

血清アルブミンの酸化機構の解明と酸化ストレス関連疾患への展開

安 楽 誠

Elucidation of the Mechanism Responsible for the Oxidation of Serum Albumin and Its Application in Treating Oxidative Stress-related Diseases

Makoto Anraku

Department of Physical Pharmaceutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Sojo University;
4-22-1 Ikeda, Nishi-ku, Kumamoto 860-0082, Japan.

(Received May 27, 2014)

Oxidative damage results in protein modification and is observed in numerous diseases. Human serum albumin (HSA), the most abundant protein in the plasma, exerts important antioxidant activities to prevent oxidative damage. This paper focuses on the characterization of chemical changes in HSA that are induced by oxidative damage, their relevance to human pathology, and the most recent advances in clinical applications. The antioxidant properties of HSA are largely dependent on Cys-34 and its contribution to the maintenance of intravascular homeostasis, including protecting the vascular endothelium under conditions related to oxidative stress. Recent studies have also evaluated the susceptibility of other important amino acid residues to exposure to free radicals. The findings suggest that a redox change in HSA is related to the oxidation of several amino acid residues by different oxidants. On the other hand, the ratio of the oxidized form to the normal form of albumin (HMA/HNA), which is a function of the redox states of Cys-34, could serve as a useful marker for evaluating systemic redox states, which would be useful for the evaluation of disease progression and therapeutic efficacy. This review provides new insights into our current understanding of the mechanism of HSA oxidation, based on *in vitro* and *in vivo* studies.

Key words—human serum albumin; oxidation; cysteine-34; antioxidant; redox

1. はじめに

血清中、最も高濃度に存在するヒト血清アルブミン (human serum albumin; HSA) は、活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) により HSA 自身が酸化されると同時に他の生体内物質に対して、抗酸化物質としての役割を果たしているが、その多くは、リガンド輸送担体としての介在的な役割と言える。^{1,2)} 例えば、生体内のラジカルや活性酸素の増加が、LDL-コレステロールの酸化や血管内皮細胞の傷害を介して動脈硬化を進展させることが知られているが、³⁾ この生体内に生じたラジカルに対して、HSA が担体として運搬する尿酸やビリルビンが捕捉剤として働き、ラジカル連鎖反応を抑制する。また HSA が減少した病態下では、ラジカルの処理や

抗酸化作用が滞り、動脈硬化が進展する可能性が考えられる。さらに、HSA の低下により、遊離脂肪酸の血小板凝集抑制作用やマクロファージの活性化に影響がみられ、動脈硬化が進展する可能性が示唆されている。⁴⁾ このような介在的な役割を果たす一方、HSA 分子上の 34 番目に唯一遊離状態で存在するシステイン残基 (Cys-34) が酸化還元作用を有していることが明らかにされている。⁵⁾ 事実、Era らは、Asahipak GS-502N という特殊なカラムを用いることにより、SH 基にいかなる物質も結合していない human mercapto-albumin (HMA・還元型) と血液中のグルタチオンや Cys などと共有結合している human non-mercapto-albumin (HNA・酸化型) を分離することに成功している。⁶⁾ われわれも、このカラムを利用して、酸化型/還元型比 (HNA/HMA: アルブミン酸化度) が、加齢により顕著に増加すること、また様々な病態時、特に、腎透析患者で顕著に増加することを確認している。⁷⁾ これらの結果に基づき、生体内の酸化還元緩衝能は還元型

The author declares no conflict of interest.

崇城大学薬学部製剤学研究室 (〒860-0082 熊本市西区池田 4-22-1)

e-mail: anraku@ph.sojo-u.ac.jp

本総説は、平成 25 年度日本薬学会九州支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

及び酸化型の HSA のバランスによって保たれていることを明らかにしてきた。⁸⁾ しかし、このアルブミン酸化度の増加が生体に及ぼす影響や、この現象が、Cys-34 のみの酸化で説明できるのか否かについては、数多くの不明な点が残されている。

