

家畜の血清 Cholinesterase に関する臨床学的研究

I. 家畜の血清 Cholinesterase 活性値の測定法

森 園 充・梶 秀 人

(昭和51年 8月31日 受理)

Clinical Studies on Serum-Cholinesterase in Domestic Animals

I Measuring Method of Serum-Cholinesterase Activity in Domestic Animals

Mitsuru MORIZONO and Hideto KABA

(Laboratory of Veterinary Medicine)

緒 言

家畜の血清 Cholinesterase (S-ChE) に関する臨床的研究の基礎となる活性値の報告は少なく、また活性値の単位もさまざまである¹⁾。さらに、測定法についてはヒトの測定法をほとんど原法のままで使用しているのが実状であるといっても過言ではない。現在、ヒトの S-ChE 活性値の測定法には種々あるが原理的に ester 型の acetylcholine を基質とする酸産生法²⁾³⁾と thiol-ester 型の acetylthiocholine, butyrylthiocholine などを基質とする DTNB 法⁴⁾⁵⁾が多く用いられている。

前者は酵素作用により生成される酢酸量の増加に伴う pH の低下を pH 指示薬の退色度で比色定量する方法で、この場合 pH の低下と指示薬の変化の程度が必ずしも平行しなかったり、また反応液を至適 pH に維持しにくいなどの問題点を有し、本法を家畜に応用した場合正常活性値の低いウシ、ブタおよびネコにおいては測定困難なケースが多く、さらに、より活性値が低くなる病的な場合には測定不能となり、これら動物においては臨床的意義を解明するのが困難な現状にある。これに対して後者は酵素作用により遊離した thiocholine を 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) で黄色に発色させて比色定量する方法で、前者に比べ反応が迅速で、著しく鋭敏かつ安定した方法である⁶⁾。いずれにしても家畜の S-ChE は動物種間で著しく基質特異性が異なるため、基質・測定条件が一定なヒトの測定法を家畜全般に適用することは妥当ではないと考えられる。

そこで著者らは、各家畜に適した S-ChE 活性値の測定法を確立する目的で本研究を用い、前述の DTNB

法により先づ基質特異性の検討を行い、本結果をもとに家畜別の新測定法を得たので報告する。

材料および方法

1. 実験動物

実験に使用した動物は、ウマ、サル、イヌ、ネコ、ブタおよびウシの6種である。各動物とも3検体を使用した。

2. 血清希釈倍数の決定

家畜別血清希釈倍数は比色定量における各基質に対する透過率がいずれも70~15%の範囲内に存在する濃度をもって決定し、ウマ、サルおよびイヌで16倍、ネコで4倍、ブタで3倍にいずれも蒸留水をもって希釈し、ウシ血清は希釈せずに用いた。希釈血清使用量は、ウマ、サル、イヌ、ネコおよびブタでは0.04 ml、ウシで0.05 mlを使用した。

3. 試薬の調整と用法

(1) 緩衝液: pH 7.6, $\mu=0.1$ のリン酸緩衝液 (Dietz らの方法⁶⁾に準拠)を使用した。

(2) 基質および基質濃度: butyrylthiocholine iodide (BTC), acetylthiocholine iodide (ATC) および propionylthiocholine iodide (PTC) の3種の基質を使用し、その濃度を 1.5×10^{-4} , 3×10^{-4} , 5×10^{-4} , 7×10^{-4} , 1×10^{-3} , 1.5×10^{-3} , 3×10^{-3} , 5×10^{-3} および $7 \times 10^{-3} M/l$ の9段階に分けた。

(3) 活性停止発色液および検量線用試薬: 井内ら⁵⁾の方法に準拠した。

4. 測定手技および測定器械

測定手技は井内ら⁵⁾の方法に従ったが、incubation 時間を30分とし、温度については国際生化学会の勧告に従い30°Cで行った。測定器械はヤマト科学のウ

オーターバスキューベーター BT-21 および日立 101 型分光光度計である。

5. 至適基質と至適基質濃度の決定

家畜別に得られた 3 種の酵素活性曲線により最も高い分解率を示す基質をそれぞれの至適基質とし、それらの基質における反応曲線が plateau に移行する濃度を至適濃度とした。

