

〔原著〕 松本歯学 3 : 15~21, 1977

フッ化ナトリウムの ラット肝薬物代謝酵素に及ぼす影響

倉 橋 寿

松本歯科大学 歯科薬理学教室 (主任 前橋 浩 教授)

The Effect of Sodium Fluoride on Hepatic Drug-Metabolizing Enzymes in Rats

HISASHI KURAHASHI

Department of Dental Pharmacology, Matsumoto Dental College

(Chief: Prof. H. Maehashi)

Summary

The effects of sodium fluoride (NaF) on drug-metabolizing enzymes (aminopyrine demethylase-AD, Hexobarbital oxidase-HO and aniline hydroxylase-AH) in the rat liver were studied *in vivo* and *in vitro*. Prior to the study, preliminary investigations were carried out on procedures of the enzyme assay concerning storage stability of these enzymes in a frozen 9,000×g supernatant fraction from the rat liver homogenate and whether nicotinamide should be involved in the incubation mixtures. Results are summarized as follows :

- 1) When a 9,000×g supernatant fraction was stored at -20°C, AD activity was decreased in 5 days to approx. 40% of the level of the first day, whereas both activities of AH and HO remained unchanged during the same period.
- 2) AD, AH and HO activities were all inhibited by the addition of nicotinamide when a higher concentration of NADP was maintained during the assay. In this study, nicotinamide was excluded from incubation mixtures.
- 3) In the *in vitro* study, when 0.1, 1, 10 and 100 mM of NaF was added to the incubation mixtures, AD and HO activities were both decreased. In contrast, AH activity was slightly increased.
- 4) In the *in vivo* study, when rats ingested NaF (10, 38, 76 and 152 ppm as F) in their drinking water for a month, it was observed that the sleeping time was prolonged by hexobarbital sodium, the fluoride was accumulated in the liver of these rats and HO activity was inhibited, but activities of AD and AH were both similar to those of control rats.

緒 言

Cook らは SKF525-A (β -diethylaminoethyl-diphenylpropyl-acetate \cdot HCl) をラットに予め投与しておくと、その後に投与した薬物の効果が著しく増強し、持続されることを見出し⁵⁾、Brodie らは、この原因が肝の microsome に存在する薬物代謝酵素の活性の変化によることを明らかにした^{1) 6)}。続いて種々の常用薬も他の薬物との併用により肝の microsome での代謝に影響を受けることが明らかとなったので^{12) 13)}、薬効評価に際しては薬物代謝酵素に対する影響を考慮する必要があるが生じてきた。現在までかなりの数の薬物についてその影響が明らかになっているものの、なお不明な薬物も残っており今後の検討が待たれている。

無機物の摂取については、その量が適当であると薬物代謝酵素の活性に影響を与えないが、mineral balance の変化はその活性を抑制し⁴⁾、欠亡や過剰はことに影響が強い^{2) 3) 8) 17)}。一方、フッ素の生体作用に関する研究は各方面でなされており、生体内諸酵素に対しては一般に阻害作用を示すことが知られているが^{9) 15)}、肝薬物代謝酵素に対する作用は明らかでない。

今回、フッ化ナトリウムを用いてフッ素のラット肝薬物代謝酵素に対する影響を aminopyrine demethylase, aniline hydroxylase および hexobarbital oxidase について in vitro および in vivo で検討した。またこれらの薬物代謝酵素活性の測定には数種の co-factor の添加が必要であり、殊に nicotinamide は NADPase による NADP の分解を防止するために加えられているが、一方では薬物代謝酵素活性をも抑制するので¹⁹⁾、この点を調べ、さらに今回測定する薬物代謝酵素の活性の保存安定性についても検討を行なった。

実験材料および方法

動物は体重約 200 g の Wistar 系雄ラットを使用し、in vivo の実験では 1 群 3 匹として対照群には蒸留水を、実験群は 4 群に対しフッ素として 19 ppm, 38 ppm, 76 ppm および 152 ppm となるようにフッ化ナトリウムを蒸留水に溶解して 1 ケ月間自由に飲用させた。

