

# マコンブの細胞壁面分から調製した硫酸化多糖の性状

青木 央, 宮崎 俊一

## Characterization of Sulfated Polysaccharide Prepared from the Cell Wall Fraction of Ma-kombu (*Laminaria japonica*)

Hiroshi Aoki and Syun-ichi Miyazaki

### 要 旨

粉碎した乾燥マコンブ（真昆布, *Laminaria japonica*）から酢酸・過酸化水素水・硫酸混合溶液を用いて細胞壁面分を抽出し、三酸化硫黄・TMA 錯体を使用して硫酸化多糖を調製した。この多糖は、ウロン酸とグルコースを等モル含み、硫酸基を単糖当り0.6~1.3個含む、分子量6000~8000以上の水溶性多糖であった。さらに、この多糖の生理活性を検討した結果、抗血液凝固活性は、26~29単位/mgあり、正常ヒト細胞の成長を抑制したり、増殖させる効果はなく、血管内皮細胞に対しては延命させることが示唆された。

### 1. 緒 言

硫酸化多糖には、抗血液凝固活性が主に活用されているヘパリンや軟骨、血管壁、結合組織などに含まれるコンドロイチン硫酸といわれる物質があり医薬品として利用されている。硫酸基をもつ多糖類は、海藻にも含まれており、フコースという糖を含有するフコイダンは硫酸化多糖の一種である。硫酸化多糖を硫酸多糖と表現することもあるが、本研究では、褐藻類の代表的な種類であるコンブの成分から硫酸基の導入を化学的に行い調製しているので硫酸化多糖と表現する。硫酸化多糖はガンの転移抑制効果やウイルスの感染抑制効果ならびに胃潰瘍をおこすヘリコバクターピロリとの関係でも様々な研究が進行しているが<sup>1,2)</sup>、このような目的での実際の利用となると血中濃度の維持が難しいと言う問題があり、経口投与による効果が確認されることが望まれている。さらに、多糖の合成が難しいということもある。多くの硫酸化多糖の研究において、海藻や藻類などから抽出する天然物に頼らざるを得ない側面がある。

一方、コンブの中でもマコンブ（真昆布, *Laminaria japonica*）は促成栽培技術の成功によっ

て、養殖生産がおこなわれており、おおむね安定した生産体制が、当センターのある渡島半島東部を中心として出来ている。マコンブが製品となるまでに、品質維持のため生じる間引のコンブや規格外品、加工残などは十分食品加工にも利用可能であるが、より一層の付加価値の高い利用法が開発されることにより、産業の振興になるものとして、先述した硫酸化多糖に注目して本研究を始めた。その結果、昆布からエキスを除いた残り成分の多くをしめる食物繊維分、すなわち細胞壁構成多糖を用いて硫酸化多糖を調製することが比較的容易に可能となり、その性状について一定の知見を得ることができた。

また、ヘパリン、コンドロイチン硫酸などの硫酸化多糖は、生体内での分布が細胞の成長する環境と密接に関わっており、さらに、サイトカインなどと言われるような細胞の成長かわる因子と相互作用があるほか、細胞同士の接触（細胞接着）に対してもかわりがあるとして注目され、現在、生化学分野の先端的な研究といえる。このような理由で、当センターでもマコンブから硫酸化多糖を調製するだけでなく、ヒト由来の正常細胞を用

いて、多糖の細胞への作用について若干の検討をおこなったので報告する。

## 2. 研究方法

### 2.1 食物繊維の分画

マコンブの食物繊維についてはサウスゲートの変法とも呼ばれている細胞分画法によった<sup>3)</sup>。乾燥したマコンブ (*Laminaria japonica*, 尾札部産, 北海道渡島支庁) をクロスビータミルで粉砕し, 60メッシュ以下の粉末10gを50mMTrisHCl (pH7.5) 溶液で石英砂とともに摩砕し, 水溶性の物質を除去した後, アセトンとクロロホルム・メタノール (1 : 1) 混合溶液を用いて脂溶性物質を除去した。さらに, デオキシコール酸とアクチナーゼEを用いて蛋白質を除去した後, 50mMリン酸緩衝液 (pH6.8), 50mMEDTA 溶液で90℃, 20分間加熱してペクチン質画分を抽出した。この画分はエタノール沈殿として回収, 凍結乾燥後に重量を測定した。つぎに, 残さを17.5% NaOHの強アルカリ性溶液に懸濁して, ヘミセルロース画分を1晩室温に放置して抽出した。この上清を酢酸で中和して沈殿画分と上清画分に分画し, 透析して凍結乾燥後, 重量を測定した。最後に残さを冷72%硫酸で可溶化し, 希釈後加熱, 加水分解された重量を残留物の重量から算出しセルロース質画分とした。

