

ノート

IL-12 誘導活性を示す天然葉緑土由来ミネラル水中の
複合糖質の構造解析加藤 祐子^{®1,3}, 太田 雅也², 亀井 恭平¹, 脇田 久伸³,
河原 岳志⁴, 山野雄一郎⁴, 濱崎 武記⁴, 照屋輝一郎⁴,
長田 和浩⁴, 西川 竜平⁴, 野口 克己⁵, 白畑 實隆⁴Structure Analysis of Complex Carbohydrate Exhibiting IL-12 Inducing
Activity Derived from Mineral Water in Natural Leaf SoilYuko KATO^{1,3}, Masaya OHTA², Kyouhei KAMEI¹, Hisanobu WAKITA³,
Takeshi KAWAHARA⁴, Yuuichiro YAMANO⁴, Takeki HAMASAKI⁴, Kiichiro TERUYA⁴,
Kazuhiro OSADA⁴, Ryuhei NISHIKAWA⁴, Katsumi NOGUCHI⁵ and Sanetaka SHIRAHATA⁴¹ Department of Industrial Chemistry, Faculty of Engineering, Tohwa University, 1-1-1, Chikushigaoka, Minami-ku, Fukuoka-shi, Fukuoka 815-8510² Department of Biotechnology, Faculty of Life Science and Biotechnology, Fukuyama University, 1, Sanzo, Gakuen-cho, Fukuyama-shi, Hiroshima 729-0292³ Advanced Materials Institute, Fukuoka University, 8-19-1, Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka-shi, Fukuoka 814-0180⁴ Department of Genetic Resources Technology, Faculty of Agriculture, Kyusyu University, 6-10-1, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka-shi, Fukuoka 812-8581⁵ Noguchi General Laboratory, 4-5-8, Tsunehisa, Miyazaki-shi, Miyazaki 880-0913

(Received 11 January 2005, Accepted 25 March 2005)

Mineral water, named Catalyser 21, prepared by the fermentation of ancient natural leaf soil, is often used as health-beneficial drinking water to enhance the immune system of cancer patients. The mineral water was dialyzed and fractionated by using gel chromatography. Fraction 4, containing carbohydrates, was further purified by using negative ion chromatography, obtaining a fraction named Fr4 (1-2). The Fr4 (1-2) was analyzed using the ABME marker method, carbohydrate analysis. It was composed of nine carbohydrates. The NMR spectra showed some specific complex carbohydrates pattern in the ¹H-NMR and 2D-NMR HMQC methods. There were many cross peaks in the HMQC spectra, which displayed ¹³C-¹H relationships of the anomeric region of complex carbohydrates. Macrophages secrete interleukin-12 (IL-12), which activate the tumor immune system. The induction activity of the Fr4 (1-2) for IL-12 on the murine macrophage cell line, RAW264.7, was tested using the RT-PCR method. The Fr4 (1-2) induced the gene expression of IL-12, suggesting that polysaccharides in mineral water are responsible for the IL-12 induction activity.

Keywords : anti-tumor activity; structure analysis; complex carbohydrate; NMR; HMQC; Interleukin-12.

¹ 東和大学工学部工業化学科: 815-8510 福岡県福岡市南区筑紫丘 1-1-1² 福山大学生命工学部生物工学科: 729-0292 広島県福山市学園町 1 番地三蔵³ 福岡大学高機能物質研究所: 814-0180 福岡県福岡市城南区七

隈 8-19-1

⁴ 九州大学大学院農学研究院遺伝子資源工学部門: 812-8581 福岡県福岡市東区箱崎 6-10-1⁵ 野口総合研究所: 880-0913 宮崎県宮崎市恒久 4-5-8

1 緒 言

本天然葉緑土由来ミネラル水は、約 30 万年前の海底が隆起した地層より採取された天然葉緑土を、バイオリアクター内で土壤微生物を使って発酵させたものである。その後、3 種類のフィルターを組み合わせた汙過フィルターラインにかけ、水の中の不溶物を除去している。本ミネラル水はカタライザー 21 としてがんをはじめとした様々な疾病の治療を補佐するミネラル水として利用されている。