そこで本稿では、HSA の Cys-34 の酸化還元の制御を始めとした酸化機構の詳細を明らかにするため、腎透析患者血清酸化 HSA について上述のカラムを用い HPLC プロファイルにより検討するとともに、これら患者血清から精製した酸化 HSA の修飾・構造・機能特性を、*in vitro* で作製した酸化 HSA と比較検討してきた結果について紹介する。さらに、Cys-34 の酸化還元状態を分離する HPLC システムを利用した抗酸化能を加味した新たな治療及び予防戦略について、われわれの知見を中心に述べる。

2. 血清アルブミンの酸化機構の解明

2-1. 腎障害時における血清酸化 HSA 分子種の変動 HSA に唯一遊離状態で存在している Cys-34 は、生体内においてリガンドのスカルベンジャーあるいはリザーバーとしての機能が活発に議論され、Cys-34 の生理学的意義が注目されている。^{1-3,9)} そこで、HSA の Cys-34 の酸化還元状態を分離する HPLC システムを利用して、健常時及び病態時、特に腎透析患者での酸化 HSA の変動を、HMA, HNA を定量し、その比を酸化 HSA の指標 (Oxidized albumin ratio : アルブミン酸化度) として比較検討した。その結果、健常人に比較した腎透析患者のアルブミン酸化度の上昇が観察され、HSA の酸化が確認された。現在、透析中の患者において、貧血を防ぐために鉄剤が同時投与されている。通常、腎疾患を始めとする病態時では活性酸素による生体内の酸化が健常人より上昇することが数多く報告されていることから、^{7,10,11)} 鉄剤を投与することにより、貧血を防ぐ一方で、この鉄剤が触媒となり、生体内の酸化を促進し、他の疾患を併発する可能性が考えられている。そこで、腎透析患者間での鉄剤投与の有無によるアルブミン酸化度の違いを比較検討した結果、腎透析患者における鉄剤の静脈内併用投与は、貧血を防ぐ一方、HSA の酸化をさらに促進させた (Fig. 1)。また、血漿カルボニル含量測定から、従来報告されている Cys-34 のみならず、塩基性アミノ酸あるいは芳香環アミノ酸残基も

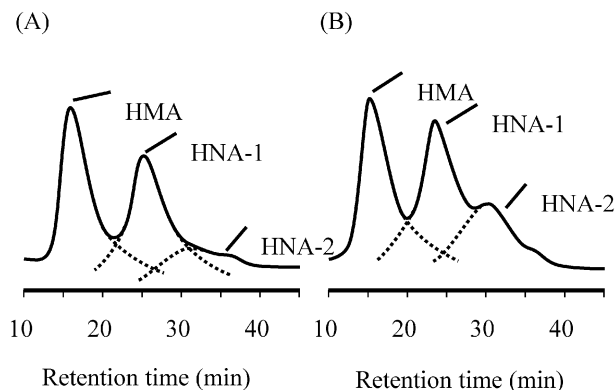


Fig. 1. HPLC Profile of Serum Albumin from HD Patients with or without Intravenous Iron Administration (IVIR)

Five microliter aliquots of serum from HD patients with or without IVIR were subjected to HPLC analysis using a Shodex Asahipak ES-502N column. (A) A representative tracing of HPLC profiles of serum albumin from HD patients without IVIR. (B) A representative tracing of HPLC profile of serum albumin from patients treated with IVIR.⁷⁾

酸化されていることが明らかになった。さらに、SDS-PAGE 上において、カルボニル基に特異的に結合する抗体を用いて各血漿中タンパク質の酸化度を比較検討した結果、HSA が特異的に酸化されていることが明らかになり、HSA の酸化が慢性腎不全時に発生する活性酸素に対して、抗酸化能効果を示すことにより、血漿中の恒常性を維持している可能性が強く示唆された。すなわち、病態時での酸化的ストレスによる血清中酸化機構として、HSA が酸化されることにより、血清中の恒常性維持に大きな役割を果たしていることが示唆され、腎透析患者への鉄剤投与設計について、1つの問題提起を示すことができた。⁷⁾