### 2.2 硫酸化多糖の調製

マコンブの細胞壁画分はアセトリシスと呼ばれている分析方法から工夫して考案した。酢酸・過酸化水素水・硫酸 (100 : 20 : 3) の混合溶液を過剰に用い, 乾燥コンブ末を70℃, 1時間, ドラフト内で加熱湿分解処理した。ガラスフィルターで吸引濾過して捕捉, 水洗後, アセトン乾燥させ細胞壁画分を得た後, 光学顕微鏡での観察と収量の測定をおこなった。一方, 4℃に冷やした濃硫酸をあらかじめ湿重量を求めておいた前述アセトン乾燥前の細胞壁画分に徐々に加えて, 黒化を避けながら72%硫酸溶液として可溶化した。その可溶化溶液に100%エタノールを加えて70%エタノール水溶液とすることで, 沈殿させた。さらに, 透析により精製した後, 凍結乾燥し, 精製した細胞壁画分を得た。精製した細胞壁画分100mgを3mlのDMSOに一度溶解, さらに3mlDMFを加え,

さらに各3mlのDMSOとDMFにて溶解性を高め, 500mg三酸化硫黄・TMA錯体 (アルドリッチ製) を加え, 3時間室温で硫酸化を行い, 加水した後, 透析チューブ (スペクトラポア1) に封入, 蒸留水5ℓに対して数回透析脱塩した。透析液の遊離の硫酸イオンが0.04mM以下になったところで終了した。この方法で25mlの硫酸化多糖溶液を得た。

### 2.3 硫酸化多糖の性状分析

構成単糖の分析は, リン酸活性化シリカゲル薄層クロマトグラフィーを行った<sup>4)</sup>。2MとなるようTFAを加えて, 窒素ガスによりアンプルに封入し, 120℃, 1時間加水分解を行い分析試料とした。TLC板は, シリカゲル60 (メルク社製, 20cm×20cm) を用い, 0.5MNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-25%メタノール溶液で一晩, 展開処理後, 用いた。展開溶液は, イソプロパノール・アセトン・0.1M乳酸 (2 : 2 : 1) 混合溶液, 発色剤は, ナフトレゾルシン・リン酸を用いた。比較のため, アルギン酸ナトリウム (和光純薬製) とデンプンの混合溶液を同様に加水分解した試料とウロン酸の代表としてグルクロン酸を同時に分析した。

さらにメタノリシスにより構成糖をTMS誘導体として, キャピラリーGC-MS (HP5870MS D-HP5890GC, カラム: DB-1 (60m×0.25mmID, 0.25μm) 昇温条件: 140℃, 2min-40℃/min-240℃ 8min, Inj250℃, Trf260℃, MSD: SCANモード, 50~650amu.) により分析した<sup>5)</sup>。内部標準物質としてイノシトールを用いた。

ウロン酸と中性糖の分析は, カルバゾール硫酸法とフェノール硫酸法さらに全有機炭素分析 (Beckman Industrial 915-B) を併用し求めた。硫酸基の含有量はTFAを加えて2Mとし, 窒素ガス下アンプルに封入し, 90℃で40分間加水分解した。ロータリーエバポレータで残留TFAを除去した後, 遊離した硫酸基をイオンクロマトグラフ (東ソー, HLC-601, カラムTSKgel IC-Anion-PW (4.6mmID×5cm), 流速1.2ml/min, 溶離液IC-Anion-A) で定量した。

代表的な他の硫酸化多糖との比較をセルロースアセテート膜電気泳動法により行った<sup>6)</sup>。泳動装置はEC-240 (アドバンテック東洋(株)製), 泳動膜はSELLECA-V (22cm×6cm) を用いた。泳動

