

ウサギにおけるアトロピン応答性体質の薬理遺伝学的研究

桃井 啓子*, 荻田 善一

富山医科薬科大学和漢薬研究所病態生化学部門

Pharmacogenetic study on the response for atropine
in Japanese White rabbit

Keiko MOMOI and Zen-ichi OGITA

*Department of Pathogenic Biochemistry, Research Institute for Oriental Medicines,
Toyama Medical and Pharmaceutical University*

(Received October 23, 1984)

Abstract

The destruction of atropine (DL-hyoscyamine) was first reported by Fleischmann over 70 years ago. Subsequently, it was demonstrated that this destruction is mediated by a hydrolytic enzyme, atropinesterase (E.C. 3, 1, 1, 10), which was first detected in the sera and liver of rabbits. Genetic analysis indicates that atropinesterase activity is inherited as co-dominant Mendelian character in rabbits. Although no morphological or physiological effects are attributed to the presence of the gene for this enzyme, it does impart resistance in rabbits to the pharmacological effects of administered atropine.

The population of rabbits can be divided into 2 distinct phenotypes which are the presence and the absence of atropinesterase activity in the serum. In our investigation the frequency of atropinesterase-positive was 52.6% in Japanese White rabbits. Electrophoretically, 2 phenotypes could be detected as the presence and the absence of the nonspecific carboxylesterase.

This enzyme in pharmacologic study was confirmed by a study of atropine-induced mydriasis in rabbits known to possess or be deficient in this serum atropinesterase.

Keywords atropine, atropinesterase, electrophoresis, rabbit**Abbreviations** atropinesterase-positive; ae (+),
atropinesterase-negative; ae (-)

緒 言

ある種の薬物が同一条件で同一種の個体に与えられても必ずしも同じ薬物反応を示すとは限らない現象はよく知られている。これは薬物に対する応答性、すなわち個体内における薬物の吸収、薬物結合

蛋白、転送蛋白さらに薬物受容体、代謝、排泄などの程度がそれぞれ異なっているためにもたらされる。このような生体の薬物に対する応答性の差異は、個体のもつ遺伝的背景の差異によってもたらされる場合が多く、Vogel¹⁾によってこの種の研究分野を薬理遺伝学と呼ぶことが提唱された。

また、東洋医学における和漢薬応答性の個人差の

*〒930-01 富山市杉谷2630
2630, Sugitani, Toyama 930-01, Japan

存在が、“随証治療”の原理に直接かわる問題として重要視されている。“和漢薬方剂”に対する生体の応答性を意味する“方証”といわゆる体質あるいは個人差に基づく身体条件、症候群に基づく“病証”とが一致した時、初めて薬物効果がもたらされ则认为している。

和漢薬効果の科学的理解のためには、この東洋医学における治療原理を解明することが必要である。しかし、現代における新しい研究方法を用いて“病証”の存在を証明することは必ずしも容易ではない。なぜならば“証”と呼ばれる形質は多くの要因が複雑にからみ合った結果、もたらされたものであることが予想されるからである。そうした意味から、“随証治療”の科学的理解は“方証”の薬理遺伝学的解明から始めるべきだと考えた。すなわち、方剂に対する生体側の薬物応答性の差異が、その個体に投与された和漢薬効果の有無に帰せられるとすれば、これは明らかに薬理遺伝学の研究課題であるからである。

ウサギでは、ロート根あるいはペラドンナ葉などのアトロピンを含んだ生薬を与えた時、高い薬理効果の認められる個体と薬理効果の認められない個体の2群に分けられることが知られている。このようなウサギのアトロピン応答性の差異は血清中に存在するアトロピンエステラーゼの活性値の程度によって決定される。^{2,3)}すなわちアトロピンエステラーゼ活性の高い個体は、アトロピンを投与した時、活性値の低いウサギに比較して、その薬理効果は低い。

“方証”の科学的解明を進める前に薬物代謝酵素活性に基づく薬物応答性をも考慮した実験系が確立されなければならないと考える。そのためには、こうした薬物応答性の異なるウサギを実験動物として選び、ある種の病態を与え、それに対する和漢薬の治療効果を検討するというようなアプローチが必要なのである。

