パンクレアチンの脂肪消化作用に及ぼす タール色素の影響について

(昭和 51 年 6 月 22 日受理)

足 立 透* 山 羽 力*

Effect of Coal Tar Dyes on Pancreatic Lipase

Tohru ADACHI and Tsutomu YAMAHA

(Department of Medical Chemistry, National Institute of Hygienic Sciences:
18-1, Kamiyoga 1-chome, Setagaya-ku, Tokyo)

The inhibitory effects of different coal tar dyes, most of which are used for food additives at present time, on pancreatic lipase were examined *in vitro* by the titration method using a pH stat.

Xanthene dyes except acid red showed the significant inhibition of lipase activity in order of eosine, erythrosine, phloxine and rose bengale. The inhibition was gradually enhanced during preincubation of dye with enzyme or substrate, almost independent of pH in preincubation. On the other hand, other dyes tested did not inhibit the enzyme activity at neutral pH, but most of them showed remarkable inhibition at pH 2.

The inhibitory effect of rose bengale was considerably enhanced by exposure of preincubation mixture under a fluorescent lamp, suggesting a photo-inactivation of the enzyme by halogen atom in the excited molecule of dye.

The inhibition was also influenced by the co-existence of other substances such as protein, sodium chloride and sucrose. From the kinetic study, the type of inhibition of pancreatic lipase by rose bengale was non-competitive.

(Received June 22, 1976)

摂取された食用色素が胃および腸管内での食物の消化、吸収に及ぼす影響の一つとして、消化酵素に対する阻害作用が考えられる。このような観点から、ペプシン^{1)~6)}、トリプシン^{5)~11)}、ロイシンアミノペプチダーゼ¹²⁾のようなタンパク質分解酵素の阻害についてはすでに幾つかの報告がなされている。著者ら¹³⁾は先にパンクレアチンのデンプン消化作用に対する各種タール色素の阻害作用について検討した。今回は、現在許可されている食用色素11種類と禁止されたもの2種類を合わせた13種類のタール色素について、パンクレアチンの脂肪消化作用に及ぼす影響を調べたので、その結果を報告する。

実験方法

1. 使用色素

実験に用いた13種の色素はエオシンとアジッドバイオレット 6B 以外は現在我国で許可されている食用色素で

ある (Table 1)。これらは用時 0.2M トリス緩衝液 (pH 7.0) または水に溶かして用いた。

2. 使用試薬

(1) トリスヒドロキシメチルアミノメタン—マレイン酸塩緩衝液 (トリス緩衝液)

0.2M (pH 7.0), 0.1M (pH 7.0), 0.05M (pH 7.0), 0.01M (pH 6.0, 7.0, 8.0)

(2) グリシン—塩酸緩衝液 (グリシン緩衝液)
0.01M (pH 2.0, 3.0)

(3) 酢酸—酢酸ナトリウム緩衝液 (酢酸塩緩衝液)
0.01M (pH 4.0, 5.0)

(4) バルビタル酸ナトリウム—塩酸緩衝液 (ペロナル緩衝液)
0.04M (pH 7.0)

上記の緩衝液は常法¹⁴⁾に従って調製した。

(5) パンクレアチン溶液 (酵素溶液)

パンクレアチン原末は帝国臓器(株)から提供されたも

* 国立衛生試験所：東京都世田谷区上用賀 1-18-1

のをを用いた。本品の脂肪消化力は局方品の約10倍の効力を示す。

パンクレアチンの原末を水で溶かして 5 ml 中に 1 mg を含むように調製し、暫時放置した後、その上澄み液を使用した。

(6) ポリビニルアルコール (PVA) 溶液

PVA ($n=1750\pm50$) 10 g に水 1,000 ml を加えて室温で約30分間かくはんした後、0.1N 塩酸溶液 5 ml を加えて 75~85° で約1時間加熱して溶かし、これに水 100 ml を加えて、更に1時間加熱し、冷後、0.1N 水酸化ナトリウム溶液を加えて pH を 7.0 とした。

(7) 基質乳液

上記調製した PVA 溶液にオリーブ油を30%の割合に加え、用時ホモジナイザー (日本精機(株)製) で5分間かくはんした均一な乳濁液を用いた。

(8) 0.05N アルコール性水酸化カリウム溶液

水酸化カリウム約 3.5 g に 80 ml の水を加えて溶かし、無アルデヒドエタノールを加えて 1,000 ml とした後、常法に従ってフタル酸水素カリウムで標定し、規定度を求めた。

