色素結合でんぷん（イエロースターチ）を用いたアミラーゼ活性測定法の膵酵素放出実験への適用

北海道教育大学紀要（第2部C）第45巻　第1号
Journal of Hakkaido University of Education (Section II C) Vol. 45, No. 1

平成6年10月
October, 1994

色素結合でんぷん（イエロースターチ）を用いたアミラーゼ活性測定法の膵酵素放出実験への適用

浅田尚登・佐藤由紀・白濱　泉
北海道教育大学旭川校基礎医科学教室

Application of amylase assay method using Procion Yellow Starch for estimation of enzyme release from pancreatic acini

Naoto ASADA, Yuki SATOH and Izumi SHIRAHAMA
Medical Sciences Laboratory, Asahikawa Campus, Hokkaido University of Education,
Asahikawa 070

Abstract

Reactive Yellow dye (Procion Yellow MX86) conjugated starch (Procion Yellow Starch) was synthesized, and conditions and procedures were studied for the application of the amylase assay that uses this chromogenic substrate on enzyme release from the pancreatic acini. The assay that uses Procion Yellow Starch as a substrate was not disturbed by the addition of reducing sugar or protein (BSA) to the reactive mixture. Because nonenzymatic liberation of the chromogen caused by the HCl that was added as the stop solution was observed, HCl concentration and processes after cessation of the reaction were judged to be in need of reexamination. Assay procedures and properties when using this chromogenic substrate were compared with those of Bernfeld's method which measures the amount of reducing sugar. The former as well as the latter method was judged to be applicable to experiments on the amylase release from pancreatic acini and to have the advantage of being able to treat large numbers of samples.

Perifusion of the rat pancreatic acini preparation with a glucose-deficient solution was judged to have little effect on amylase release in response to continuous stimulation with 10 pM CCK-8 when estimated using the Procion Yellow Starch substrate.

はじめに

アミラーゼはでんぷん分解酵素の主要なものの一つで，広く生物界に存在する．その中で，哺乳動物の消化液としては唾液と膵液中に α-アミラーゼが存在し，それぞれ口腔内，十二指腸・空腸内での摂取でんぷんの消化に重要な働きをはたしている．唾液腺では，主に耳下腺腺房細胞から唾液アミラーゼ（プチアリン）が分泌され，膵臓では膵臓腺房細胞から他の多くの酵素原に混じって膵液アミラーゼ（アミノプシン）が分泌される．上に挙げた消化腺では，腺房構造を形作っている腺房細胞が消化酵素を合成・貯蔵し，分泌刺激に応じてそれを放出する．これらの細胞からの酵素放出の研究には，しばしばアミラーゼがその指標として利用される．それは，アミラーゼがプロテアーゼなどと異なり，活性のある状態で細胞外へ放出されること，さらに，基質が扱いやすく，活性の測定が容易である，などの理由によると思われる．

α-アミラーゼはでんぷん分子中の直鎖構造部分（アミロース）を無作為に加水分解し，その結果，ぶどう糖，麦芽糖，マルトリオース，および限界デキストリンを産生する．アミラーゼの活性測定法には，1）基質であるでんぷんの低分子化速度を，ヨードによる呈色，または粘度変化で測る，2）ぶどう糖，麦芽糖の産生速度を，還元力変化，または結合色素の遊離で測る，などの方法がある（詳しくは成書[1-3]を参照されたし）．本研究では，反応性染料（reactive dye）を使って色素結合基質を研究室で調製することのできる，Procion Yelloew Starch を使ったアミラーゼ活性測定法[4]を膵腺房からの酵素放出実験に適用することを目的に，色素結合でんぷんを調製し，それを利用した活性測定操作について検討した．さらに実際に，表面灌流した膵腺房からのアミラーゼ放出経過を色素結合でんぷんを使った測定法により調べ，ぶどう糖除去灌流の効果を再検討した．

実験方法

試薬および動物

Reactive Yellow 86 (Practical grade)，ブタ膵臓 α-アミラーゼ（Type VI-B），ウシ血清アルブミン（Fraction V），トリプシンインヒビター（Type II-O, Chicken egg white），HEPES（N-2-Hydroxyethlpiperazine-N－2-ethanesulfonic acid）は Sigma Chemical (St. Louis, M. O., USA) のものを，可溶性でんぷん（Zulkowsky）は MERCK (Darmstadt, Germany) のものを，Eagle's 必須アミノ酸混合液（50 倍濃縮）は GIBCO Laboratories (Grand Island, N. Y., USA) のものを，Cholecystokinin octapeptide（CCK-8）はペプチド研究所（箕面）のものを，コラゲナーゼ（細胞分散用）は和光純薬工業（大阪）のものを，コーンスターチは食料品店で購入したものを，それぞれ用いた．その他の試薬については，特級のものを用いた．

