

石灰紅藻オオシコロとミヤベオコシにおけるウロン酸多糖の局在性と石灰化部位との関連について (藻類の CaCO_3 沈着に関する研究 VI)

岡崎恵視・白戸 爾・古谷庫造

東京学芸大学生物学教室 (184 東京都小金井市貫井北町 4-1-1)

OKAZAKI, M., SHIROTO, C. and FURUYA, K. 1984. Relationship between the location of polyuronides and calcification sites in the calcareous red algae *Serraticardia maxima* and *Lithothamnion japonica* (Rhodophyta, Corallinaceae) (Studies on the calcium carbonate deposition of algae-VI). Jap. J. Phycol. 32: 364-372.

Histochemical and scanning electron microscopic (SEM) observations have been carried out to examine possible relationship between the location of polyuronides such as alginate and CaCO_3 deposition in the tissues of the calcareous red algae *Serraticardia maxima* (Corallinoideae) and *Lithothamnion japonica* (Melobesioideae). Acid polysaccharides such as pectin, alginate and carrageenan are stained by alcian blue, but cellulose, a neutral polysaccharide is not. Methylation of polyuronides such as pectin and alginate blocks their affinity for alcian blue, but saponification of the methylated polyuronides restores the affinity. On the other hand, sulphated polysaccharide (carrageenan) can not be stained by alcian blue after methylation and subsequent saponification treatment. Thus, alginate or alginate-like polysaccharides are histochemically distinguishable from sulphated polysaccharides. This technique has revealed that the acid-insoluble polyuronides such as alginate are localized in cuticles and cell walls of epithallial, cortical and medullary cells of decalcified intergeniculate tissue of *S. maxima*. In decalcified protuberance of *L. japonica*, cell walls of perithallial cells contain similar acid polysaccharides. It is not possible to determine the intercellular location of polysaccharide because the intercellular space is almost lacking in *S. maxima*, and because this space becomes dilated extensively by decalcification in *L. japonica*. SEM observations of calcified and decalcified specimens show that CaCO_3 is deposited in cell walls of epithallial, cortical and medullary cells of *S. maxima*. In perithallium of *L. japonica* a heavy calcification occurs in cell walls and intercellular spaces. These results suggest that at least some relationships exist between polyuronides such as alginate and cell wall calcification in these algae.

Key Index Words: Acid polysaccharides; Alcian blue-staining; Alginate; Calcareous red algae; Calcification; CaCO_3 deposition; Corallinaceae; Polyuronides; Rhodophyta.

Megumi Okazaki, Chikashi Shiroto and Kurazo Furuya, Department of Biology, Tokyo Gakugei University, 4-1-1 Nukuikita-machi, Koganei-shi, Tokyo, 184 Japan

紅藻サンゴモ科石灰藻は方解石型の CaCO_3 を細胞壁及び細胞間隙に沈着することが知られている (BOROWITZKA and VESK 1978 1979)。この藻の石灰化に関する生理学的研究 (BÖHM 1978, BOROWITZKA 1979) 及び石灰化部位の形態学的研究 (BAILY and BISALPUTRA 1970, GIRAUD and CABIOCH 1979, MIYATA *et al.* 1980) はこれらの藻の石灰化機構と石灰化部位における Ca 結合能を持つ多糖類との密接な関連を強く暗示している。これらの藻の細胞壁及び細

胞間隙において、このような能力を備えた多糖類として酸性多糖が考え易いが、既に YENDO (1904), MATTY and JOHANSEN (1981) はルテニウムレッドを用いて組織化学的な手法で細胞壁にペクチン様物質が存在することを報告している。しかしルテニウムレッドは酸性多糖の一般的な染色剤であり、硫酸多糖とカルボキシル基を有する含ウロン酸多糖とを識別するには適当ではなく、また上述の研究はその様な目的で行われたものでもない。最近、OKAZAKI *et al.* (1982) は今回

用いた実験材料のオオシコロ及びミヤベオコシから Ca 結合物質を単離し、これをウロン酸多糖のアルギン酸と同定した。さらにこのアルギン酸が Ca を特異的に結合することに注目して、アルギン酸の Ca 塩を Ca 供与体とする石灰化機構を提唱した。しかしアルギン酸の組織内分布については不明であり、この仮説は充分なものとは言えない。

この論文では塩基性色素のアルシアンブルーを用いて硫酸多糖とウロン酸多糖を組織化学的に識別する方法を検討し、さらにオオシコロとミヤベオコシの組織におけるウロン酸多糖の分布と石灰化部位との関連を検討した。