6. 家畜別の新測定法

以上の方法により得られた家畜別の至適基質・基質濃度両びに血清希釈倍数を井内らの方法に導入して家畜別の新測定法を得た。その試薬の調製、用法並びに測定手技などについては次の実験成績の項に記述した。

実験成績と新測定法

1. 酵素活性曲線

a) ウマの酵素活性曲線は Fig. 1 に示すとおりである。すなわち、分解率の高い順に PTC>BTC>ATC となり、PTC が最適な基質で至適濃度は 5 mM ($5 \times 10^{-3} \text{ M/l}$) を示した。

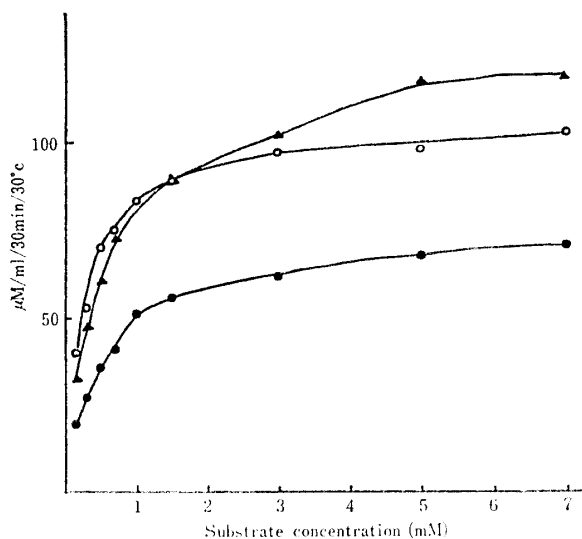


Fig. 1. Hydrolysis of BTC, ATC and PTC by horse serum cholinesterase.

○—○: butyrylthiocholine iodide (BTC)
●—●: acetylthiocholine iodide (ATC)
▲—▲: propionylthiocholine iodide (PTC)
Each point represents the mean of the activities of 3 sera.

b) サルの酵素活性曲線は Fig. 2 に示すとおりである。すなわち、BTC と PTC に対しては同程度の分解率を示し、ATC に対しては前二者に比較して低い分解率を示し、至適濃度はいずれも 5 mM ($5 \times 10^{-3} \text{ M/l}$) であった。

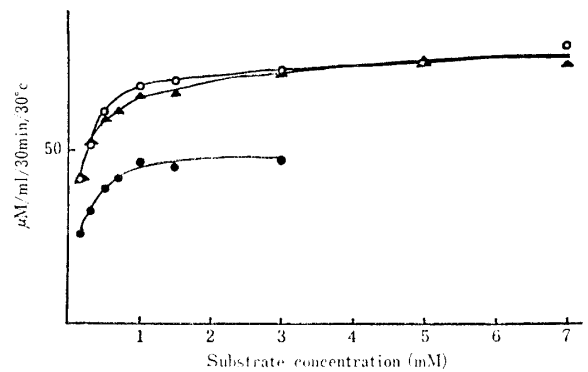


Fig. 2. Hydrolysis of BTC, ATC and PTC by monkey serum cholinesterase.

c) イヌの酵素活性曲線は Fig. 3 に示すとおりである。すなわち、PTC に対して最も高い分解率を示し、BTC と ATC に対しては同程度で PTC より低い分解率を示し、PTC が最適な基質で、至適濃度は 5 mM ($5 \times 10^{-3} \text{ M/l}$) であった。

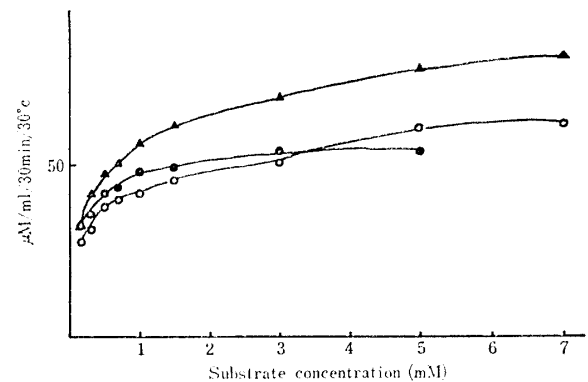


Fig. 3. Hydrolysis of BTC, ATC and PTC by dog serum cholinesterase.