近年、オリゴ糖や多糖類が免疫系を調整することが報告されている。太田らは、ホヤアレルギーのアレルゲン活性が 5 糖のオリゴ糖鎖に存在することを明らかにし¹⁾、更に加藤らはそのアレルゲン 5 糖鎖の立体構造を、2D-NMR 法で解明した²⁾。フコイダンや、 β -glucan に抗腫瘍活性があるという報告も多くある^{3)~5)}。マクロファージが分泌するインターロイキン 12 (IL-12) は cytotoxic T cell (CTL) や natural killer (NK) 細胞の活性化を介して、腫瘍免疫を活性化することが知られている。カタライザー 21 はマクロファージからの IL-12p40 サブユニットの転写を促進し、移植ガンの増殖を *in vivo* で抑制した⁶⁾。カタライザー 21 試料 (40% 液) について IL-12p40 実験を行った結果腫瘍免疫活性化を有することが明らかになったので、本研究では、カタライザー 21 試料 (原液) を透析膜による透析操作や、ゲル汙過カラム、陰イオンカラムなどで分画、精製を行い、その活性成分を解明することを試みた。

本研究では、カタライザー 21 の中の糖鎖に注目し、その IL-12p40 の誘導活性の可能性を検討した。本研究では、天然葉緑土由来ミネラル水中の糖鎖の分離、精製を行い、その糖鎖の組成を単糖分析法で、構造を NMR 法で測定し、更に抗腫瘍免疫に関する主要なサイトカインである IL-12 の誘導能を調べた。

2 実 験

2.1 試料の分離と精製

2.1.1 試薬 1. 透析用透析膜; 分子量対応領域 (3500) (Spectra/por Membrane MWCO)。2. ゲル汙過カラム用移動相溶液; クエン酸緩衝液: 20 mM-クエン酸-水和物, 0.15 M-塩化ナトリウム, 塩酸溶液で pH 3.5 に調製。ゲル汙過カラム (HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 High Resolution) (アマシャムバイオサイエンス株式会社)。3. 陰イオン交換カラム用移動相溶液; A 液: 50 mM-酢酸ナトリウム, 10 mM-エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)-2Na 塩酸溶液で pH 4.6 に調製。B 液: 50 mM-酢酸ナトリウム 1 (0~1.5 M-NaCl), 10 mM-EDTA-2Na 塩酸溶液で pH 4.6 に調製。陰イオン交換カラム (Econo-Pac High Q カートリッジ, Bio Rad 製)。

2.1.2 透析膜による透析及び凍結乾燥 原料は、天

然葉緑土由来ミネラル水 (野口総合研究所製カタライザー 21) を使用した。このミネラル水の低分子成分を除き精製する目的から、透析膜を用いて、溶液 (10 l) を 20 回にわけて透析と凍結乾燥を行った。

透析は、スペクトラム社の 3500 分子量対応領域の透析膜で、5 l の蒸留水で 3 日間、毎日水を交換しながら透析を行った。透析後の溶液は凍結乾燥器 (TAITEC 800) で、完全に凍結乾燥を行い、それをゲル汙過などのカラム分画への試料とした。10 l の原料溶液から 5.38 g の乾燥試料を得た。この試料を 22 回にわけてゲル汙過カラム処理を行った。

2.1.3 カラムによる精製 試料をゲル汙過 (HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 High Resolution, 以下 S-200 HR と略す) で精製分画した。試料約 0.3~0.5 g をクエン酸緩衝液 4 ml に溶解した後、遠心分離 (3000 rpm, 10 分間, 4℃) を行い、0.45 μ m のフィルターで汙過し、精製用試料とした。クエン酸緩衝液で平衡化したカラムに負荷し、流量 0.6 ml/min でゲル汙過クロマトグラフィーを行った。カラム溶出液は 10 ml ずつを採取した。

得られた高分子領域試料を Fr.4 及び、紫外線 (UV) 280 nm の吸収を持つ画分を Fr.9 とする。得られた画分はすべて、UV 280 nm の測定及び、フェノール硫酸法による糖含量の測定を行った (Fig. 1)。その後、Fr.4 成分を凍結乾燥した試料 37.5 mg を陰イオン交換カラムで溶離し同様に 280 nm, 糖含量を測定した (Fig. 2)

2.2 糖組成分析

2.2.1 試薬 ABME 試薬: *p*-アミノ安息香酸メチルエステル, 水素化シアノホウ素ナトリウム, 酢酸, メタノール (すべて和光純薬製, 特級)

2.2.2 分析装置及び分析条件

HPLC: 島津 LC6A 高速液体クロマトグラフィーシステム

溶出液: 溶媒 A: 5% アセトニトリル/100 mM 酢酸

溶媒 B: 15% アセトニトリル/100 mM 酢酸

グラジエント方式, 流量 0.5 ml min⁻¹

カラム: Wakosil 5C 18-200 (0.4 $\times$ 25 cm 和光純薬製)

