

視床下部性肥満マウスの肝における 糖新生に関する研究

伊藤淑子*, 越智紀代子*, 説田 武*

Study on Hepatic Gluconeogenesis in Hypothalamic Obese Mice, Particularly Viewed from Activities of the Key Enzymes and Secretions of the Related Hormones

Yoshiko Ito, Kiyoko Ochi and Takeshi Setsuda

結 言

Gold thioglucose (GT) を投与したマウスでは、視床下部の腹内側核 (VMH) が破壊されて調節性肥満¹⁾を引き起こすことが知られている。

先に我々²⁾は、GT の中毒量を dd 系雄マウスの腹腔内に1回投与して発症させた肥満マウスの内、とくに体重増加の顕著な肥満マウスでは、高血糖と尿糖が、又肝では Glycogen の増加が認められ、更に又 Alanine 添加メジウム中で incubate した肝からの Glucose 放出量の増加、血清 Corticosterone 値の増加、及び膀胱島³⁾の α -細胞の増加を認めたことなどから、GT 肥満マウスの肝では糖新生機序の亢進が推定された。

そこで今回我々は、GT 肥満マウスの肝における糖新生機序の亢進を究明する目的で、GT 投与後 7, 14, 20, 40 週目の肥満マウスの肝について、糖新生鍵酵素の Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), Fructose-1,6-diphosphatase (FDPase) と Glucose-6-phosphatase (G6Pase), 及び解糖系鍵酵素の Pyruvate kinase (PK) の活性を測定すると共に、肝における Alanine からの糖生成量の測定、血清中の Glucose, FFA, Insulin, Corticosterone 値の測定、及び膀胱島の大きさ (断面積) と α -細胞数の測定を行った。

なお、肥満マウスの肝における糖新生に及ぼす絶食の影響を知るために、GT 肥満マウスを3日間絶食さ

せた後の肝の PEPCK 及び FDPase の活性の変化を調べた。

実験材料ならびに実験方法

GT (Sigma 社) の中毒量 (1mg/g 体重) を dd 系雄マウスの腹腔内に1回注射して肥満を発症させたマウスを実験に用いた。又、20週と40週の GT 肥満マウスについて絶食を3日間行った。

飼育方法及び肝と副腎脂の incubation 実験は、吾々³⁾の方法に準じて行ない、肝では90分間、又副腎脂では30分間 in vitro で incubate した。

マウスを断頭して放血した後、肝を摘出して肝の各酵素の活性を測定した^{4),7),9)10)}。

肝の PEPCK 活性の測定：肝 1g 当り 0.25M Sucrose 7ml を肝に加えてホモジナイズした後、12,000×g で遠心分離して得た上澄液について測定した⁴⁾。予め塩酸で pH を 8.0 に調整した反応液 (2.4 μ moles ITP, 4.0 μ moles KF, 3.6 μ moles $MgSO_4$, 0.54 μ moles KCl, 0.25 μ moles Dithiothreitol, 15 μ moles Tris) 0.3ml を試験管に取り、これに上記の上澄液 0.1ml を加えて 0.4ml とし、30°C で約 5 分間加温した後、基質として 2.4 μ moles のオキザロ酢酸 0.2ml をこれに加えて、30°C で 15 分間 incubate した後、ただちに KBH_4 を約 1mg 加えて反応を停止し、生成された PEP を定量した⁵⁾。即ち、反応を停止した後、Tris を加えて中和したもの 0.1ml に混合液 (30mM KH_2PO_4 , 10mM KCl, 5mM $MgCl_2$, 0.1mM NADH, 1.0mM ADP ; KOH を加えて pH を 7.0 に調整したもの) 3.0ml を加え、次に乳酸脱水素酵素 (LDH) 10~20 μ l を加え、340nm で測定した時の吸光度の読みと、これに PK を 10~20 μ l

* 栄養生理学研究室 (Laboratory of Nutritional Physiology, Department of Food Science, Kyoto Women's University, Higashiyama-ku, Kyoto 605, Japan)

加え、340nmで測定した時の吸光度の読みの差をもって、PEP量と見做した⁶⁾。PEPCK活性を nmoles of PEP/min/mg of protein で表わした。

肝の FDPase 活性の測定：肝1g当り Sodium lactate buffer (pH 3.5) 4.0ml を肝に加えて、ホモジナイズした後、1,000×g で遠心分離して得た上澄液を pH4.5 に調整した後、38°C の温浴中で 8 時間 incubate した。これを氷冷して 4°C とした後、2,500×g で 60 分間遠心し、得られた上澄液を測定に用いた。即ち、予め加温した反応液 (50mM FDP 0.1ml, 50mM Boric acid-NaOH buffer (pH 9.5) 0.4ml, 50mM MgSO₄ 0.1ml, 5mM MnCl₂ 0.1ml) に、上述の肝の上澄液 0.2ml と 50 mM Cysteine (pH 9.5) 0.1ml を加えて 37°C で 15 分間 incubate した後、0.1M TCA 1.0ml を加えて反応を停止した⁷⁾。生成されたリン酸をモリブデン酸と反応させて生じたリンモリブデン酸を還元して、モリブデンブルーとし、660nm で比色定量⁸⁾した。FDPase の活性を μ moles of phosphate/min/mg of protein で表わした。

肝の G6Pase 活性の測定：肝 1g 当り 0.25M Sucrose 9ml を肝に加えてホモジナイズした後、予め 37°C に加温した反応液 (83mM G6P 0.1ml, 0.1M Maleic acid-NaOH buffer (pH 6.5) 0.3ml) を添加して 37°C で 15 分間 incubate した後、10% TCA 1ml を加えて反応を停止した⁹⁾。生成されたリン酸を上述の FDPase の測定に準じて定量した。G6Pase の活性を μ moles of phosphate/min/g of liver で表わした。