(9) その他の試薬は市販の特級品を用いた。

3. 酵素活性の測定法

100 ml の共せん三角フラスコに 0.2M トリス緩衝液 10 ml、色素溶液 (1×10^{-3} M) 1 ml および2% 塩化カルシウム溶液 1 ml を入れ、37° で10分間温め、これに同様に予温した酵素溶液 5 ml を加えて振り混ぜ、37° で所定の時間放置する (preincubation)。ついで、37° で予温した基質乳液 10 ml を加え、直ちに1分間激しく振った後、37° の恒温槽で60分間振りまぜながら作用させ、アセトン・エーテル (1:1) 混液 30 ml を加えて反応を停止させる。さらにエタノール 20 ml を加えて激しく振り、よく混和する。ついで、反応液をスターラでかくはんしながら、pH スタット (東亜電波工業(株)製) を用いて、0.05N アルコール性水酸化カリウム溶液を自動的にビュレットから滴下し、反応液中の遊離した脂肪酸の生成量をあらかじめ設定した pH (8.50~9.50) まで移動するのに要する 0.05N アルコール性水酸化カリウム溶液の消費量 (ml) として求めた。

別に色素溶液の代わりに水 1 ml を用いて同様に操作したものを対照とし、この場合の 0.05N アルコール性水酸化カリウムの消費量を 100% とし、色素添加時の消費量と比較することによって酵素の相対活性を求めた。

なお、空試験には酵素溶液を反応停止後に加えたものについて同様に操作し、得られた値から差し引いた。

実験結果および考察

1. 酵素活性の測定法の検討

パンクレアチンの脂肪消化力測定法には、反応液中の遊離した脂肪酸の量をアルカリ溶液で滴定する方法¹⁰⁾、

Fig. 1. Effect of enzyme concentration on fatty acid liberation

検圧による方法¹⁷⁾および表面張力の変化を測定する方法¹⁸⁾などが考えられるが、色素による酵素活性の測定の妨害などを考慮して生成した脂肪酸の量を pH スタットを用いて、一定の pH まで自動的にアルカリ滴定する方法を採用した。

パンクレアチン中のリパーゼの至適 pH は 7 付近であり、一般にリン酸塩緩衝液がよく使われているが、本実験では酵素の分解作用を促進させるために塩化カルシウムを加えているのでリン酸カルシウムの沈殿を生じ、トリス緩衝液に比べて酵素活性のかんりの低下がみられたので、緩衝液はトリス緩衝液、pH 7.0 を用いることにした。またオリーブ油の乳化剤として Fiore ら¹⁹⁾のポリビニルアルコールを用いる方法により均一な基質乳液を調製した。

至適酵素濃度は、反応時間を60分間とし、反応液中の酵素濃度を 0.5~4 mg まで変え、色素溶液の代わりに水 1 ml を加えて測定法に従って操作し、Fig. 1 に示した結果から求めた。

その結果、酵素濃度 2 mg までは酵素濃度と 0.05N アルコール性水酸化カリウム溶液の消費量とは、ほぼ直線関係にあることが分かったので、0.05N アルコール性水酸化カリウム溶液の消費量、滴定誤差などを考えて以後の実験において酵素濃度は、反応液中に 1 mg を含むようにした。

次に至適反応時間は、酵素濃度を 1 mg とし、反応時間を 15~90 分まで変えて操作し、Fig. 2 の結果から求めた。

すなわち、60分までは 0.05N アルコール性水酸化カリウム溶液の消費量と反応時間とはほぼ直線関係を示し

Fig. 2. Time course of enzyme reaction

たので、色素による酵素への阻害作用を考慮して反応時間は60分間とした。

2. R-105 と酵素または R-105 と基質との preincubation 時間と酵素活性の関係

R-105 溶液 ($1 \times 10^{-3} M$) 1 ml に酵素溶液または基質乳液を加えて、 37° で所定の時間 preincubate した後の酵素活性を Fig. 3 に示した。

この結果、いずれの場合も R-105 の添加により、直ちに酵素活性が低下し、5分で約50%の阻害がみられ、その後も時間の経過につれて徐々に強くなるが、60分で75%程度の阻害となり、両者ともほぼ同じような阻害の態度を示した。

一方、対照として酵素または基質のみを同様に prein-

Fig. 3. Effect of preincubation of enzyme and R-105 on enzyme activity

—●—, enzyme alone; —○—, enzyme plus R-105; ---▲---, substrate plus R-105.

