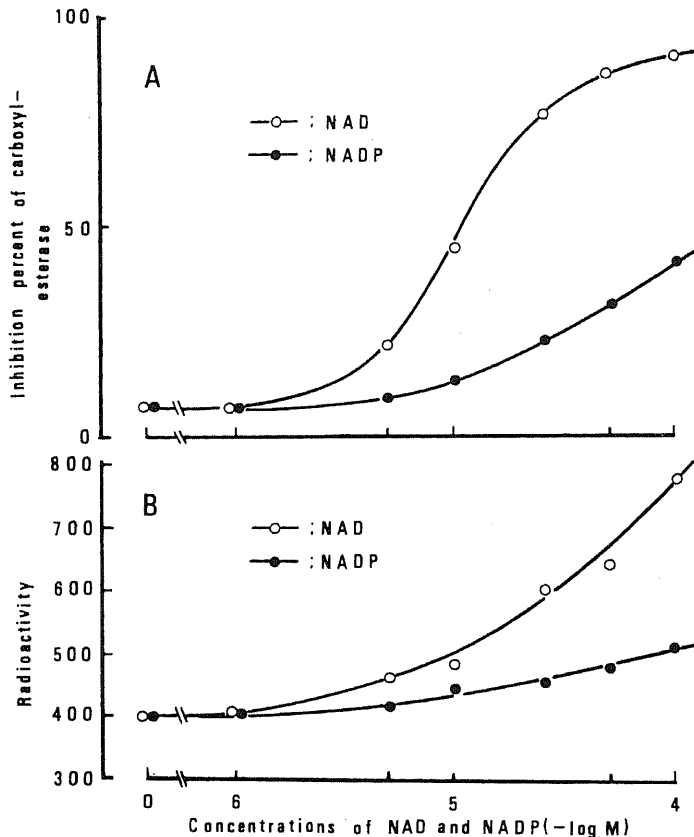


Fig. 3-7

Effects of NAD and NADP on the EPN-induced inhibition of carboxylesterase and binding of  $^{14}\text{C}$ -EPN to microsomal protein. Inhibition percent of carboxylesterase activity and amount of  $^{14}\text{C}$ -EPN bound to microsomal protein (pmoles  $^{14}\text{C}$ -bound/mg protein/10 min) are shown in A and B of the figure. The concentration of EPN used was  $1 \times 10^{-5}$  M. Each point is the mean of three experiments. —○—: NAD, —●—: NADP.

### 3-3-3 カルボキシエステラーゼと EPN との結合におよぼす SH 基阻害剤添加の検討

#### <実験方法>

使用動物および CEase 活性測定法は、3-1-1 に、 $^{14}\text{C}$ -EPN と CEase との結合量の測定は、3-3-2 に従って行った。なお SH 基阻害剤の最終濃度は 1mM である。

#### <実験結果>

Fig. 3-8A は、EPN による CEase 活性阻害におよぼす NAD および SH 基阻害剤添加の影響を示し、また、Fig. 3-8B は、 $^{14}\text{C}$ -EPN と CEase との結合におよぼす NAD および SH 基阻害剤の影響を示している。

CEase 活性の NAD による阻害増強作用に対する NEM、PCMB および IAA の影響は、3-2-6 に示した結果と同様であった。

一方、NAD 添加により非添加時の約 2.5 倍増加した  $^{14}\text{C}$ -EPN (oxon) と CEase との結合量は、NEM および PCMB の添加により全く増加が認められなくなった。この結合実験の成績は、Fig. 3-8A における CEase 活性の成績と極めて密接な関係を示した。

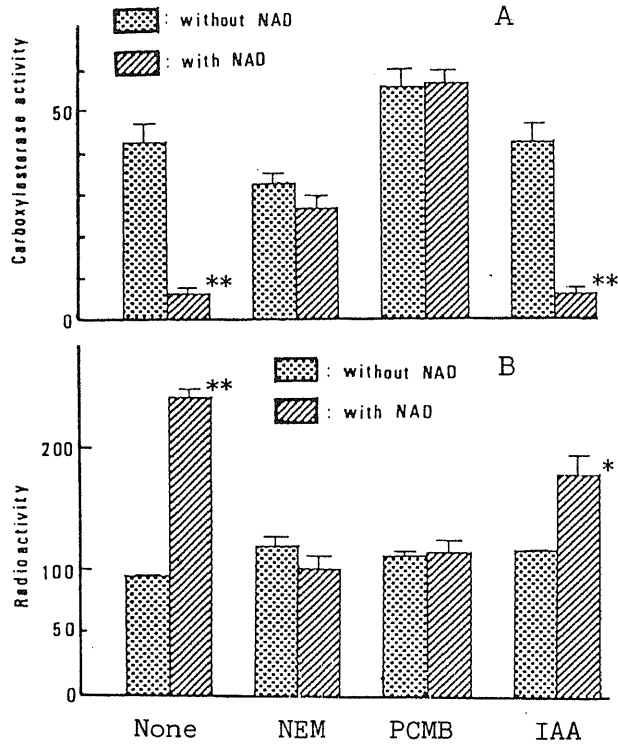


Fig. 3-8 Effects of sulfhydryl reagents on the NAD-mediated potentiation of anti-carboxylesterase action of EPN and binding of  $^{14}\text{C}$ -EPN to microsomal protein. Carboxylesterase activity and amount of  $^{14}\text{C}$ -EPN bound to microsomal protein were shown as nmoles BZH formed/mg protein/30 min and pmoles  $^{14}\text{C}$ -bound/mg protein/10 min, respectively. The concentrations of EPN, NAD and sulfhydryl reagents used were  $1 \times 10^{-6}$  M,  $5 \times 10^{-6}$  M and 1 mM, respectively. Each column is the mean  $\pm$  S.E. from three experiments. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ : showed a statistically significant difference from the none added group.

### 3-3-4 カルボキシルエステラーゼと NAD との結合の検討

#### <実験方法>

EPNによるCEase阻害に対するこれまで述べたNADの阻害増強の作用機序として、CEaseとNADとの複合体が生成し、それによりEPNによる

CEase 阻害の増強が生じる可能性を考え、本実験を行った。

$^{14}\text{C}$ -NAD と CEase との結合量の測定は、3-3-2 の  $^{14}\text{C}$ -EPN を用いた実験に準じた。 $^{14}\text{C}$ -NAD は、カルボニル- $^{14}\text{C}$ -NAD と U- $^{14}\text{C}$ -NAD を使用し、また比較の為に、 $^{14}\text{C}$ -ニコチンアミド ( $^{14}\text{C}$ -N.A) (いずれも Amersham) も用いた。これらを非標識 NAD あるいは N.A で、おおよそ 10,000 d.p.m. に希釈 (最終濃度  $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) し、CEase 活性測定用混液に加えた。

### <実験結果>

Table 3-10 は、標識部位の異なった 2 種の  $^{14}\text{C}$ -NAD と  $^{14}\text{C}$ -N.A を用い、それらの CEase との結合量を示している。

Table 3-10

#### Binding of NAD and nicotinamide to microsomal protein

Addition	Binding percent (radioactivity <sub>ppt</sub> /radioactivity <sub>initial</sub> )
NAD(Carbonyl- $^{14}\text{C}$ )	0.30 ± 0.12
NAD(U- $^{14}\text{C}$ )	0.30 ± 0.13
Nicotinamide(Carbonyl- $^{14}\text{C}$ )	0.24 ± 0.07

The concentrations of NAD and nicotinamide used were  $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ . Each value is the mean ± S.E. from three experiments.

$^{14}\text{C}$ -NAD と CEase との結合量は、阻害増強作用の認められない N.A と比べてほとんど変わらず、NAD による阻害増強作用が CEase と NAD との結合の結果生じる現象であるとの可能性は否定された。

## 第4章 考 察

第1編において見られた肝Ms CEase 活性のEPNによる阻害が、NAD 添加により顕著に増強された事について、本編では詳細な検討を加えた。

Fig. 3-1 および Table 3-1 に示した様に、ラット肝Ms CEase および ChE 活性の有機リン化合物による阻害に対して、NADはCEase活性阻害の増強を顕著に示したものの、ChEに対してはその程度が小さかった。この事は先にMurphy and Cheever (1972), Satoh and Moroi (1973b) および Moroi and Kuga (1982) などが述べているCEaseの有機リン化合物に対する感受性(親和性)がChEのそれより高いとする報告と一致する成績であり、Oxon型有機リン化合物によるChE阻害による毒作用から、生体を防禦するスカベンジャーとしてのCEaseの役割(Fonnum and Sterri, 1981)を考える時納得出来るものであった。NADの作用は有機リン化合物のアルキル基の違いによりその程度が異なり、エトキシ基を有する化合物の方がメトキシ基を有するそれよりも強いNADの作用を認めた。このアルキル基の違いによるNADの作用の差については、有機リン化合物とCEaseとの親和性の差(Murphy and Cheever, 1972; Cohen and Murphy, 1972)、Cyt. P-450、恐らくP-450<sub>PB</sub>(Lasker et al., 1982)との結合の差(Norman et al., 1974; Uchiyama et al., 1975; Kamataki and Neal, 1976)、およびフォスファターゼなどのA-エステラーゼによる有機リン化合物の分解(Mackness et al., 1983; Sultatos and Murphy, 1983)の差などの面から見た有機リン化合物の構造活性相関的な差が考えられ、更に、アルキル基の炭素鎖の違いによる化学的安定性の差も考慮しなければならないと思われる。しかしながらこの詳細について、本研究では検討していない。

Fig. 3-3 および Table 3-2 は、Oxon型有機リン化合物に対するNADの作用を見たもので、Oxon型有機リン化合物によるCEase阻害に対しては、NADの作用が発現しない事を明らかとした。