肝の PK 活性の測定：肝 1g 当り 4 倍量の抽出液 (0.1 M KCl, 5mM MgSO₄, 0.1M EDTA, 50mM Tris buffer; HCl で pH を 7.4 に合わせる) を肝に加えてホモジナイズした後、100,000×g で 1 時間超遠心して得た上澄液に、それぞれ混合液 (0.5% BSA, 0.1M KCl, 5mM MgCl₂, 50mM Tris buffer; HCl で pH を 7.4 に調整) 0.5ml を一緒に加えて、37°C で 15 分間 incubate した後、0.012% 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを含む 2N HCl 溶液 1.5ml を加えて反応を停止した。生成されたピルビン酸をヒドラジンと反応させて生ずるヒドラゾン を 510nm で比色定量¹⁰⁾した。PK の活性を μ moles of pyruvate/min/mg of protein で表わした。

肝における Alanine からの Glucose 生成量の測定は、前回²⁾の方法に従い、KRB buffer (pH 7.4) に 3mM Acetate と 0.2% BSA を加えたものの中で肝切片を 60 分間 preincubate した後、medium に Alanine (3mg/ml) を添加して肝切片を 30 分間 incubate して、Alanine

添加の前後における Glucose 放出量の差を求め、肝 1g 当りの mg で表わした。

Glucose, Glycogen の測定は、前回の方法²⁾に従った。FFA は Itaya-Ui 改良法¹¹⁾に従って測定した。血清の Corticosterone 値の測定は、Zenker の改良法¹²⁾で Corticosterone を抽出した後、島津製の蛍光分光々度計を用いて、蛍光を測定した。血清の Insulin は RIA-kit にて測定した。

睨ラ氏島の α -細胞を Grimelius 法¹³⁾により染色し、ラ氏島の断面積を測定すると共に、ラ氏島の平均 α -細胞数を測定¹⁴⁾した。

実験成績

1) GT 肥満マウスの体重及び糖尿 (Fig. 1)

GT 注射直後は摂食量が著減し、体重が一時減少したが、2 週以後は体重が直線的に著明な増加を示した。しかし、8 週以後は体重の増加が緩慢となり、20 週以後には体重が最高値に達し、その後は減少傾向を示した。

GT 投与後 14 週から 20 週にかけて糖尿が 2 匹のマウスに認められたが、40 週以後には消失した。

2) GT 肥満マウスの血清中の糖, FFA, Insulin 及び Corticosterone 値 (Fig. 2)

Table 1 Average area of pancreatic islet in the cross section and average number of α -cells per islet in the control and GT obese mice.

| MICE | WEEKS | AVE. AREA OF ISLET (μ^2) $\times 10^3$ | AVE. NO. OF α -CELLS PER ISLET |
|----------|-------|---|---------------------------------------|
| CONTROL | 0 | 95 \pm 35 | 15 \pm 6 |
| | 7 | 38 \pm 9 | 9 \pm 7 |
| | 14 | 251 \pm 44 | 45 \pm 28 |
| | 20 | 60 \pm 12 | 20 \pm 8 |
| | 40 | 92 \pm 75 | 80 \pm 27 |
| GT OBESE | 7 | 112 \pm 51 | 43 \pm 14 |
| | 14 | 206 \pm 53 | 45 \pm 12 |
| | 20 | 47 \pm 13 | 36 \pm 6 |
| | 40 | 251 \pm 47 | 13 \pm 4 |

* The area of each islet in the cross section was measured by using Abbe's apparatus and a planimeter, to obtain average area of pancreatic islet in the cross section. Each value is expressed as the mean \pm S.E.. (n=5)

体重増加が著しい7週と14週の肥満マウスでは、血糖及び血清中の Insulin 及び Corticosterone 値が高値を、又血清中の FFA 値は低値を示した。体重増加が停滞した20週の肥満マウスでは、血糖と血清中の Insulin 値が低値を、又血清中の FFA 値が高値を示した。体重の減少傾向を認めた40週の肥満マウスでは、血清中の FFA 値が減少した。

3) GT 肥満マウスの膵ラ氏島の断面積とラ氏島1個当りの α -細胞数 (Table. 1)

GT 注射後7週では、膵ラ氏島の断面積が対照に比

し大きく、 α -細胞数が増加し、又体重増加が停滞した20週では、ラ氏島の断面積は対照と差がないが、 α -細胞数が増加した。40週では、ラ氏島の断面積が再び増加し、 α -細胞数が反対に減少した。

4) GT 肥満マウスの肝の incubation 成績 (90分値) (Fig. 3)