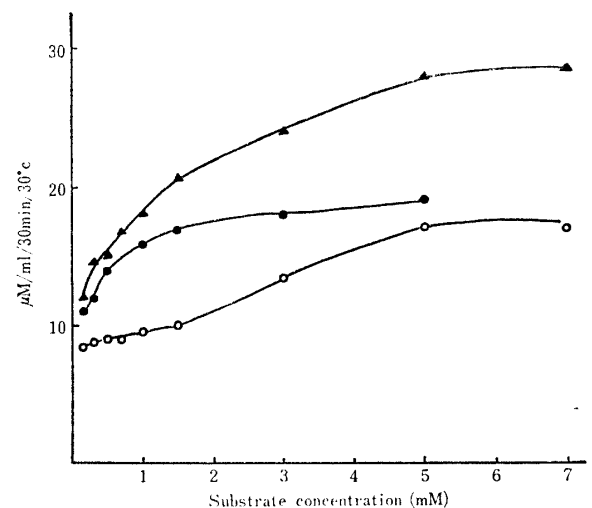


Fig. 4. Hydrolysis of BTC, ATC and PTC by cat serum cholinesterase.

d) ネコの酵素活性曲線は Fig. 4 に示すとおりである。すなわち、分解率の高い順に PTC>ATC>BTC となり、PTC が最適な基質で、至適濃度は 5 mM (5×10⁻³M/l) を示した。

e) ブタの酵素活性曲線は Fig. 5 に示すとおりである。すなわち、分解率の高い順に ATC>PTC>BTC となり、ATC が最適な基質で、その至適濃度は 3 mM (3×10⁻³M/l) を示した。

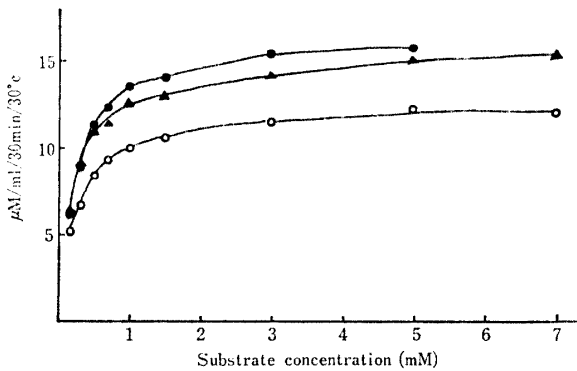


Fig. 5. Hydrolysis of BTC, ATC and PTC by pig serum cholinesterase.

f) ウシの酵素活性曲線は Fig. 6 に示すとおりである。すなわち、分解率の高い順に ATC>PTC>BTC となり、ブタと同様ウシでも ATC が最適な基質であったが、至適濃度はブタより低く、1 mM (1×10⁻³M/l) であった。

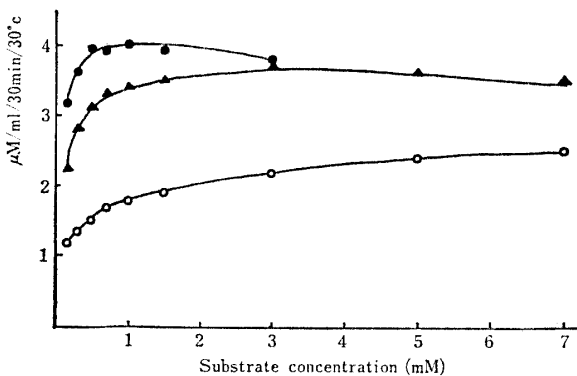


Fig. 6. Hydrolysis of BTC, ATC and PTC by cattle serum cholinesterase.