材料と方法

1. 材料 実験には紅藻サンゴモ科有節サンゴモ亜科のオオシコロ (*Serraticardia maxima*) と無節サンゴモ亜科のミヤベオコシ (*Lithothamnion japonica*) の2種を使用した。いずれも風乾藻体を実験に用いたが、ミヤベオコシは北海道大学水産学部の正置富太郎教授並びに宮田昌彦氏の御厚意により譲り受けた。

2. 顕微鏡観察

1) 組織切片の染色、メチル化及び鹼化

オオシコロは藻体先端部を、またミヤベオコシは藻体表面の突起 (Protuberance) を切り取り、まず 10% ホルマリン海水 (pH 7.8) にて室温下で48時間固定した。次にこれらの試料を 2N 塩酸で一昼夜脱灰し、常法に従ってパラフィン切片を作製した。切片の染色は酸性多糖に特異的かつ鋭敏に反応することが知られている (STEEDMAN 1950, LISON 1960) アルシアンブルー (MCB Manufacturing Chemists 社, Alcian blue 8GX) を使用した。また硫酸多糖と含ウロン酸多糖を区別するために FISHER and LILLIE (1954), LILLIE (1958) の方法に従って試料のメチル化 (Methylation) 及びその後の鹼化 (Saponification) 処理を行い、その後アルシアンブルーで染色した。次に染色液及びその用法について簡単に述べる。

〔染色液〕 1% アルシアンブルー液 (蒸留水 97 ml に氷酢酸 3 ml を加え、これにアルシアンブルー 8GX 1 g を溶解したもの)。脱パラフィンした切片を室温で30分間染色する。染色後水洗して観察する。

〔メチル化のための反応液〕 100 ml のメタノールに 0.8 ml の濃塩酸を加えたもの。これに脱パラフィンした切片を浸し約 60°C で6時間反応させる。反応後水洗して染色する。反応の対照として、塩酸を含まないメタノール中で同条件下で処理したものを作製する。

〔鹼化のための反応液〕 1% 水酸化カリウム・エタノール溶液 (70% エタノールに 1% になる様に水酸化カリウムを溶解したもの)。これにメチル化処理した切片を浸し、室温で20分間反応させる。反応後水洗して染色する。

2) 標準多糖の染色、メチル化及び鹼化

紅藻で知られている数種の多糖類 (前田・西澤 1974, 西澤 1977, OKAZAKI *et al.* 1982), 褐藻アルギン酸及びミカンのペクチンについてアルシアンブルーに対する染色性を検討し、組織切片の染色性と比較した。〔標準多糖〕 カラゲナン (Iwai Kagaku Yakuhin 社, Carrageenan 402, 硫酸多糖), セルロース (東洋紙社, Cellulose powder B, 200~300 mesh, 中性多糖), 紅藻アルギン酸 (OKAZAKI *et al.* 1982 の方法で紅藻オオシコロから単離したもの, ウロン酸多糖), 褐藻アルギン酸 (Kelco 社, 精製アルギン酸ソーダ, ウロン酸多糖), ペクチン (Waco Pure Chemical 社, Pectin from citrus, ウロン酸多糖)。これらの標準多糖の 1% 水溶液を卵白アルブミンの塗布してあるスライドガラス上に滴下し、これを乾固した。これを前述の組織切片の場合と同様にして染色または処理 (メチル化及び鹼化) して観察した。

3. 走査型電顕観察

石灰化部位を検討する目的で、脱灰及び未脱灰試料の2種類を作成した。まず常法に従って乾燥試料を 5% グルタルアルデヒドと 2% オスミウム酸で2重固定した。これを SHIMADA *et al.* (1976) の方法で凍結割断し、臨界点乾燥後、走査型電子顕微鏡 (JSM-F15, 15 KV) で観察した。また脱灰試料は2重固定後の藻体を 2N 塩酸で処理して完全に CaCO₃ を溶解除去したものから前述と同様の方法で作製した。

結 果

1. 標準多糖のアルシアンブルー染色

一部の紅藻に特有の細胞間多糖のカラゲナン (Car), セルロース (Cel), ペクチン (Pc), 紅藻アルギン酸 (Al₁) 及び褐藻アルギン酸 (Al₂) の計5種の標準多糖について、アルシアンブルーに対する染色性を調べた (Fig. 1)。図中にはそれぞれの物質を直接染色したものの (図中最左列), またはメチル化 (M) 及び鹼化 (S) 後、染色したものを示してある。MC はメチル化処理の対照を示す。