膵臓腺房を得るため，雄の Sprague-Dawley 系ラット（体重 150～290 g）を使用した．動物は，実験に使用する前 24 時間絶食させ，その間水だけは自由に与えた．

イエロースターチの調製

Reactive Yellow を結合させたでんぷん（イエロースターチ）の調製については，Jung の報告[4]に準じて行った．100 g のコーンスターチを 900 ml の水に懸濁して 55℃まで加温したものに，前もって 55℃に加温した 4 %Reactive Yellow 溶液 50 ml を加えた後，45 分間攪拌を続けた．でんぷん懸濁液の温度を 65℃に上昇させ 15 分間保った後，0.5 M Na_2CO_3 溶液 20 ml を徐々に加え，そのまま 65℃で，30 分間攪拌を続けた．でんぷん懸濁液を一晩置き，冷却，沈殿を待って，上清を吸引除去した後，沈殿に 500 ml の水を加え再懸濁し，1000 rpm で 5 分間遠心分離した．得られた沈殿に再び水を加え遠心分離することを，上清が透明になるまで繰り返した．さらに，沈殿を約 400 ml のエタノールで再懸濁し，遠心分離することを 2 回繰り返した後，エタノールに再懸濁した沈殿をブフナー漏斗で吸引濾過した．ここで得た沈殿を，一晩放置してエタノールの蒸発を待ち，ついでデシケータ内で 24 時間以上乾燥させた．この操作により，90%以上の収率でイエロースターチが得られた．

アミラーゼ活性測定操作

イエロースターチを用いたアミラーゼ活性測定操作については，本文中で検討したが，その基となった，Jung の報告した方法[4]の修正法[6]を以下に示す．

50 mM りん酸緩衝液（19.5 mM NaH_2PO_4, 31.5 mM Na_2HPO_4, 50 mM NaCl, pH 6.9）に懸濁した 3 %イエロースターチ溶液 0.8 ml を，37℃の恒温槽中で 5 分間加温したものに，アミラーゼを含む試料液（10～25 μl）を 30 秒間隔で加え，恒温槽中で振盪を続ける．盲検または標準としては，それぞれ同量の 50 mM りん酸緩衝液，または活性量の分かっている α-アミラーゼ標品を含む液を加える．正確に 30 分後に，それぞれの反応混液に 0.1 N HCl 1.6 ml を加え反応を停止させ，反応混液を 2800 rpm で 5 分間遠心分離する．上清の吸光度を 420 nm で測定することで遊離した色素量を求める．

Bernfeld の方法[5]の修正法によるアミラーゼ活性測定操作については Kanno の報告[7]に準じて行った．50 mM りん

酸緩衝液に溶解した1.5%可溶性でんぷん (Zulkowsky) 溶液1 mlを，37℃の恒温槽中で5分間加温したものに，アミラーゼを含む試料液100 μlを30秒間隔で加え，恒温槽中で振盪を続けた．盲検または標準としては，それぞれ同量の50 mMりん酸緩衝液または，10 mg/mlの麦芽糖溶液を加えた．正確に5分後に，それぞれの反応混液にDNSA試薬(1%3,5-ジニトロサリチル酸と30%ロッシェル塩を含む0.4 N NaOH溶液) 1 mlを加え反応を停止させ，反応混液を沸騰水中で5分間加熱した後，流水で冷却した．この液0.2 mlを4 mlの水に希釈し，520 nmにおける吸光度を測定して，37℃，5分間あたりの還元糖（麦芽糖相当）の産生量を算出した．

ラット膵臓腺房の分離と表面灌流

ラット膵臓からの腺房の分離については，Hootmanらの方法[8]に基づいた修正法[9]に従って，コラゲナーゼの単独処理により行った．頸椎を脱臼し放血したラットから得た膵臓尾部に，HEPES緩衝－Ringer液（HR液）で75 U/mlに調製したコラゲナーゼ溶液4 mlを注入し，O_2ガスを吹き込んだ容器内にいれ，37℃の恒温槽中で激しく振盪して30分間消化を進めた．コラゲナーゼ溶液を新たなもの4 mlと交換し，さらに30分間消化を進めた膵臓をピペッティングによりほぐした後，150 μm孔径のナイロンメッシュを通して膵腺房を得た．

腺房を154 mM NaCl溶液で再懸濁，遠心分離を繰り返して洗浄後，適当量の154 mM NaCl溶液中で超音波破砕し，これをラット膵腺房アミラーゼ試料として用いた．