検出波長: 304 nm

GC-MS: 島津 GC-MS QP5050A

カラム: DB-5 (0.25 mm $\times$ 30 m)

2.3 NMR 測定

2.3.1 試薬及び装置 D₂O Extra (99.996 atom% D) ISOTEC inc. 製。マイクロセル (BMS-005J 5 ϕ シゲミ製) Varian INOVA 600; プロトン周波数 599.882 MHz。

2.3.2 NMR 測定 ¹H-NMR 測定条件; Presaturation 法で水消去を行った。繰り返し測定回数 256 回, 測定温

度 30℃, heteronuclear multi quantum coherence (HMQC) 測定条件; シーケンス gHMQC gradients, 測定温度 30℃, Fr4(1-2) 試料を, 重水溶媒で ^1H -NMR, 2D-NMR である HMQC の測定は, gHMQC シーケンスで行った. NMR の測定は, D_2O (99.996%) 溶媒, シゲミミクロセル (5φ) を用い, 装置は Varian 製 INOVA 600 で行った.

2.4 陰イオンクロマトグラフィー

多糖硫酸エステルの分解産物である単糖の硫酸化フコースや硫酸化グルコースから, 海洋性細菌が生産するスルファターゼや, 硫酸還元菌などにより, 硫酸が脱離することが知られている⁹⁾. 本試料 Fr.4 及び Fr4(1-2) について, ^1H -NMR の測定結果から δ 1.9~2.1 (CH_2) にシグナルがみられた. 硫酸還元菌で硫酸エステルから脱硫酸後, 糖鎖の環で CH_2 基となることが考えられる. そこで, Fr4 溶液中に硫酸イオンがどのくらい存在するのかを, 陰イオンクロマトグラフィー法で測定した.

2.4.1 試薬及び試料 溶出バッファー; 2.3 mmol フタル酸, 2.5 mmol トリスアミノメタン. 標準溶液; 陰イオン混合溶液 IV (関東化学製) 硫酸イオンとして, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 ppm 各濃度となるように調製した.

試料; Fr.4 (50 μl) (S-200 HR ゲル汙過カラム分画試料) 注入量はいずれも 50 μl .

2.4.2 分析装置 日立高感度イオンクロマトグラフ L-7000 シリーズ.

カラム; 日立陰イオン分析用カラム (4.6 mm $\times$ 150 mm #2740) カラム温度 55℃.

2.4.3 分析方法 日立高感度イオンクロマトグラフ L-7000 シリーズを用いて, 溶出バッファー 2.3 mmol フタル酸, 2.5 mmol トリスアミノメタンで, 流量 1.5 ml/min, Pressure 44 kgf/cm² の条件で標準溶液の各濃度を測定し, 検量線を作成した. 続いて試料 Fr.4 (50 μl) の測定を行った.

2.5 IL-12p40 誘導活性試験

2.5.1 試料及び試薬 MilliQ 水, RAW 264.7 細胞, LPS (Lipopolysaccharide from Escherichia coli Serotype 026:B6, Sigma), GeneEluteTM Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma 製).

カタライザーの精製画分である, Fr.4, Fr4(1-2), Fr.9 及び LPS を試料とする場合には, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度になるようにサンプルを添加した minimum essential medium (MEM) 培地中で, RAW264.7 細胞を培養した.

2.5.2 実験方法 カタライザーの IL-12p40 誘導活性は, *in vitro* において RT-PCR 法により評価を行った.

マクロファージ様細胞 RAW264.7 を, カタライザー精

製画分 [Fr.4, Fr4(1-2), Fr.9] を含む 10% fetal bovine serum (FBS) 含有 MEM 培地で各時間培養を行った. GeneEluteTM Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma 製) を用いて RNA を抽出した. 更に M-MLV Reverse Transcriptase (PROMEGA 製) を用い cDNA を合成, 得られた cDNA を IL-12p40 及び glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) プライマーを用いて PCR を行った (PCR 反応条件 94℃, 2 分間のプレインキュベーションの後, 94℃; 50 秒, 62℃; 50 秒, 72℃; 60 秒の条件で 30 サイクル反応させた後, 74℃ で 4 分間のファイナルエクステンションを行った). 得られた, PCR 産物について 2.5% アガロースゲル電気泳動を行い, 発現量を測定した.