本研究の目的は、ウサギにおけるアトロピン応答性の差異を薬理遺伝学的、生化学的に解析することによって“証”を科学的に解明するための糸口を求めることにある。

材料と方法

I. 材料

試薬

硫酸アトロピン、1-Ethyl-3 (3-dimethyl amino-

propyl) carbodiimide hydrochloride, アクリルアミド, N, N'-メチレンビス(アクリルアミド)(Bis), N, N, N', N'-テトラメチル-エチレンジアミン, 過硫酸アンモニウム, 酢酸 α -ナフチル, ファーストバイオレット B 塩, トロバ酸, 以上の各試薬は、和光純薬工業から購入したものを用いた。o-ニトロフェニルヒドラジン塩酸塩は東京化成から購入したものを、トロピンは、Aldrich Chemical Company Inc. から購入したものを用いた。その他の試薬は、和光純薬工業ならびに半井化学薬品のいずれも試薬特級のものを使用した。

動物

日本白色在来種ウサギは、2.5kgに成長したものを購入し、富山医科薬科大学動物実験センターで飼育した後、実験に用いた。

II. 方法

ウサギ血清

ウサギ血清は次の2種類のものを用いた。

1. 栄研化学(株)野木工場(栃木)において購入された日本白色在来種ウサギから採血し、得られた血清を -20°C で凍結保存し使用時に融解して用いた。
2. 富山医科薬科大学動物実験センターで飼育した日本白色在来種ウサギの耳静脈より採血後、血液を室温で約1時間静置し、1,600gで15分間遠心分離して得た血清を試料とした。血清は0.5mlあたりに分注し、 -20°C で凍結保存し、使用時に融解して用いた。

組織抽出液

日本白色在来種ウサギから摘出した肝臓、腎臓、心臓、十二指腸、脾臓は、氷中で冷した生理食塩水で十分に灌流し、さらに洗浄後、各組織が40% (w/v) になるように脱イオン水を加え、氷冷中で摩砕し、40% (w/v) 摩砕液を調製した。40% (w/v) 摩砕液を 4°C で10,000gで30分間遠心し、沈渣を捨て上清をとり、さらに10,000gで20分間遠心分離後、上清を試料とした。試料は0.5mlあたりに分注し、 -20°C で凍結保存し、使用時に融解して用いた。

アトロピンエステラーゼ活性測定法

i) 寒天平板拡散法による定性的活性測定法

1%寒天溶液100mlを 55°C に保温し、硫酸アトロピン 1g, 0.16%クレゾールレッド溶液を2ml加え、0.1N水酸化ナトリウム溶液でpH 8~9のアルカリ性(赤紫)とし、直径9cmシャーレに10mlずつ流して固化した。このシャーレに直径2mmの試料孔をあけ、血清を $5\mu\text{l}$ 入れ、室温にて放置する。

一晚放置後、血清中にアトロピンエステラーゼが存在すると基質であるアトロピンを加水分解して酸が生じるため、血清を入れた試料孔の周りに赤紫色の背景に黄色の反応円が形成された。この黄色反応の認められた血清をアトロピンエステラーゼ活性陽性とし、認められなかった血清を陰性とした。

ii) o-ニトロフェニルヒドラジンを用いるカルボン酸定量法による定量的活性測定法⁴⁾

血清および各組織抽出液のアトロピンエステラーゼ活性の測定は、o-ニトロフェニルヒドラジンによるカルボン酸定量を用いた。0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH8.3) 200 μ l, 血清 (4 倍希釈) または 40% (w/v) 組織抽出液 (2 倍希釈) 5 μ l, 20mM 硫酸アトロピン溶液 20 μ l を混和し, 37 $^{\circ}$ C で 90 分間酵素反応を行なわせた。酵素反応後, 加水分解されて遊離してきたトロパン酸を o-ニトロフェニルヒドラジンで発色させ, 生成された色素の 535nm の吸収によりアトロピンエステラーゼ活性を測定した。