腺房の表面灌流については，Imamuraらの方法[10]の一部修正法[11]に基づいて行った．HR液に懸濁した腺房1 mlをホルダーに取り付けたニトロセルロースメンブランフィルター (FM-500, 5.0 μm孔，25 mm径，富士フイルム) に通した後，ローラーポンプを使って一定速度（1 ml/min）でHR液（トリプシンインヒビターを除いた）を流した．60分間の前灌流の後，2分間毎に流出液を採集し，その中に含まれるアミラーゼ活性を測定した．別に定量した1 mlの腺房懸濁液中のアミラーゼ活性を基に，酵素活性放出速度（% of initial content/min）を算出した．

HR液の組成は以下の通りである：118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1 mM Na_2HPO_4, 1.13 mM $MgCl_2$, 1.3 mM $CaCl_2$, 5.5 mM D-glucose, 10 mM HEPES (pH 7.4)．さらに使用前に，Eagle's必須アミノ酸混合液と0.1 M L-グルタミン酸をそれぞれ1/50容，ウシ血清アルブミンとトリプシンインヒビターをそれぞれ0.2%と0.01%濃度加え，O_2ガスで酸素化した．

実験結果および考察

1．イエロースターチを使ったアミラーゼ活性の測定

反応時間と色素遊離量との関係

37℃に加温した3%イエロースターチ溶液（以下，基質液）1 mlに，ブタ膵臓α-アミラーゼを含む液50 μl（活性量0.03 U）を加えて，適当な時間後，2 mlの0.1 N HClを加えて反応を停止させ，酵素反応時間と上清への色素遊離量との関係を調べた(Fig. 1)．反応時間40分までは，上清の吸光度は反応時間延長とともに直線的に上昇しており，この範囲内では，色素遊離量が反応時間に比例していることが確かめられた．

酵素用量と色素遊離量との関係

基質液に加える酵素用量を0から0.1 Uの範囲で変化させ，上清への色素遊離量の変化を調べたところ，酵素用量と上清の吸光度との間にはほぼ直線関係 ($r^2=0.998$) が得られた (Fig. 2)．この直線の傾きは約15.9と計算された．でんぷんから遊離した還元糖を定量するBernfeld法では，0から0.2 Uの範囲で酵素用量と吸光度との間に直線関係が得られ，その傾きは2.63であった．これらの結果から，Bernfeld法に比べイエロースターチ法は5倍以上高感度であると判断された．しかし，高活性のアミラーゼを含む試料をイエロースターチ法で測定するには，適当な希釈が必要である．

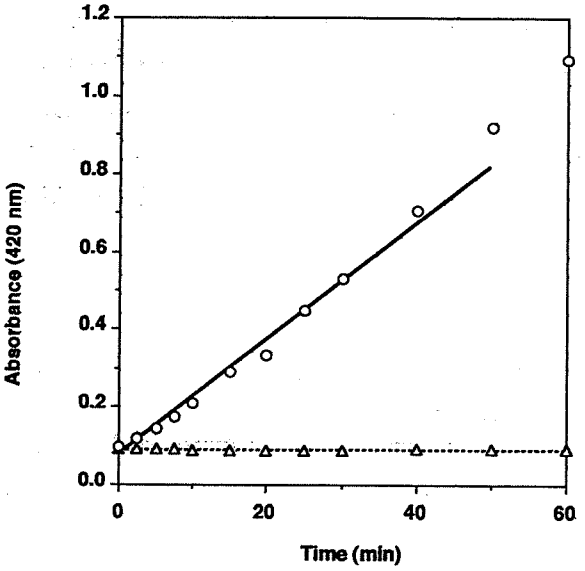

Fig. 1 Progress of enzymatic chromogen liberation from Procion Yellow Starch substrate. 1 ml of 3 % Yellow Starch was incubated with 50 μl of α-amylase (0.03 U, ○) or 50 mM phosphate buffer (△) for various period of time (0−60 min). The reaction was stopped by addition of 0.1 N HCl (2 ml). After the centrifugation, absorbance of supernatants was measured at 420 nm.

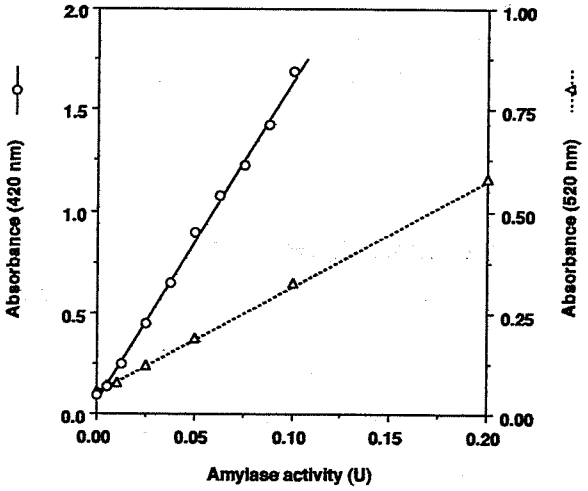

Fig. 2 Relation between enzyme activity and chromogen liberation. 1 ml of 3 % starch was incubated with various dose (0− 0.1 U) of α-amylase (50 μl) for 30 min in the method using Yellow Starch (○). 1 ml of 1.5 % soluble starch was incubated with amylase (100 μl) for 5 min in the method by Bernfeld (△).