肝の Glucose uptake は体重増加の著しい7週と14週では著変がなく、体重増加が停滞した20週及び体重の減少傾向を示した40週では増加した。

肝の Glucose release は7週で増加、14週で減少し

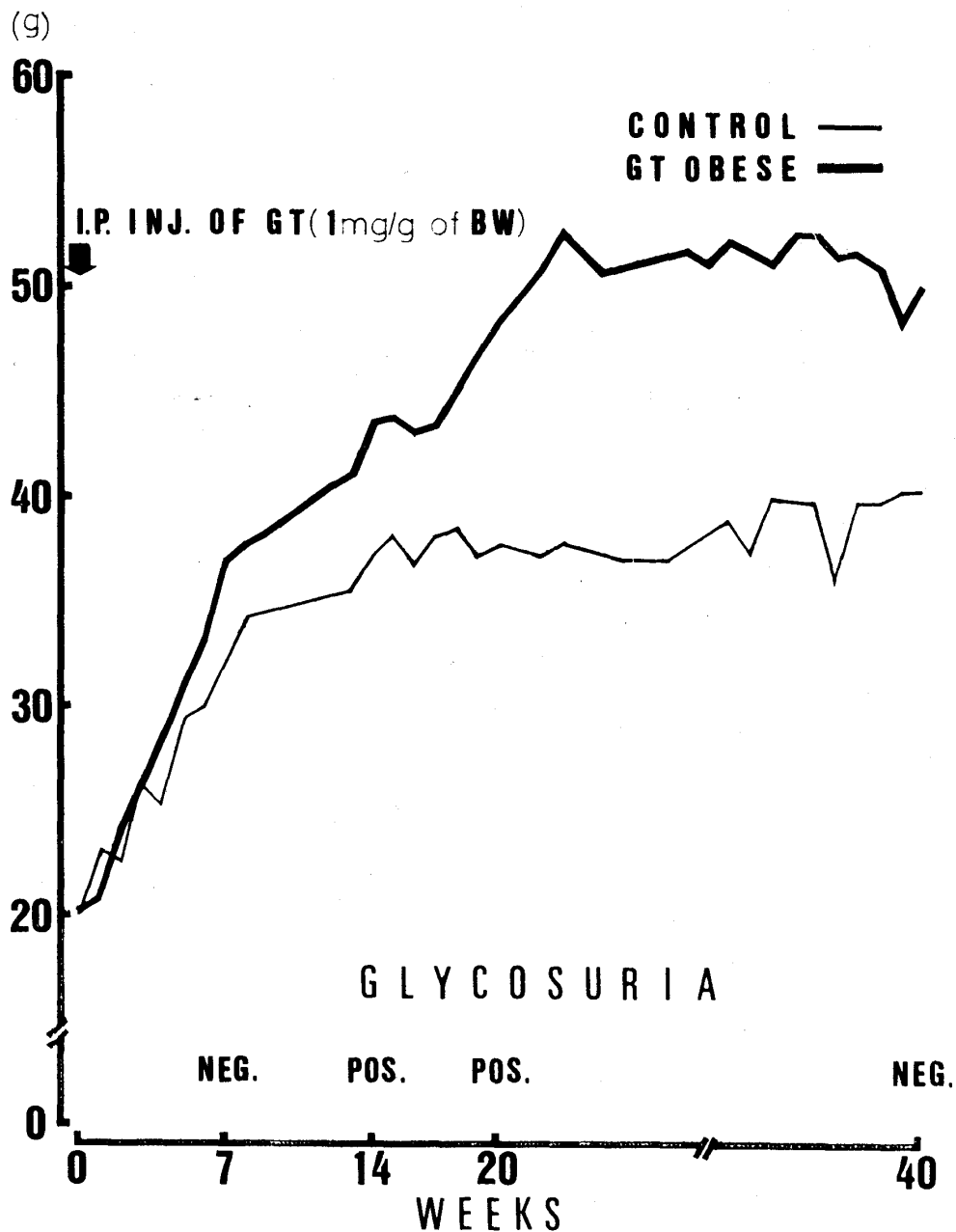


Fig. 1 Increment of body weight in the control and GT obese mice. Weeks indicate the time course after GT injection.

たが、20週と40週では対照との間に差がなかった。

肝の Glycogen 量は、7週と40週では対照との間に差がなく、14週では増加傾向を示し、20週では著明に増加した。

肝の FFA 量は、7週と20週で増加したが、14週では対照との間に差がなく、40週では減少した。

5) GT 肥満マウスの副腎脂の incubation 成績 (30分値)

副腎脂の Glucose uptake は、各週とも対照を上回

ったが、20週では対照との差が少なかった。副腎脂の重量は各週とも対照を上回ったが、20週では対照との差が少なかった。

副腎脂の FFA release は、7、14及び40週ともに減少したが、20週では増加した。

6) GT 肥満マウスの肝における Alanine からの Glucose 生成量 (30分値) (Fig. 4)

肝切片を Alanine と共に in vitro で incubate すると、Glucose の生成量は7週と14週では減少傾向を示

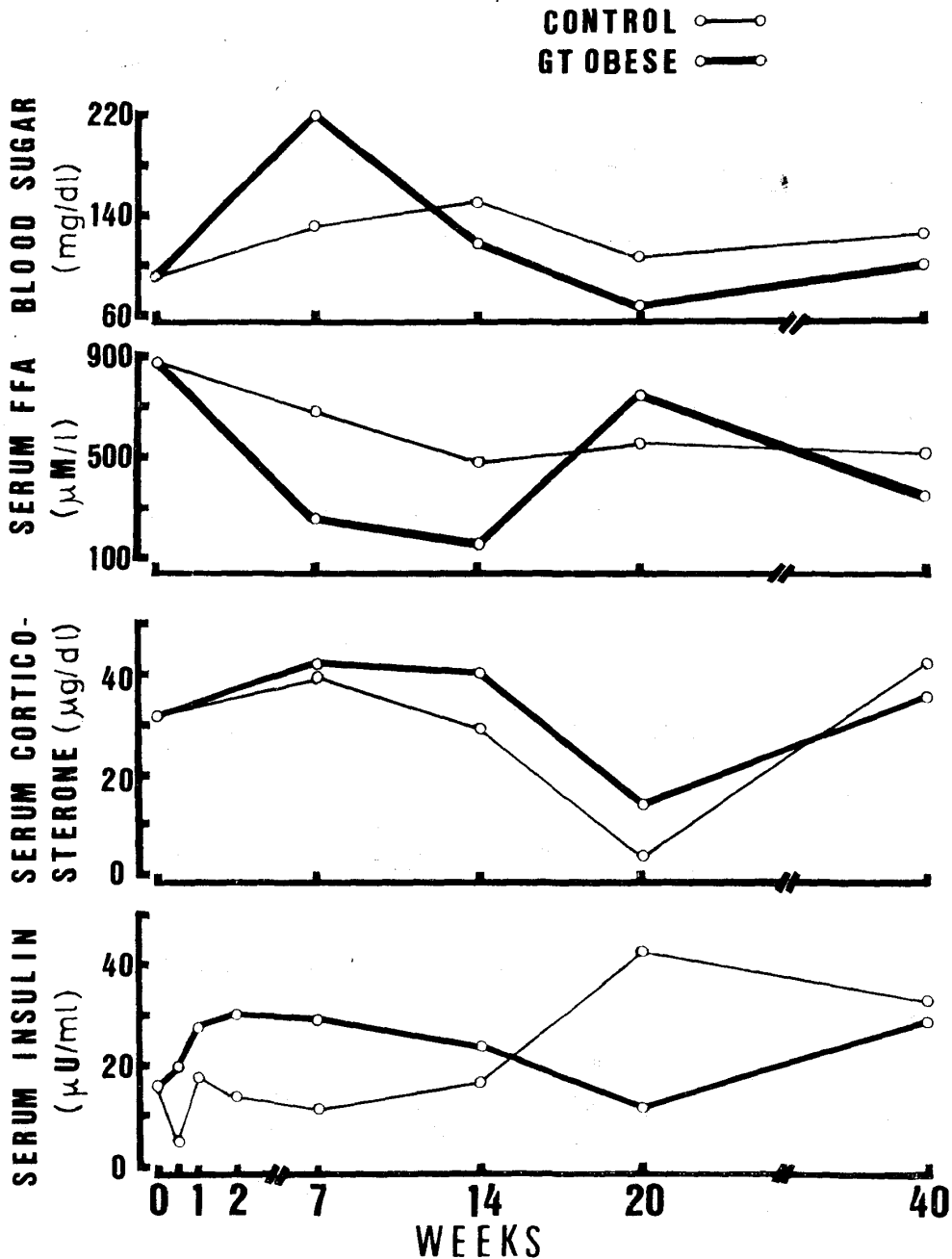


Fig 2 The time course of serum levels of glucose, FFA, corticosterone and insulin in the control and GT obese mice. Weeks indicate the time course after GT injection.