相には、ペロナール緩衝液 (pH8.6, I = 0.06, 泳動条件10mA/22cm, 15min) と0.1MHCl (泳動条件22mA/22cm, 75min) を用いた。染色液は0.5%トルイジンブルー-3.0%酢酸溶液を用いた。分子量は透析とゲルクロマトグラフィー (Bio-Gel P-2, 2.5cm ID × 100cm) の結果から推定した。

抗血液凝固活性はフィブリノーゲンに対するトロンビンの活性阻害により求めた<sup>7)</sup>。ヘパリン (コダック社製, 160units/mg) を標準として、フィブリノーゲン, アンチトロンピンは和光純薬製を用いた。

### 2.4 正常ヒト細胞に対する効果の測定

繊維芽細胞は、包皮組織由来繊維芽細胞を5% FCS含有 MCDB104培地で培養する正常ヒト繊維芽細胞培養キット (株森永生科学研究所) を用いた。成長因子は、酸性繊維芽細胞成長因子 (aFGF, 和光純薬製No.061-02851) を用いた。血管内皮細胞<sup>8)</sup> は、さい帯静脈由来血管内皮細胞を5% FCS含有 MCDB104培地で培養する正常ヒト血管内皮細胞培養キット (株森永生科学研究所) を用いた。成長因子は、ウシエンドセリアルグロースファクター (ECGF, ベーリンガーマンハイム製No.1033476) を用いた。正常細胞を各試験区, 2個の25cm<sup>2</sup>の培養フラスコで培養し, 2~3日ごとに培地を交換した。細胞数は, トリプシン消化後, トーマの血球計算板で算出した。

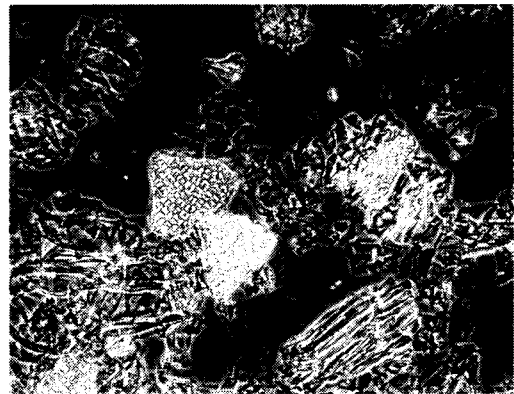
### 3. 実験結果

マコブの食物繊維分の含有量は合計で27.4 g あった (表1)。硫酸化多糖を調製する時に行われた酸分解で得られるコンブ末は, 光学顕微鏡で観察すると写真1のように細胞壁面分と形状が認められた。写真のアセトン乾燥した細胞壁面分は100g当り23g程度得られる。続いて, 硫酸化多糖として調製のため可溶化, 精製を進めた場合, 乾燥コンブ末 (60メッシュ以下) 10 g から調製されるエタノール精製乾燥多糖は, 500mg弱 (約5%) であった。この多糖は, 全て硫酸化することができた。

表1. 原料となった乾燥マコブの食物繊維の分析

分画区分	含有量 (g/100g)	
ペクチン質画分 <sup>1)</sup>	15.8	
ヘミセルロース画分 <sup>2)</sup>	上清	2.0
	沈殿	0.2
セルロース質画分 <sup>3)</sup>	9.4	
合計	27.4	

抽出条件: 1) 50mM EDTA-リン酸緩衝 (pH6.8), 100°C, 20min  
 2) 17.5%NaOH 抽出液の酢酸中和沈殿物と上清  
 3) 72%硫酸可溶化物