反応液攪拌の効果

イエロースターチは可溶性ではないため，常に攪拌していなければ試験管の底に沈殿してしまう．アミラーゼによるイエロースターチ分解に反応液の振盪が不可欠であるかどうかを知るために，37℃，30 分間の反応時間中に，恒温槽中に静置した反応液と，5 分間ごとに 5 秒間の攪拌を加えた反応液で色素遊離量を比較したところ，上清の吸光度には差は認められず（Table 1），反応液の振盪は必ずしも必要ではないと判断された．

酵素試料液の体積の影響

標準的な測定操作では，50 μl の試料液を基質液に加えているが，加える試料液の体積が，上清の吸光度にどの程度影響するかを調べた(Fig. 3)．加える酵素用量を 0.0375 U とし，試料液の体積を 9.375 から 150 μl の範囲で変化させたところ，体積 9.375 μl の場合を除いて，上清の吸光度は 0.63 前後でほぼ一定しており，加えた試料体積の多少の変動は上清の吸光度にほとんど影響しないものと判断された．

反応停止後の放置時間と HCl 濃度の影響

反応停止から反応混液の遠心分離までの放置時間を，0 から 30 分まで変化させ上清への色素遊離量を調べたところ，アミラーゼを加えたもの，盲検ともに，放置時間の延長に伴って遊離される色素量が増加した(Table 2)．この結果は，反応停止後も色素の遊離が続いていることを示している．そこで，反応停止液として用いた HCl 濃度の色素遊離量への影響を調べたところ，反応停止直後に遠心分離したものでは HCl 濃度によらず上清の吸光度はほぼ一定していたが，反応停止後に 30 分，または 60 分間放置したものでは，HCl 濃度の上昇に伴って上清の吸光度が上昇した（Fig. 4）．以上の結果から，反応停止液に用いる HCl により，イエロースターチの非酵素的分解が進むものと判断され，1）反応停止後時間を置かずに遠心分離を行う必要があること，2）反応停止液

Table 1. Effect of shaking on enzymatic chromogen liberation from Yellow Starch.

	Absorbance (420 nm)	
	Stay in the bath	Mix every 5 min
Blank	0.109	0.106
Amylase (0.01 U)	0.201	0.222
Amylase (0.05 U)	0.937	0.932

1 ml of 3% Yellow Starch was incubated with 50 μl of α-amylase (0.01 or 0.05 U) or phosphate buffer for 30 min. One group of tubes was staid in the bath without shaking and the other group was mixed for 5 sec every 5 min with a tube mixer.

Table 2. Time dependency of chromogen liberation after cessation of the reaction.

Time (min)	Absorbance (420 nm)	
	Blank	Amylase (0.05 U)
0	0.048	0.564
15	0.059	0.570
30	0.063	0.582
30*	0.056	0.532

1 ml of 3% Yellow Starch was incubated with 50 μl α-amylas (0.05 U) or phosphate buffer for 30 min and the reaction was stopped by addition of 0.1 N HCl.
*These were centrifuged just after cessation of the reaction and left for 30 min in room temperature before measurement of the absorbance.

に用いるHCl濃度をよりうすくできるかどうかを検討する余地のあることが明らかとなった.

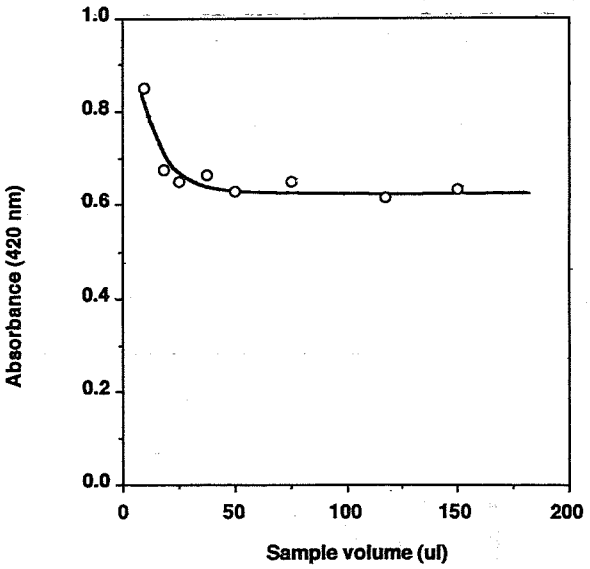

Fig. 3 Effect of sample volume on absorbance of the supernatant. 1 ml of 3 % starch was incubated with various volume (9.735−150 μl) of α-amylase (0.0375 U) for 30 min.