したが、20週では有意に増加し、40週では対照との間に差がなかった。

7) GT 肥満マウスの肝における PEPCK, FDPase, G6Pase 及び PK の活性 (Fig. 5)

GT 肥満マウスでは、肝の PEPCK 活性が7, 14, 40週ともに対照との間に差がなかったが、20週では有意に増加した。

肝の G6Pase 活性は、7週と14週では対照との間に差がなかったが、20週では有意に増加し、40週では有

意に減少を示した。

肝の FDPase 活性は7, 14週で増加、又は増加傾向を示したが、20, 40週では対照との間に差がなかった。

肝の PK 活性は、7週で有意の減少を、又14週と20週で減少傾向を示したが、40週では有意に増加した。

8) GT 肥満マウス (20週と40週) の肝の糖代謝に及ぼす絶食の影響

i) 血清中の糖, Corticosterone 及び Insulin 値 (Fig. 6)

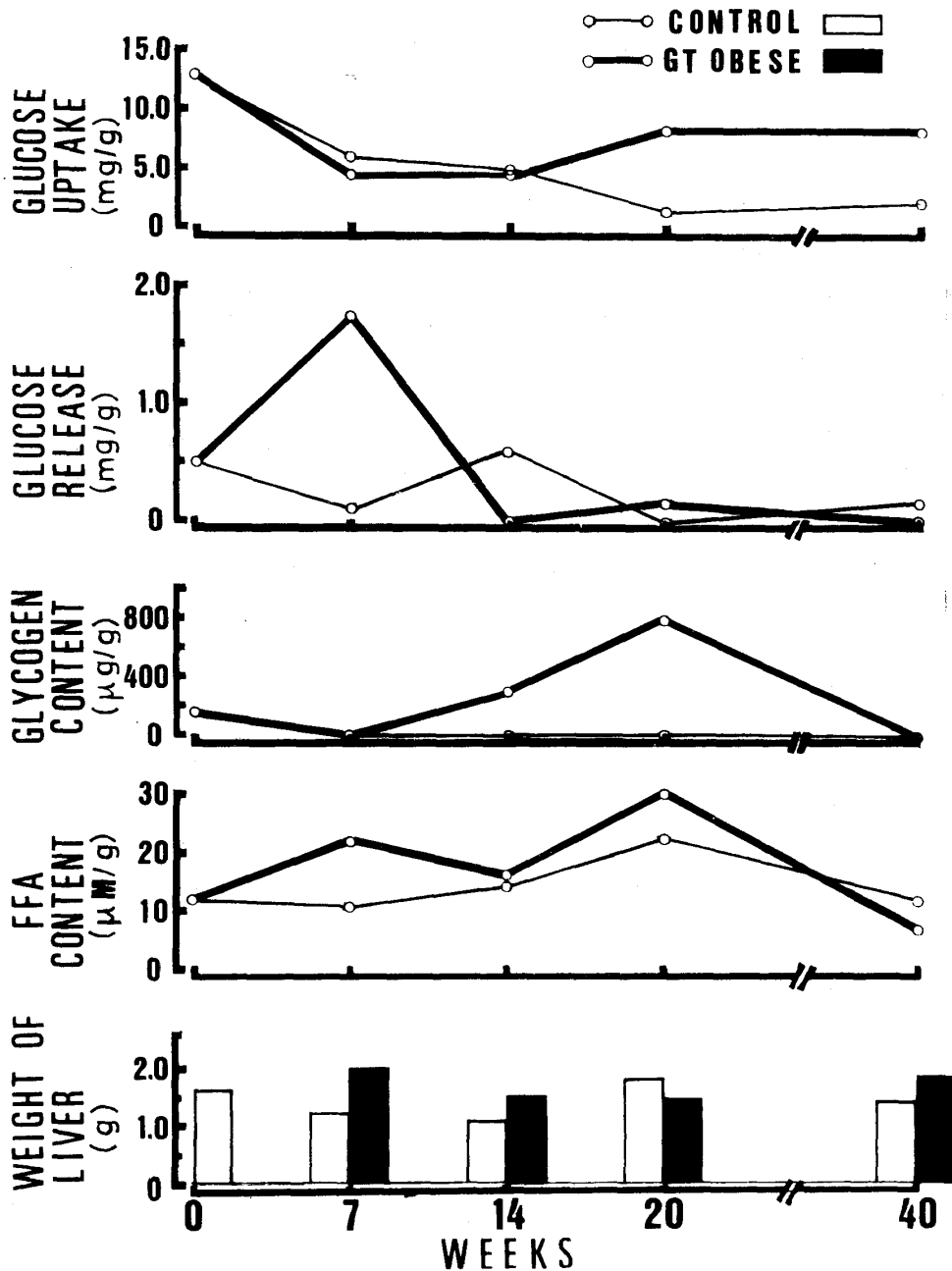


Fig.3 Glucose uptake by and glucose release [from] liver slices incubated, as well as its contents of FFA and glycogen in the control and GT obese mice. Weeks indicate the time course after GT injection.