酵素標本の作製は、ラットを断頭して放血させ

門脈から 1.15% の KCl を通して肝に含まれる血液を洗浄した後、直ちに肝を取り出して氷冷した 1.15% の KCl で洗浄し濾紙で水分を除いてから重量を測定した。肝は 1.15% の KCl を含んだ 0.02 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) とともに Potter 型 teflon homogenizer で homogenate を作製した。homogenate は 1 ml 中に肝 0.5 g (50%) を含むものと、肝 0.25 g (25%) を含むものの 2 種類を調製し、それぞれ 9,000 \times g, 10 分間, 0 $^{\circ}$ C で遠心分離 (TOMY RS-20P, No 3N roter) して、その上清部を測定用の薬物代謝酵素標本液とした。

aminopyrine demethylase 活性の測定は、基質 aminopyrine の脱メチル化により生成した formaldehyde を定量する Nash の方法を一部変更して行なった¹⁸⁾。すなわち 0.5 ml の 5 μ M (57.8 mg/dl) aminopyrine, 0.5 ml の 25% 肝 9,000 \times g 上清液, 0.3 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) 1 ml 中に semicarbazide \cdot HCl を 15 μ M (167.3 mg/dl), NADP を 0.8 μ M (67.0 mg/dl), G-6-P を 10 μ M (304.1 mg/dl), $MgCl_2$ を 25 μ M (508.3 mg/dl) 含む co-factor 液の 1.5 ml, および in vivo においては蒸留水 0.5 ml を、in vitro においては incubation 時の最終濃度に対して 6 倍の濃度を持つフッ化ナトリウム液の 0.5 ml を氷冷した 30 ml の Erlenmeyer flask に取り混合した。blank は 1 標本について必ず 1 本作成し、5 μ M aminopyrine の代りに水 0.5 ml を添加した。incubation は振とう式恒温水槽 (ヤマト科学 BT-25) 中で 37 $^{\circ}$ C, 10 分間、毎分 120 回の振とうを行なった。終了後、直ちに氷冷し、続いて 15% $ZnSO_4$ の 1 ml を添加して反応を停止させ、5 分後に除蛋白のため 1 ml の飽和 $Ba(OH)_2$ を加えて更に 5 分間放置してから全量を遠沈管に取り 8,000 \times g, 10 分間、0 $^{\circ}$ C で冷却遠心分離した。上清部の 2.5 ml を取り Nash 試薬 (308 g の ammonium acetate, 4.1 ml の acetyl acetone および 5.8 ml の acetic acid に水を加えて全量を 1,000 ml とする。) の 1 ml を加えて湯浴中で 60 $^{\circ}$ C, 30 分放置後、室温まで冷却して分光光度計 (SHIMADZU UV-200) の 415 nm で吸光度を測定した。別に 0~5 μ g/ml の formaldehyde を 5 ml に Nash 試薬 2 ml を加えて湯浴中で 60 $^{\circ}$ C, 30 分放置して発色させて検量線を作成し、これから肝 1 g が 10 分間に生成した