cubate した場合の酵素活性の低下は、60分まではほとんど認められなかった。

このように、R-105 と酵素の混液での酵素の不活性化が経時的に強まることは、ペプシン¹⁾、トリプシン^{8),10)} およびアミラーゼ¹³⁾の結果とよく似ている。これに反して、これらの報告とは異なり、基質と色素の preincubation でも同様な酵素の不活性化が認められた。

3. 各種タール色素による酵素作用の阻害

13種類の色素溶液 ($1 \times 10^{-3} M$) 1 ml に酵素溶液を加えて、 37° で60分間 preincubate した後の阻害度を Table 1 に示す。

これらの結果から、R-106を除いたキサンテン系色素の酵素阻害は R-103, R-3, R-104 および R-105 の順序で強くなり、中でも R-105 が71%とかなり強い阻害作用を有することが分かった。しかし、キサンテン系以外の色素では使用禁止の V-1 (19%)を除いては酵素活性への影響はほとんどみられなかった。

4. キサンテン系色素の添加量と酵素活性の関係

各種濃度のキサンテン系色素溶液 (0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 2.00 mM) 1 ml に酵素溶液を加えて、 37° で60分間 preincubate した後の酵素活性を測定した結果を Fig. 4 に示す。

この結果から、R-106を除いては、いずれの色素も 0.25 mM の添加で9~32%の酵素阻害を示し、添加量が増えるにつれて阻害も強くなり、色素 1 mM の添加で、R-103 (21%), R-3 (33%), R-104 (61%) および R-105 (76%) の順序 (Table 1 と同様) で酵素阻害が強くなっている。しかし、R-106 は 2 mM の添加でもほとんど阻害がみられなかった。また別の実験でキサンテン系色素の骨格であるフルオレセインを 2 mM 添加

Table 1. Inhibition of Pancreatic Lipase by Different Tar Dyes

Coal tar dyes	Inhibition (%)
Amaranth (R-2)	0
New Cocchine (R-102)	3
Tartrazine (Y-4)	0
Sunset Yellow FCF (Y-5)	2
Brilliant Blue FCF (B-1)	1
Acid Violet 6B (V-1)*	19
Fast Green FCF (G-3)	4
Indigo Carmine (B-2)	0
Acid Red (R-106)	0
Eosine (R-103)*	32
Erythrosine (R-3)	35
Phloxine (R-104)	47
Rose Bengale (R-105)	71
Control	0

* Not permitted in Japan

Fig. 4. Effect of concentration of some xanthene dyes on enzyme activity
—○—, R-106; —●—, R-3; —△—, R-103; —○—, R-104; —×—, R-105.

した際にも全く酵素阻害が認められなかった。

パンクレアチンの脂肪消化作用に及ぼす酵素阻害も膵アミラーゼ¹³⁾, トリプシン⁹⁾ でみられた結果と同じようにハロゲン原子を含まない R-106 およびフルオレセインが酵素阻害を示さなかったため、この酵素阻害作用も色素分子中のハロゲン原子によって影響されることが分かった。

5. キサンテン系色素の preincubation 時の pH と酵素活性の関係

各 0.01M のグリシン緩衝液 (pH 2.0, 3.0), 酢酸塩緩衝液 (pH 4.0, 5.0) およびトリス緩衝液 (pH 6.0,

Fig. 5. Effect of pH of preincubation mixture on enzyme activity (xanthene dyes)
—○—, R-106; —●—, R-3; —△—, R-103; —○—, R-104; —×—, R-105.

7.0, 8.0) それぞれ 5 ml に、水で溶かした色素溶液 ($1 \times 10^{-3}M$) 1 ml を加え、これに酵素溶液を加えて 37° で 5 分間 preincubate した後、0.2M トリス緩衝液 (pH 7.0) を 5 ml 加え、それぞれに基質乳液を加えて反応させた結果を Fig. 5 に示す。

なお、対照はそれぞれの pH において色素溶液の代わりに水 1 ml を加えて同様に操作したものを用いた。また preincubation の際の pH は用いた緩衝液の pH にほぼ等しいこと、および反応液の pH が 0.2M トリス緩衝液を加えた場合に 7.0 に回復することをあらかじめ確かめた。

Fig. 5 に示したように、キサンテン系色素による酵素阻害は、R-106 を除いては、弱酸性 (pH 4) から弱アルカリ性 (pH 8) までの広範囲にわたり、それぞれに特異的な酵素阻害度の変化が認められた。しかし、pH 2~3 では、R-106 を除いては、すべての色素が析出するため実験できなかった。R-106 の場合は、pH 2.4 で対照の酵素活性も著しく低下したが、約 68% とかなり強い酵素阻害を示した。

