海産植物プランクトン *Porphyridium* sp. が産生する 多糖類の生物活性と多糖類産生に及ぼす 製鋼スラグの添加効果

坂本 紘子*・虎田 英之*・後藤 堅太郎*・中村 恵江*・中野 俊樹*・山口 敏康*
佐藤 実*・齋藤 忠夫*・谷口 旭*・横山 雄彦*²・菅野 信弘*²・長久 英三*²

Biological Activity of the Polysaccharide Produced by the Marine Phytoplankton *Porphyridium* sp. and
Additive Effect of Slag on the Polysaccharide Production

Hiroko SAKAMOTO, Hideyuki TORADA, Kentaro GOTO, Yasue NAKAMURA, Toshiki NAKANO, Toshiyasu YAMAGUCHI,
Minoru SATO, Tadao SAITO, Akira TANIGUCHI, Takehiko YOKOYAMA, Nobuhiro KAN-NO and Eizou NAGAHISA

Synopsis : Marine phytoplankton *Porphyridium* sp. produced and secreted a mucilaginous polysaccharide in the incubation medium. The polysaccharide production was enhanced by the addition of slag at proper concentration. This polysaccharide showed a moderate mitogen activity, similar to dextran sulfate but lower than concanavalin A and lipopolysaccharide. Polysaccharide was found to have antitumor activity against Sarcoma 180 inoculated in the peritoneal cavity of ddY mice.

Key words : polysaccharide; phytoplankton; biological activity; mitogen; antitumor; slag; *Porphyridium* sp..

1. 緒言

自然界には、細菌類、微細藻類、担子菌、植物など、多糖類を産生する生物が多く存在している。その中でも、地球表面の約70%を占める海を生活の場とする海洋微細藻類は種類も多く、その資源量は膨大なものになると推察される。これらは、太陽エネルギーを利用して海洋中で光合成を行い、無機物から有機物生産を行う基礎生産者であると共に、食物連鎖の出発点という海洋生態系での重要な役割を担っている。海洋微細藻類が生産する有機物量は地球上での一次生産量の3分の1から2分の1を担っているといわれ、バイオマス資源として有望視されている^{1,2)}。

単細胞紅藻は、最も単純な紅藻で、すべて *Porphyridiales* 目に属する。この目は8つの属に分かれているが、中でも一般的に知られているのは *Porphyridium*, *Rhodella*, *Rhodorus* である。これらの細胞はいずれも細胞外に分泌する多糖によって表面が覆われており、外側の多糖から培養液に溶け出してゆく。この多糖は、細胞を乾燥から守るためのゼラチン層を供給する機能を果たしているのではないかとわかってきた。つまり、この多糖層が細胞と環境との間の緩衝域となり、細胞が過酷な環境下に生き残る手助けとなっていると考えられている³⁾。一方で、藻類が産生する多糖類は栄養塩類や溶存有機物の吸着性を持ち、貧栄養の環境で生き残る術として多糖を役立てているとも考えら

れているが、多糖の役割についてはまだ完全に解明されていない⁴⁾。

Porphyridium は、淡水域から海水域、湿地表面まで幅広い環境下で生息している。このうち、大規模培養に用いられている藻種は主に淡水性の *P. aeruginum* と海水性の *P. cruentum* である。細胞外に分泌する多糖は硫酸化されており、増粘剤、安定剤、乳化剤など多様な工業用途の可能性から関心が寄せられている。また、大型海藻の硫酸化多糖で認められている血中コレステロール低下作用、血圧降下作用、抗腫瘍効果などの生物活性に関しても期待されている^{5,6)}。しかし、両種の産生する多糖については、構成糖の種類や構成比率が知られているだけで⁷⁾、その糖鎖構造はほとんど解明されていない。また、生物活性についての知見も他の海藻と比較して乏しい。本研究の目的のひとつは、この紅藻プランクトン *Porphyridium* species (以下 sp. と記す) が産生する多糖の性状、その糖鎖構造および生物活性を明らかにすることである。