0.1mm

写真1 酢酸・過酸化水素水・硫酸混合溶液による分解で得られたマコブの細胞壁面分の観察

酢酸・過酸化水素水・硫酸混合溶液 (100:20:3) 70°C, 1時間加熱分解処理, 写真倍率150倍

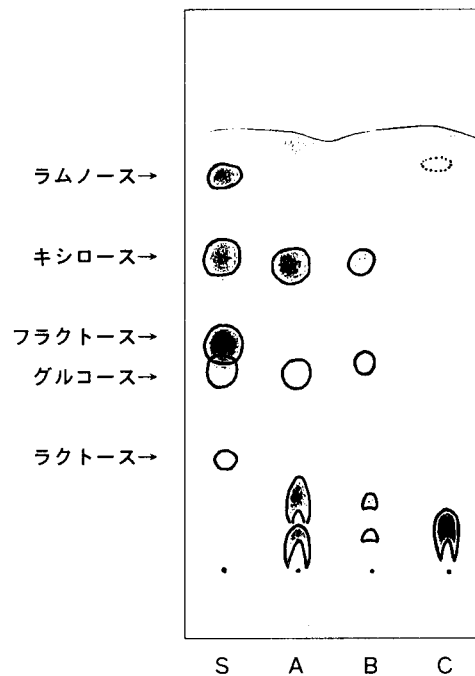


図1 TLCによるマコブ調整硫酸化多糖の構成単糖の分析

S: 標準品, A: マコブ調整硫酸化多糖加水分解物, B: デンプンとアルギン酸 Na の混合溶液の加水分解物, C: グルコン酸標準品 (ナカライテスク製) 展開溶液: イソプロパノール・アセトン・0.1M 乳酸 (2:2:1) 混合溶液, 発色剤: ナフトレゾルシン・リン酸

この細胞壁成分より調製された硫酸化多糖の構成単糖をTLCで分析した結果を図1に示した。グルコースの他に紫青色の別のスポットがあることが確認された。この発色剤では酸性多糖がこのような発色をするのでウロン酸があることがわかり、同時に泳動したグルクロン酸によっても確認できた。また、アルギン酸由来のウロン酸であることが予測された。

メタノリシスにより分析した構成単糖のガスクロマトグラフィーを図2に示した。クロマトグラフには、3本の大きなピークが認められ(図2. A)、最初の大きなピーク溶出時間23.6分は、ウロン酸であった。そのマスパターンを図2. Bに示した。近傍の小さなピーク溶出時間23.8分と近傍他4本もウロン酸が由来であった。溶出時間27~28分に2本ピークを生じたのは、グルコースであった。そのマスパターンを図2. Cに示した。

中性糖とウロン酸の構成比は、比色法の結果か

ら、中性糖が44wt%でウロン酸が56wt%と求められ、全有機炭素分析と先のCG-MS分析の結果と一致した。イオンクロマトグラフィーは、比較的弱い分解で硫酸基を外し、分析するのであるが、このときのクロマトグラフを図3に示した。硫酸イオンが検出され、これにより硫酸基の含有量を推定すると構成単糖あたり0.6~1.3個となった。

セルロールアセテート膜電気泳動法による分析結果を図4に示した。ベロナール緩衝液を用いた場合は、単一バンドとして観察され、また、塩酸を用いた場合は、やや広がりのあるバンドを形成した。分子量は透析膜の分画分子量から6000~8000以上あると推定された。またこの多糖は濾過滅菌が可能で、比色法で見る滅菌前後での濃度減少は認められなかった。さらに、この多糖の抗凝固活性は26~29units/mgであった。表2にマコンブ調製硫酸化多糖の性状をまとめた。