2-2. *In vitro* 及び *in vivo* における酸化 HSA の構造・機能特性 先の腎透析患者の結果から、Cys-34 の酸化が確認された一方、カルボニル含量の増大から、*in vitro* で報告されている種々の酸化過程が、実際に、*in vivo* でも生じている可能性が高いものと推察される。そこで、血清中で発生すると考えられているいくつかの活性酸素種を用いて *in vitro* 条件下で酸化 HSA を調製して、その修



安南 誠

崇城大学薬学部製剤学研究室・准教授。1998 年熊本大学薬学部卒業。2003 年熊本大学大学院薬学研究科博士後期課程修了 (博士 (薬学) 取得)。熊本大学薬学部特任助手、福山大学薬学部講師を経て 2011 年より現職。

飾・構造及び機能特性について腎透析患者血液から単離精製した HSA と比較検討した。その結果、過酸化水素を利用した HSA の酸化初期段階の評価系において、Cys-34 及び Met 残基が選択的に酸化されているにもかかわらず、構造、機能や動態特性の大きな変化はみられなかった。^{12,13)} 事実、部位特異的変異法を駆使した Cys-34 をアラニンに置換した C34A 及び Met 6 残基すべてをアラニンに置換した六重変異体 (6 point) の抗酸化作用を比較検討した結果、Cys-34 は多様な活性酸素種に対して優れたスカベンジ能を有するユニバーサルな抗酸化残基として機能しており、他方、Met は補助的な役割を果たしている可能性が強く示唆された。¹⁴⁾ また、変異による抗酸化能以外の機能や構造に大きな変化は認められなかったことから、Cys-34 及び Met 残基が酸化されることにより HSA の構造・機能を維持している可能性が示唆された。さらに金属触媒や次亜塩素酸を利用した HSA の酸化亢進段階の評価系において、HSA 分子上の主な薬物結合部位であるサイト I 及びサイト II の中で、サイト II に存在する塩基性アミノ酸残基、特に Arg-410 が酸化され、立体構造の変化が起こり、サイト II の機能特性であるエステラーゼ様活性やリガンド結合能の著しい低下が観察され、酸化反応の進行に伴い、生体内半減期の促進と肝特異的取り込みの増大が観察された (Table 1)。^{9,15-18)} 一方、血液透析 (hemodialysis; HD) 患者血清から単離精製した HD-HSA は血中の HSA の酸化状態を反映するという興味深い現

象が、HPLC 解析を用いた Cys-34 の酸化状態の検討結果から明らかにされた。この HD-HSA において、先の *in vitro* で作製された酸化 HSA と同様カルボニルの増大が認められ、さらに、カルボキシメチルリジン (CML) やイミダゾロンなどの advanced glycation endproducts (AGE) 化が亢進していることが明らかとなった。また HD-HSA の抗酸化能を評価し、健康人から単離した HSA (normal-HSA) と比較検討した結果、HD-HSA の抗酸化能は、normal-HSA と比べ有意に低下していることが観察された。さらに、血液透析患者における心血管系合併症 (cardiovascular disease; CVD) 発症との関連が示唆される好中球活性化に対する単離 HSA の影響を検討した結果、HD-HSA は好中球を活性化し、好中球による活性酸素産生亢進を誘導することが明らかとなった [Fig. 2(A)]。加えて、この好中球の活性化と単離 HSA の CML 化との間には良好な相関関係が得られた [Fig. 2(B)]。以上の結果から、血液透析患者の血中における HSA の修飾が、抗酸化能の低下のみならず、好中球の活性酸素産生亢進を誘導することで、透析時の合併症である CVD 発症の一要因となる可能性が示唆され、この好中球活性化に HSA の CML 修飾の重要性が考えられた。^{18,19)}

これまでの *in vitro*, *in vivo* の結果より、含硫黄アミノ酸残基、特に Cys-34 は酸化ストレスに対する防御系として長期にわたり機能することより、サイト II に存在する Arg-410 のような HSA の消失過

Table 1. Oxidation of Albumin and Its Effect on High Affinity Binding and Elimination