ぶどう糖, 麦芽糖添加の影響

α-アミラーゼはでんぷんの直鎖部分を加水分解するため, 反応が進行した結果, ぶどう糖や麦芽糖が産生される. また, 膵腺房からの酵素放出実験では, 通常ぶどう糖を含む生理塩溶液を用いる. そこで, 反応混液中にぶどう糖, または麦芽糖を添加して, 色素遊離量への影響を調べた(Fig. 5). その結果, ぶどう糖, 麦芽糖ともに実験した10 mg/ml以下の範囲では, 上清の吸光度にほとんど差は見られず, 酵素活性への影響はないものと判断された. ラット膵腺房破砕液を用いた実験でも, 同様の結果が得られた(結果は示していない). 一方, Bernfeld法では還元糖を定量しているため, 反応混液中に酵素反応によらないぶどう糖・麦芽糖が存在することは, アミラーゼ活性の測定結果に大きく影響する. そのため, 酵素放出実験に用いる生理塩溶液中のぶどう糖濃度を変えたり, ぶどう糖を他の糖で置換したときには, Bernfeld法では正味のアミラーゼ活性を求め難い. そのような実験では, 糖の存在に影響されないイエロースターチ法は好都合である.

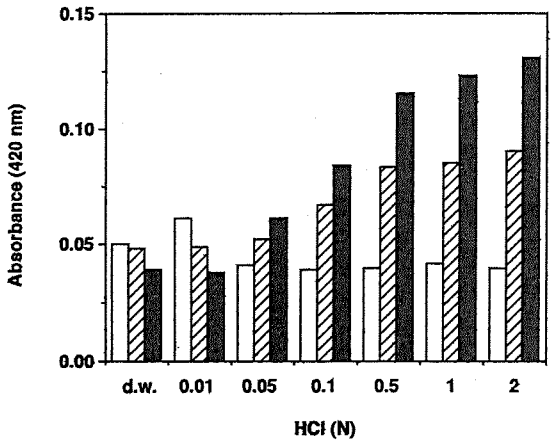

Fig. 4 Effect of HCl concentration on chromogen liberation from the Yellow Starch. 2 ml of various concentration of HCl (0−2 N) was mixed with 1 ml of 3 % Yellow Starch, and mixtures were centrifuged just after (□), 30 min after (▨) or 60 min after (▩) then.

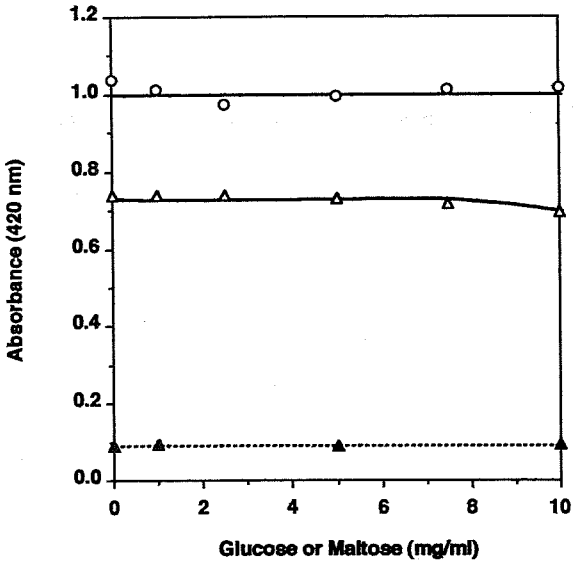

Fig. 5 Effect of glucose or maltose concentration on enzymatic chromogen liberation. 0.8 ml of 3 % starch containing various concentration (0−10 mg/ml) of glucose (○) or maltose (△) was incubated with 50 μl of α-amylase (0.04 U or 0.03 U) or 50 mM phosphate buffer (▲) for 30 min.

蛋白質添加の影響

アミラーゼ活性を測定する試料には，常に多少の蛋白質が含まれている．そこで，反応混液中にウシ血清アルブミン（BSA）を添加して，蛋白質がアミラーゼ活性の発現にどのような影響を及ぼすのかを調べたところ，蛋白質濃度上昇に伴って色素遊離量が上昇する結果が得られた（Fig. 6）．この理由は明らかではないが，盲検での色素遊離量には変化が見られないことから，添加したBSAが酵素活性にたいして何らかの保護効果を持つのかもしれない．実用上は，基質液1 mlにたいして血清試料（蛋白質濃度7 g/dl程度）を50 μl加えたとしても，反応混液の蛋白質濃度は3 mg/ml程度に過ぎず，さらに，膵腺房からの酵素放出実験においては，0.1 mg/ml以上の蛋白質濃度に達することは考えにくいことから，蛋白質濃度の影響を考慮する必要は無いと考えられる．蛋白質を加えた反応混液での検量線の作成を行えば，