6. キサンテン系以外の色素の preincubation 時の pH と酵素活性の関係

中性において、V-1 を除いては、ほとんど酵素阻害がみられなかったキサンテン系以外の色素について、グリシン緩衝液 (pH 2) 5 ml に、水で溶かした色素溶液 ($1 \times 10^{-3}M$) 1 ml および酵素溶液を加えて、 37° で 5 分間 preincubate した後、前述 5 と同様に操作して酵素活性を測定した結果を Table 2 に示す。

この結果、pH 2 では、対照の酵素活性もかなりの低下がみられたが、V-1, G-3 を除いたすべての色素が何らかの阻害を示し、中でも R-102, R-2 が著しく強い阻害を示している。しかしながら、著者らの行った別の実験で、pH 3 では対照の酵素活性に比べてこれらの色素は全く酵素阻害を示さず、色素の共存によって逆に、酵素活性が高められるような現象が認められた。

Table 2. Effect of pH of Preincubation Mixture on Enzyme Activity (Other Dyes Except Xanthene Dyes)

Coal tar dyes	pH 2 Inhibition (%)
R-2	62
R-102	100
Y-4	91
Y-5	82
B-1	32
V-1*	0
G-3	0
B-2	100
Control	0

* Not permitted in Japan

このようにキサントゲン系 (R-106 を除く) 以外の色素による酵素阻害は、脛アミラーゼ¹⁸⁾ の場合とは異なり、かなり強い酸性 (pH 2) 領域において現れることが分かった。

7. R-105 の酵素阻害作用に及ぼす他物質の影響

日常摂取している食品に含まれている数種の物質を選び、R-105 と共存した時の酵素活性への影響を調べるため、それぞれの化合物を水に溶かし、さらに 0.1M トリス緩衝液 (pH 7.0) を等量加えて試料濃度が所定の濃度になるように調整して試料溶液とし、この試料溶液 5ml に R-105 溶液 ($1 \times 10^{-3}M$) および酵素溶液を加えて 37° で 60 分間 preincubate した場合の阻害度を Table 3 に示す。

なお、対照はそれぞれの試料溶液 5ml に R-105 溶液の代わりに水を加えたもの、また R-105 のみの場合は、試料溶液の代わりに 0.05M トリス緩衝液 5ml を加えたものを同様に操作した。

Table 3 から明かなように、アルブミンの添加で、R-105 による酵素阻害がほとんど認められなくなるのは、色素がアルブミンに吸着結合され、酵素に対する阻害作用をなくしたためと思われる。また、塩化ナトリウムの共存は、R-105 のみに比べて、酵素阻害を幾分緩和し、一方、ショ糖の添加は阻害をわずかに促進させるような作用を示し、脛アミラーゼに対する効果とは全く反対の作用を現わすことが分かった。しかし、デンプン、CMC の共存では、R-105 のみの場合と阻害度はほとんど変わらなかった。

なお、用いたそれぞれの化合物は単独では酵素活性にはほとんど影響を与えなかったが、CMC の場合は、約 72% と著しい酵素活性の低下がみられた。

8. ヨウ素と酵素との preincubation 時間と酵素活性の関係

R-105 の構成成分であるハロゲン原子による酵素活性

Table 3. Effect of Some Substances on Enzyme Inhibition by R-105

Added substances	Concentration in preincubation mixture (%)	Inhibition (%)
NaCl	5.0	48
NaCl	2.5	58
Sucrose	10.0	74
Sucrose	5.0	59
Soluble starch	2.0	67
Soluble starch	1.0	59
Serum albumin	1.0	7
CMC	1.0	61
R-105 alone*	—	67
Control	—	0

* $1 \times 10^{-3}M/ml$

Fig. 6. Effect of preincubation of enzyme and R-105 or I_2 on enzyme activity

—○—, R-105 ($5 \times 10^{-4}M$); —●—, I_2 ($1 \times 10^{-3}M$).