鉄の精錬過程で大量に生じる製鋼スラグは、現在までのところ主に埋め立てに使われるのみであり、新規利用法が模索されている。そのひとつとして、スラグによる有用海産藻類の増殖が計画されている。スラグが海産藻類の生育に及ぼす影響には興味を持たれる。本研究では、紅藻植物プランクトン *Porphyridium* sp. の成長ならびに多糖産生に及ぼすスラグ添加の影響についても調べた。

平成14年8月19日受付 平成14年10月1日受理 (Received on Aug. 19, 2002; Accepted on Oct. 1, 2002)

* 東北大学大学院農学研究科 (Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, 1-1 Tsutsumidori-Amamiyamachi Aoba-ku Sendai 981-8555)

*2 北里大学水産学部 (School of Fisheries Sciences, Kitasato University)

2. 材料・方法

実験に供した *Porphyridium* sp. は、著者の一人中村が三陸沿岸の海水から分離したものである。

2.1 培養と多糖の産生

(1) プランクトンの培養

Porphyridium sp. は、Table 1 に示した松平-EDTA 培地⁸⁾で、20°C、白色蛍光灯連続照射下（約 80 μ E）においてメンブランフィルター濾過空気を通気しながら約 40 日間培養した。

(2) プランクトンの生育と多糖産生量の経日変化

Porphyridium sp. の生育は、培養液中のクロロフィル *a* 量の変化から推定した。クロロフィル *a* 量の測定は西沢らの蛍光分光法⁹⁾により行った。多糖の産生は培養液中の糖量より推定した。すなわち、採取した培養液を遠心分離（15000 rpm, 30 min）し、得られた上澄の糖量をフェノール硫酸法により求めた¹⁰⁾。

2.2 プランクトンの生育と多糖の産生に及ぼす製鋼スラグの添加効果

異なる培養液での *Porphyridium* sp. の増殖の変化ならびに産生多糖量の変化を測定するために、Table 1 に示す 6 つの培地を準備した。人工海水に硝酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウムを添加した培地をコントロールとし、更にコントロールと松平-EDTA 培地をベースとし、それぞれに濃度を変えたスラグを添加した。各培地での *Porphyridium* sp. の生育はクロロフィル *a* 量で、産生多糖量はフェノール硫酸法によりそれぞれ測定した。

2.3 多糖の分離・精製

Porphyridium sp. 培養液からの多糖の回収は以下のように行った。培養液 1 l を遠心分離（10000 rpm, 30 min）し、藻体を除去し、上澄液を 4°C で 5 l の純水（蒸留水）に対して透析した。純水を毎日交換しながら 3 日間透析し、完全に塩分を除去した。透析内液にその 4 倍量の 100% エタノールを攪拌しながらゆっくり加え、4°C で 3 時間放置した後、遠心分離（10000 rpm, 30 min）した。沈殿を少量の純水に溶解した後、4°C で 1 l 純水に対し 1 晩透析後、透析内液を凍結乾燥し、粗多糖を得た。

この粗多糖を DEAE-Sephacel イオン交換ゲルにより精製した。すなわち、粗多糖 50 mg を 300 ml の純水に溶解し、これに 50 ml の DEAE-Sephacel ゲルを加え、ガラス棒で穏やかに時々攪拌しながら 2 時間放置した。これをガラスフィルター（17-G3）上に移し、穏やかに吸引しながらゲルを 20 倍量（v/v）の純水で洗浄した。その後、10 倍量（v/v）の 2M NaCl 溶液で吸着物質を溶出した。この溶出液を 4°C で純水に対して 4 日間透析し、脱塩した。透析内液を凍結乾燥し、精製多糖を得た。

多糖の均一性は以下に述べるセルロースアセテート膜電気泳動法で調べた¹¹⁾。泳動前に、セルロースアセテート膜

Table 1. Composition of culture mediums.