電気泳動法によるエステラーゼの解析

荻田らにより考案された垂直式微量電気泳動法⁵⁾を用いて非特異的なエステラーゼを検出した。187.5 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH8.8) をゲル緩衝液として含む 8% または 8% から 16% 濃度勾配のポリアクリルアミド分離ゲル薄層および 31.25mM トリス-塩酸緩衝液 (pH6.8) をゲル緩衝液として含む 4% ポリアクリルアミド濃縮ゲル薄層を用いた。試料と 125mM トリス-塩酸緩衝液 (pH6.8), グリセリン 40% (v/v), ブロムフェノールブルーを 0.0005% 含む希釈溶液を等量混和し, 1 分間 10,000 μ で遠心分離後, 上清を電気泳動用試料液とした。試料液を適量 (2 ~ 5 μ l) をとり, 12.5mM トリス 95mM グリシンからなる泳動緩衝液 (pH8.3) にて 1 mA/cm の定電流条件で 60 分から 90 分間, 4 $^{\circ}$ C で電気泳動を行った。泳動分離後のゲル薄層を 12.5mM リン酸緩衝液 (pH6.8) で 5 分間, 3 回洗った。このゲル薄層を 12.5mM リン酸緩衝液 (pH6.8) 50ml 中に 1% 酢酸 α -ナフチル, アセトン溶液を 1 ml 加え, 混合した基質溶液に浸漬した。さらに 12.5mM リン酸緩衝液 (pH6.8) 約 5ml 中にファーストバイオレット B 塩を約 50mg 溶解させた溶液を加えた。15 分間 37 $^{\circ}$ C で酵素反応を行わせると, 非特異的なエステラーゼ活性は茶色の活性泳動帯として検出された。

アトロピン応答性の瞳孔反応による判定

ウサギの瞳孔を十分に縮小させる刺激として, 瞳孔の約 15cm 上方から白熱燈 (60W) の光線を瞳孔に照射した。この時の瞳孔の直径を測定し, 0 時間における瞳孔の直径とした。硫酸アトロピンを 2

mg/ml となるように生理食塩水に溶解し, 硫酸アトロピン溶液を作製した。この硫酸アトロピン溶液をウサギの耳静脈に 0.25mg/kg²⁾ 注射した。硫酸アトロピン投与後, 瞳孔の直径を 5 分ごとに測定し, その経時変化を追った。コントロール実験は, あらかじめアトロピンを投与する前に同一個体で行った。すなわち, 投与する硫酸アトロピン溶液と同量の生理食塩水を耳静脈に注射し, 瞳孔反応の経時変化を測定した。

結 果

アトロピンエステラーゼ活性陽性ウサギの出現頻度

寒天平板拡散法を用いて栃木で購入したウサギ 190 羽の血清中のアトロピンエステラーゼ活性の有無について定性的な判定を行った。その結果アトロピンエステラーゼ活性をもつウサギの出現頻度は, オス 31 羽中 20 羽 (64.5%), メス 159 羽中 80 羽 (50.3%) であった。したがって, この集団におけるアトロピンエステラーゼ活性陽性ウサギの出現頻度は, オス, メス合わせて全体で 52.6% であった (Table I)。

Table I The frequency of 2 distinct phenotype of atropinesterase activity in a population of male and female Japanese White rabbits

phenotype		+	-
number	♂ 31	64.5%	35.5%
	♀ 159	50.3%	59.3%
	total 190	52.6%	47.4%

(+): atropinesterase activity-positive

(-): atropinesterase activity-negative

ウサギ血清エステラーゼのザイモグラム

富山で購入したウサギ 10 個体の血清中の非特異的なエステラーゼを微量電気泳動法を用いて分離検出した。電気泳動により泳動分離されたアトロピンエステラーゼ活性陽性ウサギの血清エステラーゼザイモグラムには易動度の速い部分に強い活性泳動帯が検出されたが, 陰性の個体ではこの活性泳動帯を欠損していた (Fig. 1)。

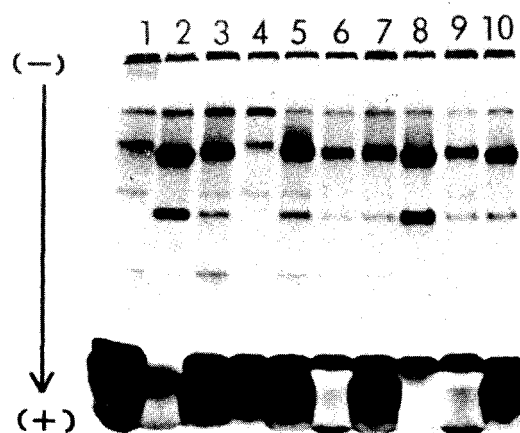


Fig. 1 Electrophoretic patterns of serum esterases of 10 individual rabbits.