2. ミカエリス定数 (Km)

1.5×10⁻⁴, 3×10⁻⁴, 5×10⁻⁴ および 7×10⁻⁴ M/l の4点の基質濃度における酵素活性曲線を Lineweaver-Burk プロットに変換して求めた Km は Table 1 に示すとおりである。すなわち、家畜の S-ChE に対する3種の基質の Km は、5.0×10⁻⁵ M/l から 5.5×10⁻⁴ M/l の間にあり、Das ら⁹⁾, Ecobichon ら¹⁰⁾,

Table 1. Km values for serum cholinesterase of domestic animals in three kinds of substrates.

Species	Substrate	BTC	ATC	PTC
Horse		2.9×10 ⁻⁴	5.5×10 ⁻⁴	3.3×10 ⁻⁴
Monkey		1.1×10 ⁻⁴	2.3×10 ⁻⁴	1.1×10 ⁻⁴
Dog		1.3×10 ⁻⁴	1.8×10 ⁻⁴	1.3×10 ⁻⁴
Cat		—	1.6×10 ⁻⁴	8.8×10 ⁻⁵
Pig		3.1×10 ⁻⁴	2.7×10 ⁻⁴	2.1×10 ⁻⁴
Cattle		1.9×10 ⁻⁴	5.0×10 ⁻⁵	9.9×10 ⁻⁵

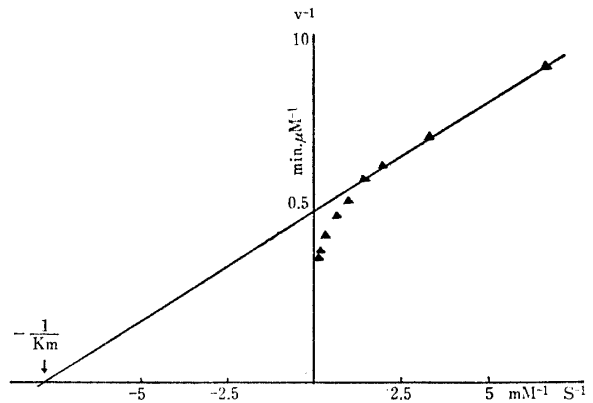


Fig. 7. Lineweaver-Burk plot of PTC for dog serum cholinesterase.

Voss¹¹⁾ および Chiu ら¹²⁾ の報告と近似の値であった。

3. 家畜別 S-ChE 活性値の新測定法

上述の実験結果から家畜別至適基質、基質濃度が明らかになったので、比色測定における吸光係数の誤差をさらに少なくするため、血清希釈倍数については、各家畜の正常活性値における透過率がいずれも 50~30%の範囲に存在するように設定した結果、ウマ 26 倍、サル・イヌ 21 倍、ネコ 6 倍、ブタ 3 倍に希釈しウシでは希釈せずに用いることが、より効果的であることがわかった (Table 2 参照)。そこで本実験によ

Table 2. The optimal substrate, preferred substrate concentration and serum dilution for the assay of serum cholinesterase activity in domestic animals.

Species	Substrate	Substrate concentration (M/l)	Serum dilution
Horse	PTC	5×10 ⁻³	26
Monkey	BTC, PTC	5×10 ⁻³	21
Dog	PTC	5×10 ⁻³	21
Cat	PTC	5×10 ⁻³	6
Pig	ATC	3×10 ⁻³	3
Cattle	ATC	1×10 ⁻³	undiluted

って得られた各家畜における至適基質，基質濃度および血清希釈倍数を井内らの方法に導入して次のとおり改良した。

[A] 試薬の調製と用法

(1) リン酸緩衝液

(*pH* 7.6, $\mu = 0.1$): KH_2PO_4 0.7757 g および $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 11.2462 g を水に溶かして 1000 ml とする。