中性多糖であるセルロースは酸性基をもたないので、アルシアンブルーでは全く染色されなかった (Cel)。セルロースの微顆粒が観察されるのは、顆粒自身が幾

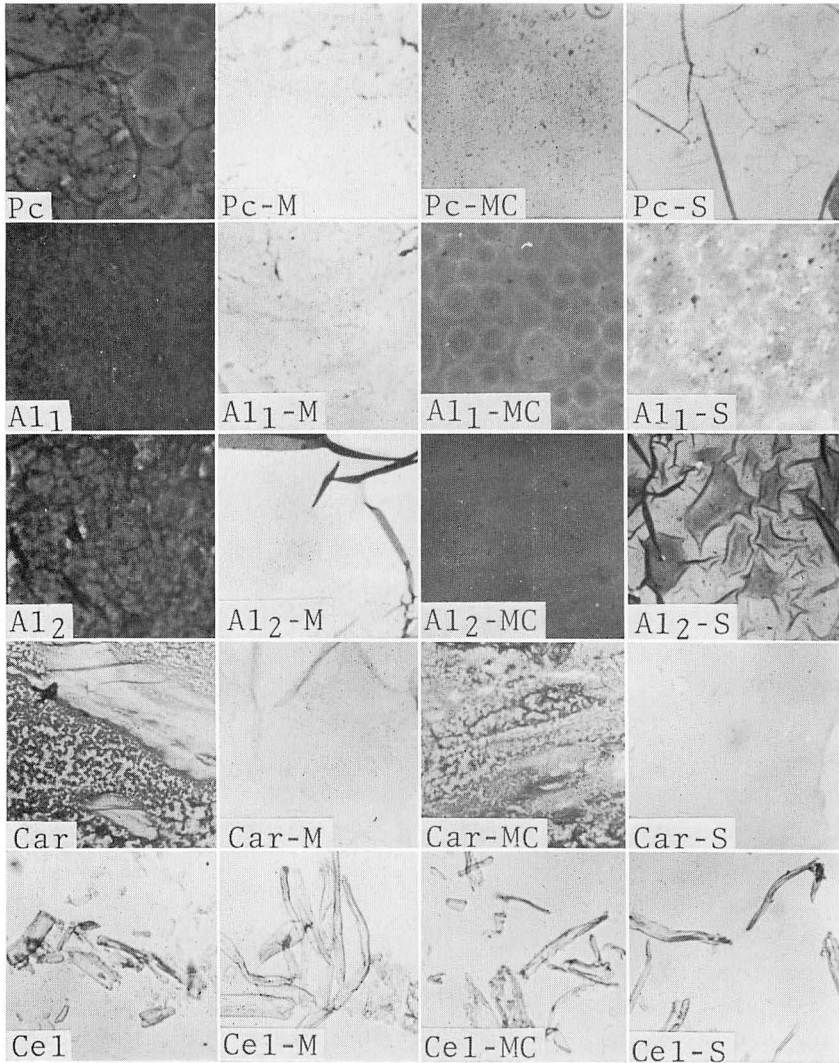


Fig. 1. Staining of various polysaccharides by alcian blue. The following polysaccharides were used as standard; pectin (Pc), alginate from coralline red alga (Al_1), alginate from brown alga (Al_2), carrageenan (Car) and cellulose (Cel). Series of left column and a symbol MC show staining without any treatment of the sections and staining of the sections after methylation in a medium omitted HCl (control for methylation treatment), respectively.

分コントラストを示すため、色素で染色されたためではない。酸性多糖はアルシアンブルーにより強く染色されたが (Pc, Al_1 , Al_2 , Car), いずれもメチル化するとその染色性は著しく低下した (Pc-M, Al_1 -M, Al_2 -M, Car-M)。一方メチル化の対照では、メチル化を触媒する塩酸が反応液中に含まれていないため、未処理の場合と同じ様に強く染色されている (Pc-MC, Al_1 -MC, Al_2 -MC, Car-MC)。メチル化処理したウロン酸多糖に鹼化処理をほどこすと、ペクチン、アルギ

ン酸はアルシアンブルーに対する染色性をほぼ回復した (Pc-S, Al_1 -S, Al_2 -S)。これに対して、硫酸多糖のカラゲナンの場合には、メチル化処理に続く鹼化後もアルシアンブルーに対する染色性は回復せず低下したままであった (Car-S)。この様にウロン酸多糖と硫酸多糖が鹼化処理後にアルシアンブルー色素に対して異なった反応を示すのは次の様に説明されている。(1) ウロン酸多糖はメチル化処理によりカルボキシル基がメチル化されて封鎖されるのに対して、硫酸多糖