formaldehyde の量 (μg) を定量した。

aniline hydroxylase 活性は基質 aniline の水酸化によって生じた p-aminophenol を定量する Guarino らの方法を一部変更して測定した¹⁰⁾。すなわち 0.5 ml の 10 μM (129.6 mg/dl) aniline \cdot HCl, 1 ml の 25% 肝 9,000 \times g 上清液, 0.3 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) 1 ml 中に NADP を 0.8 μM , G-6-P を 10 μM , MgCl_2 を 25 μM を含む co-factor 液の 2 ml および in vivo では蒸留水 0.5 ml を, in vitro では incubation 時の最終濃度に対して 8 倍の濃度を持つフッ化ナトリウム液の 0.5 ml を氷冷した 30 ml の Erlenmeyer flask に混合した。blank は 10 μM aniline \cdot HCl の代りに水 0.5 ml を添加した。incubation は 37 $^{\circ}\text{C}$, 10 分間, 毎分 120 回振とうし, 終了後直ちに冷却して 2 ml を 50 ml 共栓付遠沈管に取り, 8.0 g の NaCl と 25 ml の過酸化物を含まない ether を加え 10 分間振とう後 ether 層の 20 ml を別の 50 ml 共栓付遠沈管に取る。これに 2 ml の 1% phenol と 2 ml の 0.25 M Na_3PO_4 を加えて 5 分間振とう後, ether 層を除き, 水層は 30 分間放置して 630 nm の吸光度を測定した。別に 0 \sim 8 $\mu\text{g/ml}$ の p-aminophenol を 2 ml と 2% phenol を 1 ml および 0.5 M Na_3PO_4 の 1 ml を加えて室温で 30 分放置して発色させて検量線を作成し, これから肝 1 g が 10 分間に生成した p-aminophenol の量の (μg) を定量した。

hexobarbital oxidase 活性は基質 hexobarbital の消失量を定量するための Cooper らの方法を一部変更して測定した⁷⁾。すなわち 0.5 ml の 2 μM (47.3 mg/dl) hexobarbital, 1 ml の 50% 肝 9,000 \times g 上清液, aniline hydroxylase の測定に用いた co-factor 液の 2 ml および in vivo では蒸留水 0.5 ml を, in vitro では incubation の時の最終濃度に対して 8 倍の濃度のフッ化ナトリウム液 0.5 ml を氷冷した 30 ml の Erlenmeyer flask に混合した。この際同じ内容の flask を 2 本ずつ作り, 1 本は 37 $^{\circ}\text{C}$, 10 分間, 毎分 120 回振とうして hexobarbital の代謝を行なわせ, 他の 1 本は代謝を進行させないようにそのまま氷冷を継続した。終了後, 直ちに氷冷して 2 ml を 50 ml 共栓付遠沈管に取り, 0.5 M citric acid-NaOH buffer (pH 5.5) の NaCl 飽和溶液 3 ml と heptane 中に iso-amylalcohol を 0.5% 含む混液の 10 ml を加

え 10 分間振とう後 heptane 層の 5 ml を別の 50 ml 共栓付遠沈管に取り, 0.8 M Na_2HPO_4 -NaOH buffer (pH 11.0) の 4 ml を加えて 10 分間振とうしてから heptane 層を除き, 30 分以内に分光光度計で 245 nm と 280 nm の吸光度を測定してその差を消失した hexobarbital の量とした。検量線は 0.8 M Na_2HPO_4 -NaOH buffer (pH 11.0) 中に hexobarbital 0 \sim 20 $\mu\text{g/ml}$ を含む溶液を用いて作製した。

蛋白質量は Lowry らの方法を一部変更して測定した¹⁶⁾。すなわち肝 9,000 \times g 上清液 1 ml を 10 ml 共栓付遠沈管に取り 3 ml の 10% trichloroacetic acid を加えて 2,000 r.p.m で 10 分間遠心し, 上清を捨て, 沈澱には 6 ml の 1N NaOH を加えて熱水中で溶解し, この 0.5 ml を取り水を加えて 10 ml となし試料液とした。この 0.5 ml を試験管に取り, 100 ml の 2% Na_2CO_3 中に 10 mg の CuSO_4 と 20 mg の potassium sodium tartrate を含む液の 2.5 ml を加え, 10 分後に 2 倍希釈した phenol 試薬 0.25 ml を加えて 60 分後に 750 nm の呼光度を測定した。検量線は牛血清 albumin (0 \sim 250 $\mu\text{g/ml}$) を用いて同様に作製した。