Mode of oxidation	Indicator of oxidation	Used ligand	Change	Elimination ($T_{1/2}$)	Reference
Ascorbic acid/ FeCl_2 Chloramine T H_2O_2	Carbonyl groups	Warfarin (site I) Ketoprofen (site II)	\pm \pm, \downarrow^a	\pm, \downarrow^a	12
Ascorbic acid/ FeCl_2	Carbonyl groups	Warfarin (site I) Ketoprofen (site II)	\pm \downarrow	\downarrow	17
Chloramine T	Carbonyl groups Fraction of HNA-2	Warfarin (site I) Ketoprofen (site II)	\pm, \downarrow^b	\pm, \downarrow^b	13
Hemodialysis	Carbonyl groups HNA/HMA ratio	Warfarin (site I) Ketoprofen (site II)	\downarrow \downarrow	\pm	18
Cystine	HNA-1	L-tryptophan Cefazoline Verapamil	\downarrow \downarrow $\downarrow\downarrow$	—	9

^a Depending on the type of oxidant. ^b Depending on the concentration of the oxidant.

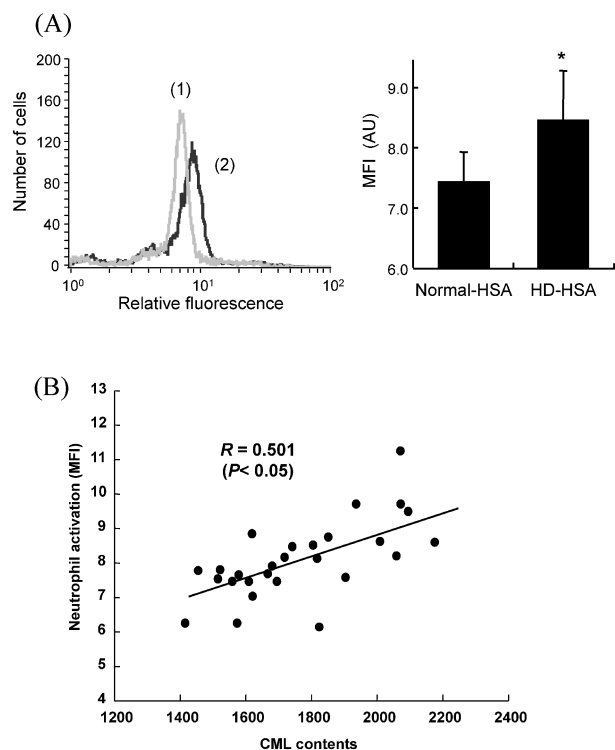


Fig. 2. ROS Production by Neutrophils Incubated with Purified HSA (A) and Relationship between Neutrophil Activation and CML-modified HSA (B)

(1) Normal-HSA purified from normal subjects ($n=10$). (2) HD-HSA purified from HD patients ($n=20$). * $p < 0.05$, compared with Normal-HSA.^{18,19)}

程において鍵を握る残基を酸化から保護しているのではないかと推察される。したがって、腎不全を始めとした多くの酸化ストレス疾患においてアルブミン酸化度を低値に保つことは、酸化ストレスを軽減するだけでなく、血管内での恒常性の維持や CVD などの合併症予防に重要であることが示された (Fig. 3)。今後、アルブミン酸化度をできるだけ低く保つような治療薬あるいは治療方法の開発が、血液透析患者の予後改善につながるかもしれない。^{20,21)}

3. Cys-34 の酸化還元状態を酸化ストレスマーカーとする新たな治療及び予防指針

Cys-34 の酸化還元状態の変動が生体内酸化ストレスを評価する上で重要な指標であることが明らかになり、この HPLC システムを利用した抗酸化能を加味した新たな治療及び予防戦略についていくつか紹介する。

3-1. 酸化ストレスを加味した透析患者における鉄剤の新たな投与設計 血液透析患者における腎性貧血に対して、鉄剤の静脈内投与が臨床現場で汎用されている。この鉄剤の静脈内投与は、貧血を防