Channels: 1, 3, 4, 5, 7, and 10. atropinesterase activity-positive, 2, 6, 8, and 9. atropinesterase activity-negative.

ウサギ血清中におけるアトロピンエステラーゼの活性値

富山で購入したウサギ20個体の血清中のアトロピンエステラーゼ活性をカルボン酸定量法を用いて測定した (Table II)。その結果から、0.4units/ml以上の活性値をもつ個体を優性のホモ接合体 (*AE/AE*)、活性が検出されない個体を劣性のホモ接合体 (*ae/ae*)、0.2units/mlから0.4units/mlの活性値を示す個体をヘテロ接合体 (*AE/ae*) として遺伝子型を決定した (Table II)。

Table II Atropinesterase activities in rabbit sera

No.	Atropinesterase activity units/ml	Genotype
1	0.348	<i>AE/ae</i>
2	0	<i>ae/ae</i>
3	0.494	<i>AE/AE</i>
4	0.270	<i>AE/ae</i>
5	0.292	<i>AE/ae</i>
6	0	<i>ae/ae</i>
7	0.274	<i>AE/ae</i>
8	0	<i>ae/ae</i>
9	0	<i>ae/ae</i>
10	0.260	<i>AE/ae</i>
11	0.280	<i>AE/ae</i>
12	0	<i>ae/ae</i>
13	0	<i>ae/ae</i>
14	0	<i>ae/ae</i>
15	0.482	<i>AE/AE</i>
16	0.476	<i>AE/AE</i>
17	0.297	<i>AE/ae</i>
18	0	<i>ae/ae</i>
19	0.368	<i>AE/ae</i>
20	0.302	<i>AE/ae</i>

アトロピンエステラーゼの組織分布

アトロピンエステラーゼ活性陽性 {No.5 (Table II)}: 血清アトロピンエステラーゼ活性値 (0.292 units/ml)} ウサギの肝臓, 腎臓, 十二指腸, 脾臓におけるアトロピンエステラーゼ活性をカルボン酸定量法を用いて測定したところ, 肝臓のみに活性が認められた (Table III)。

Table III Atropinesterase activities in rabbit tissue

Tissue	protein mg/ml	atropinesterase activity units/ml	units/mg protein
Serum	62.2	0.292	4.69×10^{-3}
Liver	18.3	0.100	5.46×10^{-3}
Kidney	-	0	0
Heart	-	0	0
Intestine	-	0	0
Spleen	-	0	0

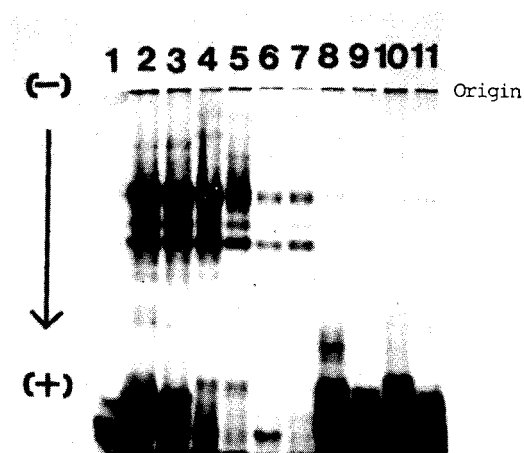


Fig. 2 Electrophoretic pattern of tissue esterases of 2 individual rabbits.