Table 3-3の精製エステラーゼを用いた成績は、以上のNADの作用がMs存在下でのみ認められる現象である事を示しており、この事から、NAD

による CEase の阻害増強作用は、Ms 中に存在する未知物質(未知因子)の共存下においてのみ発現する作用である事が推察された。

第 1 章において明らかとなった種々の P = S 型有機リン化合物による Ms CEase 活性阻害の NAD による阻害増強作用(以後、本研究においてこの NAD の作用を“NAD-効果”と略して称する事にする)について、第 2 章では、その機構を知る目的で Fig. 3-4、Table 3-4、Table 3-5 および Fig. 3-5、Table 3-7 に示す実験を行った。その結果、Ms 内在性の未知因子は熱に不安定で、コール酸により可溶化され、セリン酵素阻害剤により阻害されず、さらに、NEM、PCMB など SH 基阻害剤で阻害される性質を有する事が明らかとなった。SH 基阻害剤の内 IAA では、“NAD-効果”が消失しなかった事については、Fig. 3-6 に示した様に、NEM による CEase 阻害型式と IAA のそれとが異なる事から、Ms 内在性未知因子が 1 種類ではない事を示唆した。ラット肝 Ms CEase は NEM および PCMB により阻害されない(Moroi and Satoh, 1975)との報告と、Fig. 3-5 に示した PMSF による CEase 阻害の結果および Table 3-8 の結果は、“NAD-効果”の消失に Ms CEase の阻害が直接関与していない事を示している。

以上の諸知見より、“NAD-効果”を発現する Ms 内在性未知因子は、その作用発現に NAD そのものの構造を必要とする(第 1 編の Fig. 1-4 および本編の Table 3-6)ある種の酵素、恐らく、その諸性質から Ms 内在性デヒドロゲナーゼである事が推測された。

第 3 章は“NAD-効果”について更に詳細な検討を加えたもので、Table 3-9 は、EPN oxon 生成量が NAD により促進される事を示している。この事と Fig. 3-3、Table 3-2 における Oxon 型有機リン化合物に対して“NAD-効果”が認められない事を併せ考えると、“NAD-効果”は、P = S 型有機リン化合物が Oxon 型に変換された結果生じたものであると推察される。この事は、Fig. 3-7 AB の結果からも支持された。即ち、Fig. 3-7 AB において、“NAD-効果”と、CEase と  $^{14}\text{C}$ -EPN(oxon)との結合はよく一致しており、また、それは NADP より NAD において顕著に認められた。Oxon 型有機リン化合物の CEase との結合について、Cohen and



Murphy (1972) は、マラチオンの Oxon 型であるマラオキシソンの CEase との結合が、CEase 活性阻害と良い相関性を示す事を報告している。今回、NAD 添加により  $^{14}\text{C}$ -EPN (oxon) と CEase との結合量が増加し、その時の CEase 活性がそれと逆比例的に低下した事は彼らの報告とも矛盾せず、Table 3-9 に示した EPNoxon 生成の結果とも一致していた。

一方、この EPNoxon と CEase との結合は NEM および PCMB で阻害され (Fig. 3-8B)、この結合実験からも SH 基を有する未知因子の関与が示された。

これらの結果および考察より “NAD-効果” 発現に関与する酵素としては、活性中心に SH 基を有し、NADP より NAD をより強く要求する Ms デヒドロゲナーゼが考えられ、これにより添加した NAD が NADH に変換し、それが Cyt. P-450 系による EPN の酸化的脱硫化反応を促進し、EPNoxon 生成量を増加させると仮定した。

この仮定に対しての研究は、“NAD-効果” の作用機序として、第 4 編にて詳述する。

## 第4編 有機リン化合物によるカルボキシエステラーゼ阻害のNADによる阻害増強作用(“NAD-効果”)に関する作用機序の検討

第3編において、有機リン化合物による肝ミクロゾーム(Ms)カルボキシエステラーゼ(CEase)活性阻害が、NADの添加により著るしく増強される事、およびその増強作用の特徴についてくわしく報告した。周知のごとく、肝MsチトクロームP-450(Cyt. P-450)依存によるチオノ(P=S)型有機リン化合物のフォスフェート(Oxon)型有機リン化合物への酸化的脱硫化反応は、NAD(P)Hと分子状酸素の存在下で促進される事が知られているが、電子供与体とならないNADの作用については明確にされていない。第3編の結果より、このNADによるCEaseの阻害増強(“NAD-効果”)の作用機構が仮定され、“NAD-効果”の引き金としてMs内在性因子の関与、更に、その未知因子の候補物質としてMs内在性長鎖デヒドロゲナーゼが考えられた。

デヒドロゲナーゼの多くは、細胞のミトコンドリアあるいは可溶性画分(Cytosol)に存在(Glenn and Vanko, 1959; Deitrich, 1966; Bütter, 1965; Marjanen, 1972, 1973)するものが多いが、近年、Msにも存在する事が報告されている(Koivula and Koivusalo, 1975; Nakayasu, 1978; Lee, 1979)。その臓器内分布は肝に極めて多く(中安, 1983)、Koivula and Koivusalo(1975)によるラット肝細胞内アルデヒドデヒドロゲナーゼの分布は、ミトコンドリア45-50%、Ms 35-45%、Cytosol 10-15%であり、Tottmer et al.(1973)は、ミトコンドリア35%、Ms 26%、リソゾーム20%、核10%、Cytosol 4%であると報告している。Nakayasu(1978; 1983)は、Ms内在性デヒドロゲナーゼは膜結合の状態が存在し、脂質代謝による代謝物の代謝的解毒作用を行う酵素で、主に長鎖アルコールやアルデヒドを基質とすると報告している。更にその特徴として、1) 活性中心にSH基を有する、2) NADPよりNADを主な補酵素とする、3) コール酸により可溶化される、4) アイソザイムの1つである長鎖ア

ルコール デヒドロゲナーゼは、NEMにより阻害されるがIAAでは阻害されない、なども知られている (Lee, 1979; Nakayasu et al., 1978; 中安, 1983)。これらの特徴と、第3編で得た“NAD-効果”の特徴とは一致する点が少なくない。

そこで、本編は、このMs 内在性長鎖デヒドロゲナーゼと“NAD-効果”との関連性について、デヒドロゲナーゼの阻害剤添加の影響、EPNからEPNoxonの生成、Ms Cyt. P-450の関与などの面からも検討を加え、“NAD-効果”発現の作用機序を明確にする事を目的として実施した。

## 第1章 肝ミクロゾーム内在性デヒドロゲナーゼの関与

### 4-1-1 NAD類似体による“NAD-効果”とそれらの補酵素能との関連性

#### <実験方法>

実験動物およびCEase 活性測定法は第3編に、飼育法およびMs 調製法は第1編に従って行った。用いたNAD ( $\beta$ -NAD)類似体は $\alpha$ -NAD (Sigma)、3-アセチル-NAD (Ac-py AD, Sigma)、3-アルデヒド-NAD (py-Al AD, Sigma)および3-アミノ-NAD (Am-py AD, Sigma)であり、その構造式をFig. 4-1に示す。

本実験では、上記NAD類似体の補酵素能を知る為、基質としてデシルアルデヒド (n-デカナール、和光純薬)を用い、Ms アルデヒド デヒドロゲナーゼ活性をNakayasu et al. (1978)の方法に従い測定した。活性測定用混液は、Ms 懸濁液 (蛋白量 約 0.3 mg) 0.1 ml、NADおよびその類似体 (最終濃度  $5 \times 10^{-4}$  M) 20  $\mu$ l、デシルアルデヒド (同  $5 \times 10^{-4}$  M) 10  $\mu$ lを1% Triton X-100を含む0.2 Mピロリン酸ナトリウム 緩衝液 (pH 9.0)にて全量2 mlとし、分光光度計の恒温 (25  $^{\circ}$ C)セル中で5分間反応させ、340 nm ( $\alpha$ -および $\beta$ -NAD)あるいは360 nm (Ac-py AD、

py-A1 ADおよびAm-py AD)における吸光度差を測定し求めた。尚、吸光度差の認められた $\beta$ -NADとAc-py ADの分子吸光係数は、それぞれ6.22および $9.1 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mole}^{-1}$ である。

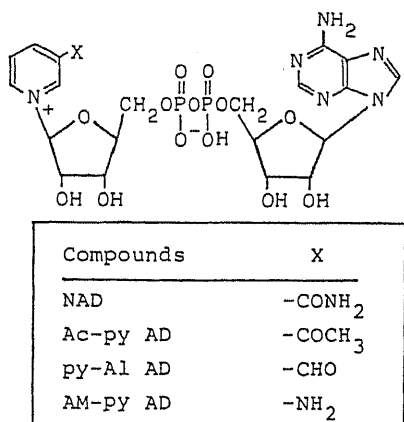


Fig. 4-1  
Chemical structure of NAD and its analogs

### <実験結果>

Table 4-1には、種々のNAD類似体を用いた時の“NAD-効果”を示し、Table 4-2は、Msアルデヒドデヒドロゲナーゼに対するNAD類似体の補酵素能を示している。

“NAD-効果”は、 $\beta$ -NADとAc-py ADでのみ顕著に認められ、 $\alpha$ -NAD、py-A1 ADおよびAm-py ADは、 $1 \times 10^{-4} \text{ M}$  添加でも作用を示さなかった。デヒドロゲナーゼに対する補酵素能は“NAD-効果”とよく一致しており、それは $\beta$ -NADとAc-py ADでのみ認められ“NAD-効果”とデヒドロゲナーゼに対する補酵素能とは、密接な関係にある事が示された。

Table 4-1 Effect of NAD and its analogs on the EPN-induced inhibition of carboxylesterase

Addition	Carboxylesterase activity
Control	67.7 $\pm$ 2.0
EPN	63.5 $\pm$ 2.3
EPN + $\alpha$ -NAD (5 x 10 <sup>-5</sup> M)	63.4 $\pm$ 2.1
(1 x 10 <sup>-4</sup> M)	62.2 $\pm$ 1.8
EPN + $\beta$ -NAD (5 x 10 <sup>-5</sup> M)	4.4 $\pm$ 0.6*
EPN + Ac-py AD (5 x 10 <sup>-5</sup> M)	4.3 $\pm$ 0.4*
EPN + py-Al AD (5 x 10 <sup>-5</sup> M)	63.4 $\pm$ 2.4
(1 x 10 <sup>-4</sup> M)	62.5 $\pm$ 3.1
EPN + Am-py AD (5 x 10 <sup>-5</sup> M)	63.7 $\pm$ 2.4
(1 x 10 <sup>-4</sup> M)	64.4 $\pm$ 2.4

Carboxylesterase activity was shown as nmoles BZH formed/mg protein/30 min. The concentration of EPN used was 1 x 10<sup>-5</sup>M. Numbers in parentheses represent the concentrations of each NAD analogs used. Each value is the mean  $\pm$  S.E. from three experiments. \*p < 0.01: showed a statistically significant difference from the EPN alone group.