20週の GT 肥満マウスでは、絶食後の血糖と血清 Corticosterone 値の増加が対照に比べて著明であるが、血清 Insulin 値の減少の程度がより強い。又、40週の GT 肥満マウスでは、絶食により血糖には変化がなく、血清 Corticosterone 値が増加した。

ii) 肝の PEPCK 及び FDPase の活性ならびに Alanine からの糖生成量 (Fig. 7)

対照マウスでは3日間の絶食により、肝の PEPCK と FDPase の活性、及び Alanine からの糖生成量が著明に増加したが、20週の GT 肥満マウスの肝では、PEPCK と FDPase の活性ならびに Alanine からの糖生成量がいずれも3日間の絶食により殆ど変化しなかった。

40週の GT 肥満マウスを3日間絶食させた場合にも、これと略々同様の結果が得られた。

考 察

GT 肥満マウスを体重増加の程度から、肥満の初期、進行期、固定期及び退行期の4期に分ち考察する。

肥満の初期と進行期 (GT 投与後7と14週) では、1日の摂食量が増加し、体重が急速かつ顕著に増加した。肝、副腎脂、脾などの臓器の重量も増加し、特に副腎脂の湿重量が対照の約3.5倍に増加し、副腎脂の incubation 実験では、TG 合成の亢進が示唆された。又、血清の Insulin 値が高く、FFA 値が低いことは、

脂肪組織における TG 合成の亢進と関係がある様に思われる。

肝の incubation 成績では、肥満の初期では肝の Glucose release と FFA 量が増加したが、肥満の進行期では、肝の Glucose release が減少し、TG と Glycogen 量が増加し、肝における TG 合成の亢進が考えられた。

肝の PEPCK と G6Pase の活性が減少の傾向を示したことは、肝における解糖系の促進、ひいては FFA 合成の促進を示唆する。肝の FDPase 活性の増加ないし増加傾向は、糖新生の亢進よりはむしろ、FFA の合成に必要な五炭糖リン酸回路における NADPH の合成の促進^{15),16)}を示唆する。血清 Insulin 値の著増にも拘らず、PK 活性が減少傾向を示したのは恐らく、FDPase 活性が著明に増加した結果であろうと思われる。

脾では、ラ氏島の断面積が対照に比べて増加し、血清 Insulin 値が高いことから、脾ラ氏島の β -細胞からの Insulin 分泌の亢進が窺われた。又、ラ氏島の断面積当りの α -細胞数が対照の約5倍に増加し、 α -細胞からの Glucagon 分泌の亢進が推察された。これは恐らく Insulin の過剰分泌に拮抗して Glucagon 分泌が亢進したためであろうと思われる。

肥満の初期では、過食による過血糖が肝或は副腎脂における FFA 或は TG 合成の活発化と関係があると

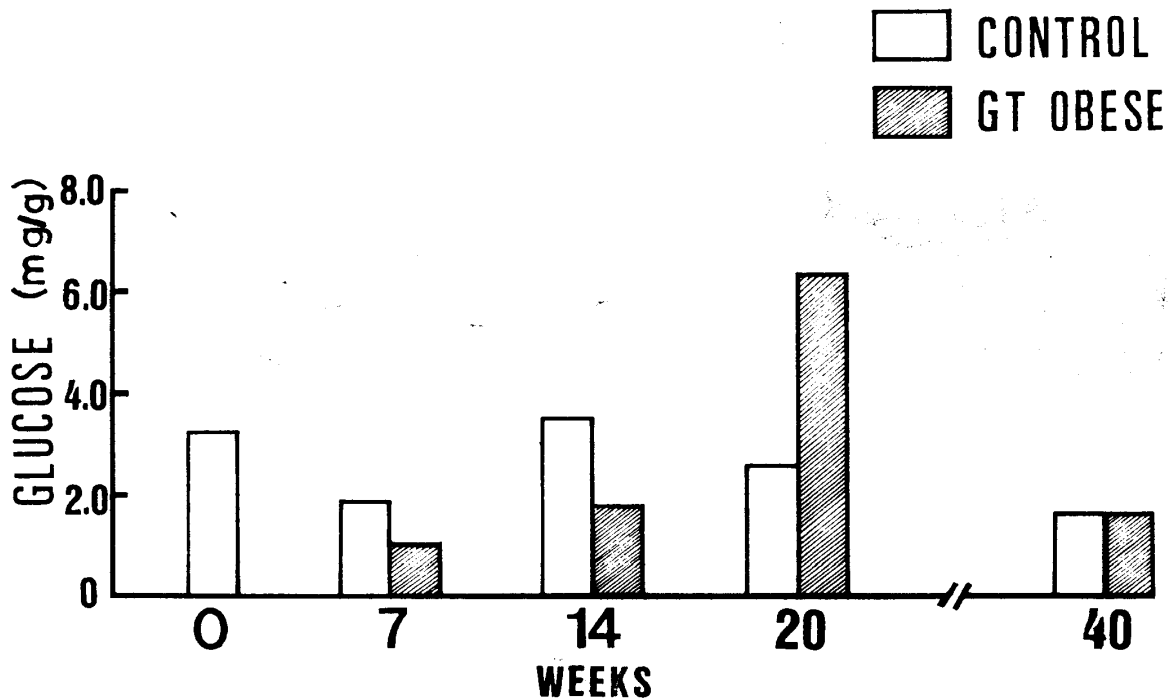


Fig 4 Glucose release from liver slices incubated with alanine in the control and GT obese mice. Weeks indicate the time course after GT injection.

思われるが、これには恐らく GT 注射により視床下部の VMH が障害されて Insulin の過剰分泌^{19),20)} を来したことが影響していると思われる。この時期の肝では、まだ糖新生機序の亢進は見られなかった。

肥満の進行期では、脂肪組織における TG 合成が活発で、肝では FFA 合成よりも Glycogen 合成の方が

亢進の程度が強い様に思われた。この時期には、血清の Corticosterone 値及び膵ラ氏島の α -細胞の増加が、血清 Insulin 値の増加と共存していたことから考えると、肝では糖新生機序が亢進する以前の過渡期的段階にあったものと思われる。