Channels: 1. serum, 2. liver, 4. kidney, 6. heart, 8. intestine, 10. spleen of *ae* (+) rabbit (No. 5), 3. liver, 5. kidney, 7. heart, 9. intestine, 11. spleen of *ae* (-) rabbit (No. 9)

アトロピンエステラーゼ活性陽性個体と陰性個体における各組織エステラーゼの差異

Fig. 2に示されるようにアトロピンエステラーゼ活性陽性の個体 (No. 5) と陰性の個体 (No. 9) の各組織における酢酸 α -ナフチルを基質とする非特異的エステラーゼザイモグラムには, 陽極側の一群のエステラーゼ活性泳動帯に差異が認められた。

アトロピンエステラーゼ活性陽性個体と陰性個体におけるアトロピン応答性の差異

Fig. 3 に示されたようにアトロピンエステラーゼ活性陽性個体 (No.10) と陰性個体 (No.2) の各々にアトロピン溶液 (2 mg/ml) を 0.25mg/kg 量を耳静脈より注射し、瞳孔の光反射応答性の程度を経時的に測定した。アトロピンエステラーゼ活性陽性個体は、20分頃から、アトロピンの薬理効果より回復し始め、50分を経過した時点で、瞳孔の直径は正常値に回復した。一方、陰性個体では、100分間経過した後もアトロピンによる瞳孔散大作用からは回復せず、瞳孔の直径は最大値の状態を保ち、アトロピンの薬理効果が長時間維持されていることが認められた。

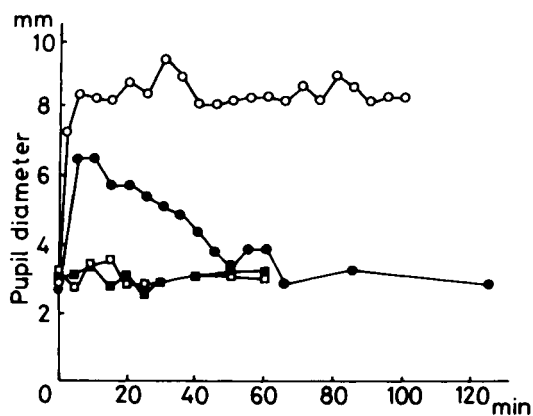


Fig. 3 The effect of atropine on pupil.
ae(+) rabbit administered atropine (0.25mg/kg) (—●—),
ae(-) rabbit administered atropine (0.25mg/kg) (—○—), ae(+) rabbit administered saline (—■—), ae(-) rabbit administered saline (—□—).

考 察

華岡青洲が考案した有名な麻酔薬「通仙散」には、曼陀羅華、草烏頭、白芷、当帰、川芎、天南星が処方されている。このうち、麻痺、麻酔作用を有する生薬は、曼陀羅華、草烏頭であり、植物名チョウセンアサガオである曼陀羅華に含有されている主要有効成分は、*l*-ヒヨスシアミン、スコポラミンであることが知られている。この*l*-ヒヨスシアミンを有する生薬は、曼陀羅華の他にロート根、ペラドンナ葉であるが、天然に含まれている*l*-ヒヨスシアミンは、これらの生薬から抽出される際にほとんどがラセミ化して*dl*-ヒヨスシアミンいわゆるアトロピンとして抽出される。現在、アトロピンは、副交感神経遮断薬として、胃、十二指腸潰瘍、有機リ

ン系殺虫剤の中毒、非薬物性パーキンソニズム、さらに眼科領域では、散瞳効果を利用して虹彩炎の癒着防止など、広く繁用されている。ウサギのアトロピン応答性は、血清中のアトロピンエステラーゼ活性の有無によって決定されることは、従来からよく知られてきた事実である。そこで我々は生薬成分に対する薬理的応答性という面から、「証」の1つの型としてウサギのアトロピン応答性について解析することにした。

ウサギの血清中には、アトロピンを薬理作用のないトロパン酸とトロピンに加水分解する酵素、アトロピンエステラーゼ (E.C. 3, 1, 1, 10) の存在することが、Fleishmannによって70年前に報告された⁶⁾。次いで、ウサギのアトロピン抵抗性の形質は、相互優性のメンデル式遺伝様式で遺伝することが確かめられた。⁷⁻⁹⁾ これら外国での報告に用いられているウサギは、ニュージーランド白色種であることから、国内で最も入手しやすい日本白色在来種を用いて、アトロピン応答性についての生化学的、薬理学的研究を行うことにした。

アトロピンエステラーゼ陽性個体の出現頻度

日本白色在来種においてアトロピン抵抗性個体すなわち血清中のアトロピンエステラーゼ活性陽性個体の出現頻度について検討した。栃木で購入した日本白色在来種のウサギ190羽からなる集団におけるアトロピンエステラーゼ陽性個体は、100羽 (52.6%) (Table I) であり、富山で購入した20羽のウサギの中の陽性個体は、12羽 (60.0%) (Table II) であった。したがって、これら地域におけるウサギ集団中の出現頻度には差がないと結論された。