Table 4-2 Comparison of aldehyde dehydrogenase activity in the existence of NAD and its analogs as a cofactor

Addition	Microsomal aldehyde dehydrogenase activity
$\alpha$ -NAD	0.0
$\beta$ -NAD	48.9 $\pm$ 1.2
Ac-py AD	19.9 $\pm$ 1.2
py-Al AD	0.0
Am-py AD	0.0

Aldehyde dehydrogenase activity was shown as NADH nmoles/mg protein/min. Concentrations of NAD and four NAD analogs used were 5 x 10<sup>-4</sup>M. Decylaldehyde was used as a substrate. Each value is the mean  $\pm$  S.E. from three experiments.

## 4-1-2 NEMによるデヒドロゲナーゼ阻害と“NAD-効果” およびEPNoxon生成との関係

### <実験方法>

使用動物およびコール酸によるMsの可溶化法は第3編に、Msデヒドロゲナーゼ活性測定法は、4-1-1に従って行った。第3編にて“NAD-効果”を消失させる事が知られたNEMは、最終濃度 $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ — $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ になる様、CEase活性測定では0.2 Mトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)に溶解し、プレインキュベーション時に添加した。また、デヒドロゲナーゼ活性測定では、0.2 Mピロリン酸ナトリウム緩衝液(pH9.0)に溶解し、基質添加の前に活性測定用混液に添加した。

EPNoxon生成の実験は、第3編、3-2-2で示した可溶化Msの上澄(sup)での“NAD-効果”を更に明確なものとする目的も含め、酵素材料としてsupを用いて実施した。NEMの最終濃度は1.5 mMとし、反応開始時に添加した。

### <実験結果>

Fig. 4-2は、“NAD-効果”とMsアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性におよぼすNEM添加の影響を示している。

NEM添加量の増加に伴いMsアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性は低下し、一方、“NAD-効果”はそれに比例して消失した。また、デヒドロゲナーゼを介さないNADH添加によるCEase阻害増強作用は、NEM添加により影響を受けなかった。

この事は、“NAD-効果”発現にMs内在性デヒドロゲナーゼが関与している事を示唆した。

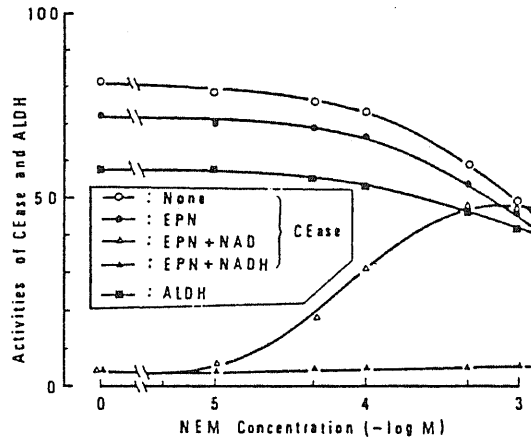


Fig. 4-2 Effects of N-ethylmaleimide on the NAD-effect and microsomal aldehyde dehydrogenase activity. Activities of carboxylesterase (CEase) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) are shown as nmoles of BZH formed/mg protein/30 min and nmoles of NADH formed/mg protein/min, respectively. The concentrations of EPN and NAD(H) used were  $1 \times 10^{-5}$  M and  $5 \times 10^{-5}$  M, respectively. Each point is the mean of three experiments.

Table 4-3 は、コール酸で可溶化したMs を酵素材料とした時の、CEase 活性測定用混液中での EPNoxon 生成量におよぼす NEM の影響を示している。

EPN のみでは定量限界以下であった EPNoxon 生成量は、NAD 添加 (PMSF、EDTA 添加の系も含む) により 0.9 ~ 1 % となった。この値は、第 3 編、3-3-1 で述べた可溶化しない Ms を用いた成績の約  $\frac{1}{3}$  であり、また、3-2-2 における CEase に対する NAD の作用程度を裏付ける結果でもあった。一方、この NAD 添加により増加した EPNoxon 生成量は、NEM 添加により定量限界以下となった。

Table 4-3

Effects of NAD on the enzymatic formation of EPNoxon from EPN in the supernatant of liver microsomes after cholate treatment

Addition	EPNoxon formed ( $10^{-7}$ M)	%(EPNoxon/EPNadded)
EPN	N.D.	—
EPN+NAD	$1.28 \pm 0.15$	0.85
EPN+NAD+NEM	N.D.	—
EPN+NAD+PMSF+EDTA	$1.48 \pm 0.12$	0.99
EPN+NAD+PMSF+EDTA+NEM	N.D.	—

N.D.: less than  $0.5 \times 10^{-7}$  M. The initial concentration of EPN added was  $1.5 \times 10^{-6}$  M. The concentrations of NAD, NEM, PMSF and EDTA used were  $7.5 \times 10^{-6}$  M, 1.5 mM, 1 mM and  $4.5 \times 10^{-6}$  M in 5 ml of incubation mixture, respectively. Liver microsomes were solubilized by addition of sodium cholate (1 mg/mg protein) at 0°C for 30 min. Each value is the mean  $\pm$  S.E. from four experiments.

#### 4-1-3 ジスルフィラム添加の“NAD-効果”に与える影響

##### <実験方法>

デヒドロゲナーゼの阻害剤として知られるジスルフィラム(和光純薬)(Kiedgaard, 1949; Graham, 1951; Stripp et al., 1969; Kitson, 1975)は、 $1 \times 10^{-6}$  M -  $1 \times 10^{-4}$  Mとなる様、CEase 活性測定用混液にプレインキュベーション時に添加した。

##### <実験結果>

Fig. 4-3は、“NAD(H)-効果”に対するジスルフィラムの影響を示している。

対照およびEPN添加の系でのCEase 活性は、ジスルフィラムの添加量に伴って低下した。そして、NADおよびNADH添加により見られていた阻害増強作用は、 $5 \times 10^{-5}$  M -  $1 \times 10^{-4}$  Mで消失し始めた。しかし、その消失は、CEase 活性そのもののジスルフィラムによる阻害と同程度となってしまった為、本実験より“NAD-効果”のジスルフィラムによる消失は、その傾向として認められるものの、明確に述べる事は出来なかった。



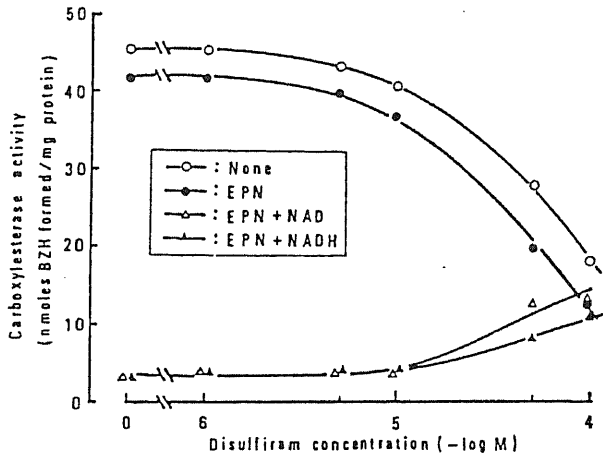


Fig. 4-3 Effects of disulfiram on NAD(H)-mediated potentiation of the anti-carboxylesterase action of EPN. The concentrations of EPN, NAD and NADH used were  $1 \times 10^{-5}$  M,  $5 \times 10^{-5}$  M and  $5 \times 10^{-5}$  M, respectively. Each point is the mean of three experiments.

#### 4-1-4 NAD(H)によるカルボキシルエステラーゼ阻害増強作用におよぼすデヒドロゲナーゼの基質添加の影響

##### <実験方法>

Msに存在する長鎖アルコールデヒドロゲナーゼ(NAD<sup>+</sup>オキシドレダクターゼ)(Lee, 1979)の基質となるセチルアルコール(ヘキサデカノール、東京化成)は、所定濃度となる様、CEase活性測定用混液にプレインキュベーション時に添加した。本実験でのNAD(H)添加濃度は、“NAD(H)効果”へのセチルアルコールの影響が明瞭となる様、NADは $1 \times 10^{-5}$  M、NADHは $5 \times 10^{-6}$  Mと、これまでより低濃度とした。

##### <実験結果>

Fig. 4-4は、EPNによるCEase阻害のNADおよびNADHによる阻害

増強作用におよぼすMsデヒドロゲナーゼの基質（アセチルアルコール）添加の影響を示している。

セチルアルコール  $2.5 \times 10^{-5}$  M 添加により、NADの作用は更に強いものとなったが、NADHの作用は特に増強されなかった。この事はMsデヒドロゲナーゼがその基質を利用してNADをNADHに変換させ、その結果、さらに“NAD-効果”を促進させた可能性を示唆するものであった。

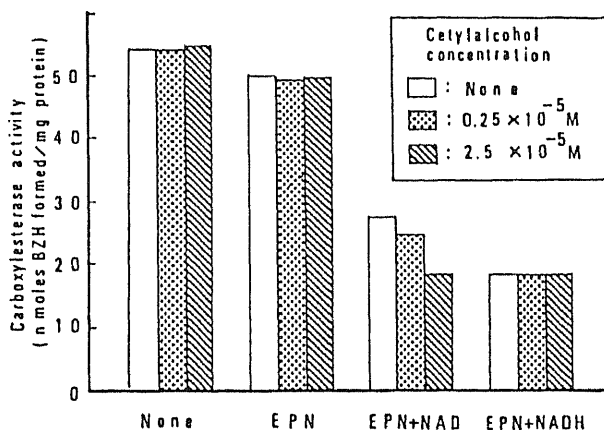


Fig. 4-4 Effects of cetylalcohol on the NAD-effect. The concentrations of EPN, NAD and NADH used were  $1 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-6}$  M and  $5 \times 10^{-6}$  M, respectively. Each column is the mean of two experiments.