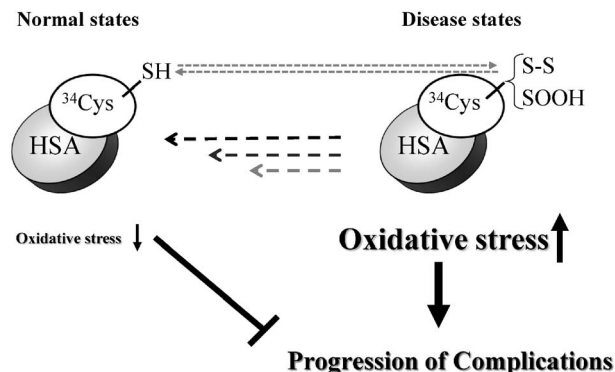


Fig. 3. Proposed Mechanism for the Contribution of Cys-34 to the Maintenance of Homeostasis in Blood

The treatments where the levels of Cys-34 oxidation are minimized at low levels in several diseases may be beneficial for preventing the onset and progression of serious complications, which affects the prognosis for survival.^{20,21)}

ぐ一方で、鉄を触媒とした Fenton 反応により生体内の酸化をさらに促進させる可能性があるが、これまで鉄剤の投与指針はなく漫然と使用する傾向にあった。しかしながら、近年、鉄投与による酸化亢進が報告されてきていることなどから、2004 年日本透析医学会により鉄剤使用のガイドラインが作成され、鉄剤の投与は鉄剤 40 mg を週 3 回 1 ヶ月、ないしは週 1 回 3 ヶ月間投与することが推奨されている。そこで、上記 2 例の投与スケジュールに沿って鉄剤を投与した血液透析患者の血清を用い、酸化ストレス変動について比較検討した。その結果、両投与群とも貧血の改善の指標であるヘモグロビンの改善度に有意な差は観察されなかったものの、週 1 回 3 ヶ月間投与が酸化亢進の少ない鉄剤投与方法であることが明らかになった (Fig. 4)。この結果に基づき、現在、臨床現場では、週 1 回 3 ヶ月間静脈内投与が推奨されている。²²⁾

3-2. 尿毒素吸着剤クレメジン®の抗酸化作用を利用した多面的治療戦略 酸化ストレスを抑制することが、腎不全の進行並びに CVD の発症予防につながると期待されているが、これら病態時の酸化ストレスを取り除く有効な手段はなく、新たな抗酸化剤の開発が望まれている。尿毒素吸着剤クレメジン®は腎不全時に体内に蓄積する種々の尿毒症物質を吸着し、腎不全の進行や透析導入を遅延する薬剤として透析導入前の腎不全患者に用いられている。中でも、クレメジン®により効率よく吸着される尿毒症物質の 1 つにインドキシル硫酸 (indoxyl sul-

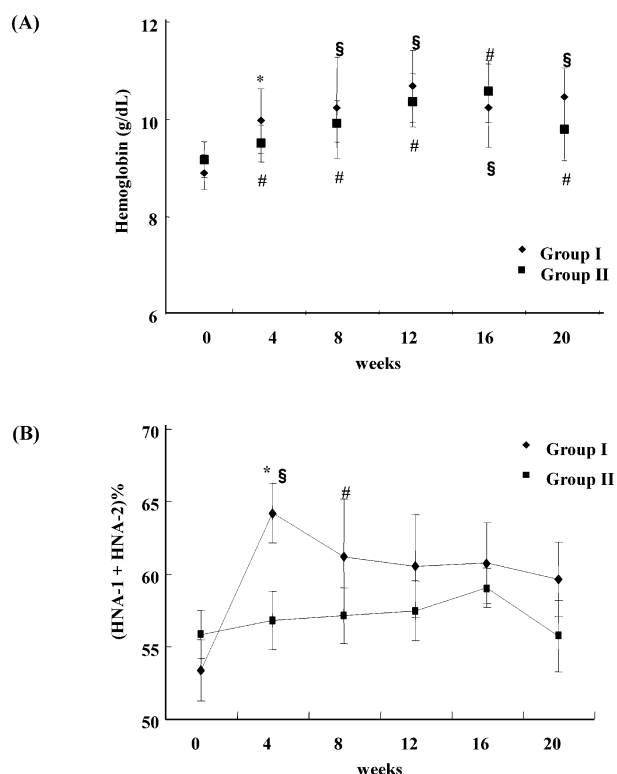


Fig. 4. Effect of IVIR Frequencies on Hemoglobin (A) and Oxidized Serum Albumin Ratio (B)