アトロピンエステラーゼ遺伝子とその沈黙遺伝子 (silent gene) の出現頻度から栃木のウサギ集団における遺伝子型の理論的な分布を計算し、実際的な各遺伝子型に属するウサギの表現型の出現頻度と比較し、 χ^2 テストにより検定を行った (Table IV)。計算された理論値と実際の観察値は、0.05の信頼限界で一致することが明らかにされた。このことは、アトロピンエステラーゼ遺伝子ならびに対立遺伝子である沈黙遺伝子の適応度 (fitness) には差異のない中立突然変異であることを示している。この沈黙遺伝子の出現頻度が高いことから、本形質は集団中に安定に保存されている多型形質の1つであると結論することができた。

ニュージーランド白色種ウサギでは、陽性個体の出現頻度が75%⁷⁾あるいは61.2%¹⁰⁾であったという報告があり、これらと比較すると日本白色在来種あるいは、我々が調査した集団では多少低い頻度で

Table IV Comparison of the observed proportion of genotypes of atropinesterase with the expected proportion in Japanese White rabbits

Genotype	expected proportion	expected number	observed number
<i>AE/AE</i>	0.097	1.94	3
<i>AE/ae</i>	0.429	8.58	9
<i>ae/ae</i>	0.474	9.48	8
total	1	20	20

$\chi^2=0.823$ Degrees of freedom = 1 Probability = 0.35

あったが、ほとんど出現頻度が似かよっていることから前述の結論を支持するものである。また、アトロピンエステラーゼ活性値においても、日本白色在来種 (Table II) とニュージーランド白色種^{11, 12)}との間には、ほとんど差のないことが確認できた。

アトロピンエステラーゼの組織分布

各組織におけるアトロピンエステラーゼ活性を測定したところ、血清中のアトロピンエステラーゼ活性陽性個体では、すでにD. Glick¹³⁾によって報告されているように血清以外にアトロピンエステラーゼ活性は肝臓組織のみにおいて検出された (Table III)。一方、血清中のアトロピンエステラーゼ活性陰性個体では、肝臓組織においても活性は検出されなかった。さらに、電気泳動法的解析によって、アトロピンエステラーゼ活性陽性個体と陰性個体における肝臓、腎臓、十二指腸、脾臓のエステラーゼザイモグラムをそれぞれ比較検討した (Fig. 2)。その結果、陽性個体と陰性個体のそれぞれの組織の酢酸 α -ナフチルを基質とする非特異的エステラーゼザイモグラムでは、陽極側の一群のエステラーゼ活性泳動帯に差異が認められた。しかし、血清に存在するアトロピンエステラーゼ活性泳動帯の位置に肝臓における非特異的エステラーゼ活性泳動帯が重なって存在するので、肝臓に検出されたアトロピンエステラーゼ活性を電気泳動法的に分離確認することはできなかった。このことからアトロピンを基質とする特異的エステラーゼ活性を泳動分離し、活性検出する方法を開発する必要がある。

アトロピン応答性の差異

血清中のアトロピンエステラーゼ陽性個体と陰性個体のそれぞれにアトロピンを投与すると、陽性個体ではアトロピンがアトロピンエステラーゼによって分解されるため、すみやかにアトロピンの瞳孔散大作用から回復がみられ、一方、陰性個体では作用が持続していたことから、ウサギにおけるアトロピ

ン応答性と血清アトロピンエステラーゼ活性値との相関関係を薬理学的に確認することができた (Fig. 3)。このようなアトロピンの薬理効果を瞳孔散大作用ではなく、胃弛緩作用で判定した報告²⁾があり、この結果と我々の結果はほぼ一致している。

以上のことよりこのウサギにおけるアトロピン応答性の差異がアトロピンエステラーゼ活性値の高低によるものであることが確認できたことから、アトロピンに高い応答性をもつ個体および無応答性のウサギ個体に有機リン剤中毒、胃潰瘍などの病態モデルを作成し、それぞれにアトロピンを含有するロートエキスあるいはロートエキスを含んだ方剤を与え、治療効果にアトロピン応答性の差異がどう影響をもたらすかを明らかにしたい。このような研究方式によって、“証”の存在を生化学的、薬理的に裏づけたいと考えている。