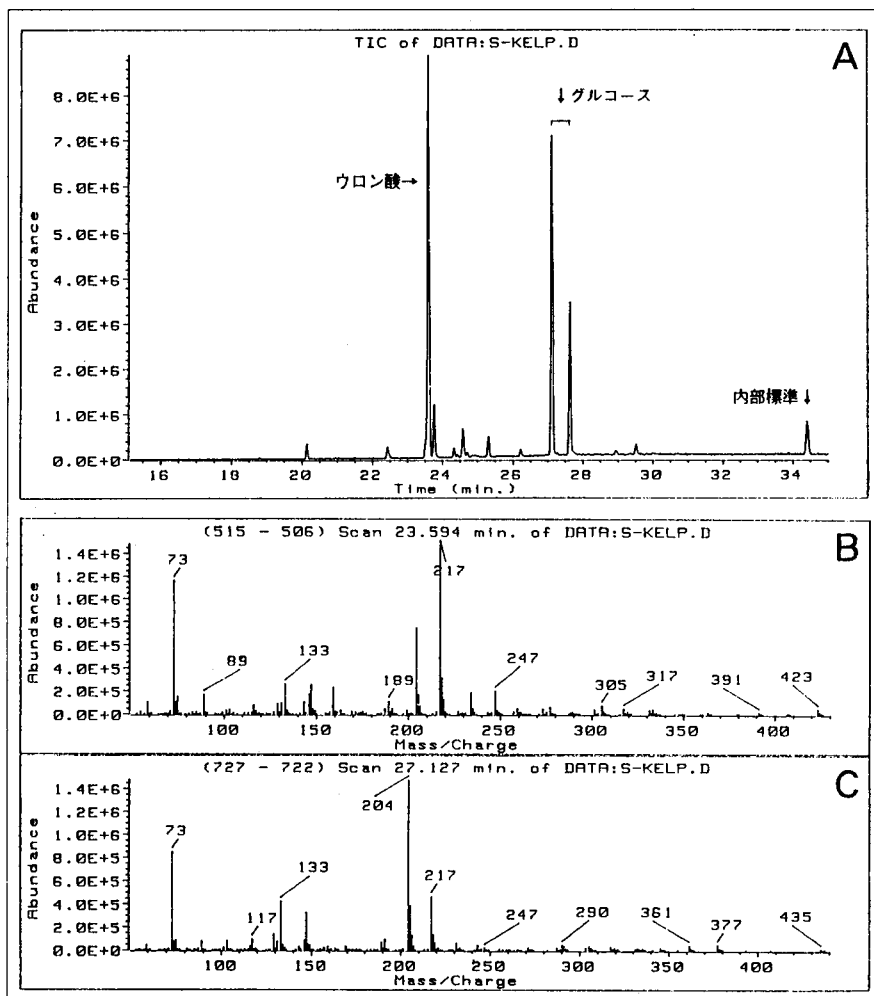


図2 メタノリシスによるマコンブ調整硫酸化多糖 TMS 誘導体の GC-MS 分析

A : トータルイオンクロマトグラフ (HP 5870 MSD-HP 5890 GC, カラム: DB-1 (60m×0.25mm ID, 0.25μm) 昇温条件: 140°C 2 min-40°C/min・240°C 8 min, Inj 250°C, Trf 260°C, MSD: SCAN モード50~650amu.) 内部標準物質: イノシトール, B : ウロン酸のメインピーク (23.6分) のマスパターン, C : グルコースのメインピーク (27.1分) のマスパターン

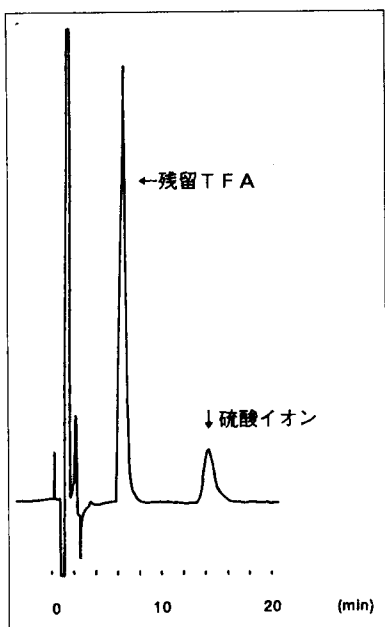


図3 マコンブより調整した硫酸化多糖から TFA 加水分解により脱離させた硫酸イオンの分析

カラム：TSKgel IC-Anion-PW (4.6mm ID×5 cm)，流速1.2ml，カラム温度30℃，溶離液：IC-Anion-A，装置：HLC-601 (東ソー製)

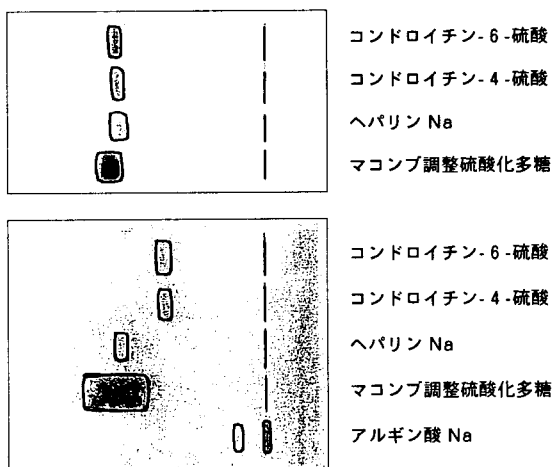


図4 マコンブ調整硫酸化多糖のセルロースアセテート膜電気泳動

上段：ベロナール緩衝液 (pH8.6, I=0.06) 10mA/22cm, 15分間，  
下段：0.1MHC, 22mA/22cm, 75分間，染色液：トルイジンブルー酢酸溶液