肥満の固定期 (GT 注射後20週) では、マウスの体

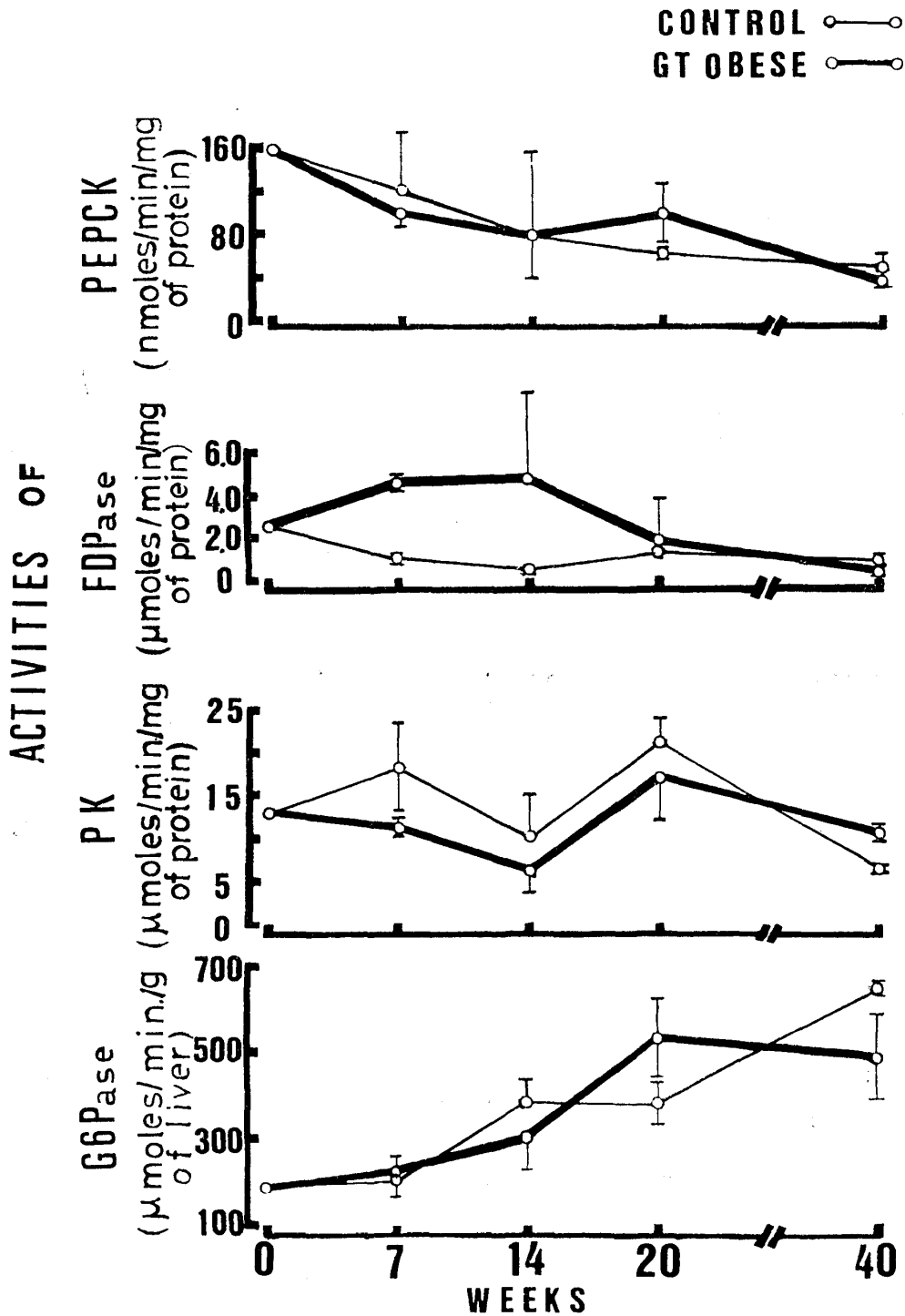


Fig. 5 The time course of hepatic activities of PEPCK, FDPase, G6Pase and PK in the control and GT obese mice. Weeks indicate the time course after GT injection.

重増加が停滞し、1日の摂食量も減少し、副腎脂の湿重量は肥満の進行期に比べて減少し、副腎脂からの FFA の放出量が増加したことから、副腎脂では TG の分解が進み、血中に放出された FFA が末梢組織で利用されたと思われる。事実、血中では FFA が増加した。TG 分解が亢進した原因としては、血清の Insulin 値が減少し、Corticosterone 値が増加したことから、恐らくは副腎脂でのホルモン感受性リパーゼの活性化¹⁵⁾が考えられる。Insulin は細胞の Glucose uptake

を促進するが、又 c-AMP を介してリパーゼ活性を抑制する¹⁵⁾と言われる。又、Corticosterone は Glycerol のエステル化を妨げ、TG の合成を妨げる¹⁵⁾ことが知られている。

この時期の肥満マウスの肝では、PEPCK の活性が増加し、PK の活性が減少傾向を示したことから、肝では糖新生が亢進したものと考えられる。又、肝における Alanine からの糖生成が著明に増加したことは、恐らく Alanine aminotransferase の活性が亢進して