## 第2章 “NAD-効果”への肝ミクロゾームチトクロームP-450の関与

### 4-2-1 SKF 525-A 添加の検討

#### <実験方法>

Cyt. P-450の阻害剤であるSKF 525-Aは、CEase活性測定用混液に、プレインキュベーション時およびその後の基質添加時の2方法で、い

れも 1 mM (最終濃度) 添加した。

#### < 実験結果 >

Table 4-4 は、“NAD-効果”に対する SKF 525-A 添加の影響を示している。

プレインキュベーション時に SKF 525-A を添加する事により“NAD-効果”は消失したが、NAD → NADH の変換がすでに終了していると思われる基質との同時添加では SKF 525-A の影響は見られなかった。

Table 4-4

Effects of SKF 525-A on NAD-mediated potentiation of the anti-carboxylesterase action of EPN

Addition		Carboxylesterase activity	% of control
Preincubation	Incubation		
None (control)	None	52.4±7.2	100.0
SKF 525-A	None	46.7 (n=2)	89.1
EPN	None	46.2±6.0	88.2
EPN+NAD	None	9.4±0.8*	17.9
EPN+NAD+SKF 525-A	None	45.8±3.4	87.4
EPN+NAD	SKF 525-A	7.2±0.6*	13.7
EPN+SKF 525-A	NAD	47.2±4.0	90.1

Liver microsomes were preincubated at 37°C for 10 min with 0.5 ml of Tris-HCl buffer (pH 8.0) plus the addition listed in the table in a total volume of 1.0 ml. At the end of preincubation, 0.5 ml of the substrate solution (isocarboxazid, 3 mM) was added. The incubation was continued for a further 30 min at 37°C, and then enzyme activity was assayed. The concentrations of EPN, NAD and SKF 525-A used were  $1 \times 10^{-5}$  M,  $5 \times 10^{-5}$  M and 1 mM, respectively. Carboxylesterase activity is shown as nmoles BZH formed/mg protein/30 min. Each value is the mean±S.E. from three experiments. \*P<0.01, statistically significant difference from the EPN-added group.

#### 4-2-2 KSCNによるチトクローム P-450 量の減少と “NAD-効果”との関係

#### < 実験方法 >

Cyt. P-450 量の測定は、Ms 懸濁液 (蛋白量 約 3 mg) 0.1 ml、EPN 溶液 (最終濃度  $1 \times 10^{-5}$  M) 0.25 ml、NAD (同  $5 \times 10^{-5}$  M) 0.25 ml およ

び 0.2 M トリス-塩酸 緩衝液 (pH 8.0) 0.15 ml を含む CEase 活性測定用 混液に、種々の濃度の KSCN (チオシアン酸カリウム、半井化学) 0.25 ml を加え、37 °C、10 分間インキュベーションした。この反応液を 0.1 M リン 酸 緩衝液 (pH 7.4、20 % グリセロールおよび 0.2 % エマルゲン 913 を含 む) にて、蛋白量が約 1 mg/ml となる様に希釈し、その 3 ml を用い、第 2 編 の方法に従って行った。また、CEase 活性測定実験における KSCN の添加 は、プレインキュベーション時に行った。

<実験結果>

Fig. 4-5 は、“NAD-効果”と Ms Cyt. P-450 量におよぼす KSCN の影響を示している。

“NAD-効果”は KSCN 添加量に伴なって消失し、0.25 M 添加で CEase 活性はほぼ回復した。

一方、Cyt. P-450 量は、KSCN の増加に従い “NAD-効果” の消失と 比例的に減少した。

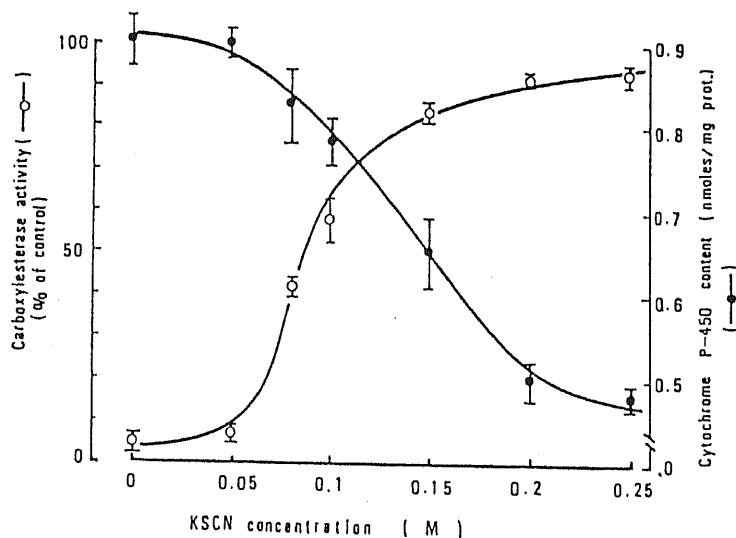


Fig. 4-5

Effects of KSCN on the NAD-effect and cytochrome P-450 contents. The concentrations of EPN and NAD used were  $1 \times 10^{-5}$  M and  $5 \times 10^{-6}$  M, respectively. Each point is the mean  $\pm$  S.E. from three experiments.

### 4-2-3 NAD(H) およびNADP(H) 添加によるEPNoxon 生成の検討

#### <実験方法>

実験動物は第3編に、EPNoxonの定量は第1編に従って行った。

#### <実験結果>

Fig. 4-6は、EPNによるCEase活性阻害と、活性測定用混液中でのEPNoxon生成におよぼすNAD、NADP、NADHおよびNADPH添加の影響を示している。

EPNによるCEase活性阻害に対して、NADHおよびNADPHは強い阻害増強を示し、 $1 \times 10^{-5}$  Mでほぼ100%阻害した。NADは前者より弱いものの $1 \times 10^{-4}$  M添加で、ほぼ100%阻害した。しかし、NADPはその作用が弱く $5 \times 10^{-4}$  Mでも約50%の阻害であった。

一方、EPNoxon生成におけるこれら4種のピリジヌクレオチドの作用は、CEase活性に対する作用と良好に対応しており、EPNによるCEase活性阻害とピリジヌクレオチド依存性のEPNの代謝的活性化とが、密接な関係にある事を更に支持した。

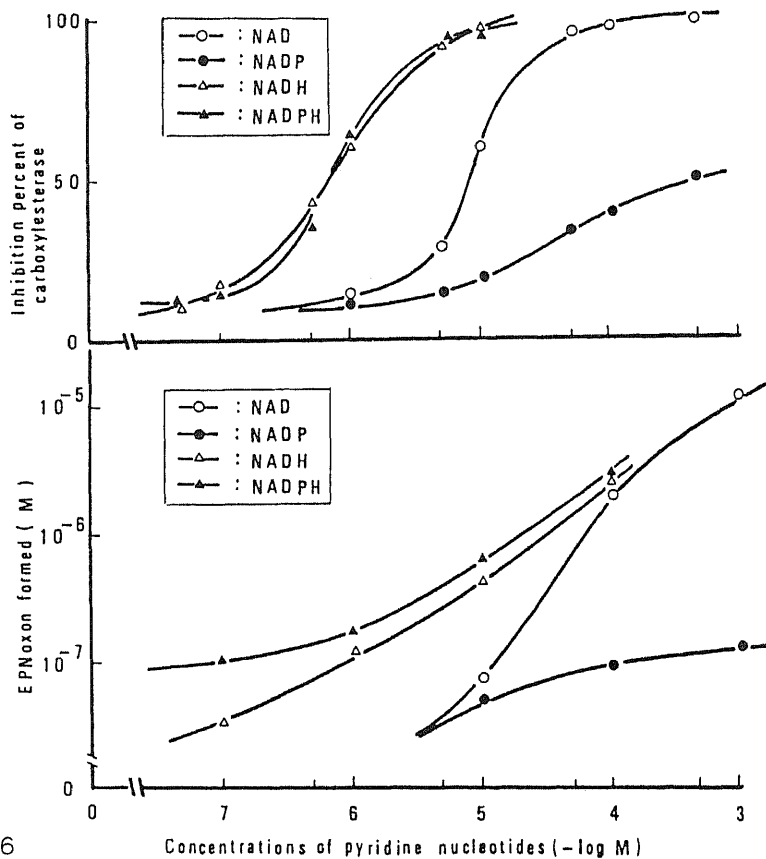


Fig. 4-6

Effects of pyridine nucleotides on EPN-induced inhibition of liver microsomal carboxylesterase and formation of EPNoxon in vitro. The initial concentration of EPN added was  $1 \times 10^{-5}$  M in 1.5 ml of incubation mixture for the carboxylesterase assay and  $1.5 \times 10^{-5}$  M in 1 ml of incubation mixture for the EPNoxon assay. Each point is the mean of three experiments.

### 第3章 考 察

第3編において推定した“NAD-効果”に対する、肝Ms内在性長鎖デヒドロゲナーゼの関与の可能性について、本編にて更に検討した結果、次の結論を得た。即ち、1) “NAD-効果”と肝Ms長鎖アルデヒドデヒドロゲナーゼに対するNAD類似体の補酵素能とは良好に一致する (Table 4-2)、2) NEMによるアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性の阻害と、“NAD-効果”の消失とは良好に一致する、3) デヒドロゲナーゼを介するNADからNADH

への変換を必要としないNADHの添加の系では、デヒドロゲナーゼ阻害の影響を受けない(以上 Fig. 4-2)、4) Ms 内在性長鎖アルコールデヒドロゲナーゼの基質添加によりNADの作用は更に増強されたが、NADHの系では変化が認められない(Fig. 4-4)、などである。これらはいずれも

“NAD-効果”へのMs 内在性長鎖アルコール又はアルデヒドデヒドロゲナーゼの関与を強く示唆するものである。

Fig. 4-3は、“NAD-効果”に対するジスルフィラム添加の影響を見たものである。ジスルフィラムは、4-1-3で述べた様にデヒドロゲナーゼの阻害剤であると共に、Cyt. P-450系の阻害剤でもある(Stripp et al., 1969)。更に、Fig. 4-3のごとくCEase活性も著るしく阻害されており、これら複数の酵素阻害の為、“NAD-効果”の消失を明確に述べる事は出来なかったものの、NAD添加の系におけるジスルフィラムによる“NAD-効果”の消失程度がNADH添加の系に比べてわずかしか大でない事から、ジスルフィラムによる“NAD-効果”消失は、第1にCyt. P-450系の阻害、第2にデヒドロゲナーゼの阻害、の両者の阻害の結果であると考えられた。

第1章の成績より、“NAD-効果”へのMs 内在性長鎖デヒドロゲナーゼの関与が明確となったので、第2章では、そのデヒドロゲナーゼを介して生じたNADHを電子供与体として要求するCyt. P-450の関与と“NAD-効果”との関係を検討した。

NADHのCyt. P-450系への電子供与体としての作用は、Cyt.  $b_5$ を経由する系としてすでに知られている事であるが、その作用はNADPHのそれより20-60%少ない(Nakatsugawa et al., 1965; Leeling and Casida, 1966; Morello et al., 1968; Hitchcock and Murphy, 1971; Shishido et al., 1972)か、あるいは同等(Casida, 1961; Agosin et al., 1969)であるとする説と、逆にNADHの方がNADPHより有効であるとする報告(Johnson and Dahn, 1966)など、一致していない。