実験成績

in vitro におけるフッ素の影響

酵素反応溶液中のフッ素濃度を, 0 mM, 0.1 mM, 1 mM, 10 mM および 100 mM となるようにフッ化ナトリウムを添加した時の薬物代謝酵素活性に対する影響を in vitro で測定し, フッ素濃度が 0 mM の時を 100% として比活性で示した。Fig. 1 は aminopyrine demethylase について測定したもので, フッ素 10 mM までの活性の抑制はわずかで有意差は見られなかったが 100 mM ではおよそ 20% の抑制を示した。Fig. 2 は aniline hydroxylase について測定したもので, 活性はフッ素濃度の増加にともなって上昇し, 100 mM では 44% の増加を見た。Fig. 3 は hexobarbital oxidase について測定したもので, フッ素 10 mM までは有意差がなく 100 mM で約 15% の抑制を示した。

in vivo におけるフッ素の影響

Table 1 はフッ素の 19 ppm, 38 ppm, 76 ppm および 152 ppm の水溶液を 1 群 3 匹のラットに

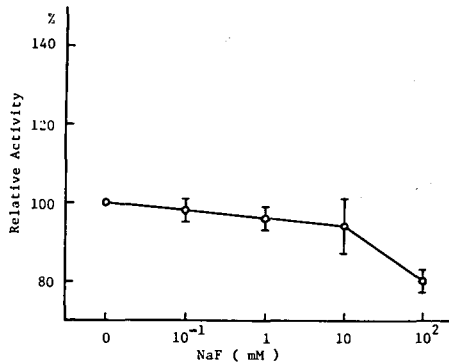


Fig. 1. The effect of sodium fluoride on aminopyrine demethylase activity.

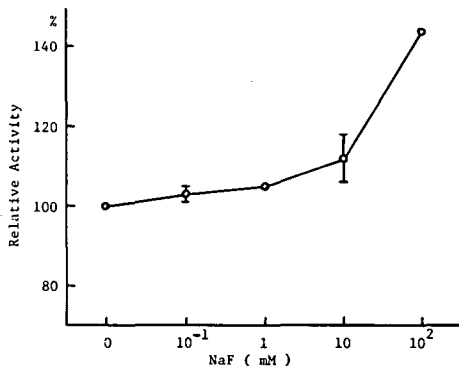


Fig. 2. The effect of sodium fluoride on aniline hydroxylase activity.

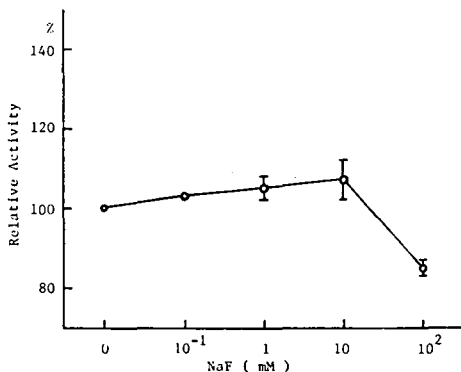


Fig. 3. The effect of sodium fluoride on hexobarbital oxidase activity.

1ヶ月間、自由に飲用させた後、体重1kgあたりの1日のフッ素の平均摂取量、hexobarbitalを100mg/kg腹腔内投与した時の睡眠時間および肝臓中のフッ素量をフッ素イオン電極を使用して

Table 1. Fluoride Intake, Liver Fluoride Concentration and Hexobarbital Sleep Time.

Treatment (as F)	Fluoride intake (mg/kg/day)	Liver fluoride (μg/g liver)	Hexobarbital sleep time (min)
Control	-----	167 ± 6	22.2 ± 3.8
19 ppm	4.1 ± 0.4	171 ± 5	23.8 ± 4.1
38 ppm	8.8 ± 0.8	172 ± 7	27.2 ± 2.2
76 ppm	18.2 ± 2.0	190 ± 7*	30.7 ± 1.3*
152 ppm	31.0 ± 2.9	198 ± 6**	31.9 ± 0.9*

Each value represents the mean ± S.D. of three male rats on sodium fluoride treatment (1 month).