(2) 基質緩衝液

a) ウマ, サル, イヌおよびネコ (5×10^{-3} M/l): propionylthiocholine iodide (PTC, *mw* = 303.216) 0.0758 g を (1) のリン酸緩衝液に溶かし 50 ml とする。

b) ブタ (3×10^{-3} M/l): acetylthiocholine iodide (ATC, *mw* = 289.18) 0.0434 g を (1) のリン酸緩衝液に溶かし 50 ml とする。

c) ウシ (1×10^{-3} M/l): ATC 0.0145 g (1) のリン酸緩衝液に溶かし 50 ml とする。

(3) 活性停止発色液:

a) 10^{-3} M/l DTNB 溶液: 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB, *mw* = 396.35) 0.396 g を正確にはかり, (1) のリン酸緩衝液に溶かし 100 ml とする。

b) 0.6% ラウリル硫酸ナトリウム溶液: sodium lauryl sulfate (*mw* = 288.88) 0.6 g を水に溶かし 100 ml とする。

c) 用法: 試薬 a) および試薬 b) を 1:1 の容積比に使用直前混合する。

(4) 基準液

a) 10^{-4} M/l DTNB 液: 上記の発色液を (1) のリン酸緩衝液で 10 倍に希釈して使用する。

b) 10^{-3} M/l グルタチオン液: Glutathione (還元型 GSH, *mw* = 307.32) 0.0077 g を (1) のリン酸緩衝液に溶かし 25 ml とする。

[B] 測定手技 (Table 3 参照)

(1) 希釈血清をつくる (Table 2 参照, 家畜により希釈量は異なる)。

Table 3. Procedure for assay.

	Blank	Test
Diluted serum	—	0.05ml
H ₂ O	0.05ml	—
Substrate	3 ml	3 ml
	15min at 30°C	
DTNB+Inhibitor	3 ml	3 ml
	Read the absorbance at 412nm	

(2) Test tube に希釈血清を 0.05 ml, Blank tube に蒸留水を 0.05 ml 加える。

(3) あらかじめ 30°C に加温しておいた基質溶液を各試験管に 3 ml ずつ加え混和し, 30°C, 15 分間インキュベートする。

(4) 時間がきたら活性停止発色液を各々に 3 ml ずつ加え, 黄色に発色させる。

(5) 波長 412 nm にて, 盲検液を対照に被検液の吸光度を測定する。

[C] 検量線の作成 (*K factor*¹³⁾ の算定)

10^{-4} M/l DTNB 溶液を試験管 A, B, C に 1.5, 1.0, 0.5 ml 採量し, 同量の 10^{-3} M/l GSH 溶液を添加し, 試薬 (1) のリン酸緩衝液を用いて最終容量 6.0 ml とする。

試薬 (1) のリン酸緩衝液を対照として A, B および C の吸光度 α , β および γ を読みとる。試験管 A, B および C にはそれぞれ 0.30 μ M, 0.20 μ M および 0.10 μ M の SH 基を含んでいる。

K factor (μ M/absorbance unit)

$$= \frac{0.30}{\alpha} + \frac{0.20}{\beta} + \frac{0.10}{\gamma}$$

[D] 活性値の表現

本法で得られた活性値は次式に従って国際単位 (IU, μ M/ml/min) で表示する。

$$\text{activity} = \frac{\text{absorbance change}}{15(\text{min of incubation})} \times \text{factor} \\ \times \frac{\text{serum dilution}^*}{0.05 (\text{ml of diluted serum})}$$

*ウマ 26, サル・イヌ = 21, ネコ = 6, ブタ = 3, ウシ = 1

[E] 本測定法の再現精度: ウマ血清 1 サンプルを 10 回測定した結果, 変動係数 (CV) 1.80% であった。

4. 原法と改良法における活性値の比較

各酵素活性曲線から得られる井内らの法 (BTC, 5×10^{-4} M/l) と著者らの方法との家畜別 S-ChE 活性値を百分率で示したものが Table 4 である。ウマで 1.7 倍, サルで 1.2 倍, イヌで 2.0 倍, ネコで 3 倍, ブタで 1.8 倍およびウシで 2.6 倍といずれも著者らの方法がすぐれた数値を示している。

考 察

血清希釈倍数の決定については, 分光学的に透過率 70~15% の範囲の濃度が最も測定誤差が少ない¹⁴⁾ と

Table 4. Comparative data between the modified and the Iuchi's methods obtained by the substrate activity curves of serum cholinesterase in domestic animals.