Cyt. P-450の阻害剤であるSKF 525-Aは、“NAD-効果”を完全に消失させ(Table 4-4)、またCyt. P-450をCyt. P-420に変換させる(Imai and Sato, 1967)KSCNの添加もCyt. P-450量を減少させ、

その時“NAD-効果”は減少した (Fig. 4-5)。これらの事実は、“NAD-効果”に Cyt. P-450 が関与する事を示している。

Fig. 4-6 に示した成績は、EPNの CEase 活性阻害と、EPNoxon 生成に対する Cyt. P-450 の関与を最終的に確認した実験であり、これまでに得られた“NAD-効果”の成績との矛盾は認められなかった。また、EPNの EPNoxon への交換は、CEase 活性の阻害程度とそのパターンにおいて近似しており、この事は、CEase の阻害が EPNoxon により生じた結果である事を再確認した。

また、CEase の阻害増強作用の面、あるいは EPNoxon の生成量の面より見た Cyt. P-450 への電子供与体としての NADPH および NADH の作用は、ほぼ同等（わずかに NADPH の方が大）であり、先に述べた Casida (1961) および Agosin et al. (1969) の報告を支持するものであった。

以上の結果および考察より、有機リン化合物による肝 Ms CEase 活性阻害に対する、NAD 添加により生じる阻害増強作用（“NAD-効果”）発現の作用機序を Fig. 4-7 に要約した。

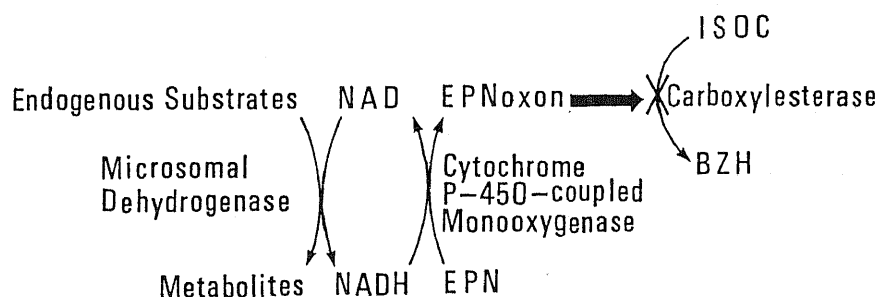


Fig. 4-7 Speculative diagram on the potentiation of EPN-induced inhibition of carboxylesterase by NAD. ISOC, Isocarboxazid; BZH, Benzylhydrazine;



“NAD-効果”の作用機序は、連結した4段階の反応により進行する。即ち、1) NADは、脂質代謝に関与する肝Ms内在性長鎖アルコールおよびアルデヒドデヒドロゲナーゼ(恐らく複数のデヒドロゲナーゼ)と結合し、2成分複合体をまず生成し、その酵素・NADに長鎖アルコールおよびアルデヒドが結合し、3成分複合体を形成する。3成分複合体は脱水素反応を受けNADは還元されNADHとなり、解離される。このNADH生成こそが、“NAD-効果”の初発段階である。2) NADHは、Cyt. P-450依存の有機リン化合物の酸化的脱硫化反応に電子供与体として利用される。3) 生成したOxon型有機リン化合物は、CEaseの活性中心にあるセリン残基を、NAD非添加時より、より多くリン酸化する。4) その結果CEase阻害の増強作用が発現する。

肝臓を主とする生体内各臓器に分布するCEaseは、有機リン化合物によりリン酸化される一方、カルボキシルエステルを有するマラチオンなどに対してはそれらを加水分解する作用(DuBois et al., 1968; Cohen and Ehrich, 1976; Fonnum and Sterri, 1981; Motoyama et al., 1984)をも有する事が知られている。この有機リン化合物によるCEaseのリン酸化がNAD添加によりChEに比べて顕著に認められた本研究は、有機リン化合物の毒性を、有機リン化合物がChEと結合する前にそのリン酸と結合する事により薬物結合蛋白としての、場合によっては有機リン化合物水解酵素としてある程度軽減する作用を持つCEaseの生体内での役割を、Msレベルで生化学的に解明したものである。

## 総 括

ラット肝Ms膜結合性CEaseの生化学的並びに薬理学的研究の一環として、CEaseの有機リン化合物による阻害と、それにおよぼすラット肝CytosolおよびNAD添加の影響を検討し、それらの作用機序を以下の通り明らかにした。

1. 有機リン化合物であるEPNによるラット肝Ms CEase活性の阻害は、肝Cytosolの添加により顕著に増強された。その作用機序として、Cytosol中に存在するNADPHが、EPNのMsチトクロームP-450依存性酸化的脱硫化反応の電子供与体として利用され、その結果、EPNOxon生成量が増加し、CEase活性の阻害が増強された事を明らかにした。
2. 絶食ラットの肝Cytosolを用いた場合、1.に述べた現象が認められず、6-AN投与絶食ラットの肝Cytosolの添加では見られた。この事から6-ANは絶食により減少したCytosol中のNADPHを増加させ、その結果、Ms薬物代謝酵素系が促進された事を明らかにした。
3. NADの添加により、有機リン化合物による肝Ms CEase活性阻害の顕著な増強作用が認められた。これを“NAD-効果”と称し、この“NAD-効果”の発現機序を検討した結果、第1段階として肝Ms内在性長鎖デヒドロゲナーゼが極めて密接に関与している事を明らかにした。即ち、
  - 1) 肝Msに存在するNAD要求性の長鎖デヒドロゲナーゼを介してNADがNADHに変換され、それが“NAD-効果”の引き金となり、
  - 2) 有機リン化合物のMsチトクロームP-450依存性酸化的脱硫化反応に、このNADHが電子供与体として利用される。
  - 3) 生成したOxon型有機リン化合物が、CEaseのセリン残基をより強力にリン酸化する結果、
  - 4) NAD非添加時と比べて、CEase活性阻害が増強される。以上1)～4)に述べた一連の作用機序により“NAD-効果”が発現したものである事を明らかにした。

## 謝 辞

本研究に際して、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜わり、さらに、本論文の御校閲を戴きました恩師、千葉大学薬学部 北川晴雄教授に謹んで感謝の意を表します。

また、本研究遂行にあたり、終始温かい御指導と幾多の御助言を戴き、さらに、本論文の御校閲を賜りました前千葉大学薬学部助教授 現東京薬科大学 佐藤哲男教授に深く感謝の意を表します。

さらに、著者に本研究の機会を快くお与えくださいました エスエス製薬株式会社代表取締役 泰道直方社長、および、終始御激励御助言を賜りました 同常務取締役 小高愛親博士に謹んで御礼申しあげます。

また、本研究遂行にあたり、御激励御理解を戴いた エスエス製薬株式会社研究開発本部長 飯田 隆博士、中央研究所長 中島利章博士、同副所長 桑村 司博士に厚く御礼申しあげます。

また、本研究に協力して下さった千葉大学薬学部薬効・安全性学講座薬物学研究室 大沢淳子、遠藤貴子、高官万里各学士、細川正清修士、および、エスエス製薬株式会社中央研究所 及川隆幸修士に心から感謝致します。

また、本研究実施期間中、種々の御鞭撻と御助言を戴いた 千葉大学薬学部薬効・安全性学講座薬物学研究室 上野光一講師、五十嵐隆助手、大森栄教務職員、および、研究室一同に深謝致します。

## 掲載雑誌目録

第1編の内容は、Japan. J. Pharmacol., 35, 433-437 (1984) に下記表題で掲載されたものである。

Potential of EPN-induced inhibition of liver microsomal carboxylesterase by addition of liver cytosol from 6-aminonicotinamide-treated, starved rats.

第2編の内容は、Arch. int. Pharmacodyn. Ther., 269, 20-33 (1984) に下記表題で掲載されたものである。

Effects of a single administration of 6-aminonicotinamide on hepatic microsomal drug metabolism in rats.

第3編、第1章の3-1-1および3-1-2、および第4編、第1章の4-1-1の内容は、Res. Commn. Chem. Path. Pharmacol. に下記表題で投稿中である。

Increase in anti-carboxylesterase action of organophosphorothioates by nicotinamide adenine dinucleotide (NAD).

第3編、第1章の3-1-3、第2章の3-2-6および第3章の3-3-1から3-3-3の内容は、Japan. J. Pharmacol., 37, 39-44 (1985) に下記表題で掲載されたものである。

Enhancement of the binding of O-ethyl O-p-nitrophenyl phenylphosphonate (EPNnoxon) to microsomal carboxylestetase by NAD in vitro.

第3編、第2章の3-2-4の内容は、Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol., 26, 547-562 (1979) に下記表題で掲載されたものである。

Potentiation of ethyl para-nitrophenyl phenylphosphonothioate (EPN)-induced inhibition of liver microsomal carboxylesterase by NAD in vitro in rats.

第3編、第2章の3-2-2、および第4編(第1章の4-1-1を除く)の内容は、Japan. J. Pharmacol., 37, 245-252 (1985) に下記表題で掲載されたものである。

NAD-coupled enzymatic oxidation of O-ethyl O-p-nitrophenyl phenylphosphonothioate (EPN) to its oxygen analog with liver microsomes of rats.

第3編および第4編の内容は、総括として J. Toxicol. Sci., 9, 300 (1984) に下記表題で掲載された。

NAD-mediated potentiation of anti-carboxylesterase action of EPN(5); Participation of microsomal dehydrogenase(s).