*Significantly different from control value ($P < 0.05$).

**Significantly different from control value ($P < 0.01$).

Table 2. Drug-Metabolizing Enzyme Activities after Prolonged Sodium Fluoride Treatment (1 Month).

Treatment (as F)	Hexobarbital oxidase	Aminopyrine demethylase	Aniline hydroxylase
Control	329 ± 6	21.6 ± 1.5	33.9 ± 0.5
19 ppm	332 ± 8	22.5 ± 1.4	32.9 ± 2.0
38 ppm	311 ± 4*	23.1 ± 1.7	36.4 ± 2.2
76 ppm	297 ± 5**	21.7 ± 1.3	30.7 ± 4.0
152 ppm	271 ± 10**	21.9 ± 1.9	32.9 ± 2.4

Enzyme activities are expressed as μg of hexobarbital consumed/g liver/10 min (hexobarbital oxidase); μg of formaldehyde formed/g liver/10 min (aminopyrine demethylase); and μg of p-aminophenol formed/g liver/10 min (aniline hydroxylase).

Each value represents the mean ± S.D. of three male rats.

*Significantly different from control values ($P < 0.05$).

**Significantly different from control values ($P < 0.01$).

測定したもので、蒸留水を飲用させた対照群と比較すると76 ppm以上の濃度群で睡眠時間および肝臓中のフッ素濃度が有意に増加した。またこれらのラットの薬物代謝酵素活性について測定した結果をTable 2に示したがaminopyrine demethylaseとaniline hydroxylaseについて有意な変化は見られなかった。しかしhexobarbital oxidaseの活性はフッ素38 ppm以上の濃度群で有意な抑制を認めた。

nicotinamide 添加の影響

incubation medium中のnicotinamideの濃度を10 mMとしNADPの濃度を変化させた時のそれぞれの薬物代謝酵素活性の変化について測定した。Fig. 4はaminopyrine demethylaseの活性についてNADPの濃度を0.04 mMから0.325 mMまでの範囲で測定したものであり、NADPの濃度が0.12 mM以上でnicotinamide添加による活性の抑制が見られた。Fig. 5はaniline hydroxylaseの活性について、NADPの濃度を0.025 mMから0.2 mMまでの範囲で測定したも

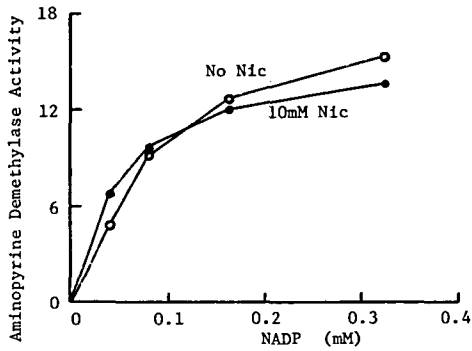


Fig. 4. The effect of nicotinamide on aminopyrine demethylase activity in 9,000 x g supernatant fraction. Enzyme activity expressed as μg of formaldehyde formed/g liver/10 min.

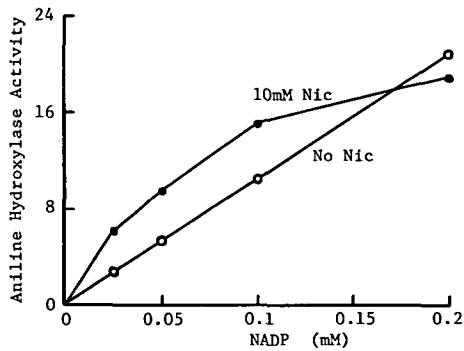


Fig. 5. The effect of nicotinamide on aniline hydroxylase activity in 9,000 x g supernatant fraction. Enzyme activity expressed as μg of p-aminophenol formed/g liver/10 min.