Higher IVIR frequency group (group I: 40 mg of iron 3 times a week for 4 w, ◆). Lower IVIR frequency group (group II: 40 mg of iron once a week for 12 w, ■). * $p < 0.05$ as compared with 0 w (group II), # $p < 0.01$ as compared with 0 w (group I), and \$ $p < 0.01$ as compared with 0 w (group II). Values are expressed as mean \pm S.E.; $n = 11$ for each patient group.²²⁾

fate; IS) がある。近年 IS が ROS の産生に関与することが腎の細胞を用いた研究により報告されている。もし IS が腎のみでなく血中でも酸化ストレスを引き起こすのであれば、クレメジン®が腎不全患者における有効な抗酸化剤となり得る可能性が十分に考えられることから、われわれはクレメジン®の抗酸化作用の解明を目的に、腎不全患者及び慢性腎不全モデルラット [chronic renal failure (CRF) ラット] を用いて酸化ストレスに及ぼすクレメジン®投与の影響を検討した。その結果、慢性腎不全患者において、クレメジン®投与群では非投与群に比べて酸化ストレスの指標であるアルブミン酸化度の有意な抑制が観察された (Fig. 5)。さらに、CRF ラットを用いた検討においても同様の結果が得られた。さらに、CRF ラットにおける血中 IS 濃度とアルブミン酸化度の間に良好な相関性が認められたことから、慢性腎不全における血中酸化ストレスの増大に対し、IS の蓄積が重要な役割を果たしている

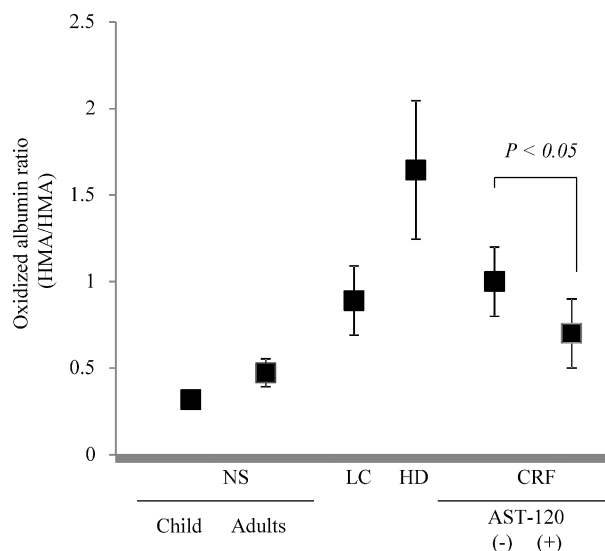


Fig. 5. Change in Oxidized Serum Albumin Ratio in Healthy Subjects and Patients

Estimated by Ref. (22–27). NS; normal subjects, LC; liver cirrhosis, HD; hemodialysis, CRF; chronic renal failure. Values for each albumin fraction (f(HMA), f(HNA-1), and f(HNA-2)) were estimated by dividing the area for each fraction by the total area corresponding to serum albumin. AST-120 (Kremezin®), an oral carbonaceous adsorbent that has been used in pre-dialysis reduced the oxidized albumin ratio in CRF patients.

可能性が示唆された。^{22–27)} この興味深い結果に基づき、臨床現場でのクレメジン®の更なる有効利用が期待される。

3-3. 機能性食品キトサンの抗酸化作用を利用した多角的補完代替療法 これまでの検討は治療を主としたものであったが、病態を発症する以前の未病の状態、いわゆる酸化ストレス軽減を目的とした予防戦略をたてることができれば、患者の QOL また医療経済的にも非常に有効であると考えられる。そこで、われわれは、脂質代謝改善作用を有するキトサンの多面的効果である抗酸化能に着目し、CRF モデルラットを用いてキトサンの抗酸化及び腎保護効果について検討した。その結果、キトサンは、腎不全の進行を抑制するだけではなく、抗酸化作用も併せ持つことが強く示唆され、IS 濃度変化と酸化ストレスの指標であるアルブミン酸化度の変化に良好な相関も観察された。この現象はキトサンによる消化管内尿毒症物質の吸着作用が、血中の抗酸化作用を惹起したことに起因するものと考えられた (Fig. 6)。^{28–31)}