結 論

ウサギは、高いアトロピンエステラーゼ活性を有するアトロピンエステラーゼ陽性個体と、その活性を欠損した陰性個体とに分類することができる。

栃木で購入した日本白色在来種のウサギ190羽からなる集団におけるアトロピンエステラーゼ陽性個体は、100羽 (52.6%) であり、富山で購入した20羽のウサギの中の陽性個体は、12羽 (60.0%) である。したがって、これら地域におけるウサギ集団中の出現頻度には差がなかったといえる。

アトロピンエステラーゼ遺伝子とその沈黙遺伝子 (silent gene) の出現頻度から栃木のウサギ集団における遺伝子型の理論的な分布を計算し、実際の各遺伝子型に属するウサギの表現型の出現頻度と比較した。その結果、理論的に計算された遺伝子型と実際の表現型の観察値との間には差がないことがわかった。このことは、アトロピンエステラーゼ遺伝

子ならびに対立遺伝子である。沈黙遺伝子の適応度 (fitness) には差異のない中立突然変異であることを示している。この沈黙遺伝子の出現頻度が高いことから、本形質は、集団中に安定に保存されている多型形質の1つであると結論することができた。

アトロピンエステラーゼ陽性個体および陰性個体におけるアトロピン応答性に関しては、陽性個体では速やかにアトロピンを分解し、その薬理効果からの回復がみられ、これに反して陰性個体では長時間にわたりアトロピンの薬理効果が持続された。このようにアトロピンの薬理効果の持続は、血清アトロピンエステラーゼ活性値との間に強い相関関係のあることを確認することができた。

文 献

- 1) Vogel, F. : Modern problems of human genetics. *Ergen. Inn. Med. Kinderk* **12**, 52–125, 1959
- 2) Hobbiger, F. and Lessin, A. W. : Correlation between transience of atropine-block and the incidence of atropine-esterase in rabbits. *J. Physiol.* **128**, 71, 1955
- 3) Ecobichon, D.J. and Comeau, A.M. : Genetic polymorphism of plasma carboxyesterases in the rabbit : Correlation with pharmacologic and toxicologic effects. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **27**, 28–40, 1974
- 4) Momoi, K. and Ogita, Z. : A new colorimetric determination of atropinesterase activity using the 2-nitrophenyl hydrazine coupling reaction. *Jpn. J. Clin. Chem.* **13**, 245–249, 1984
- 5) Ogita, Z. and Markert, M.V. : A miniaturized system for electrophoresis on polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **99**, 233–241, 1979
- 6) Fleischman, P. : Atropinentgiftung durch blut. *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.* **62**, 518–526, 1910
- 7) Swain, P.B. and Glick, D. : Atropinesterase, a genetically determined enzyme in the rabbit. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **29**, 55–59, 1943
- 8) van Zutphen, L.F.M. : Serum esterase genetics in rabbits II. Genetic analysis of the prealbumin esterase system, including atropinesterase and cocainesterase polymorphism. *Biochem. Genet.* **12**, 327–343, 1974
- 9) Stormont, C. and Suzuki, Y. : The atropinesterase-cocaineesterase system of isozyme in rabbits : distribution of phenotypes and their genetic analysis. In "Isozymes IV" (Ed. by Markert, C.L.), Academic Press, New York, p699–712, 1975
- 10) Liebenberg, S.P. and Linn, J.M. : Seasonal and sexual influences on rabbit atropinesterase. *Laboratory Animals* **14**, 297–300, 1980
- 11) Margolsis, F. and Feigelson, P. : Purification and characterization of a genetically determined rabbit serum esterase. *J. Biol. Chem.* **238**, 2620–2627, 1963
- 12) van Zutphen, L.F.M. : Qualitative and quantitative detection of atropinesterase and cocainesterase in two breeds of rabbits. *Enzymologia* **42**, 201–218, 1972
- 13) Glick, D. and Glaubach, S. : The occurrence and distribution of tropinesterase. *J. Gen. Physiol.* **25**, 197–205, 1941