表2. マコンブの細胞壁画分より調整した硫酸化多糖の性状

中性糖 <sup>1)</sup>	ウロン酸 <sup>1)</sup>	分子量 <sup>2)</sup>	硫酸基 <sup>3)</sup>	抗凝固活性 <sup>4)</sup>
wt%	wt%		base/suger	units/mg
44	56	6000~ 8000以上	0.6~1.3	26~29

1) フェノール硫酸法, カルバゾール硫酸法, 全有機炭素分析法  
2) 透析法, ゲルクロマトグラフィー 3) イオンクロマトグラフィー  
4) フィブリノーゲンに対するトロンビン活性阻害

正常ヒト繊維芽細胞の場合の成長の影響を調べた結果を表3に示した。継代培養操作1日後の繊維芽細胞は、完全に付着したような状態においてマコンブの硫酸化多糖を0.14 μg/ml添加すると、やや増殖の割合が鈍るが、ほぼ順調に成長した。一方、継代直後の細胞に添加した場合は、細胞数が減少し、4.8日で半減する緩やかな割合であった。また、細胞内に顆粒状の組織が発達することが認められた。(写真2)

正常ヒト血管内皮細胞での結果を表4に示した。成長因子5 μg/mlとヘパリン10 μg/mlを添加したものは正常に増殖した。2日間で細胞数が2倍に増える割合であった。一方、無添加の場合は細胞数が1.2日で半数に減少する割合であった。このような系において、マコンブより合成した硫酸化多糖を12 μg/mlを添加した場合、成長因子の添加がない環境で、細胞数が半数に減少するのに1.9日という結果を得ることができた。細胞の形態は写真3の示すように正常であった。

表3. 正常ヒト繊維芽細胞の成長への影響

a) 継代後1日培養して硫酸化多糖を添加した場合

	培養前 cells/5 ml	培養後 cells/5 ml	培養日数 days	倍加日数 days
無添加	1.0×10 <sup>5</sup>	2.3×10 <sup>6</sup>	9	2.0
添加 <sup>1)</sup>	1.0×10 <sup>5</sup>	8.5×10 <sup>5</sup>	9	2.0

b) 継代と同時に硫酸化多糖を添加した場合

	培養前 cells/5 ml	培養後 cells/5 ml	培養日数 days	倍加日数 days
無添加	9.6×10 <sup>4</sup>	8.8×10 <sup>5</sup>	6	1.9
添加 <sup>1)</sup>	9.6×10 <sup>4</sup>	4.0×10 <sup>4</sup>	6	-4.8

1) マコンブ調整硫酸化多糖の0.14 μg/ml

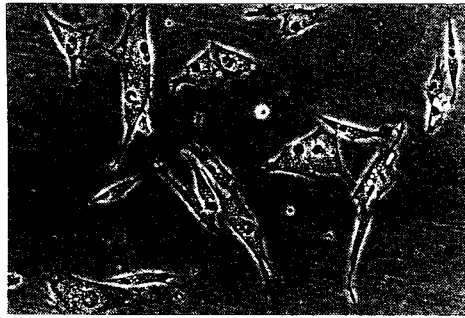
表4. 正常ヒト血管内皮細胞の成長への影響

	培養前 cells/5 ml	培養後 cells/5 ml	培養日数 days	倍加日数 days
無添加	6.0×10 <sup>4</sup>	5.7×10 <sup>3</sup>	4	-1.2
通常 <sup>1)</sup>	6.0×10 <sup>4</sup>	2.4×10 <sup>3</sup>	4	2.0
添加 <sup>2)</sup>	6.0×10 <sup>4</sup>	1.4×10 <sup>4</sup>	4	-1.9

1) 成長因子 (ECGS) 5 μg/ml, ヘパリン 5 μg/ml  
2) マコンブ調整硫酸化多糖のみ12 μg/ml



a) 継代後1日培養して硫酸化多糖を添加した場合



b) 継代と同時に硫酸化多糖を添加した場合

写真2 正常ヒト繊維芽細胞の観察

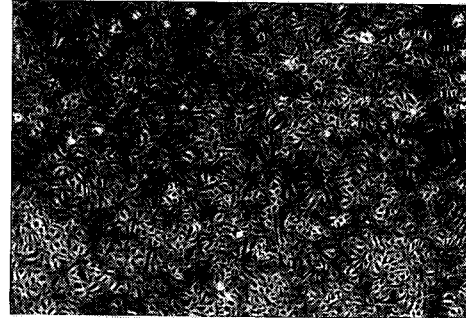
#### 4. 考 察

コンブにはガラクトロン酸は含まれていないので、表1のペクチン質画分とは、あくまでも前述の抽出条件で得られる画分とすべきものである<sup>9)</sup>。セルロース質画分は細胞壁構成糖として知られている。この結果は、四訂食品分析成分表に掲載の値と矛盾するように見えるが、食品分析表の糖質は差し引き計算によるみなし分析であることがこのような結果の違いを生じる大きな原因になると思われた。