## 参考文献

- Abou-Donia, M.B., Reichert, B.L. and Ashry, M.A. (1983): The absorption, distribution, excretion and metabolism of a single oral dose of O-ethyl O-4-nitrophenyl phenylphosphonothioate in hens. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 70, 18-28.
- Ackerman, D.M. and Leibman, K.C. (1977): Effect of experimental diabetes on drug metabolism in the rat. *Drug Met. Disp.*, 5, 405-410.
- Agosin, M., Scaramelli, N., Gil, L. and Letelier, M.E. (1969): Some properties of the microsomal system metabolizing DDT in Triatoma infestans. *Comp. Biochem. Physiol.* 29, 785-793.
- Aldridge, W.M. (1953): Serum esterase. I. Two types of esterases (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate and a method for their determination. *Biochem. J.*, 53, 110-117.
- Ammon, H.P.T. and Steinke, J. (1972): 6-Aminonicotinamide (6-AN) as a diabetogenic agent. *Diabetes*, 21 143-148.
- Ammon, H.P.T., Patel, T.N. and Steinke, J. (1973): The role of the pentose phosphate shunt in glucose-induced insuline release: In vitro studies with 6-aminonicotinamide, methylene blue, NAD<sup>+</sup>, NADH, NADP<sup>+</sup>, NADPH and nicotinamide on isolated pancreatic rat islets. *Biochim. Biophys. Acta*, 297, 352-367.
- Ammon, R. (1977): The enzymic cleavage of several pharmaceutical esters. *Arzneim. Forsch.*, 27, 944-949.
- Arndt, R., Schlaak, H.E., Uschtrin, D., Sudi, D., Michelssen, K. and Junge, W. (1978): Investigation on the functional role of rat liver carboxylesterase isoenzymes. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 359, 641-651.
- Augnsteyn, R.C., De Jersey, J., Webb, E.C. and Zerner, B. (1969): On the homology of the active-site peptides of liver carboxylesterase. *Biochem. Biophys. Acta*, 171, 128-137.
- Aust, S.D. and Stevens, J.B. (1971): Aminopyrine demethylase-multiplicity shown by dieldrin and DDT inhibition. *Biochem. Pharmacol.*, 22, 1061-1069.
- Bast, A. and Noordhoek, J. (1981): Product inhibition during the hepatic microsomal N-demethylation of aminopyrine in the rat. *Biochem. Pharmacol.*, 30, 19-24.
- Bay, H.G., James, S.P., Raffan, I.M., Ryman, B.E. and Thorpe, W.V. (1949): The fate of certain organic acids and amides in the rabbit. 7. An amidase of rabbit liver. *Biochem. J.*, 44, 618-625.
- Bergmann, F., Seagel, R. and Rimon, S. (1957): A new type of esterase in hog-kidney extract. *Biochem. J.*, 67, 481-486.

- Bernhammer, E. and Krisch, K. (1965): Deacetylation of phenacetin by liver esterase. *Biochem. Pharmacol.*, 14, 863-871.
- Bielicki, L. and Krieglstein, J. (1976): Decreased GABA and glutamate concentration in rat brain after treatment with 6-aminonicotinamide. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 294, 157-160.
- Böcking, A., Hansert, J. and Von Deimling, O. (1976): Esterase. XXII. Cellular and subcellular localization of the ES-9-esterase in mouse kidney. *Histochemistry*, 46, 177-188.
- Brunnemann, A., Coper, H. and Neubert, D. (1964): Biosynthese Comparative effects of diabetogenic agents on hepatic drug metabolism. *Drug Met. Disp.*, 10, 81-86.
- Bütter, H. (1965): Aldehyd- und Alkoholdehydrogenase-Aktivität in Leber und Niere der Ratte. *Biochem. Z.*, 341, 300-314.
- Casida, J.E. (1961): Specificity of substituted phenylphosphorus compounds for esterase inhibition in mice. *Biochem. Pharmacol.*, 5, 332-342.
- Chamberlain, J.G. (1982): Effects of acute vitamin replacement therapy on 6-aminonicotinamide induced cleft palate late in rat pregnancy. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 142, 888-890.
- Chamberlain, J.G. and Goldyne, M.E. (1970): Intra-amniotic injection of pyridine nucleotides or adenosine triphosphate as countertherapy for 6-aminonicotinamide teratogenesis. *Teratol.*, 3, 11-16.
- Chawalit, K., Sretarugsa, P. and Thithapandha, A. (1982): Comparative effects of diabetogenic agents on hepatic drug metabolism. *Drug Met. Disp.*, 10, 81-86.
- Chen, T.S., Kinoshita, F.K. and DuBois, K.P. (1972): Acute toxicity and antiesterase action of O-ethyl-S,S-diphenyl phosphorodithioate (Hinosan<sup>TM</sup>). *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 23, 519-527.
- Choudhury, S.R. (1976): Sensitivity of carboxylesterases of rat serum to diethyl-p-nitrophenyl phosphate. *Enzyme*, 21, 349-356.
- Cohen, S.D. and Murphy, S.D. (1972): Inactivation of malaoxon by mouse liver. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 139, 1385-1389.
- Cohen, S.D. and Ehrich, M. (1976): Cholinesterase and carboxylesterase inhibition of Dichlorvos and interactions with malathion and triorthotolyl phosphate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 37, 39-48.
- Cohen, S.D. and Orzech, D.J. (1976): The effect of TOTP pretreatment on the metabolism and toxicity of procaine in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 37, 132-133.
- Cohen, S.D. and Orzech, D. (1977): Triorthotolyl phosphate inhibition carboxylesterases and potentiation of procaine toxicity. *Biochem. Pharmacol.*, 26, 1791-1795.

- Coper, H. and Neubert, D. (1964): Effect of 6-amino NAD and other NAD analogues on the formation of NADH-P and its transphosphorylation to ATP. *Biochim. Biophys. Acta*, 82, 167-170.
- Coper, H., Hadass, H. and Lison, H. (1966): Untersuchungen zum Mechanismus zentralnervöser Funktionsstörungen durch 6-Aminonicotinamid. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Path. Pharmacol.*, 255, 97-106.
- Dietrich, L.S., Friedland, J.M. and Kaplan, L.A. (1958): Pyridine nucleotide metabolism: Mechanism of action of the niacin antagonist, 6-aminonicotinamide. *J. Biol. Chem.*, 233, 964-968.
- Dietrich, R.A. (1966): Tissue and subcellular distribution of mammalian aldehyde-oxidizing capacity. *Biochem. Pharmacol.*, 15, 1911-1922.
- Dixon, M. (1953): The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem. J.*, 55, 170-171.
- DuBois, K.P., Kinoshita, F.K. and Frawley, J.P. (1968): Quantitative measurement of inhibition of aliesterases, acylamidase and cholinesterase by EPN and Delnav. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 12, 273-284.
- Dudman, N.P.B. and Zerner, B. (1975): Carboxylesterases from pig and ox liver. in "Methods in Enzymology" Vol. 35, Lowenstein, J.M.(ed.). Academic Press, New York, pp. 190-208.
- Durham, W.F., Gaines, T.B. and Hayes, W.J. (1956): Paralytic and related effects of certain organic phosphorus compounds. *Arch. Ind. Health*, 13, 328-330.
- Ecobichon, D.J. (1973): Characterization of canine hepatic and renal esterases. *Can. J. Biochem.*, 51, 506-513.
- Ellman, G.L., Courtney, D.K., Andres, V. and Featherstone, R.M. (1961): A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88-95.
- Eto, Y. and Suzuki, K (1973): Cholesterol ester metabolism in rat brain. A cholesterol ester hydrolase specifically localized in the myelin sheat. *J. Biol. Chem.*, 248, 1986-1991.
- Fonnum, F. and Sterri, S.H. (1981): Factors modifying the toxicity of organophosphorous compounds including soman and sarin. *Fundamental Appl. Toxicol.*, 1, 143-147.
- Fukuda, K., Imai, M., Shido, H. and Mizuhara, V. (1978): Histochemical study on non-specific esterase activity in the liver, kidney and small intestine from nine different mammalian species. *Acta Histochem. Cytochem.*, 11, 78-89.
- Gibaldi, M. and Perrier, D. (1975): Trapezoidal rule. in "Drug and the pharmaceutical sciences, Vol. 1, Pharmacokinetics", Swarbrick, J.(ed.). Marcel Dekker Inc, New York, pp. 293-296.



- Glenn, J.L. and Vanko, M. (1959): Choline and aldehyde oxidation by rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.*, 82, 145-152.
- Graham, W.D. (1951): In vitro inhibition of liver aldehyde dehydrogenase by tetraethylthiuram disulphide. *J. Pharm. Pharmacol.*, 3, 160-168.
- Gram, T.E., Wilson, J.T. and Fouts, J.R. (1968): Some characteristics of hepatic microsomal systems which metabolize aminopyrine in the rat and rabbit. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 159, 172-181.
- Green, A.L. (1964): Studies on the mechanism of inhibition of monoamine-oxidase by hydrazine derivatives. *Biochem. Pharmacol.*, 13, 249-261.
- Goromaru, T., Noda, A., Matsuyama, K. and Iguchi, S. (1976): Metabolism and excretion of aminopyrine in man. *Chem. Pharm. Bull.*, 24, 1376-1383.
- Goromaru, T., Furuta, T., Baba, S., Noda, A. and Iguchi, S. (1981): Metabolic studies of aminopyrine in rat and man by using stable isotope tracer techniques. *Chem. Pharm. Bull.*, 29, 1724-1729.
- Haugen, D.A. and Suttie, J.W. (1974): Purification and properties of rat liver microsomal esterases. *J. Biol. Chem.*, 249, 2717-2722.
- Heymann, E. (1980): Carboxylesterase and amidase. in "Enzymatic Basis of Detoxication", Vol. II, Jakoby, W.B.(ed.). Academic Press, New York. pp. 291-323.
- Heymann, E. (1982): Hydrolysis of carboxylic esters and amides. in "Metabolic Basis of Detoxication", Vol. II, Jakoby, W.B., Bend, J.R. and Caldwell, J.(eds.). Academic Press, New York, pp. 229-245.
- Herken, H. (1971): Antimetabolic action of 6-aminonicotinamide on the pentose phosphate pathway in brain. in "Symposium on Mechanism of Toxicity", Aldridge, W.N.(ed.). McMillan and Co., Ltd., pp. 189-203.
- Hildebrandt, A. and Estabrook, R.W. (1971): Evidence for the participation of cytochrome b<sub>5</sub> in hepatic microsomal mixed-function oxidation reactions. *Arch. Biochem. Biophys.*, 143, 66-79.
- Hitchcock, M. and Murphy, S.D. (1971): Activation of parathion and guthion by mammalian, avian and piscine liver homogenates and cell fractions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 19, 37-45.
- Hodgson, E. and Dauterman, W.C. (1980): Metabolism of toxicants: Phase I reactions. in "Introduction to Biochemical Toxicology", Hodgson, E. and Guthrie, F.E.(eds.). Elsevier North Holland, pp. 67-91.