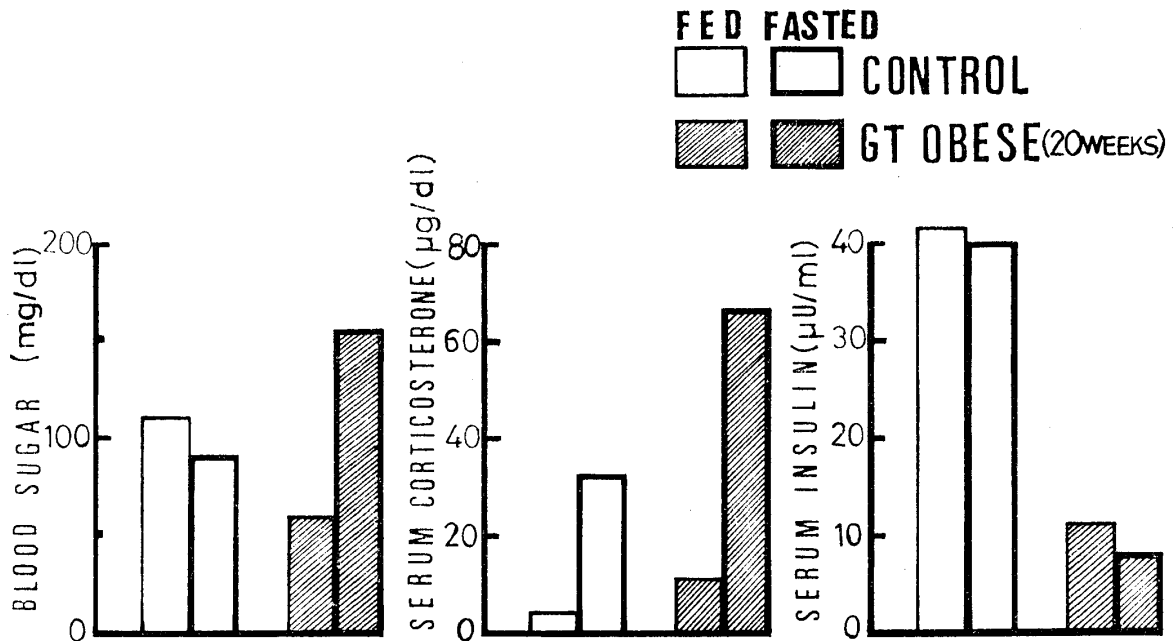


Fig. 6 The effect of fasting on serum levels of glucose, insulin and corticosterone in the control and GT obese mice at 20 weeks after GT injection.

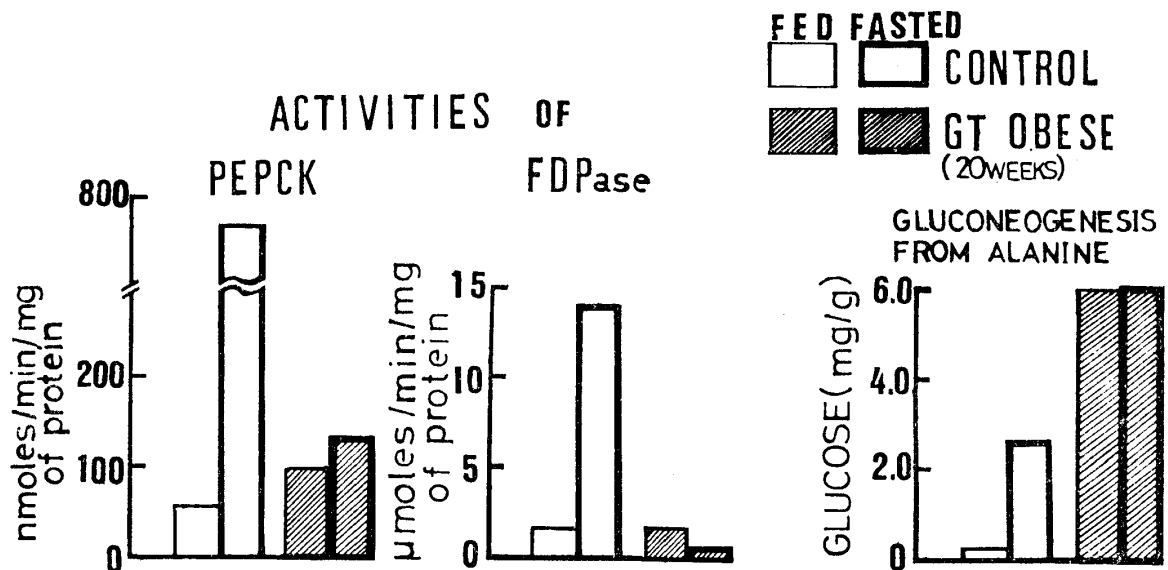


Fig. 7 The effect of fasting on hepatic PEPCK and FDPase activities, as well as hepatic gluconeogenesis from alanine in the control and GT obese mice at 20 weeks after GT injection.

Alanine からの糖新生が促進したことを示唆する。

又、肝では FFA が増加したが、FDPase の活性に変化がなかったことから、肝の FFA の増加はむしろ脂肪組織からの FFA の動員が増加した結果と思われる。FFA 或は、Acetyl CoA, 又は Citrate には解糖系鍵酵素の活性を阻害する^{17,18)}ことが知られており、従ってこの時期の肝における糖新生の亢進の一因として、脂肪組織における TG 分解の促進が考えられる。

この時期の肥満マウスでは、膵ラ氏島が小さくて、数も減少したが、ラ氏島 1 個当りの α -細胞の数が多かったことから、 α -細胞からの Glucagon の分泌が相対的に増加したものと推察される。

以上より、肥満の固定期では、マウスの体重増加が停滞し、それまでは Insulin の過剰分泌により TG 合成が優先的であったものが、Insulin 分泌の減少や Corticosterone の分泌増加、或は Glucagon 分泌の相対的増加などによって TG や蛋白質の分解が促進して FFA, 或はアミノ酸などの代謝産物が増加した結果、肝では糖新生が亢進したと思われる。

肥満の退行期 (GT 注射後 40 週) では、わずかであるが体重減少の傾向が認められた。副腎脂からの FFA の放出量が減少したことは、TG 合成が再び活発化したことを示唆する。事実、血清中の FFA 値が低値を示した。肥満の固定期では、血清 Insulin 値が一時的に減少したが、肥満の退行期では再び対照の値に近くまで増加したことから、脂肪組織では TG の合成が促進したことを示唆する。

この時期の肝では、Glucose uptake の増加と Glycogen と FFA 含有量の減少を認め、又、FDPase, G6Pase 及び PEPCK の活性の減少、或は減少傾向と PK の活性の増加を認めたことから、肝では糖新生が低下し、反対に解糖が活発化したことが考えられる。これには少なくとも Insulin 分泌の増加と Glucagon 分泌の減少が関係している様に思われる。

肥満の固定期では、恐らく Insulin の過剰分泌の結果、ラ氏島が疲労して縮小する傾向を示したが、肥満の退行期では、ラ氏島が再び肥大の傾向を示し、Insulin 分泌が増加すると共に、ラ氏島の α -細胞が減少して Glucagon 分泌の低下が示唆された。

なお、肥満の退行期では、体内の脂肪組織の重量が増加傾向を示したにもかかわらず、マウスの体重が減少傾向を示したのは、恐らく肥満の固定期に肝の糖新生が亢進した結果、体内で蛋白質の消耗を来たしたためではなからうかと推察される。