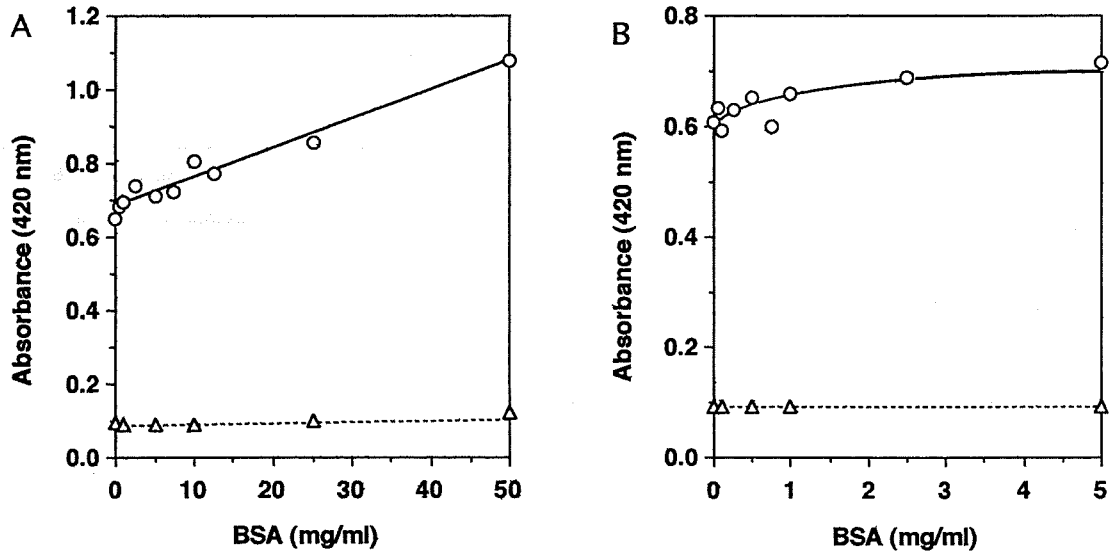

Fig. 6 Effect of protein concentration on enzymatic chromogen liberation. 0.8 ml of 3 % starch containing various concentration of BSA (0−50 mg/ml in A, 0−5 mg/ml in B) was incubated with 50 μl of α-amylase (0.04 U) for 30 min. In this experiment, 50 mM phosphate buffer in the substrate solution was replaced with 20 mM Tris-HCl buffer containing 50 mM NaCl (pH 7.4).

高蛋白質試料のアミラーゼ活性をより正確に求めることができると思われる．

2．ラット膵腺房アミラーゼ活性の Cl^- 濃度依存性

α-アミラーゼがその活性を発揮するためには溶液中の Cl^- の存在が不可欠である，そこで，ラット膵腺房の破砕液を用いて，ラット膵腺房アミラーゼ活性の Cl^- 濃度にたいする依存性を調べた．NaCl濃度を0から750 mMの広い範囲で変化させたときには，酵素活性はNaCl濃度25 mMで最大に達し，それ以上のNaCl濃度では，酵素活性は次第に低下した（Fig. 7A）．さらに，NaClまたは，NH_4Cl を0から100 mMの範囲で加えて酵素活性を調べたところ，数mMの Cl^- 存在下で酵素の活性化が見られ，30から100 mMの濃度範囲でほぼ最大の活性値を示すことが明らかとなった（Fig. 7B）．また，NaCl，NH_4Cl いずれの塩でもアミラーゼ活性化効果は同様であった．Bernfeld法によっても同様の結果が得られた．また，ブタ膵アミラーゼ標品で得られた活性の Cl^- 濃度依存性ともよく似ていた．

以上より，イエロースターチを用いたアミラーゼ活性測定法で得られた結果は，これまで，または今回，Bernfeldの方法により得られた結果と大きく異なることはなかった．従って，いずれの方法でも膵放出液のアミラーゼ活性の測定に有効であると判断された．また，両測定操作を比較すると，Bernfeld法では反応時間が5分間と短く，短時間で測定が終了するという点が長所として挙げられ，短所としては，反応時間が短いため一時に測定できる試料の数が限られる点，反応混液の沸騰水中での加熱，冷却，希釈と，操作がやや煩雑である点，使用する試験管数が多くなる点が挙げられる．一方，イエロースターチ法では，長所としては，反応時間が30分間と長いため，一時に多数の試料を測定できる点，一本の試験管で酵素反応から吸光度測定まで行える点，基質及び試薬がより安価である点が挙げられる．短所とし