4. おわりに

本研究では、HSA の Cys-34 を中心とした酸化機構を解明することにより、血管内における酸化スト

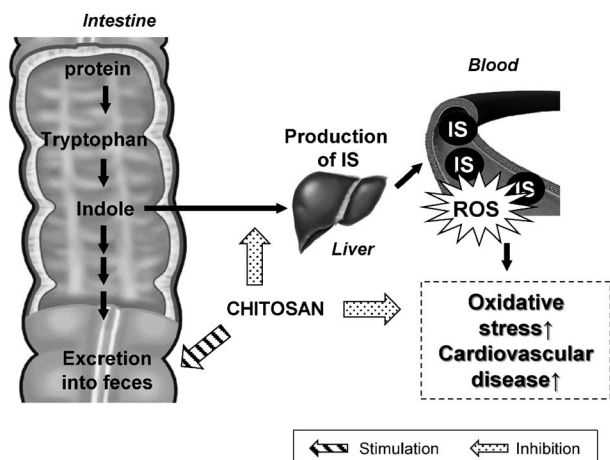


Fig. 6. Proposed Mechanism by Which Chitosan Inhibits Oxidative Stress in the Systemic Circulation of CRF Rats

レス制御の一端を明らかにした。また、HSAの酸化に重要な役割を果たすCys-34の酸化還元状態を酸化ストレスマーカーとする新たな治療及び予防指針は、今後の多くの病態の治療及び予防に大きく貢献するものと期待される。

謝辞 本研究は、崇城大学薬学部教授（熊本大学薬学部名誉教授）、小田切優樹先生のご指導の下で行ったものであり心から感謝申し上げます。また、有益なご助言とご助力を賜りました熊本大学薬学部、丸山 徹教授、福山大学薬学部、富田久夫教授、崇城大学薬学部、平山文俊教授に厚く御礼申し上げます。貴重なご助言を賜りました熊本大学医学部、北村健一郎准教授に厚く御礼申し上げます。さらに多大なご協力を頂きました熊本大学薬学部、渡邊博志准教授、門脇大介准教授、末永綾香講師、異島 優助教、熊本赤十字病院、下石和樹博士、崇城大学薬学部、上釜兼人教授、庵原大輔助教を始め、卒業生及び在校生の皆様に深く感謝致します。

REFERENCES

- 1) Peters T. Jr., "All about Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications," Academic Press, San Diego, 1996.
- 2) "Human Serum Albumin," ed. by Otagiri M., Chuang V. T., Maruyama T., Kragh-Hansen U., Sojo University Publishing Center, Kumamoto, 2013.
- 3) Halliwell B., *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 569–571 (1988).