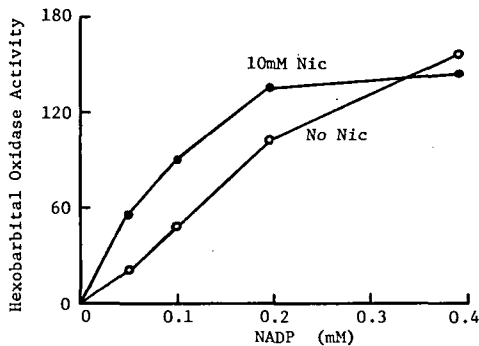


Fig. 6. The effect of nicotinamide on hexobarbital oxidase activity in 9,000 x g supernatant fraction. Enzyme activity expressed as μg of hexobarbital consumed/g liver/10 min.

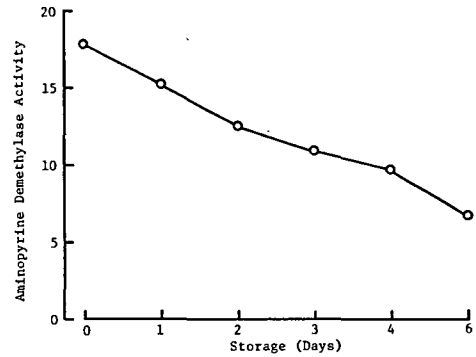


Fig. 7. Stability in the activity of aminopyrine demethylase in frozen 9,000 x g supernatant fraction. The activity expressed as μg of formaldehyde formed/g liver/10 min.

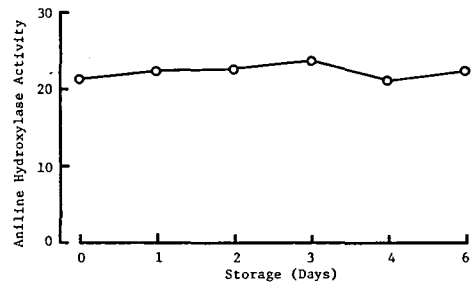


Fig. 8. Stability in the activity of aniline hydroxylase in frozen 9,000 x g supernatant fraction. The activity expressed as μg of p-aminophenol formed/g liver/10 min.

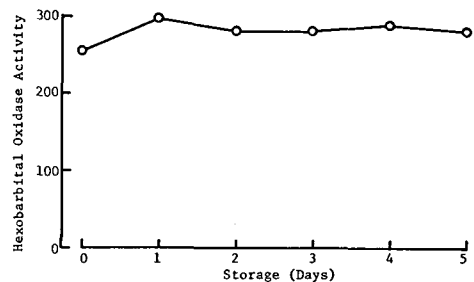


Fig. 9. Stability in the activity of hexobarbital oxidase in frozen 9,000 x g supernatant fraction. The activity expressed as μg of hexobarbital consumed/g liver/10 min.

のであり、NADP の濃度が 0.17 mM 以上で活性の抑制が見られた。Fig. 6 は hexobarbital oxidase の活性について NADP の濃度を 0.05 mM から 0.4 mM までの範囲で測定したものであり、

NADP の濃度が 0.34 mM 以上で活性の抑制が見られた。

薬物代謝酵素活性の保存安定性

実験に用いる酵素標本は新鮮なものを用いることが望ましいが、都合で翌日以後に測定することがあるため、目的とする薬物代謝酵素活性の保存安定性を調べて活性の低下を見ないうちに測定を完了させる必要がある。今回の実験に必要な期間を1週間以内と考え、freezer 中に酵素標本を -20°C で5日間凍結保存し、これらの活性の経日変化について測定した。Fig. 7 は aminopyrine demethylase について測定したものであるが、活性は1日毎に8%~17%減少し6日間で約60%の低下を見た。Fig. 8 は aniline hydroxylase について、Fig. 9 は hexobarbital oxidase について測定したものであるが、ともに活性は6日間安定であり低下は見られなかった。