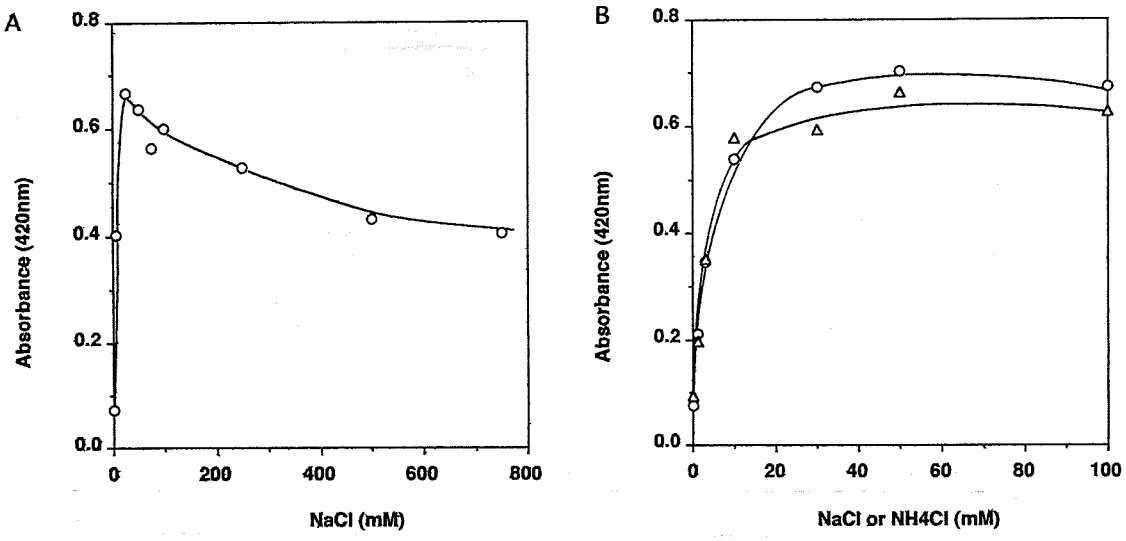

Fig. 7 Effect of Cl^- concentration on amylase activity in rat pancreas. A : 1 ml of 3 % Yellow Starch containing various concentration of NaCl (0−750 mM) was incubated with the pancreatic acini homogenate (50 μl) for 30 min. B : 1 ml of 3 % starch containing various concentration (0−100 mM) of NaCl (○) or NH_4Cl (△) was incubated with the homogenate (50 μl). In these experiments, 50 mM phosphate buffer containing 50 mM NaCl was replaced with 10 mM HEPES buffer (pH 7.0).

ては，遠心分離が必要である点，少数の試料でも測定時間が長く必要な点が挙げられる．イエロースターチ法は血清中のアミラーゼ活性の臨床検査測定を目的に考案されたこともあり[4]，より多数の試料を測定するのに好都合だと判断される．膵腺房からのアミラーゼ放出実験については，多数の試料の測定を伴う表面灌流実験ではイエロースターチ法を適用する利点があると考えられる．また，イエロースターチ法で要する反応時間については，短縮することも可能であると考えられるので，様々な規模の実験に適した反応時間で測定操作を検討していく余地があると思われる．

3．アミラーゼ活性放出反応に及ぼすぶどう糖除去の効果

ラット膵腺房をニトロセルロース膜上に置いて表面灌流し，CCK-8 を含む灌流液で酵素放出を刺激したときのアミラーゼ放出経過をイエロースターチ法で測定したところ，これまで，Bernfeld 法を用いて調べられた酵素放出経過との違いは認められなかった (Fig. 8A)．CCK-8 刺激開始 20 分前より，刺激 14 分目までの間をぶどう糖を除いた HR 液で表面灌流したものでは，刺激開始前の静止時アミラーゼ放出は低くなる傾向が認められたが，刺激に応じた放出経過には有意な差は認められなかった (Fig. 8B)．さらに，ぶどう糖を含む HR 液に戻した前後 (実験 34 分目前後) にも，アミラーゼ放出速度の変化は認められず，1）灌流液からのぶどう糖の除去は，CCK-8 刺激に応じたアミラーゼ放出経過になんら影響を及ぼさないこと，2）表面灌流液中のぶどう糖濃度の変動は，イエロースターチ法による膵腺房からのアミラーゼ放出経過測定に全く影響しないこと，が明らかとなった．表面灌流液からのぶどう糖除去の効果については，Brnfeld 法を利用してアミラーゼ放出を調べた実験では，刺激に応じたアミラーゼ放出反応の抑制をするように見えたが，今回，より高感度で，灌流液中のぶどう糖濃度変動の影響を受けない，アミラーゼ活性測定法によりそれが否定された．

要　　約

反応性染料である Procion Yellow を結合させたでんぷんを用いたアミラーゼ活性測定法を膵腺房からの酵素放出実験に適用するために，基質であるイエロースターチの調製を行い，酵素活性測定条件とその操作について検討した．イ