Ctrl	Artificial sea water + NaNO ₃ + NaHCO ₃
Ctrl-S20	Ctrl + slag 20mg/ml
Ctrl-S30	Ctrl + slag 30mg/ml
M-EDTA	Matsudaira-EDTA medium*
M-EDTA-S20	M-EDTA + slag 20mg/ml
M-EDTA-S30	M-EDTA + slag 30mg/ml

* 8) Y. Nakamura, K. Ouchi and N. Fujita: Red Tides: Biology, Environmental Science, and Toxicology, ed. by T. Okaichi et al., Elsevier, New York (1989), 241.

（ADVANTEC SERECA-V, 長さ 5 cm）を 25% メタノールに浸し、更に 0.2 M 酢酸カルシウム溶液に 30 分間浸した後、泳動槽にセットした。多糖水溶液（0.5 mg/ml）をセルロースアセテート膜上にスポットし、0.2 M 酢酸カルシウム溶液を電解液として泳動電流 1 mA/cm 幅で 2 h 泳動した。泳動後のセルロースアセテート膜を 0.5% トルイジンブルー 3% 酢酸溶液に 10 分間浸漬して全体を染色し、ついで 3% 酢酸溶液で背景を脱色した。

2.4 多糖の一般的性状と糖組成

(1) 多糖の元素分析

精製多糖の元素分析は東北大学理学研究科有機微量元素分析室に依頼して行った。

(2) 多糖の分子量推定

精製多糖の分子量推定は、Asahipack GS-710 (7.6×500 mm) カラムを装着した GPC モードによる高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で行った。移動相に純水を用い、検出は示差屈折計（RI 検出器）で行った。あらかじめ合成プルラン（生化学工業、分子量 48000, 100000, 186000, 380000, 853000 Dalton）を用いて分子量推定のための検量線を作成した。

(3) 多糖の粘度

多糖の粘度は回転粘度計（Tokimec END, 東京）により測定した¹²⁾。測定条件は 25°C で糖濃度は 0.5%，コーンの種類は 1°34' とした。

(4) 糖組成と組成比

多糖の完全加水分解物について高速液体クロマトグラフィー（HPLC）に供し、構成糖の種類、組成比を調べた。多糖液（1 mg/ml）10 μ l に 8 M TFA 10 μ l を添加し、100°C、3 時間完全加水分解し、ついで N-アセチル化した後、ABEE（4-アミノ安息香酸エチルエステル）化し、HPLC に供した¹³⁾。HPLC の条件は次の通りである。カラム：ODS カラム（4.6×250 mm, 5 μ m）、移動相 A: 0.2 M ホウ酸カリウム緩衝液（pH 8.9）/アセトニトリル（93/7）、B: 0.02% TFA/アセトニトリル（50/50）、グラジエント条件：初期条件 100% A 液から 50 分後 20% A 液 80% B 液へとリニアグラジエント溶出、流速：1 ml/min、カラム温度：30°C、検出：蛍光検出器（Ex.305, Em.360）。

多糖の硫酸基含量はロジゾン酸法¹⁴⁾によって求めた。

Fig. 1. Change of chlorophyll-a content in the M-EDTA medium.

2・5 生物活性

(1) リンパ球幼若化活性

粗多糖のリンパ球幼若化活性は、テトラゾリウム塩 (MTT) アッセイ法により測定した¹⁵⁾。すなわち、マウスの脾臓を摘出し、PBS 溶液中で細断後、ステンメッシュで濾過した。濾液を遠心分離 (1000 rpm, 10 min) 後、FCS-RPMI-1640 培地で2度洗浄し、浮遊させた。あらかじめコンカナバリン A (Con.A) を用いて求めておいた幼若化活性最適細胞数 2×10^6 cell/ml に調製した。なお、細胞はチュルク液で染色し、検鏡した。調製した細胞浮遊液を 0.2 ml/ずつマイクロプレートのウェルに分注し、50, 100, 150 および 200 μ g/ml に調製した多糖 PBS 溶液を 10 μ l ずつそれぞれ添加した。対照のマイトジェンとして Con.A, リポ多糖 (LPS), デキストラン硫酸 Na およびワカメ (葉状部, 芽株) 多糖を用いた。CO₂ インキュベータ (5% CO₂, 37°C) で 72 時間培養後、MTT 粉末 0.025 g を RPMI-1640 培地に溶解し、これを各ウェルに 2 滴ずつ添加し、再度 CO₂ インキュベータで 3 時間培養した。培養後マイクロプレートごと遠心分離 (1600 rpm, 10 min) し、パスツールピペットで上澄を除き、0.2 ml のエタノールで溶解後、マイクロプレートリーダーで比色定量 (570 nm) し、活性化率を求めた。以上の操作は無菌的に行った。