考 察

薬物代謝酵素に対するフッ化ナトリウムの影響は、in vitro の実験ではフッ素の濃度の増加にとともに aminopyrine demethylase の活性をやや抑制し、さらに高濃度では hexobarbital oxidase の活性も抑制したが、aniline hydroxylase の活性は逆に増加するという結果を得た。aniline hydroxylase 活性の増加原因を知るため酵素標本または cofactor の一方を除いて測定したが、いずれも活性がなかったためフッ素の存在が aniline の in vitro での代謝をなんらかの理由で促進しているものと思われたが詳細については今後更に検討したい。

in vivo では肝のフッ素量が対照群と有意差を持つ群において hexobarbital 投与による睡眠時間が有意に延長され、hexobarbital oxidase 活性もほぼ同様のフッ素濃度で抑制されたが、aminopyrine demethylase 活性および aniline hydroxylase 活性については有意差を生じなかった。また 19 ppm 以下のフッ素濃度は薬物代謝酵素に影響を与えず、更にフッ素の影響は in vivo と in vitro では異なることが示された。

薬物代謝酵素活性を測定する際に、co-factor mixture に nicotinamide を加えるのは添加した NADP が酵素標本中に存在する NADPase により分解されるのを防止する目的で加えられてきた

が、Schenkman らにより薬物代謝酵素活性も抑制されることが明らかにされた¹⁹⁾。今回の結果からは、NADP が低濃度の場合は nicotinamide を加えた方が高い活性を示したが、NADP が高濃度の場合は nicotinamide を加えない方が高い活性を示し、更に NADP の高濃度の時が酵素反応の maximal velocity であることから、なるべく incubation の時間を短縮して NADP の添加量を増し、nicotinamide を加えない方が良いと結論された。

薬物代謝酵素の保存安定性については、Leibman が acetanilide, aminopyrine, pentobarbital および chlorpromazine の代謝に関して 10,000×g 上清を酵素標本として -15°C で2ヶ月以上保存した時の活性の低下は25%程度であると報告している¹⁰⁾。また Kamataki らが aniline hydroxylase 活性について肝 9,000×g 上清を -20°C で6ヶ月間保存した時の活性低下は32%であった¹¹⁾。今回の結果から1週間以内での aniline hydroxylase および hexobarbital oxidase の活性測定には凍結保存した酵素標本を用いることが可能であるが、aminopyrine demethylase 活性の測定には必ず新鮮な酵素標本を用いなければならないことが示された。

結 論

フッ化ナトリウムのラット肝薬物代謝酵素に対する影響を in vitro および in vivo で測定し、合わせて incubation medium 中に nicotinamide を添加することの可否、および凍結保存による薬物代謝酵素活性の安定性について調べた。

in vitro でのフッ素の影響は、その濃度の増加にとともに aminopyrine demethylase 活性および hexobarbital oxidase 活性を抑制する傾向にあったが aniline hydroxylase 活性は逆に増大した。

in vivo でのフッ素の影響は、肝のフッ素量が対照群と有意差を生じる 76 ppm 群以上で hexobarbital 投与による睡眠時間が延長され、hexobarbital oxidase 活性も抑制されたが aminopyrine demethylase 活性および aniline hydroxylase 活性は有意差がなく in vitro とは傾向の異なる結果を生じた。また in vivo および in vitro ともに 19 ppm (1 mM) 以下の濃度では影響を認

めなかった。

incubation medium 中には NADP の添加量を増して incubation の時間を短縮すれば nicotinamide を加えない方がよい結果を得た。

肝 9,000×8 上清酵素標本を 5 日間凍結保存した時の安定性は aniline hydroxylase 活性および hexobarbital oxidase 活性で変化がなく, aminopyrine demethylase 活性のみ 1 日毎に 8%~17% の低下を生じた。