3 結果と考察

試料をゲル汙過 S-200 HR で精製, 分画し得られた高分子領域試料 (Fr.4) を更に, 陰イオンカラム Econopac を用いて, 精製, 分画した中の分画 1~2 である Fr4(1-2) を用いて, 単糖分析 [*p*-aminobenzoic methyl ester (ABME) 標識法による高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 測定及び gas chromatography (GLC) 測定], 更に, NMR 測定 (^1H -NMR, HMQC), 陰イオンクロマトグラフィー測定, IL-12p40 誘導能実験を行った.

Fr.4 は最も糖の含量が多く, Fr.9 は糖及び UV 280 nm の吸収のある画分であった. これらは集めて各々の透析, 凍結乾燥を行った (Fig. 1). 更にこの S-200HR ゲル汙過カラムにより得られた画分 Fr4 について, 10 kDa, 50 kDa, 200 kDa の 3 種類の限外汙過膜を通して限外汙過を行った結果, およその分子量範囲が得られた.

a. 限外汙過膜透過画分, b. 限外汙過膜保持画分, c. 限外汙過膜非透過残渣についてそれぞれの限外汙過膜における a, b, c の回収率 (%) を求めた結果, この Fr.4 は 200 kDa 以上が約 40%, 50 kDa~200 kDa 約 30%, 10 kDa~50 kDa 約 30% という分子量推定が得られた.

次に, S-200 HR で得られた Fr.4 (37.5 mg) を, 陰イオン交換カラム Econo-Pac High Q カートリッジ (以下 Econopac と略す) を用いて精製, 分画した. その各フラクションの UV 280 nm の測定と, 糖含量の結果を Fig. 2 に示す.

最終的に Fig. 2 のクロマトグラムで示した画分を合わせて, Fr.1~2, Fr 3~5, Fr 6~12, Fr 13~16 の 4 つの画分とした. 各々を凍結乾燥し得られた重量を Table 1 に示す.

この Fr.4 の中の, Fr(1-2) を Fr4(1-2) と略す. Fr4(1-2) は各画分のなかでも最も糖含量の多い成分である.

ABME 標識法にて, 試料 250 ng から, 糖組成分析を行った. 結果は, Table 2 に示すように, Fr4(1-2) の糖鎖

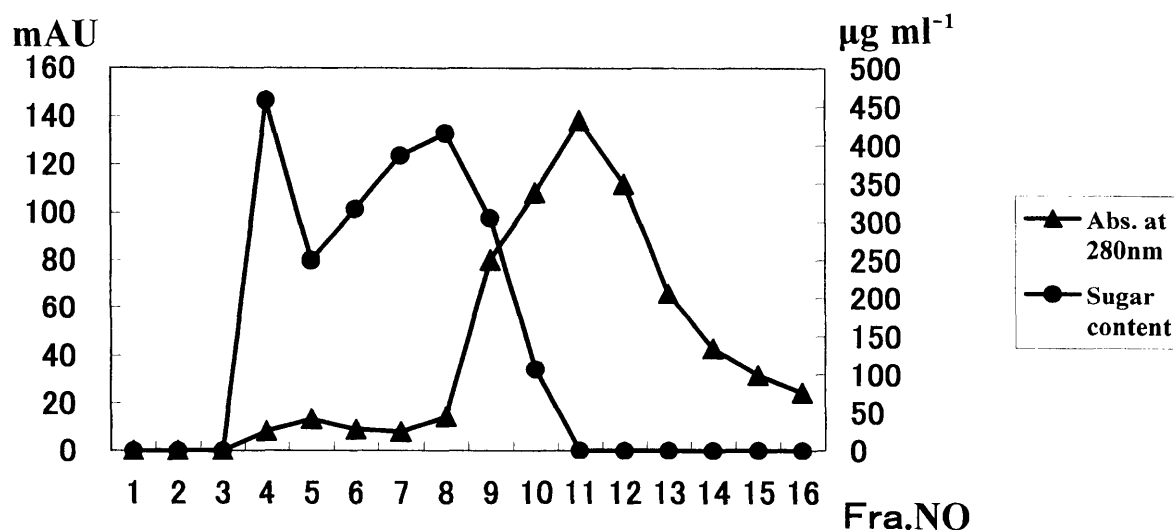


Fig. 1 S-200 HR gel filtration column fraction; Fra 4 and Fra 9 are gathered to lyophilization to each other (▲ mAU) UV (280) absorption of each fraction (10 ml/fra) and (● $\mu\text{g ml}^{-1}$) sugar content