(2) サルコーマ 180 腹水癌に対する抗腫瘍活性

Std: ddy マウス (6 週齢, 雄, 平均体重 28.7 g) を日本エスエルシー社より購入した。マウス腫瘍細胞サルコーマ 180 (以下 S-180) は東北大学加齢医学研究所附属医用細胞資源センターより入手した。マウスは飼料および飲水を自由に摂取させた。実験は対照区, 体重 kg あたり粗多糖 10 mg 投与区および 1 mg 投与区とし, 1 群 10 匹を用いた。S-180 はマウス腹腔内で 6 日間予備培養し, そこから採取した腫瘍細胞について 1 匹あたり 1×10^6 個を腹腔に移植した。腫瘍細胞移植後, 10 日間 1 日 1 回, 0.2 ml の滅菌生理食塩水 (扶桑薬品工業) に溶解した粗多糖をそれぞれ 10 mg および 1 mg/kg の濃度で腹腔内投与した。対照区には滅

Fig. 2. Change of polysaccharide in the M-EDTA medium.

菌生理食塩水のみを投与した。腫瘍細胞投与日を 0 日とし, 以後の生存数の経日変化を調べた。

3. 結果および考察

3・1 培養と多糖の産生

(1) プランクトンの培養

Porphyridium sp. の培養液は, 淡赤色から徐々に赤みを増し, 培養開始約 20 日目で濃赤色になった後, 徐々に赤みが薄れ, 約 30 日後には褐色となった。

(2) プランクトンの生育と多糖産生量の経日変化

クロロフィル *a* 量を測定した結果を Fig. 1 に示す。クロロフィル *a* 量は, 培養開始 4 日目から 6 日目にかけ急激に増加し, 7 日目以降の増加は緩くなり, 約 15 日目でピークに達し, その後減少していった。産生多糖量は Fig. 2 のように, クロロフィル *a* 量が減少し始めた 16 日頃を過ぎてからも増加し続け, 約 35 日目でピークに達した。

3・2 プランクトンの生育と多糖の産生に及ぼす製鋼スラグの添加効果

各種培地における *Porphyridium* sp. の増殖の変化を Fig. 3 に示す。これら 6 種類の培地において, ピーク時のクロロフィル *a* 量が最も高かったものは, 松平-EDTA 培地にス

ラグ 20 mg/l を添加した培地 (S20 松平) であった。また、スラグの添加量で比較すると、松平-EDTA 培地にスラグ 20 mg/l 添加したものは、松平-EDTA 培地より増殖が促進されたが、30 mg/l 添加したもの (S30 松平) は松平-EDTA 培地より増殖が抑制された。コントロール培地 (Ctrl) においても同様の結果が得られた。このように、スラグはある濃度までは *Porphyridium* sp. の増殖を促進するが、それを超えると増殖を抑制する傾向にあった。すなわち、*Porphyridium* sp. の成長には、スラグ添加の適正量が存在することが示唆された。

次に、産生多糖量の変化を Fig. 4 に示した。産生多糖量が最終的に最も大きかったものは、クロロフィル *a* 量と同様に、松平-EDTA 培地にスラグ 20 mg/l 添加したもの

(S20 松平) であった。しかし、クロロフィル *a* 量の変化で認められた、コントロール培地をベースとした培地と、松平-EDTA 培地をベースとした培地の間のはっきりとした差は、産生多糖量の変化において認められなかった。