- 4) Phillips A., Shaper A. G., Whincup P. H., *Lancet*, **335**, 858 (1990).
- 5) Roche M., Rondeau P., Singh N. R., Tarnus E., Bourdon E., *FEBS Lett.*, **582**, 1783–1787 (2008).
- 6) Era S., Kuwata K., Imai H., Nakamura K., Hayashi T., Sogami M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1247**, 12–16 (1995).
- 7) Anraku M., Kitamura K., Shinohara A., Adachi M., Suenaga A., Maruyama T., Miyana K., Miyoshi T., Shiraishi N., Nonoguchi H., Otagiri M., Tomita K., *Kidney Int.*, **66**, 841–848 (2004).
- 8) Soejima A., Kaneda F., Manno S., Matsuzawa N., Kouji H., Nagasawa T., Era S., Takakuwa Y., *Am. J. Kidney Dis.*, **39**, 1040–1046 (2002).
- 9) Kawakami A., Kubota K., Yamada N., Tagami U., Takehana K., Sonaka I., Suzuki E., Hirayama K., *FEBS J.*, **273**, 3346–3357 (2006).
- 10) Tovbin D., Mazor D., Vorobiov M., Chaimovitz C., Meyerstein N., *Am. J. Kidney Dis.*, **40**, 1005–1012 (2002).
- 11) Himmelfarb J., McMonagle E., *Kidney Int.*, **60**, 358–363 (2001).
- 12) Anraku M., Yamasaki K., Maruyama T., Kragh-Hansen U., Otagiri M., *Pharm. Res.*, **18**, 632–639 (2001).
- 13) Anraku M., Kragh-Hansen U., Kawai K., Maruyama T., Yamasaki Y., Takakura Y., Otagiri M., *Pharm. Res.*, **20**, 684–692 (2003).
- 14) Iwao Y., Ishima Y., Yamada J., Noguchi T., Kragh-Hansen U., Mera K., Honda D., Suenaga A., Maruyama T., Otagiri M., *IUBMB Life*, **64**, 450–454 (2012).
- 15) Iwao Y., Anraku M., Hiraie K., Kawai K., Nakajou K., Kai T., Suenaga A., Otagiri M., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **21**, 140–146 (2006).
- 16) Iwao Y., Anraku M., Yamasaki K., Kragh-Hansen U., Kawai K., Maruyama T., Otagiri M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1764**, 743–749 (2006).
- 17) Meucci E., Mordente A., Martorana G. E., *J. Biol. Chem.*, **266**, 4692–4699 (1991).
- 18) Mera K., Anraku M., Kitamura K., Nakajou K., Maruyama T., Otagiri M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **334**, 1322–1328 (2005).

- 19) Mera K., Anraku M., Kitamura K., Nakajou K., Maruyama T., Tomita K., Otagiri M., *Hypertens. Res.*, **28**, 973–980 (2005).
- 20) Anraku M., Takeuchi K., Watanabe H., Kadowaki D., Kitamura K., Tomita K., Kuniyasu A., Suenaga A., Maruyama T., Otagiri M., *J. Pharm. Sci.*, **100**, 3968–3976 (2011).
- 21) Anraku M., Chuang V. T., Maruyama T., Otagiri M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1830**, 5465–5472 (2013).
- 22) Anraku M., Kitamura K., Shintomo R., Takeuchi K., Ikeda H., Nagano J., Ko T., Mera K., Tomita K., Otagiri M., *Clin. Biochem.*, **41**, 1168–1174 (2008).
- 23) Shimoishi K., Anraku M., Kitamura K., Tasaki Y., Taguchi K., Hashimoto M., Fukunaga E., Maruyama T., Otagiri M., *Pharm. Res.*, **24**, 1283–1289 (2007).
- 24) Oetl K., Marsche G., *Methods Enzymol.*, **474**, 181–195 (2010).
- 25) Kadota K., Yui Y., Hattori R., Murohara Y., Kawai C., *Jpn. Circ. J.*, **55**, 937–941 (1991).
- 26) Imai H., Hayashi T., Negawa T., Nakamura K., Tomida M., Koda K., Tajima T., Koda Y., Suda K., Era S., *Jpn. J. Physiol.*, **52**, 135–140 (2002).
- 27) Bar-Or D., Heyborne K. D., Bar-Or R., Rael L. T., Winkler J. V., Navot D., *Prenat. Diagn.*, **25**, 245–249 (2005).
- 28) Anraku M., Kabashima M., Namura H., Maruyama T., Otagiri M., Gebicki J. M., Furutani N., Tomida H., *Int. J. Biol. Macromol.*, **43**, 159–164 (2008).
- 29) Anraku M., Fujii T., Furutani N., Kadowaki D., Maruyama T., Otagiri M., Gebicki J. M., Tomida H., *Food Chem. Toxicol.*, **47**, 104–109 (2009).
- 30) Anraku M., Fujii T., Kondo Y., Kojima E., Hata T., Tabuchi N., Tsuchiya D., Goromaru T., Tsutsumi H., Kadowaki D., Maruyama T., Otagiri M., Tomida H., *Carbohydr. Poly.*, **83**, 501–505 (2011).
- 31) Anraku M., Tomida H., Michihara A., Tsuchiya D., Iohara D., Maezaki Y., Uekama K., Maruyama T., Otagiri M., Hirayama F., *Carbohydr. Polym.*, **89**, 302–304 (2012).