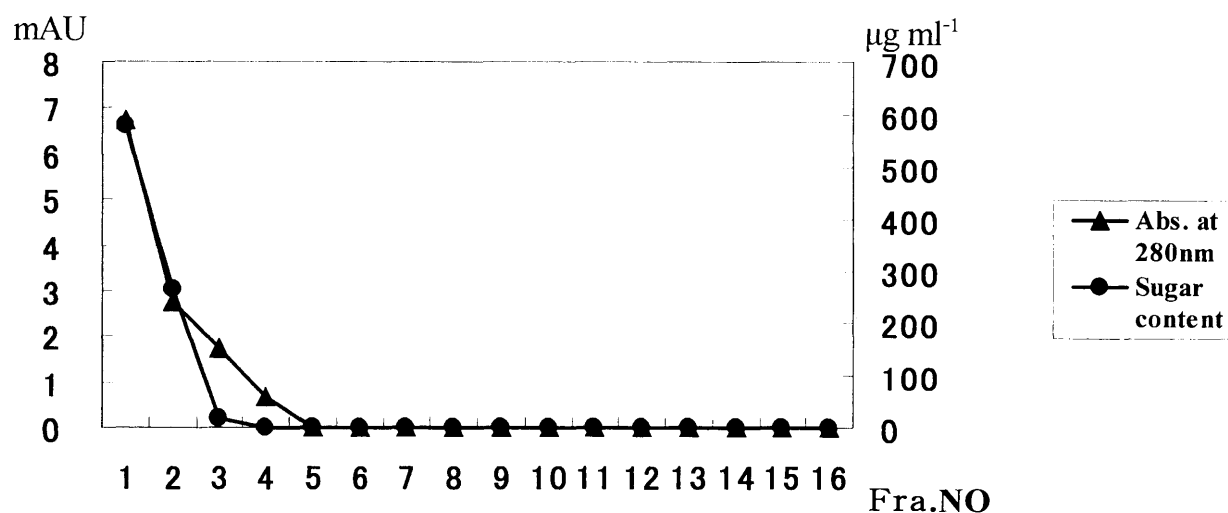


Fig. 2 Econopac anion exchange column fraction; Fra 4 of S-200 HR was separated with the Econopac anion exchange column UV (280) absorption (▲ mAU) of each fraction (10 ml) and the sugar content (● $\mu\text{g ml}^{-1}$)

Table 1 Amount of each Fractions from Econopac anion exchange column (applied total amount of Fr4 was 37.5 mg)

Fraction	1 ~ 2	3 ~ 5	6 ~ 12	13 ~ 16
Amount/mg	26.9	3.4	0.5	0.6

Table 2 Carbohydrate Composition of Fr.4(1-2)

Carbohydrate	nmol/mg
Galactose	198
Glucose	364
Mannose	348
Arabinose	108
Xylose	216
Fucose	172
Rhamnose	308
N-Acetyl Glucosamine	116
N-Acetyl Galactosamine	64