- Hoffman, D.J. and Sileo, L. (1984): Neurotoxic and teratogenic effects of an organophosphorus insecticide (phenyl phosphonothioic acid-O-ethyl-O-(4-nitrophenyl)ester) on mallard development. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 73, 284-294.
- Horie, T., Yamato, C., Kitada, M. Kanakubo, Y., Yoshioka, H. and Omura, T. (1984): Induction of drug-metabolizing enzymes by spirohydantoin compounds. in "Sixteenth Symposium on Drug Metabolism and Action", Sawada, H. (ed.). *Pharmac. Soc. Japan*, pp. 197-200.
- Iguchi, S. (1981): 日本薬学会第101年会要旨, pp. 46-49.
- Imai, Y., Ito, A. and Sato, R. (1966): Evidence for biologically different types of vesicles in the hepatic microsomal fraction. *J. Biochem.*, 60, 417-418.
- Imai, Y. and Sato, R. (1967): Conversion of P-450 to P-420 by neutral salts and some other reagents. *Europ. J. Biochem.*, 1, 419-426.
- Imai, Y. and Sato, R. (1974): A gel-electrophoretically homogenous preparation of cytochrome P-450 from liver microsomes of phenobarbital-pretreated rabbits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 60, 8-14.
- Inoue, M., Morikawa, W., Tsuboi, M., Yamada, Y. and Sugiura, M. (1979a): Hydrolysis of ester-type drugs by the purified esterase from human intestinal mucosa. *Japan. J. Pharmacol.*, 29, 17-25.
- Inoue, M., Morikawa, M., Tsuboi, M. and Sugiura, M. (1979b): Studies of human intestinal esterase. IV. Application to the development of esterase prodrugs of salicylic acid. *J. Pharm. Dyn.*, 2, 229-236.
- Iyanagi, T., Makino, N. and Anan, F.K. (1981): Studies on the microsomal mixed-function oxidase system: Mechanism of action of hepatic NADPH-cytochrome P-450 reductase. *Biochem.*, 20, 1722-1730.
- Johnson, R.E. and Dahn, P.A. (1966): Activation and degradation efficiencies of liver microsomes from eighth vertebrate species, using organophosphates as substrates. *J. Econ. Ent.*, 59, 1437-1442.
- Johnson, W.J. and McColl, J.D. (1956): Antimetabolite activity of 6-aminonicotinamide. *Fed. Proc.*, 15, 284.
- Junge, W., Heymann, E., Krisch, K. and Hollandt, H. (1974): Human liver carboxylesterase. Purification and molecular properties. *Arch. Biochem. Biophys.*, 165, 749-763.
- Junge, W. and Krisch, K. (1975): The carboxylesterases/amidases of mammalian liver and their possible significance. *Crit. Rev. Toxicol.*, 3, 371-434.

- Kamat, D.N. and Pore, A.A. (1972): The occurrence of "Brush Border" esterase in the kidney of some vertebrates. *Acta Histochem.*, 44, 300-307.
- Kamataki, T. and Neal, R.T. (1976): Metabolism of diethyl p-nitrophenyl phosphonothionate (parathion) by a reconstituted mixed-function oxidase enzyme system: Studies of the covalent binding of the sulfur atom. *Mol. Pharmacol.*, 12, 933-944.
- Kaneko, A., Yoshida, Y., Enomoto, K., Kaku, T., Hirata, K. and Onoe, T. (1979): Induction of a microsomal butyryl esterase in rat liver by phenobarbital treatment. *Biochim. Biophys. Acta*, 582, 185-195.
- Kaplan, N.O. (1954): Significance of enzymatically catalyzed exchange reactions in chromotherapy. *Science*, 120, 437-440.
- Kawabata, N., Sugiyama, S., Kuwamura, T., Satoh, T. and Kitagawa, H. (1983): Studies to increase the antitumor activity of 1-(tetrahydro-2-furanyl)-5-fluorouracil and its metabolic aspects by combined administration with L-cysteine. *Japan. J. Pharmacol.*, 33, 735-747.
- Kiedgaard, N.O. (1949): Inhibition of aldehyde oxidase from liver by tetraethylthiuram disulphide (Antabuse). *Acta Pharmacol.*, 5, 397-403.
- Kisch, B., Koster, H. and Strauss, E. (1943): The procaine esterase. *Exptl. Med. and Surg.*, 1, 51-65.
- Kitson, T.M. (1975): The effect of difulpiram on the aldehyde dehydrogenases of sheep liver. *Biochem. J.*, 151, 407-412.
- Klingenberg, M. (1974): Nicotinamide-adenine dinucleotides, spectrophotometric and fluorimetric methods. in "Methods of Enzymatic Analysis", 2nd edition 4, Bergmeyer, H.U. (ed). Academic Press, New York, pp. 2045-2059.
- Koehler, B.A., Schwartz, M.A. and Oberhaensli, W.E. (1962): Metabolism of C<sup>14</sup>-iproniazid and C<sup>14</sup>-isocarboxazid in man. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 138, 11-20.
- Koivula, T. and Koivusalo, M. (1975): Different forms of rat liver aldehyde dehydrogenase and their subcellular distribution. *Biochem. Biophys. Acta*, 397, 9-23.
- Kolbe, H., Keller, K., Lange, K. and Herken, H. (1971): Studies of carbohydrate metabolism in rat kidney after pharmacological blockade of the pentose phosphate pathway. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 271, 93-102.
- Krisch, K. (1971): Carboxylic ester hydrolases. in "The Enzymes", Vol. 5, Boyer, P.D. (ed.), Academic Press, New York, pp. 43-69.
- Kröger, H., Voss, H., Plotze G. and Emmel, H. (1980): Prevention of the teratogenic effect of 6-aminonicotinamide in chick embryos by nicotinic acid and L-methionine. *Arzneim.-Forsch. /Drug Res.*, 30, 1903-1904.

- Kuhn, D. and Heymann, E. (1982): Identification of the chloramphenicol-hydrolyzing enzyme of guinea pig liver as one of the nonspecific carboxylesterases. *Biochem. Pharmacol.*, 31, 781-786.
- Landauer, W. (1957): Niacin antagonists and chick development. *J. Exp. Zool.*, 136, 509-530.
- Lasker, J.M., Graham, D.G. and Abou-Donia, M.B. (1982): Differential metabolism of O-ethyl O-4-nitrophenyl phenylphosphonothioate by rat and chicken hepatic microsomes. *Biochem. Pharmacol.*, 31, 1961-1967.
- Lee, T-c. (1979): Characterization of fatty alcohol: NAD<sup>+</sup> oxidoreductase from rat liver. *J. Biol. Chem.*, 254, 2892-2896.
- Leeling, N.C. and Casida, J.E. (1966): Metabolites of carbaryl-(1-naphthyl methylcarbamate) in mammals and enzymatic systems for their formation. *J. Agric. Fd. Chem.*, 14, 281-290.
- Lineweaver, H. and Burk, D. (1934): The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 658-666.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J. Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Mackness, M.I. and Walker, C.H. (1983): Partial purification and properties of sheep serum 'A'-esterase. *Biochem. Pharmacol.*, 32, 2291-2296.
- Maksay, G., Tegye, Z. and Otvos, L. (1978): Kinetic investigations of liver microsomal esterases with oxazepam esters. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 359, 879-886.
- Marjanen, L.A. (1972): Intracellular localization of aldehyde dehydrogenase in rat liver. *Biochem. J.*, 127, 633-639.
- Marjanen, L.A. (1973): Comparison of aldehyde dehydrogenases from cytosol and mitochondria of rat liver. *Biochem. Biophys. Acta*, 327, 238-246.
- Matsubara, T. and Tsuchi, A. (1977): Hepatic aminopyrine N-demethylase system: Effect of cyanide on microsomal N-demethylase activity. *Japan. J. Pharmacol.*, 27, 701-708.
- Matsubara, T., Mori, S., Tsuchi, A., Masuda, Y. and Takeuchi, Y. (1983): Carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rat. Evidence for different susceptibilities of rat liver lobes. *Japan. J. Pharmacol.*, 33, 435-445.
- Matsuyama, K., Kado, K., Nishiuchi, M., Goromaru, T., Tsuzuki, O., Noda, A. and Iguchi, S. (1981a): Characteristic biotransformation of aminopyrine in rat when administered with barbital. *J. Pharm. Dyn.*, 4, 28-34.

- Matsuyama, K., Takenaka, S., Yoshida, N., Sugimoto, I., Noda, A. and Iguchi, S. (1981b): 日本薬学会第101年会要旨, pp. 603.
- McLachlan, J.C. (1980): The effect of 6-aminonicotinamide on limb development. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 55, 307-318.
- Mentlein, R., Suttorp, M. and Heymann, E. (1984): Specificity of purified monoacylglycerol lipase, palmitoyl-CoA fydrolase, palmitoyl-carnitine hydrolase, and non-specific carboxylesterase from rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 228, 230-246.
- Mihara, K. and Sato, R. (1972): Partial purification of NADH-cytochrome  $b_5$  reductase from rabbit liver microsomes with detergents and its properties. *J. Biochem.*, 71, 725-735.
- Moog, P. and Krisch, K. (1974): Purification and characterization of atropine esterase from rabbit liver microsomes. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 355, 529-547.
- Morello, A., Vandanis, A. and Spencer, E.Y. (1968): Comparative metabolism of two vinyl phosphorothionate isomers (thione phosdrin) by the mouse and the fly. *Biochem. Pharmacol.*, 17, 1795-1802.
- Moroi, K. and Satoh, T. (1975): Comparison between procaine and isocarboxazid metabolism in vitro by a liver microsomal amidase-esterase. *Biochem. Pharmacol.*, 24, 1517-1521.
- Moroi, K., Ushiyama, S., Satoh, T. and Kuga, T. (1976): Enzyme induction by repeated administration of tetrachlorvinphos in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 37, 377-386.
- Moroi, K. and Kuga, T. (1980): Isocarboxazid metabolism in vitro by liver microsomal carboxylesterase of monkey. *Biochem. Pharmacol.*, 29, 1491-1496.
- Moroi, K. and Kuga, T. (1982): Inhibitory effect of leptophos on carboxylesterase(isocarboxazid amidase) in rat liver. *Toxicol. Lett.*, 11, 81-85.
- Motoyama, N., Kao, L.R., Lin, P.T. and Dauterman, W.C. (1984): Dual role of esterases in insecticide resistance in the green rice leabopper. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 21, 139-147.
- Murphy, S.D. and DuBois, K.P. (1957): Enzymatic conversion of the dimethoxy ester of benzotrazine dithiophosphoric acid to an anticholinesterase agent. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 119, 572-583.
- Murphy, S.D. and DuBois, K.P. (1958): The influence of various factors on the enzymatic conversion of organic thiophosphates to anticholinesterase agents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 124, 194-202.
- Murphy, S.D. and Cheever, K.L. (1972): Carboxylesterase and cholinesterase inhibition in rats. *Arch Environ. Health*, 24, 107-114.