マコンブの食物繊維分である細胞壁には、セルロースだけでなく、ウロン酸を含むヘテロ多糖の化学構造であることが示された。酢酸-過酸化水素水-硫酸混合溶液を用いて得られる細胞壁画分は、硫酸化を行わない状態では、加水分解に対して耐性をしめすこと、サウスゲートの変法により分画されたそれぞれの食物繊維分の分析において、通常のメタノリシスによる加水分解が充分おこなわれたか検討の余地があることなどを考慮して、本文中にデータをしめさなかったが、それぞれの食物繊維画分の構成単糖についてCG-MSによる分析の結果、フコースは、ヘミセルロース上清画分に抽出され、その含有量は、単糖として23%程度であった。ペクチン質画分にも7%程度あった。また、セルロース質画分はグルコースが62%、



a) 無添加



b) 通常<sup>1)</sup>



c) 添 加<sup>2)</sup>

写真3 正常ヒト血管内皮細胞の観察

- 1) 成長因子 (ECGS) 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , ヘパリン 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$
- 2) マコンブ調整硫酸化多糖のみ12  $\mu\text{g}/\text{ml}$

グルクロン酸として定量された成分が29%あった。ペクチン質画分は、グルクロン酸として24%、ガラクトロン酸として36%の他にマンニトールとして定量された成分が19%あった。この結果からも推察されるように、酢酸-過酸化水素-硫酸混合溶液を用いた方法では、フコースが検出されないこと、マンニトールとして定量される成分があることなど成分の類似性、及び収量から、食物繊維分の主にセルロース画分とペクチン質画分の中間の性質を抽出する簡便な抽出方法といえた。

この画分は冷72%硫酸により可溶化されることにより硫酸化多糖としての利用が可能になるとともに、可溶化、エタノール精製、透析などの調製工程を経ることにより、マンニトールと見られる成分は検出されなくなり、成分は、よりセルロー

ス質画分といわれる細胞壁構成物質に近くなると考えられた。そして、その骨格構造を構成している単糖は、グルコースとウロン酸類のグルロン酸とマンヌロン酸であって構成モル比は1:1と推定された。ウロン酸は、コントロールとして、アルギン酸とでんぷんを混合したサンプルの加水分解物を泳動している TLC の結果ともよく一致し、また、アルギン酸を単独でメタノリシスにより CG-MS で同様に分析した結果と硫酸化多糖のウロン酸の部分のデータは、一致していたので、既にアルギン酸の構成単糖で良く知られたグルロン酸やマンヌロン酸であると推定された。そして、セルロースアセテート膜電気泳動の実験で、ベロナール緩衝液を泳動相に用いた場合の結果より、この硫酸化多糖は単一成分であることがわかる。以上の結果は、コンブの細胞壁がグルコースとウロン酸を含むヘテロ多糖であることを示していると考えられ、コンブがいわゆるセルラーゼにより簡単に分解されない事実と矛盾しない。また、アルギナーゼとして強力な精製酵素がみあたらないことにも説明がつく。

セルロースアセテート膜電気泳動の結果の中で、塩酸を泳動相に用いた場合には多糖の硫酸化の程度を表すとされていることから<sup>10)</sup>、この硫酸化多糖には、バンドの広がりや認められるので非特異的に硫酸化が行われているといえた。イオンクロマトグラフィーの結果より算出すると、単糖1分子にたいして0.6~1.3分子程度の硫酸基を含むと言う結果を得ているが、コンドロイチン硫酸は単糖2分子に対して1分子の硫酸基が付いている多糖であり、ヘパリンは単糖2分子に3分子の硫酸基をもつ、このことから平均すると単糖1分子にたいして1分子弱程度の硫酸基が導入されているということになるのではないかと思う。