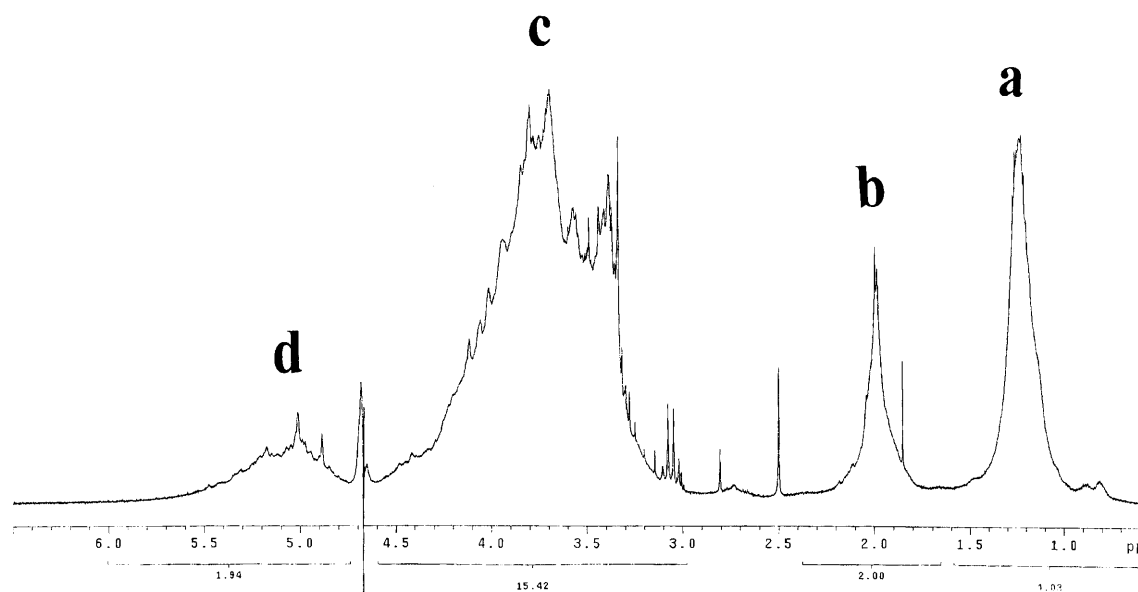


Fig. 3 ^1H -NMR spectrum of Fr4(1-2) with pre-saturation sequence (δ 4.67 HDO signal, 600 MHz, 313 K)
a; CH_3 of methyl pentose, b; CH_2 , c; CH of sugar ring, d; CH of anomeric region

Table 3 Proton (^1H) and carbon (^{13}C) Chemical shifts of Fr4(1-2) at Anomeric region (the number show at Fig. 4A)

NO.	^1H (δ)	^{13}C (δ)	NO.	^1H (δ)	^{13}C (δ)
1	5.21	99.29	8	4.99	100.67
2	5.19	99.27	9	4.96	100.62
3	5.17	99.94	10	4.93	100.48
4	5.16	99.50	11	4.90	98.94
5	5.04	97.68	12	4.86	98.60
6	5.07	100.51	13	4.70	98.90
7	5.02	94.21	14	4.45	102.77

成分は9種の単糖から構成されることが分かった。9種の単糖は、HPLC分析及びGLC分析から、それぞれの単糖の標準品とのリテンションタイムから同定を行い、更にgas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) 測定法で各単糖の分子量の確認を行った。(分析方法はRef. 7-8に記載)。本試料 Fr4(1-2) の ABME 標識による糖組成成分分析結果を Table 2 に示す。

単糖分析の結果から、この Fr4(1-2) の構成糖はガラクトース、グルコース、マンノース、アラビノース、キシロース、フコース、ラムノース、*N*-アセチルグルコサミン、*N*-アセチルガラクトサミンの9糖からなることが分かった。ラムノース以外は、糖タンパク質を構成する単糖であり、生理的に重要な単糖である。単糖を合計した糖含量はこの試料の33.1%を占めている。更に本試料では、キシロース (216 nmol)、フコース (172 nmol) など植物性由来の糖を多く含むという特徴がある。更に、アラビノースとラムノースも (108 nmol, 308 nmol) と高い含有量を

示しており、D-アラビノースはヘミセルロース、ペクチン質などに含まれ、L-ラムノースは多糖成分としての分布が広い。

^1H -NMR スペクトルは糖鎖に特徴的なシグナルを示している。 ^1H -NMR から、 δ 1.1~1.4 (CH_3)、はメチルペントース (フコース、ラムノース) の CH_3 領域のシグナル、 δ 1.9~2.1 (CH_2) (このシグナルについては後述)、 δ 3.2~4.4 (糖の環 CH)、 δ 4.8~5.2 (アノメリックプロトン) 領域に多くのシグナルが重なっているが、これらのシグナルは、糖鎖に特徴的なシグナルと考えられる (Fig. 3)。更に、HMQC スペクトルからは、糖の特徴的なアノメリック炭素と水素の相関シグナルが多数得られている [$\delta(\text{H})$ 5.21 - $\delta(\text{C})$ 99.29, $\delta(\text{H})$ 5.07 - $\delta(\text{C})$ 100.51, $\delta(\text{H})$ 4.99 - $\delta(\text{C})$ 100.67 etc] (Table 3, Fig. 4)。

なお、タンパク質特有の低磁場の NMR シグナル (δ 6.5~8.5, NH, フェノール性水素) は認められなかった。陰イオンクロマトグラフィーの測定結果から、Fr4 中の硫酸イオンは、およそ 1.29 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ であった。したがって ^1H -NMR の δ 1.9~2.1 (Fig. 3b) (CH_2) のシグナルは硫酸化糖の硫酸基が脱離後の (CH_2) の可能性があると考えられる。