稿を終るにあたり、御校閲を賜った松本歯科大学歯科薬理学教室前橋 浩教授に謝意を表します。また御助言をいただいた信州大学医学部薬理学教室の中西頼央助教授に謝意を表し、あわせて御協力をいただいた本学歯科薬理学教室員各位に感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Axelrod, J., Reichenenthal, J. and Brodie, B. B. (1954) Mechanism of potentiating action of β -diethylaminoethyl-diphenylpropylacetate. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 112: 49—54.
- 2) Becking, G. C. and Morrison, A. B. (1970) Hepatic drug metabolism in zinc-deficient rats. *Biochem. Pharmacol.* 19: 895—902.
- 3) Becking G. C. and Morrison, A. B. (1970) Role of dietary magnesium in the metabolism of drugs by NADPH-dependent rat liver microsomal enzymes. *Biochem. Pharmacol.* 19: 2639—2644.
- 4) Conney, A. H. (1967) Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. *Pharmac. Rev.* 19: 317—366.
- 5) Cook, L., Toner, J. J. and Fellows, E. J. (1954) Effect of β -diethylaminoethyl-diphenylpropylacetate hydrochloride on action of series of barbiturates and C. N. S. depressants. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 111: 131—141.
- 6) Cooper, J. R., Axelrod, J. and Brodie, B. B. (1954) Inhibitory effects of β -diethylaminoethyl-diphenylpropylacetate on variety of drug metabolic pathways in vitro. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 112: 55—63.
- 7) Cooper, J. R. and Brodie, B. B. (1955) Enzymatic metabolism of hexobarbital (evipal). *J. Pharmacol. exp. Ther.* 114: 409—417.
- 8) Dingell, J. V., Joiner, P. D. and Hurwitz, L. (1966) Impairment of hepatic drug metabolism in calcium deficiency. *Biochem. Pharmacol.* 15: 971—976.
- 9) Eagers, R. Y. (1969) Toxic Properties of Inorganic Fluorine Compounds: 106—113. Elsevier publishing Co., Ltd. Essex.
- 10) Guarino, A. M., Gram, T. E., Gigon, P. L., Greene, F. E. and Gillette, J. R. (1969) Changes in Michaelis and spectral constants for aniline in hepatic microsomes from phenobarbital-treated rats. *Mol. Pharmacol.* 5: 131—136.
- 11) Kamataki, T. and Kitagawa, H. (1974) Effects of lyophilization and storage of rat liver microsomes on activity of aniline hydroxylase, contents of cytochrome b₅ and cytochrome p-450 and aniline-induced p-450 difference spectrum. *Japan. J. Pharmacol.* 24: 195—203.
- 12) Kato, R., Chiesara, E. and Vassanelli, P. (1962) The in vitro inhibition of pentobarbital metabolism by chlorpromazine. *Experientia*, 18: 269—270.
- 13) Kato, R., Chiesara, E. and Vassanelli, P. (1964) Further studies on the inhibition and stimulation of microsomal drug metabolizing enzymes of rat liver by various compounds. *Biochem. Pharmacol.* 13: 69—83.
- 14) Leibman, K. C. (1965) Metabolism of trichloroethylene in liver microsomes. *Mol. Pharmacol.* 1: 239—246.
- 15) Lilienthal, B. and Martin, N. D. (1956) Investigation of the antienzymatic action of fluoride at the enamel surface. *J. dent. Res.* 35: 189—196.
- 16) 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.
- 17) Moffitt, A. E. and Murphy, S. D. (1973) Effect of excess and deficient copper intake on rat liver microsomal enzyme activity. *Biochem. Pharmacol.* 22: 1463—1476.
- 18) Nash, T. (1953) The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem. J.* 55: 416—421.
- 19) Schenkman, J. B., Ball, J. A. and Estabrook, R. W. (1967) On the use of nicotinamide in assays for microsomal mixed-function oxidase activity. *Biochem. Pharmacol.* 16: 1071—1081.