Species	Method	Iuchi's method (BTC, $5 \times 10 \text{ M/l}$)	Modified method
Horse		100 %	170 %
Monkey		100 %	120 %
Dog		100 %	200 %
Cat		100 %	300 %
Pig		100 %	180 %
Cattle		100 %	260 %

されていることから、基礎実験においてはこれに準じて血清の希釈倍数を決定した。さらに、家畜別の改良測定法においては、血清希釈による測定誤差をより少なくするために各家畜の正常活性値における透過率を50~30%の範囲に設定した結果、ウマ26倍、サルおよびイヌ21倍、ネコ6倍、ブタ3倍、ウシ1倍となり、血清希釈倍数が家畜により著しく異なることがわかり、家畜のS-ChE測定が初歩的段階において単一でないことがまず指摘された。

家畜における基質特異性について、Ecobichonら¹⁰⁾はpH 8.4、 10^{-3} M/l の基質濃度の条件下で、5種のester型の基質(choline ester: acetyl-, propionyl-, butyryl-, pentanoyl- and hexanoyl-choline, chloride or iodide salts)で比較検討し、ウマ、ネコ、イヌ、サルおよびブタではbutyrylcholineに、ウシではacetylcholineに至適性を有することを指摘し、Mersmannら¹⁵⁾はpH 7.4およびpH 8.4の条件下で、2種のthiolester型の基質(ATC, BTC)について検討し、ウマおよびイヌではBTCに至適性が見られ、ブタ、ウシおよびネコではATCに至適性を見出している。Ecobichonらと著者らの間には僅かにサルとウシが一致し、他はいずれも異った所見が得られているが、この相違を生じた原因については、① ester型の基質を使用しているのに対し、著者らはthiolester型を使用している。② 滴定法に対し、著者らはDTNB法による比色法である。③ 基質のpHが8.4であるのに対し、著者らのそれは7.4である。④ 基質濃度を 10^{-3} M/l および $2 \times 10^{-3} \text{ M/l}$ の2点に限定して検討を行っているのに対し、著者らは $1.5 \times 10^{-4} \text{ M/l}$ から $7 \times 10^{-3} \text{ M/l}$ に至る9点に段階的に濃度勾配を設けて検討しているなど実験上の諸相異点にあると考えられる。

次に、Mersmannらの実験においては、基質の中で著者らの用いているPTCを欠いている以外は、基

質のtype、測定原理は同一で実験の設定もほとんど類似しており、結果的に比較の対象となるATCとBTCにおいては著者らと全く同一所見を呈した。

ウマS-ChEのPTCに対する酵素活性曲線、イヌS-ChEのBTCとPTCに対する酵素活性曲線およびネコS-ChEのBTCとPTCに対する酵素活性曲線はいずれも 10^{-3} M/l 前後から濃度が高くなるにつれて反応速度が加速され、酵素反応の典型的なMichaelis-Mentenの式に従わなかった。すなわち、Lineweaver-Burkプロット(その1例をFig. 7に示す)は 10 M/l 以上の基質濃度においてhyperbolic-type curve(双曲線型曲線)を示しているが、この現象はChristianら¹⁶⁾のacetylcholineを基質としたヒトS-ChEにおいて、またVoss¹¹⁾のATCを基質としたヒトT-ChEにおいても観察されている。Chiuら¹²⁾はpolyacrylamideゲル電気泳動によって分離した4つのウマS-ChE isoenzymeのBTCに対するおのおののKmが最大5倍も異っていることを報告し、Walter, Dixon and WebbおよびReinerはKmを異にする二つの類似の酵素を含んだ反応混合物が一つの基質に作用する場合、Lineweaver-Burkプロットは直線関係よりはむしろ双曲線関係を示すだろうと述べていることから、本実験のLineweaver-Burkプロットにおける双曲線型曲線は、S-ChE isoenzyme間のKmの相異に基づくものと考えられる。