- Nakatsugawa, T., Ishida, M. and Dahm, P.A. (1965): Microsomal epoxidation of cyclodiene insecticides. *Biochem. Pharmacol.*, 14, 1853-1865.
- Nakatsugawa, T., Tolman, N.M. and Dahm, P.A. (1968): Degradation and activation of parathion analogs by microsomal enzymes. *Biochem. Pharmacol.*, 17, 1517-1528.
- Nakayasu, H., Mihara, K. and Sato, R. (1978): Purification and properties of a membrane-bound aldehyde dehydrogenase from rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 83, 697-704.
- Nakayasu, H. (1983): アルデヒド脱水素酵素の種差. "薬物代謝の比較生化学", Kato, R. and Kamataki, T.(eds.). 清至書院, pp. 291-308.
- Nash, T. (1953): Colorimetric estimation of formaldehyde by means of Hantzsch reaction. *Biochem. J.*, 55, 416-421.
- Neal, R.A. (1967a): Studies on the metabolism of diethyl 4-nitrophenyl phosphorothionate(parathion) in vitro. *Biochem. J.*, 103, 183-191.
- Neal, R.A. (1967b): Studies on the enzymic mechanism of the metabolism of diethyl 4-nitrophenyl phosphorothionate(parathion) by rat liver microsomes. *Biochem. J.*, 105, 289-296.
- Neal, R.A. and DuBois, K.P. (1965): Studies of the mechanism of detoxification of cholinergic phosphorothioates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 148, 185-192.
- Nishizawa, Y. (1972): 農薬の生化学と作用機序. "最新農薬概論", 広川書店, pp. 64-128.
- Nomeir, A.A. and Dauterman, W.C. (1979): In vitro metabolism of EPN and EPNO by mouse liver. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 10, 190-196.
- Nomeir, A.A., Hajjor, N.P., Hodgson, E. and Dauterman, W.C. (1980): In vitro metabolism of EPN and EPNO in susceptible and resistant strains of house flies. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 13, 112-120.
- Norman, B.J., Poore, R.E. and Neal, R.A. (1974): Studies of the binding of sulfer released in the mixed function oxidase-catalyzed metabolism of diethyl-p-nitrophenyl phosphorothionate (parathion) to diethyl-p-nitrophenyl phosphate(paraoxon). *Biochem. Pharmacol.*, 23, 1733-1744.
- Nousiainen, U., Torronen, R. and Hanninen, O. (1984): Differential induction of various carboxylesterases by certain polycyclic aromatic hydrocarbons in the rat. *Toxicol.*, 32, 243-251.
- O'Brien, R.D. (1959): Activation of phosphorothiophosphates by liver microsomes. *Nature*, 183, 121-122.

- Omura, T. and Sato, R. (1964): The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, 239, 2370-2378.
- Oshima, T., Nakajima, E. and Hattori, K. (1980): Hydrolysis of methylpredonisolone hemisuccinate to methylpredonisolone by a nonspecific carboxylesterase. *Pharmacol. Res. Commun.*, 12, 139-146.
- Oshino, N., Imai, Y. and Sato, R. (1966): Electron transfer mechanism associated with fatty acid desaturation catalyzed by liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 128, 13-28.
- Oshino, N., Imai, Y. and Sato, R. (1971): Function of cytochrome  $b_5$  in fatty acid desaturation by rat liver microsomes. *J. Biochem.*, 69, 155-167.
- Pederson, T.C. and Aust, S.D. (1970): Aminopyrine demethylase. Kinetic evidence for multiple microsomal activities. *Biochem. Pharmacol.*, 19, 2221-2230.
- Pessayre, D., Descatoire, U., Tinel, M. and Larrey, D. (1982): Self-induced by oleandomycin of its own transformation into a metabolite forming an active complex with reduced cytochrome P-450 comparison with troleandomycin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 221, 215-221.
- Phillips, A.H. and Langdon, R.G. (1962): Hepatic triphosphopyridine-nucleotide cytochrome c reductase. Isolation, characterization and kinetic studies. *J. Biol. Chem.*, 237, 2652-2660.
- Prakash, M.R. and Baouer, N.Z. (1981): Inhibition of gamma amino-butyric acid transaminase with 6-aminonicotinamide in regions of the rat brain. *Biochem. Pharmacol.*, 30, 663-664.
- Proctor, N.H. and Casida, J.E. (1975): Organophosphorus and methyl carbamate insecticide teratogenesis: Diminished NAD in chicken embryos. *Science*, 190, 580-581.
- Randall, L.D. and Bagdon, R.E. (1959): Pharmacology of iproniazid and other amine oxidase inhibitors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 80, 625-642.
- Raftell, M., Berzins, K. and Blomberg, F. (1977): Immunochemical studies of a phenobarbital-inducible esterase in rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 181, 534-541.
- Reinke, L.A., Belinsky, S.A., Evans, R.K., Kauffman, F.C. and Thurman, R.G. (1981): Conjugation of p-nitrophenol in the perfused rat liver: The effect of substrate concentration and carbohydrate reserved. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 217, 863-870.
- Sato, R., Omura, T. and Nishibayashi, H. (1965): Carbonmonoxide binding hemoprotein and NADPH-specific flavoprotein in liver microsomes and their roles in microsomal electron transfer. in "Oxidases and related redox systems", Vol. 2, King, T.E., Mason, H.S. and Marrison, M.(eds.). Wiley, New York, pp. 861-878.
- Sato, T. (1973): A liver arylamidase extremely sensitive to organophosphorus compounds. *Life Sci.*, 13, 1181-1188.

- Satoh, T. and Moroi, K. (1970): A simple and sensitive colorimetric assay of benzylhydrazine. *Anal. Chim. Acta*, 51, 449-454.
- Satoh, T. and Moroi, K. (1972): Solubilization, purification and properties of isocarboxazid hydrolase from guinea pig liver. *Biochem. Pharmacol.*, 21, 3111-3120.
- Satoh, T. and Moroi, K. (1973a): Species differences in induction and inhibition of liver isocarboxazid hydrolase. *Life Sci.*, 12, 169-176.
- Satoh, T. and Moroi, K. (1973b): Comparative studies on the inhibition of liver amidase, aminopeptidase and serum cholinesterase by EPN. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 25, 553-559.
- Satoh, T. and Moroi, K. (1975): Comparison between procaine and isocarboxazid metabolism in vitro by a liver microsomal amidase-esterase. *Biochem. Pharmacol.*, 24, 1517-1521.
- Satoh, T. and Moroi, K. (1977): Effect of pretreatment with tri-cresylphosphates and phenobarbital on the metabolism and toxicity of procaine in rats. *Japan. J. Pharmacol.*, 27, 233-237.
- Schlauder, M.C. (1971): The effects of 6-AN on pyridine nucleotide content in the rat fetus. *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, 14, 95-100.
- Schwartz, M.A. (1960): The metabolism of isocarboxazid (Marplan) in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 130, 157-165.
- Schwartz, M.A. (1961a): Isocarboxazid metabolism in rat liver homogenate. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 107, 613-616.
- Schwartz, M.A. (1961b): Monoamine oxidase inhibition by isocarboxazid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 135, 1-6.
- Shishido, T., Usui, K. and Fukami, J. (1972): Oxidative metabolism of diazinon by microsomes from rat liver and cockroach fat body. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 2, 27-38.
- Sonawane, B.R. and Knowles, C.O. (1972): Comparative metabolism of two carboxylate herbicides (EP-475 and phenmedipham) in rats. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1, 472-482.
- Stripp, B., Greene, F.E. and Gillette, J.R. (1969): Disulfiram impairment of drug metabolism by rat liver microsomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 170, 347-353.
- Su, M.Q., Kinoshita, F.K., Frawley, J.P. and DuBois, K.P. (1971): Comparative inhibition of aliesterases and cholinesterase in rats fed eighteen organophosphorus insecticides. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 20, 241-249.
- Sultatos, L.G. and Murphy, S.D. (1983): Hepatic microsomal detoxification of the organophosphates paraoxon and chlorpyrifos oxon in the mouse. *Drug Met. Disp.*, 11, 232-238.



- Takesue, S. and Omura, T. (1970): Purification and properties of NADH-cytochrome b<sub>5</sub> reductase solubilized by lysosomes from rat liver microsomes. *J. Biochem.*, 67, 267-276.
- Ting, K.S., Coon, J.M. and Conney, A.C. (1949): A spectrophotometric method for determination of procaine and p-aminobenzoic acid. *J. Lab. Clin. Med.*, 34, 822-829.
- Toki, S., Toki, K. and Tsukamoto, H. (1962): Metabolism of drugs XXXI. Metabolic fate of methylhexobarbital (5-cyclohexyl-3, 5-dimethylbarbituric acid). *Chem. Pharm. Bull.*, 10, 708-714.
- Tottmar, S.O.C., Pettersson, H. and Kiessling, K.H. (1973): The subcellular distribution and properties of aldehyde dehydrogenases in rat liver. *Biochem. J.*, 135, 577-586.
- Tsujita, T., Okuda, H. and Yamasaki, N. (1982): Purification and some properties of carboxylesterase of rat adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta*, 715, 181-188.
- Uchiyama, M. Yoshida, T., Homma, K. and Hongo, T. (1975): Inhibition of hepatic drug-metabolizing enzymes by thiophosphate insecticides and its drug toxicological implications. *Biochem. Pharmacol.*, 24, 1221-1225.
- Vining, L.C. (1975): Chloramphenicol hydrolase. *Methods Enzymol.*, 43, 734-737.
- Voss, G. and Sachsse, K. (1970): Red cell and plasma cholinesterase activities in micro samples of human and animal blood determined simultaneously by a modified acetylthiocholine/DTNB procedure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 16, 764-772.
- Wolcott, R.M. and Neal, R.A. (1972): Effect of structure on the rate of the mixed function oxidase catalyzed metabolism of a series of parathion analogs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 22, 676-683.
- Yang, R.S.H., Dauterman, W.C. and Hodgson, E. (1969): Enzymatic degradation of diazinon by rat liver microsomes. *Life Sci.*, 8, 667-672.
- Yang, R.S.H., Hodgson, E. and Dauterman, W.C. (1971): Metabolism in vitro of diazinon and diazoxon in rat liver. *J. Agr. Fd. Chem.*, 19, 10-13.