IL-12 は活性化 B 細胞やマクロファージが産生する分子量 7 万のサイトカインで、p40 及び p35 の 2 つのサブユニットがジスルフィド結合で結ばれたヘテロ 2 量体の糖タンパク質である。サブユニット単独では生理活性を示さない。機能としては、T 細胞や NK 細胞からの interferon- γ (IFN- γ) や tumor necrosis factor- α (TNF- α) の産生誘導、NK 細胞や CD8 + T 細胞の細胞障害活性増強、Th0 細

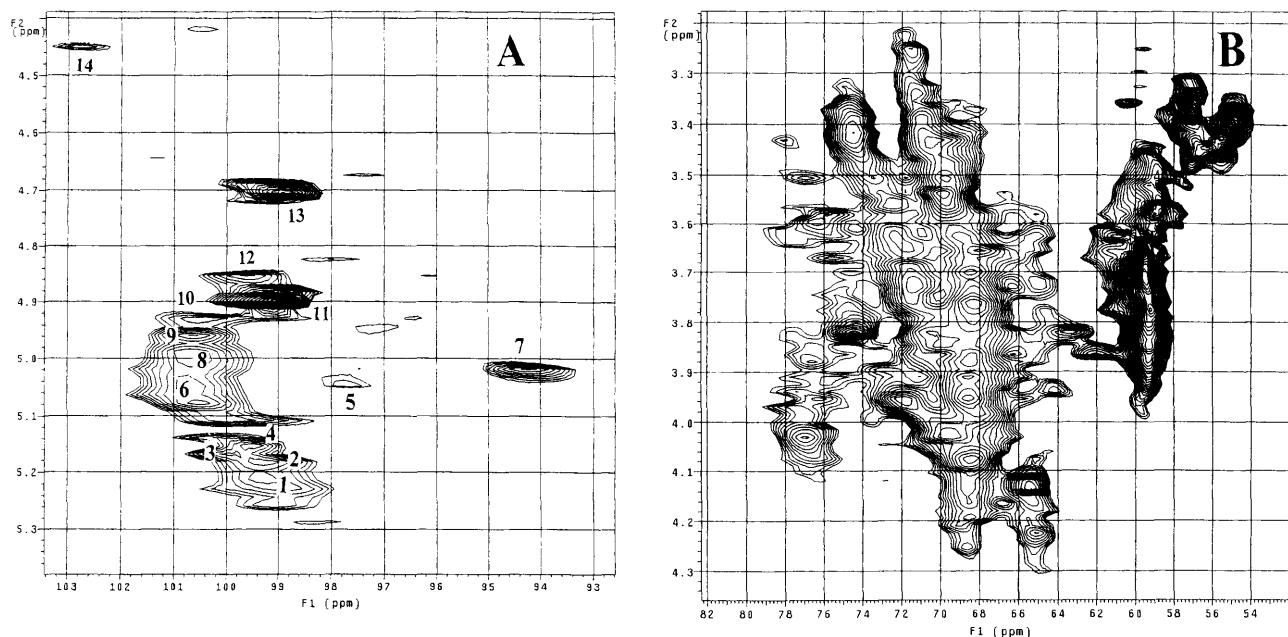


Fig. 4 Partial HMQC spectra of Fr4(1-2) gHMQC sequence (600 MHz, 313 K) numbering 1 to 14 display ^1H - ^{13}C correlations (the number show at Table 3) (A) anomeric region, (B) sugar ring region

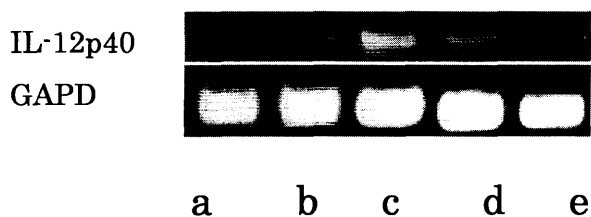


Fig. 5 Effects of the purified Catalyser 21 fractions on the transcription of IL-12p40 gene in RAW264.7 cells

Upper lane: (a), Control; (b), LPS; (c), Fra.4; (d), Fra.4(1-2); (e), Fra.9. Lower lane shows the expression of glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase (GAPD) gene as a marker of cDNA amount supplied to RT-PCR.

胞から Th1 細胞への分化促進, 活性化 NK 細胞や T 細胞の増殖促進などが知られている. p35 遺伝子は恒常的に発現しており, p40 サブユニットの遺伝子発現が IL-12 活性誘導に関係している. 分画精製する前の, 40% カタライザー溶液には IL-12 p40 誘導活性が認められた⁶⁾.