分子量についてはゲルクロマトグラフィーによる予備試験でもオリゴ糖クラスの高糖は生成していなかった。

抗凝固活性を示す硫酸化多糖の代表であるヘパリンは、その活性が140~170ユニット/mgある。調製された硫酸化多糖は、N-硫酸を持たないO-硫酸だけの構造をしていると考えられるので、抗凝固活性の結果は、その活性が多糖骨格の化学構造よりもN-硫酸にあることを支持する内容であったといえる。しかし、この点については、鎖長お

よび分子形状などについても考察する余地が十分にある<sup>11)</sup>。この硫酸化多糖は、N-硫酸を持たないいわゆる植物性の硫酸化多糖として今までにない試料と言えるので、他の動物由来硫酸化多糖の生理活性研究用の比較対照試料としても有用であると思われる。

正常ヒト繊維芽細胞を用いた実験結果の追試で、14 µg/ml, 1.4 µg/mlにおいても完全付着した繊維芽細胞には、いわゆる細胞刺殺性を認めなかったことや、継代操作直後の添加は、トリプシン処理により細胞膜の表層の構造が変化していることが主な原因で、表3のように大きく結果に差が出たと解釈される。しかし、濃度が比較的低くてもこのような変化が起ることは、この硫酸化多糖が細胞接着に対して大きな影響を及ぼす性質を持っているのではないかということが推察できた。

一方、血管内皮細胞は、血液と直接接している細胞であり、毛細血管を構成しているので、コンブを食品化学から検討するうえで、種々の細胞の中でも血管内皮細胞を研究対象とすることに大いに興味を持って良いと考えられる。実験の結果では、血管内皮細胞に対しては、細胞を延命させる効果があったという内容であった。細胞を死滅させるような毒性もなく、逆に過剰の増殖をもたらすようなこともないと考えられた。この理由については、まだ検討が重ねられるべき点ではあるが、血管形成に硫酸化多糖が関係している報告があること<sup>12)</sup>、また、褐藻類には、元来、いくらかの硫酸化多糖が含まれていて、その薬理などの研究もいくつか報告されていることもあり<sup>13)</sup>、長寿との関係で興味ある結果ではないかと考えられる。

#### 参考文献

- 1) T. Yoshida, Y. Yasuda, T. Mimura, Y. Kaneko, H. Nakashima, N. Yamamoto and T. Uryu: Carbohydrate Research, 276, (1995) 425-436
- 2) 高野 良, 吉川秀一: 化学と生物, 34, 9, (1996) 598-604
- 3) 桜井直樹: 細胞分画法 (毛利秀雄, 香川靖雄編), 実験生物学講座, 丸善, 6, (1984) 317-336
- 4) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解, 金原出版, (1990) 301-304

- 5) M. F. Chaplin and J. F. Kennedy :  
Carbohydrate Analysis : a practical approach, IRLpress, Oxford Washington DC (1986) 1-36
- 6) 河合由美子, 阿武喜美子 : ムコ多糖実験法 [I] (阿武喜美子, 長谷川栄一編集), 科学の領域臨時増刊96号, 南江堂, (1972) 49-63
- 7) 日本生化学会編 : 血液 (下), 続生化学実験講座, 東京化学同人, 8, (1987) 570-571
- 8) 三井洋司, 小林美枝子 : 細胞培養技術, 新生化学実験講座, 東京化学同人, 18, (1990) 197-202
- 9) 科学技術庁資源調査会編 : 四訂日本食品標準成分表の改訂に関する調査報告, 科学技術庁資源調査会報告, 87, (1982) 264-265
- 10) 瀬野信子, 阿武喜美子 : 糖質の化学上 (日本生化学会編), 生化学実験講座4, 東京化学同人, (1982) 148-149
- 11) 奥山 隆, 音谷 登, 佐々木勸, 村田克己 : ヘパリン (吉澤善作監修, 講談社サイエンティフィック編), 講談社, (1979)
- 12) C. J. Jackson, I. Giles, A. Knop, A. Nethery and L. Schrieber : Exp. Cell. Res. 215, 2 (1994) 294-302
- 13) 野田宏行 : 水産利用化学 (鴻巣章二, 橋本周久編), 新水産学全集, 恒星社厚生閣, 24, (1992) 292-311