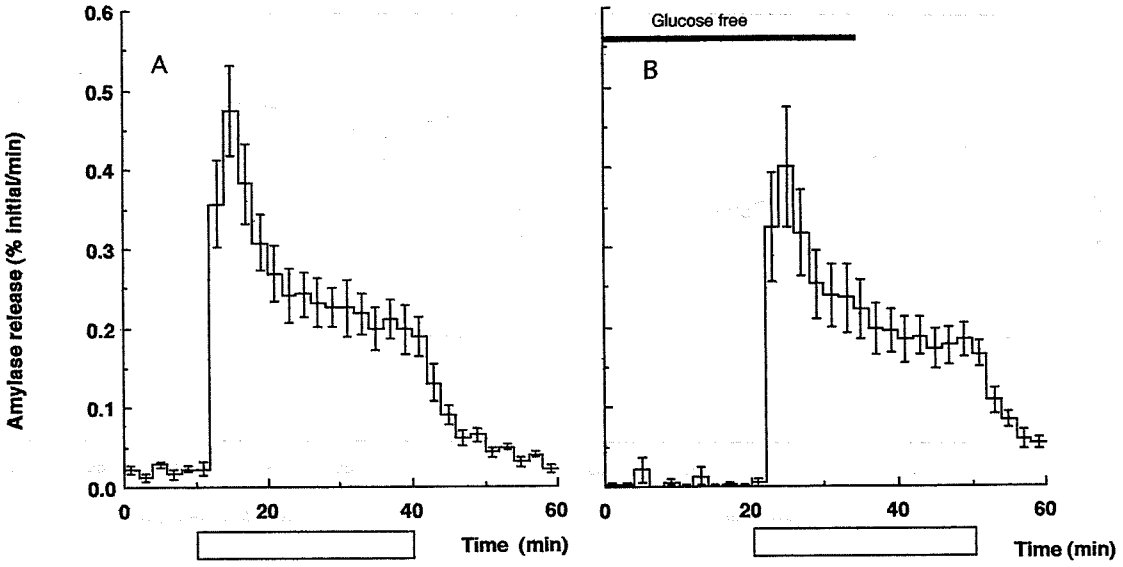

Fig. 8 Effects of glucose deprivation on amylase release response to 10 pM CCK-8. A : Isolated pancreatic acini were perifused constantly and stimulated with CCK-8 containing HR solution. B : At a time indicated by bar, the acini were perifused with glucose deficient HR. Values represent means ± SEM from 4 experiments. The open horizontal bars indicated the period of CCK-8 stimulation.

エロースターチ法による測定結果は，反応混液中の還元糖や蛋白質に影響されなかった．しかし，反応停止後でも，反応停止液として加えたHClにより非酵素的な色素の遊離が認められたことから，HCl濃度や反応停止後の操作については，再検討の余地があると考えられた．さらに，還元糖を定量するBernfeldの方法と測定操作，測定結果を比較したところ，膵腺房からの酵素放出経過を調べる実験に適用可能であると判断された．また，Bernfeldの方法に比べ，多数の試料の測定に好都合であると判断された．

イエロースターチ法を利用して調べたところ，ぶどう糖除去液による灌流は，CCK-8刺激に応じたラット膵腺房からの酵素放出反応になんら効果を持たないものと判断された．

引用文献

1) 中村道徳（1989）「澱粉・関連糖質酵素実験法」（中村道徳，貝沼圭二 編）pp. 129−151，学会出版センター，東京
2) 谷口肇（1989）「澱粉・関連糖質酵素実験法」（中村道徳，貝沼圭二 編）pp. 10−24，学会出版センター，東京
3) 小田恒郎（1989）「澱粉・関連糖質酵素実験法」（中村道徳，貝沼圭二 編）pp. 266−273，学会出版センター，東京
4) Jung, D. H. (1980) *Clin. Chim. Acta* **100**, 7−11
5) Bernfeld, P. (1955) in *Methods in Enzymology Vol. 1* (Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., eds), pp. 149−158, Academic press, New York
6) 葉原芳昭によるDr. Willams, J. A. の研究室での測定操作の紹介
7) Kanno, T. (1975) *J. Physiol.* (*Lond.*) **245**, 599−616
8) Hootman, S. R., Brown, N. M., Williams, J. A. and Logsdon, C. D. (1986) *Am. J. Physiol.* **251**, G75−G83
9) Habara, Y., Williams, J. A. and Hootman, S. R. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **137**, 664−669
10) Imamura, K., Wakasugi, H., Shiozaki, H. and Ibayashi H. (1983) *Jpn. J. Physiol.* **33**, 687−698
11) Habara, Y., Satoh, Y., Saito, T. and Kanno, T. (1990) *Biomedical Res.* **11**, 389−398