著者は本実験結果を総合して、ヒトの井内らの方法を中心に家畜別に適合した測定法に改良した結果、ウマで1.7倍、イヌで2.0倍、ネコで3倍、ブタで1.8倍、ウシで2.6倍という全家畜の鋭敏度の向上が得られた事は、本法が迅速簡単で、再現精度が高い事と併せて、獣医臨床領域の要請に充分寄与し得る測定法と考える。

要 約

BTC, ATC および PTC の3種の基質を使用し、家畜のS-ChEの基質特異性について検討した結果、新測定法(実験成績参照)と次の知見が得られた。

1) S-ChE測定用供試血清はウマ26倍、サルおよびイヌ21倍、ネコ6倍、ブタ3倍にそれぞれ蒸留水で希釈し、ウシは原血清を使用することが適当であり、家畜により血清の希釈倍率が著しく異なることが判った。

2) ウマ、イヌおよびネコではPTCが、サルではBTCおよびPTCが、ブタおよびウシではATCが

至適基質であった。また、基質濃度については、ウマ、サル、イヌおよびネコでは 5×10^{-3} M/l、ブタでは 3×10^{-3} M/l およびウシでは 1×10^{-3} M/l を選択した。

3) 各家畜の S-ChE に対する 3 種の基質 BTC, ATC および PTC の K_m は、おのおのウマで 2.9×10^{-4} M/l, 5.5×10^{-4} M/l, 3.3×10^{-4} M/l, サルで 1.1×10^{-4} M/l, 2.3×10^{-4} M/l, 1.1×10^{-4} M/l, イヌで 1.3×10^{-4} M/l, 1.8×10^{-4} M/l, 1.3×10^{-4} M/l, ネコで 1.6×10^{-4} M/l, 8.8×10^{-5} M/l, ブタで 3.1×10^{-4} M/l, 2.7×10^{-4} M/l, 2.1×10^{-4} M/l, ウシで 1.9×10^{-4} M/l, 5.0×10^{-5} M/l, 9.9×10^{-5} M/l であった。

4) 本測定法により得られる活性値は国際単位で表示され、原法に比べウマで 1.7 倍、サルで 1.2 倍、イヌで 2.0 倍、ネコで 3.0 倍、ブタで 1.8 倍およびウシで 2.6 倍も高く表現される。

5) 本測定法の変動係数 (C·V) は 1.80 % で再現精度高く、迅速簡単に操作できる。

文 献

- 1) Hnnter, A. R.: Determination of the serum cholinesterase. *Brit. J. Anaesth.*, **42**, 872-874 (1970)
- 2) 高橋 浩・柴田 進: 臨床検査に使用出来る簡単な血清ヒョリンエステラーゼ超微量定量法。医学と生物学, **20**, 96-98 (1951)
- 3) 佐々木匡秀: メタニトロフェノール指示薬を用いる血清コリンエステラーゼ超微量定量法。臨床病理, **12**, 555-558 (1964)
- 4) Garry, P. J. and Routh, J. I.: A micro method for serum cholinesterase. *Clin. Chem.*, **11**, 91-96 (1965)
- 5) 井内岩夫・鈴野成子: 岡山地区に於ける異常血清コリンエステラーゼの調査(予報)ならびにその新しい検出法について。川崎病院医誌, **2**, 97-108 (1969)
- 6) 丹羽正治: コリンエステラーゼ。臨床検査, **15**, 30-35 (1971)
- 7) Auggustinsson, K. B.: Electrophoresis studies on blood plasma esterase. I. Mammalian plasma. *Acta. Chem. Scand.*, **13**, 571-592 (1959)
- 8) Dietz, A. A., Rubinstein, H. M. and Lubrano, T.: Colorimetric determination of serum cholinesterase and its genetic variants by the propionylthiocholine-dithiobis nitrobenzoic acid procedure. *Clin. Chem.*, **19**, 1309-1313 (1973)
- 9) Das, P. K. and Liddell, J.: Value of butyrylthiocholine assay for identification of cholinesterase variants. *J. Med. Genet.*, **7**, 351-355 (1970)
- 10) Ecobichon, DD. J. and Comeau, A. M.: Pseudocholinesterase of mammalian plasma. Physicochemical properties and organophosphate inhibition in eleven species. **24**, 92-100 (1973)
- 11) Voss, G.: The fundamental kinetics of cholinesterase reaction with substrates and inhibitions in an automated, continuous flow system. *Residue Rev.*, **23**, 72-95 (1968)
- 12) Chiu, Y. C., Tripathi, R. K. and O'Brien, R. D.: Differences in reactivity of four butyrylcholinesterase isozymes towards substrate and inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 35-42 (1972)
- 13) Garry, P. J.: A manual and automated procedure for measuring serum cholinesterase activity and identifying enzyme variants. *Clin. Chem.*, **17**, 192-198 (1971)
- 14) 広田 穰: 実験技術に関連した諸問題。紫外・可視スペクトルの解釈。共立出版, 95-115(1967)
- 15) Mersmann, H. J. and Sanguinetti, M. C.: Automated determination of plasma and erythrocyte cholinesterase in various species. *Am. J. Vet. Res.*, **35**, 579-583 (1974)
- 16) Christian, S. T. and Beasley, J. G.: Michaelis constant for isolated cholinesterase systems. *J. Pharm. Sci.*, **57**, 1025-1027 (1968)