そこで、産生多糖量をクロロフィル *a* 量あたりの多糖量に表して比較した (Fig. 5)。これは、産生多糖量の最大値をクロロフィル *a* 量の平均値で除した値である。その結果、S30 のように、クロロフィル *a* 量の値が小さいものの方が、クロロフィル *a* 量あたりの産生多糖量が多いことが分かった。すなわち、成長の悪いものが多くの多糖を産生する傾向にあった。*Porphyridium* sp. は、直径が約 5 μ m の球状を呈し、それらが体外に分泌する多糖によりお互いの細胞が密着しあい、ブドウ房状に集合していることが電子顕微鏡

Fig. 3. Change of chlorophyll-*a* content in various culture mediums.

Fig. 4. Change of polysaccharide content in various incubation mediums.

観察により確認されている。その産生多糖の役割は明らかではないが、ひとは細胞壁を欠く本種の体表を外部環境から保護する役割を果たしていると考えられている。一方で、藻類が産生する多糖類は、栄養塩類や溶存有機物の吸着性を持つとされ、貧栄養状態すなわち培養液内の栄養塩や溶存有機物が少ないものの方が、産生する多糖量がより多くなる現象と合致する。

3.3 多糖の分離・精製

粗多糖と精製多糖をセルロースアセテート膜電気泳動に供した結果を Fig. 6 に示した。粗多糖の泳動では、原点と陽極側へテーリングしながら泳動するバンドの2つのバンドが認められた。原点に認められるバンドは中性糖と、陽極側へ泳動するバンドは酸性糖と考えられる。酸性糖が示すテーリングは多糖の溶解性の低さと粘性の高さが原因と考えられる。一方、DEAE-Sephacel イオン交換ゲルにより精製回収した酸性多糖は、原点にバンドは認められず陽極側に単一のバンドを示し、テーリングも小さくなり、酸性糖のみが回収されていることが確認できた。

次に、スラグ添加培地から調製した多糖の電気泳動を Fig. 7 に示した。スラグ添加培地から調製した粗多糖は、松平-EDTA 培地から調製した粗多糖とほぼ同一のバンドを示した。このことから、スラグを培地に添加しても、産生する多糖の帯電性、すなわち硫酸基含量などには違いはないと思われる。

Fig. 5. Polysaccharide content per chlorophyll-a content in various culture medium.

3.4 多糖の一般的性状と糖組成

(1) 多糖の元素分析

Porphyridium sp. が産生する多糖は、炭素、水素、窒素および硫黄を含み、それらの割合は各々 31.4%, 5.5%, 0.9%, および 3.6% であった。また、ロジゾン酸法による硫酸基の定量結果から、この糖には硫酸基が約 10% 含まれており、硫黄はこの硫酸基に由来するものと思われる。スラグ添加培地から調製した多糖の元素組成には無添加培地のそれと差は認められなかった。

(2) 多糖の分子量推定

精製酸性多糖を HPLC に供したところ、分子量マーカーの最大値 853000 Dalton の溶出 (11.5 min) よりも早い 9 min にピークが認められた (Fig. 8)。そこで、分子量マーカーにより作成した分子量検量線に外挿して分子量を推定すると 600 万 Dalton となる。この結果はこれまでに報告されている *Porphyridium* sp. の産生多糖の推定分子量 700 万 Dalton¹⁶⁾ に近似しているが、今回の推定量は分子量マーカーの範囲を大きく超えており、広い範囲での直線性を確認していないことから、このものの分子量が 200 万 Dalton 以上であると推察するにとどまった。

(3) 多糖の粘度

Porphyridium sp. の酸性多糖の粘度は、103.7 cp であり、

Fig. 6. Electrophoresis pattern of polysaccharide of *Porphyridium* sp.

Fig. 7. Comparison of electrophoresis pattern of polysaccharides obtained from M-EDTA medium and slag added medium.

Fig. 8. Molecular mass estimation of polysaccharide of *Porphyridium* sp.

Fig. 9. HPLC analysis of sugar composition of polysaccharide of *Porphyridium* sp.