への影響を調べるため、R-105 の 1 分子中には 4 原子のヨウ素を含んでいるので、R-105 の $5 \times 10^{-4}M$ 色素濃度に含まれているヨウ素原子に対応する $1 \times 10^{-3}M$ のヨウ素溶液 1ml と酵素溶液、また比較のために R-105 溶液 ($5 \times 10^{-4}M$) 1ml と酵素溶液との混液を 37° で経時的に preincubate した結果を Fig. 6 に示す。

なお、この場合トリス緩衝液がヨウ素を若干消費することが分かったので、トリス緩衝液の代わりに 0.04M ペロナル緩衝液 (pH 7.0) を用いた。

この結果から明かなように、ヨウ素による酵素阻害は、添加直後、瞬間的に約 98% と著しく強い阻害がみられ、以後、経時的な変化は全く認められなかった。これに反して、R-105 の阻害は 1 分間放置で約 50% の酵素活性の低下がみられ、その後も経時的に徐々に低下し 60 分で 80% 程度であった。

これらのことから、分子状のヨウ素は R-105 と比べて阻害の態度は異なるがかなり強い酵素阻害作用を有することが認められた。

9. R-105 またはヨウ素の酵素阻害作用に及ぼす光の影響

キサントゲン系色素は光増感作用を有することから、今まで検討してきた中で最も強い酵素阻害を示した R-105 を用いて、光照射下での酵素作用への影響を調べた。

R-105 溶液 ($5 \times 10^{-4}M$) と酵素溶液、またヨウ素溶液 ($1 \times 10^{-3}M$ または $1.25 \times 10^{-4}M$) と酵素溶液との混液を光照射装置 (東芝白色けい光ランプ 10W 3 本付、照射距離上方から約 20 cm) 内に入れ、恒温器内で光を当てながら 37° で経時的に preincubate した後の酵素活性を Fig. 7 に示した。

一方、比較のため遮光下の実験はすべて暗所 (暗箱内) で行い、色素溶液も暗所に保持したものをを用い、光照射の操作を除いてはすべて同様に操作して、酵素活性を求め、その結果も併わせて示してある。

Fig. 7. Effect of light on enzyme inhibition by R-105 or I_2

—●—, in the dark; —○—, exposure to light ($R-105\ 5 \times 10^{-4} M$); ---■---, in the dark; ---□---, exposure to light ($I_2\ 1.25 \times 10^{-4} M$); —△—, in the dark or exposure to light ($I_2\ 1 \times 10^{-8} M$).

Fig. 7 に示したように、R-105 と酵素との混液に光照射すると、混和 1 分間放置で約 50% の阻害がみられ、その後も照射時間の経過と共にかなり強くなり、60 分照射で約 96% の酵素阻害がみられている。また、暗所でも光照射の場合とはほぼ同程度の阻害が 1 分放置後にみられたが、その後の酵素活性の低下は緩やかで 60 分で 70% 程度であった。

一方、 $1 \times 10^{-3} M$ のヨウ素添加では、ヨウ素濃度が高いためか、1 分間放置で約 93% と瞬時強い阻害を示し、以後、経時的な変化はほとんど認められず、また光の影響も確かめられなかった。そこで更に水で薄め、 $1.25 \times 10^{-4} M$ のヨウ素溶液を用いて阻害の様子を調べたところ、やはり阻害は瞬間的にみられ、1 分間放置でそれぞれ、ほぼ 65% (暗所下)、80% (光照射下) となり、その後、経時的な変化はほとんどみられず、阻害の平衡状態の達成が極めて短時間で起こることを確かめた。

また、ヨウ素も光照射することによって若干阻害が増加されることが分かる。

これらのことから、R-105 の酵素阻害が光照射時間の経過につれて増大するのは、村上ら¹¹⁾がすでに指摘したように光照射によって色素から遊離された励起ハロゲン原子が持続的に供給されるためと思われる。しかし、膵アミラーゼ¹⁸⁾の場合と同様、添加する色素濃度によって基底状態での色素もかなり弱い、経時的な阻害を示す

Fig. 8. Lineweaver-Burk's plot of enzyme in the presence of R-105

—●—, R-105; —○—, control.

ことから、酵素阻害の機構は相当複雑なものと思われる。

また、ヨウ素による酵素阻害が、村上ら¹¹⁾のトリプシンに対する光照射下での報告とは異なり、阻害が瞬間的にみられ、経時的な変化が認められないのは、おそらく、ヨウ素に対する酵素の感受性、添加ヨウ素濃度、光照射条件などの相違によるためであろう。