そこで, カタライザーの分画, 精製画分である高分子領域試料 Fr4, 及び糖含量の多い試料 Fr4(1-2), 低分子領域試料 Fr.9 及び, LPS について IL-12p40 誘導活性試験を行った.

IL-12p40 誘導活性試験を測定した結果, 試料の Fr4, Fr4(1-2) 及びリポポリサッカライド (LPS) には IL-12p40 誘導活性が認められたが, control 及び Fr9 には認

められなかった (Fig. 5). なお, 本 IL-12p40 誘導活性試験方法は定性的な試験法であり, 発現の結果を定量的に示すものではないので, Fr4, と Fr4(1-2) の活性の違いを比較するものではないと考えられる. 一方, 細胞壁に LPS が含まれていることはよく知られている¹⁰⁾¹¹⁾. しかしながら, LPS を陰イオン交換カラム (Econopac) で溶出させた溶出曲線の結果から, UV (280 nm) の溶出曲線では, 40~55 ml の位置に主成分の溶出が確認されたが, Fr4 (1-2) の Econopac 溶出曲線では, 10~20 ml の位置に主成分が確認されており (Fig. 2), 明らかに LPS の挙動とは異なっている. 更に, 糖質含有量においても, LPS は Fr4(1-2) の溶出曲線における糖成分の挙動とは異なることが明らかとなった. したがって, 本試料 Fr4(1-2) は, LPS とは異なるものであると考えられる. なお, 今後 LPS についても更に検討を行っていく考えである.

本研究で得られた結果から, カタライザー 21 の分画, 精製試料である高分子領域成分 Fr4, 及びその精製画分で糖含量の多い Fr4(1-2) は IL-12p40 誘導活性を有しており, 抗腫瘍活性成分として機能することが示唆された. なおこれは複合糖質であることが, 単糖分析法や NMR 法などから判明した. これらの結果は, 複合糖質による, 免疫調節機構を解明する手がかりになると考えられる.

今後, 試料の酵素処理などで糖鎖の分子量サイズを小さくし, この Fr4(1-2) の構造解析を更に行っていく. 糖鎖配列や, 各種 2D-NMR から構造の詳細を解明し IL-12 誘導活性成分の研究を進めていく.

(財)日本食品分析センター多摩研究所五十嵐友二博士には試料の精製分画についてご協力頂き, お礼を申し上げます。

文 献

- 1) M. Ohta, S. Shigeta, K. Ono, T. Takao, Y. Shimonishi, S. Oka: *Arch. Biochem. Biophys.*, **275**, 151 (1989).
- 2) Y. Kato, M. Ohta, T. Munakata, M. Fujiwara, N. Fujii, S. Shigeta, F. Matsuura: *Magnetic Resonance in Chemistry*, **39**, 259 (2001).
- 3) B. Mytar, M. Gawliczka, R. Szatanek, M. Wakoszyn, I. Ruggiero, B. Piekarska, M. Zembala: *Inflammation Research*, **53**, 100 (2004).
- 4) N. Kodama, T. Kakuno, H. Nanba: *Mycoscience*, **44** (3), 257 (2003).
- 5) I. Ando, Y. Tsukumo, T. Wakabayashi, S. Akashi, K. Miyake, T. Kataoka, K. Nagai: *International Immunopharmacology*, **2** (8), 1155 (2002).
- 6) T. Kawahara, K. Teruya, Y. Katakura, H. Takada, S. Sirahata: *Animal Cell Technology: From Target to Market* {E. Lindner-Osslon et al. (eds.)}, pp. 10-12, Kluwer Academic Publishers (2001).
- 7) T. Kotake, A. Tonari, M. Ohta, F. Matsuura, N. Sakurai: *Physiologia Plantarum*, **112**, 308 (2001).
- 8) K. Akasaki, Y. Yamaguchi, M. Ohta, F. Matsuura, K. Furuno, H. Tsuji: *Chem. Pharm. Bull.*, **38** (10), 2766 (1990).
- 9) J. H. Kim, D. S. Byun, J. S. Choi, W. C. Kim: *Appl Microbiol Biotechnol.*, **63** (5), 553 (2004).
- 10) S. G. Wilkinson: *Biochim. Biophys. Acta*, **187**, 492 (1969).
- 11) M. Kates, P. W. Derco: *J. Lipid. Res.*, **14**, 438 (1973).