アルギン酸ナトリウム (12.8 cp), κ -カラギーナン (15.2 cp), およびアラビアゴム (<1.0 cp) と比べて著しく高かった。スラグ添加培地から調製した多糖の粘度は無添加培地のそれと差は認められなかった。

(4) 糖組成と組成比

酸性多糖の構成糖は、HPLC の分析結果からキシロース、ガラクトース、グルコースであることが確認され、クロマトグラム の面積比より求めた組成比はそれぞれ約 2:1:1 であった (Fig. 9)。このことから、*Porphyridium* sp. が産生する多糖の構成糖およびその組成比は、*P. cruentum* や *P. aeruginum* が産生する多糖とは異なることが明らかとなった (Table 2)¹⁷⁾。なお、スラグ添加培地から調製した多糖の糖組成比は無添加培地のそれと差は認められなかった。以上のことより、*Porphyridium* sp. が産生する多糖はスラグ添加による化学的、物理的な変化は生じないと思われた。

3・5 生物活性

(1) リンパ球幼若化活性

粗多糖のリンパ球幼若化活性化率は、3.22% (50 μ g/ml) から 4.09% (100 μ g/ml) の範囲にあった (Table 3)。この値は、硫酸化多糖の 1 種フコイダンを多く含むワカメ葉状部やワカメ芽株由来の多糖の活性化率の 2 分の 1 程度であるが、デキストラン硫酸の活性化率に近似していた。一方、マイトジェンの標準物質として使用されるコンカナバリン A (Con.A) や LPS と比較すると、濃度が互いに異なるものの、

Table 2. Sugar composition of polysaccharide of *Porphyridium* sp.¹⁷⁾

Sugar	<i>P. sp.</i>	<i>P. cruentum</i>	<i>P. aeruginum</i>
Xylose	2.0	2.4	4.0
Galactose	1.0	2.1	1.0
Glucose	1.0	1.0	1.0
Rhamnose			1.5
Glucuronic acid		1.2	2.0

Table 3. Mitogen activities of polysaccharides.

Polysaccharide mitogen	Concentration (μ g/ml)	Activation (%)
Wakame leaf	200.0	9.40 $\pm$ 0.19 ^{*1}
Wakame spore leaf	200.0	6.25 $\pm$ 0.34
<i>Porphyridium</i> sp.	50.0	3.22 $\pm$ 0.24
	100.0	4.09 $\pm$ 0.13
	150.0	3.90 $\pm$ 0.22
	200.0	3.83 $\pm$ 0.16
Con.A	4.0	12.08 $\pm$ 1.79
LPS ^{*2}	7.8	8.75 $\pm$ 0.13
Sodium dextran sulfate	200.0	4.76 $\pm$ 0.17

* Experimental condition: incubation: 5%CO₂, 37°C, 72h

cell number: 2.0×10^6 cell/ml

*1: mean $\pm$ SD(n=3)

*2: Originated in *E. coli* 026:B6 (Sigma)

Fig. 10. Survival rate of mice.

Porphyridium sp. の多糖はかなり低い値を示した。また、活性化率は多糖の添加量が 100 μ g/ml で最も高く、150 μ g/ml、200 μ g/ml と量が増えるに従ってやや低下した。これは、*Porphyridium* sp. の多糖が持つ化学的性質 (例えば、硫酸基による酸性化) または、物理的特性 (高分子量、高粘性) により、ある濃度までは活性化率を上げるが、それを超えると逆にリンパ球の幼弱化を妨げる作用があるのではないかと考えられる。

(2) サルコーマ 180 腹水癌に対する抗腫瘍活性

Porphyridium sp. の粗多糖の腹水癌に対する効果で、腹水癌の増殖によると考えられるマウスの体重増加は、多糖投与期間中は対照区に比べ、いずれの粗多糖投与区においても抑制されていた (データ省略)。しかし、その後は生存数が減少し比較が困難になった。