10. R-105 による酵素の阻害型式

R-105 による阻害度が基質濃度を変化させることによってどのように影響されるかを調べるため、R-105 溶液 ($1 \times 10^{-3} M$) に酵素溶液を加えて、 37° で 10 分間 preincubate し、ついで、種々の濃度の基質溶液を加え、さらに 37° で 60 分間作用させた後の酵素活性を Lineweaver-Burk 法に従って、横軸には基質濃度 (%) の逆数 ($1/S$) を、縦軸にはそれぞれに対応する $0.05 N$ アルコール性水酸化カリウム溶液の消費量 (ml) の逆数 ($1/V$) を図示したものが Fig. 8 である。

Fig. 8 に示したように R-105 は基質に対して不拮抗的に作用することが認められた。

結 論

パンクレアチンとタール色素を *in vitro* で作用させて、色素共存下におけるパンクレアチンの脂肪消化作用の測定法を確立し、これらの色素による酵素活性に及ぼす影響を検討した。

1) キサンテン系色素 (R-106 を除く) は、酵素との

preincubation 時の pH にほとんど影響されることなく、パンクレアチンの脂肪消化作用を阻害し、エオン、エリスロシン、フロキシシンおよびローズベンガルの順序で阻害が強くなることを認めた。

2) キサンテン系以外の色素および R-106 は、中性の領域では、V-1を除いてほとんどパンクレアチンの脂肪消化作用の阻害はみられなかったが、強酸性(pH 2 付近)の領域では、多くのものが阻害を示した。

3) R-105 によるパンクレアチンの脂肪消化作用の阻害は、アルブミンとの共存によって著しく抑制された。また、塩化ナトリウムがこの阻害を若干弱める作用を有することが分かった。

4) R-105 によるパンクレアチンの脂肪消化作用の阻害は、preincubation 時に光照射を行うと照射時間の経過とともに暗所に比べて著しく増加されることが認められた。一方、ヨウ素による酵素阻害は瞬間的にみられ、以後、経時的な変化は認められなかったが、光照射下では若干阻害が増加した。

5) 酵素阻害作用が構造中にハロゲン原子を持たない R-106 やフルオレセインではみられず、また、分子状のヨウ素がかなり強い阻害を示すことからこのキサンテン系色素の酵素阻害作用の発現には、色素分子中のハロゲン原子が関与していることが推定される。

6) R-105 による酵素阻害は不拮抗型の阻害であった。

終りにパンクレアチン原末を提供いただいた帝国臓器(株)に感謝するとともに、本研究に御協力いただいた斉藤 孝氏に感謝致します。

本報の概要は第26回日本食品衛生学会(昭和48年11月、名古屋)において発表した。

なお本研究の一部は昭和48年度国立衛生試験所特別研究費によった。

文 献

- 1) 古武弥三, 水田泰子, 榎本 隆: 食衛誌. **7**, 230 (1966).
- 2) 園田美喜子, 菊野恵一郎: 和洋女子大学紀要, **16**, 1 (1972).
- 3) 後藤たへ, 遠藤 一, 木須靖子, 加藤節子: 栄養と食糧, **25**, 480 (1972).
- 4) 吉田 勉: 同上, **26**, 487 (1973).
- 5) 吉田 勉, 大森孝子: 臨床栄養, **43**, 67 (1973).
- 6) 榎本則行, 井上芳昌, 内田 泰: 佐賀大学農学彙報, **29**, 9 (1970).
- 7) 榎本則行, 園田博正: 同上, **27**, 55 (1969).
- 8) 伊藤利之, 池沢宏郎, 石坂音治: 衛生化学, **15**, 253 (1969).
- 9) 伊藤利之, 池沢宏郎, 手島節三: 同上, **16**, 134 (1970).
- 10) 村上浩紀, 坂田幸平, 波多野昌二, 渡辺忠雄: 食衛誌. **13**, 12 (1972).
- 11) 村上浩紀, 坂田幸平, 波多野昌二, 渡辺忠雄: 同上, **13**, 19 (1972).
- 12) 田中慶一, 岡原国男: 同上, **14**, 234 (1973).
- 13) 足立 透, 山羽 力: 同上, **15**, 85 (1974).
- 14) Colowick, S. P., Kaplan, N. O. (Editor): "Methods in Enzymology", **1**, 139 (1955), Academic Press, New York.
- 15) Fiore, J. V., Nord, F. F.: Arch. Biochem., **23**, 473 (1949).
- 16) Willstätter, R., Waldschmidt-Leitz, E., Memmen, F.: Z. physiol. Chem., **125**, 93 (1923).
- 17) Wills, E. D.: Biochem. J., **57**, 109 (1954).
- 18) Sobotka, H., Glick, D.: J. Biol. Chem., **105**, 199 (1934).