以上要するに、肥満の退行期では血清 Insulin 値が

増加し、脂肪組織での TG 合成が活発化すると同時に、肝では糖新生が低下して解糖が促進したことが考えられる。

20 週の GT 肥満マウスを 3 日間絶食させて、肝の糖代謝に及ぼす絶食の影響を調べた結果、正常マウスでは 3 日間の絶食により、肝の糖新生機序が亢進したのに対して、GT 肥満マウスでは肝の糖新生機序には殆ど影響が認められなかった。40 週の GT 肥満マウスを 3 日間絶食させた場合も、これとほぼ同様の結果が得られた。

Harper¹⁵⁾によれば、絶食状態ではまず、肝の Glycogen 分解が亢進して血糖値を正常に維持しようとするが、Glycogen が枯渇すると脂肪組織からの FFA, 或は筋肉からのアミノ酸から Glucose を生成してエネルギー源に利用する。しかし、GT 肥満マウスに比べて脂肪組織の少ない正常マウスの絶食では、肝におけるアミノ酸からの糖新生に依存する率が高く、従って肝の糖新生機序が亢進したと推察される。反対に、脂肪組織が著しく多い GT 肥満マウスの絶食では、恐らく Corticosterone 分泌の増加の結果、脂肪分解が亢進して FFA が増加し、これがエネルギー源に利用されるために糖新生の依存率が低く、肝では糖新生鍵酵素の生合成が促進しなかったものと推察される。

結 論

GT 肥満マウスの糖代謝異常を、特に肝の糖新生の面から究明する目的で、肝の糖新生鍵酵素である PEPCK, FDPase 及び G6Pase の活性、ならびに解糖系鍵酵素の PK の活性を測定し、又 *in vitro* で肝を incubate して Alanine からの Glucose 生成量を測定すると共に、肝と副腎脂の incubation 実験を行なった。更に、糖新生と関係のあるホルモンの分泌を知るために、血清中の Insulin と Corticosterone 値を測定すると共に、膵ラ氏島の α -細胞を組織学的に調べて Glucagon 分泌の異常を窺った。

1) 肥満の初期及び進行期 (GT 注射後 7 及び 14 週) の肥満マウスでは、過食と高血糖を伴い、体重が著しく増加し、肝及び副腎脂では Glucose からの FFA, 又は TG 合成が活発化する。それには少なくとも GT 注射による視床下部の VMH 障害に因る Insulin の過剰分泌が影響している様に思われた。しかし、この時期の肝では、未だ糖新生の亢進はみられなかった。

2) 肥満の固定期 (GT 注射後 20 週) の肥満マウスでは、体重の増加が停滞し、血清 Insulin 値が低下したが、Corticosterone や Glucagon の分泌が Insulin 分泌に対

して相対的に増加した結果、肝のPEPCKとG6Pase活性の増加及びPK活性の減少傾向を認め、又Alanineからの糖生成量も増加した。副腎脂ではTGの分解が促進し、又、肝ではFFAが増加すると共に糖新生が促進することが立証された。

3) 肥満の退行期(GT注射後40週)の肥満マウスでは、血清のInsulin値が再び増加し、副腎脂ではTGの合成が促進する傾向を示し、又肝では糖新生が低下して解糖が活発化する傾向を認めた。

4) GT肥満マウス(GT注射後20週と40週)を3日間絶食させると、肝の糖新生鍵酵素のPEPCKとFDPaseの活性は、糖新生の有、無にかかわらず、殆ど影響を受けなかったが、正常マウスの肝では両酵素の活性が著しく増加した。

本論文の概要は、第6回国際内分泌学会(メルボルン、1980年2月)で発表した。

謝 辞

Insulinの測定を担当して頂いた京都専売病院の森本昌親先生、ならびに玉田妙子氏に厚く感謝します。

参 考 文 献

- 1) Mayer, J.; Human nutrition; its physiological, medical and social aspects 291—294 (1972)
- 2) 説田 武, 飯田優子, 小笠原雅子, 松井美恵子, 水尾朋子, 藤川紀子, 伊藤淑子, 榎本佐代子, 岡本弘子, 森本昌親, 玉田妙子; 京都女子大学食物学会誌, 34, 1—10 (1979)
- 3) 説田 武, 清水康代, 清水久美子, 津田千恵子, 猶原裕子; 京都女子大学食物学会誌, 30, 5—14 (1975)
- 4) Nordlie, R.C. and Lardy H.A.; J.B.C., 238, 2259—2263 (1963)
- 5) 日本生化学会編; 生化学実験講座, 12, 113—114 (1975), 東京化学同人
- 6) 日本生化学会編; 生化学実験講座, 10, 392—413 (1975), 東京化学同人
- 7) McGilvery, R.W.; Methods in Enzymology, 2, 543—546 (1955)
- 8) 馬場茂明, 奥田 清, 編; 医化学実験法講座, 3 B, 臨床化学II, p. 200 (1973), 中山書店
- 9) Swanson, M.A.; Methods in Enzymology, 2, 541—543 (1955)
- 10) 日本生化学会編; 生化学実験講座, 12, 148—149 (1975), 東京化学同人
- 11) 山村雄一, 他編; 医化学実験法講座 3 B, 臨床化学分析II, 229—234 (1973), 中山書店
- 12) 岩井一義; 現代診断検査法大系—内分泌疾患(1), 117—118 (1964), 中山書店
- 13) 榎本 真, 他編; 実験動物の病理組織, 126—127 (1975), ソフトサイエンス社
- 14) 説田 武, 富宿敦子, 藤川紀子, 三河純子; 京都女子大学食物学会誌, 33, 1—11 (1978)
- 15) Harper, H.A.; 三浦義彰監訳, ハーパーの生化学, 原書15版 (1975), 丸善
- 16) Bloxham, D.P. and York, D.A.; Biochem. Soc. Trans., 4, 989—993 (1976)
- 17) Weber, G., Lea, M.A. and Stem, N.B.; Advan. Enzy. Regul., 5, p. 257 (1968)
- 18) 勝沼信彦, 他著; 代謝調節 (1973) 朝倉書店
- 19) 森本靖彦, 加藤弘己; 代謝, 13, 1211—1221 (1976)
- 20) 嶋津 孝; 代謝, 13, 741—749 (1976)