延命効果 (Fig.10) については、対照区の間延命日数 (10 匹中 5 匹が死亡した日) は 14.5 日、平均延命日数 (最終判定日 35 日目までに死亡した日数の平均) は 13.8 日で

あったが、これに対し粗多糖投与区の間延命日数では1 mg/kg区が16日、10 mg/kg区が12日と明確な延命効果は認められなかったが、平均延命日数は1 mg/kg区で22.9日、10 mg/kg区で17.1日と延命効果が認められた。また、1 mg/kg投与区では3匹、10 mg/kg区でも1匹が最終判定日35日目において生存していた。今回の実験で、腹水癌に対する抗腫瘍活性は、粗多糖投与量が10 mg/kgよりも、1 mg/kgの方が優れていた。このことは、多糖に適正投与量が存在することを示唆している。

4. まとめ

単細胞紅藻 *Porphyridium* sp. は細胞外に多量の多糖を分泌した。培養液へのある濃度のスラグの添加は多糖の産生量を増やした。スラグ添加による多糖の性状に変化は認められなかった。

Porphyridium sp. が産生する多糖は中性多糖と硫酸化された酸性多糖からなっていた。酸性多糖は分子量200万以上で、水に溶かすと強い粘性を与えた。酸性多糖の構成糖はキシロース、ガラクトース、グルコースが2:1:1の比率からなり、これまで報告されている *Porphyridiales* 目に属する藻類が産生する酸性多糖の構成糖とは異なっていた。この多糖はマウスを用いた実験で抗腫瘍活性を示したが、活性発現には適正な投与濃度があることが判明した。多糖は弱

いながらもマイトジェン活性を有しており、これが抗腫瘍活性と関わりがあると考えられた。

文 献

- 1) 鳥羽良明：海と地球環境, 日本海洋学会編, 東京大学出版会, 東京, (1991), 238.
- 2) M. Ohmori: *Kagaku-to-Seibutsu*, **40** (2002), 487.
- 3) S. Arad: *Algal Biotechnology*, ed. by T. Stadler *et al.*, Elsevier Applied Science, New York, (1988), 65.
- 4) Y. Yoshida: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **66** (2000), 395.
- 5) A. Ginzberg, M. Cohen, U. Sod-Moriah, S. Shany, A. Rosenshtrauch and S. Arad: *J. Appl. Phycol.*, **12** (2000), 325.
- 6) I. Dvir, R. Chayoth, U. Sod-Moriah, S. Shany, A. Nyska, A. H. Stark, Z. Madar and S. Arad: *Br. J. Nutr.*, **84** (2000), 469.
- 7) J. Heaney-Kieras and D. J. Chapman: *Carbohydr. Res.*, **53** (1976), 169.
- 8) Y. Nakamura, K. Ouchi and N. Fujita: *Red Tides: Biology, Environmental Science, and Toxicology*, ed. by T. Okaichi *et al.*, Elsevier, New York, (1989), 241.
- 9) 藤田善彦：藻類研究法, 西沢一俊, 千原光雄編, 共立出版, 東京, (1979), 400.
- 10) 大熊誠一：糖質の化学 (下), 山科郁男, 山川民夫, 鈴木 旺編, 東京化学同人, 東京, (1986), 370.
- 11) 瀬野信子：糖質の化学 (下), 山科郁男, 山川民夫, 鈴木 旺編, 東京化学同人, 東京, (1986), 362.
- 12) 松村 剛：糖質の化学 (下), 山科郁男, 山川民夫, 鈴木 旺編, 東京化学同人, 東京, (1986), 447.
- 13) S. Yasuno, K. Kokubo and M. Kamei: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63** (1999), 1353.
- 14) L. J. Silverstri: *Anal. Biochem.*, **123** (1982), 303.
- 15) T. Mosmann: *J. Immunol. Methods*, **5** (1984), 55.
- 16) M. Huleihel and S. Arad: *Anticancer Res.*, **21** (2001), 2073.
- 17) E. Percial and R. A. J. Foyl: *Carbohydr. Res.*, **72** (1979), 165.