Summary

This paper deals with studies on the determination of optimal conditions pertaining to accurate measurement of serum-cholinesterase in various domestic animals, concerning with such factors as substrate specificity, optimal concentration of substrate, and serum dilution etc.

There are delicate differences among the respective species, it is supposedly not adequate to apply the method for human sample to the veterinary case.

Specificity of the three substrates BTC*¹, ATC*² and PTC*³; optimal concentration of substrate, and optimal dilution of test serum were pursued, using DTNB method, new method with precise condition being proposed thereby.

From the results of experiment, it is revealed that sensitivity of substrate is depending on

the animal species, namely PTC is most sensitive to horse, dog and cat serum; BTC and PTC are more reactive to monkey serum, and ATC is most effective to pig and cattle serum,

Concentration of substrate is another important problem to be solved in the test, and concentrations of 5×10^{-3} M/l in horse, monkey, dog and cat of 3×10^{-3} M/l in pig and of 1×10^{-3} M/l in cattle were ascertained to be the most favorable ones, respectively.

Concerning the dilution of sample serum, it is also important to determine the dilution fittest from the spectrometric view point, and proper enough to put the reading error to naught.

The optimal dilutions of sample serum were noted to be 26 times in horse serum 21 times in dog and monkey, 6 times in cat, 3 times in pig, respectively but no dilution in cattle was manifested.

Michaelis constants of these three substrates BTC, ATC and PTC for variable sera were 2.9×10^{-4} M/l, 5.5×10^{-4} M/l, 3.3×10^{-4} M/l in horse; 1.1×10^{-4} M/l, 2.3×10^{-4} M/l, 1.1×10^{-4} M/l in monkey; 1.3×10^{-4} , 1.8×10^{-4} M/l, 1.8×10^{-4} M/l, 1.3×10^{-4} M/l in dog, no testea, 1.6×10^{-4} M/l in 8.8×10^{-4} M/l cat; 3.1×10^{-4} M/l, 2.7×10^{-4} M/l, 2.1×10^{-4} M/l in pig and 1.9×10^{-4} M/l, 5.0×10^{-4} M/l, 9.9×10^{-4} M/l in cattle, respectively.

The activity value obtained by DTNB method under our proper condition is indicated with international unit (IU: M/ml/min) and it gives the titres as high as 1.7 times in horse, 1.2 times in monkey, 2.0 times in dog, 3.0 times in cat, 1.8 times in pig and 2.6 times in cattle, compared with the original method.

By virtue of small coefficient of variation (CV = 1.8%) obtained by ten times repetitions of horse serum, and supplied with high replicable accuracy, this new method is supposed to be compared favorably with the original one.

As well as its specificity and superior reactivity, it has the additional advantage of being easier and less time-consuming in its procedure.

*1 PTC: propionylthiocholine iodide.

*2 BTC: butyrylthiocholine iodide.

*3 ATC: acetylthiocholine iodide.