はその硫酸基が加水分解により脱離する (FISHER and LILLIE 1954)。(2) メチル化処理したものに鹼化処理をほどこすと、ウロン酸多糖から脱メチル化が起こり再び塩基性色素に対する染色性を回復するが、硫酸多糖は既に硫酸基を失っているため染色性の回復は起こらない (SPICER and LILLIE 1957)。この染色法は動物組織中の酸性多糖を組織化学的に識別するために確立されたものであるが、KANTOR and SCHUBERT (1957)は単離したコンドロイチン硫酸を用いてLILLIEら (前述)の組織化学で適用されたとほぼ同じ条件下で上記 (1), (2)の反応が起きることを証明している。今回、著者らは酸性多糖に特異的かつ鋭敏に作用し、さらに染色液の pH を調整する必要のないアルシアンブルー (塩基性色素の一種) (STEEDMAN 1950)を用いたが、Fig. 1の結果からウロン酸多糖を硫酸多糖から組織化学的に比較的明瞭に区別出来ることが明らかになった。今回はウロン酸多糖であるアルギン酸の石灰藻組織中の分布を知ることを目的にしているが、この物質は酸不溶性であるのでパラフィン切片作製の酸による脱灰処理でも溶出することはあり得ないことも指摘しておきたい。

2. 組織切片のアルシアンブルー染色

オオシコロの先端節間部の縦断切片に見られる構造を Fig. 2A に示した。藻体は多軸構造を示し、藻体中心部の髄 (Me, Medulla) と藻体外層の皮層 (Cx, Cortex) から成る。Fig. 2B はその皮層部分の拡大像で、皮層細胞の外側には一層の表皮細胞 (E, Epithal-

lial cell) が存在し、クチクラ (Cu, Cuticle) がそれを被っている。Fig. 2C はミヤベオコシの突起 (Protuberance) 周辺部の構造を示す。数層の表皮細胞が重なった表層 (Epithallium) とそれによって被われた中層 (P, Perithallium) から成り、中層では細胞の融合も観察された。クチクラは観察されなかった。

次に2種の藻体組織のアルシアンブルー染色の結果について述べる。オオシコロの皮層 (縦断切片) と髄 (横断切片) については、それぞれ Fig. 3A 及び 3B に示した。藻体組織を直接アルシアンブルーで染色すると、クチクラと表皮細胞、皮層細胞及び髄細胞の細胞壁が良く染色された (A-No, B-No)。またこれらの細胞の細胞間隙はほとんど存在しなかった。組織切片をメチル化すると、クチクラ及び前述の各細胞の細胞壁に見られたアルシアンブルーに対する染色性は著しく低下することがわかった (A-M, B-M)。しかしこのメチル化した切片を鹼化して染色すると、これらの部分の染色性に明らかな回復が認められた (A-S, B-S)。この様な結果は、これらの細胞壁にウロン酸多糖、例えば紅藻のアルギン酸の存在を示すものである。

Fig. 3C, D はミヤベオコシについての染色結果で、Cは突起周辺部の中層細胞の縦断面像を、Dは突起中央部における中層細胞の横断面像を示している。いずれの細胞もその細胞壁がアルシアンブルーによって良く染色されていることがわかる (C-No, D-No)。脱灰により糸状の細胞列が互いに分離し、間隙が異常に拡大しており、この部位には好アルシアンブルーの物質

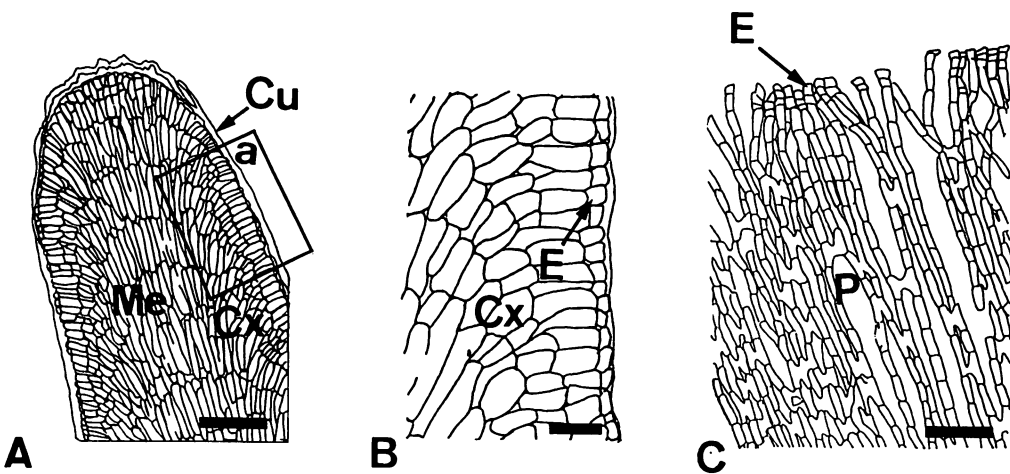


Fig. 2. Diagrams of tissue sections. A. organization at the apex of *Serraticardia maxima*; B. detailed structure of region "a" shown in A; C. detailed structure of perithallium in protuberance of *Lithothamnion japonica*. Cu. cuticle; Cx. cortex; E. epithallial cell; Me. medulla; P. perithallium Scale=100 μ m (A), 25 μ m (B, C).

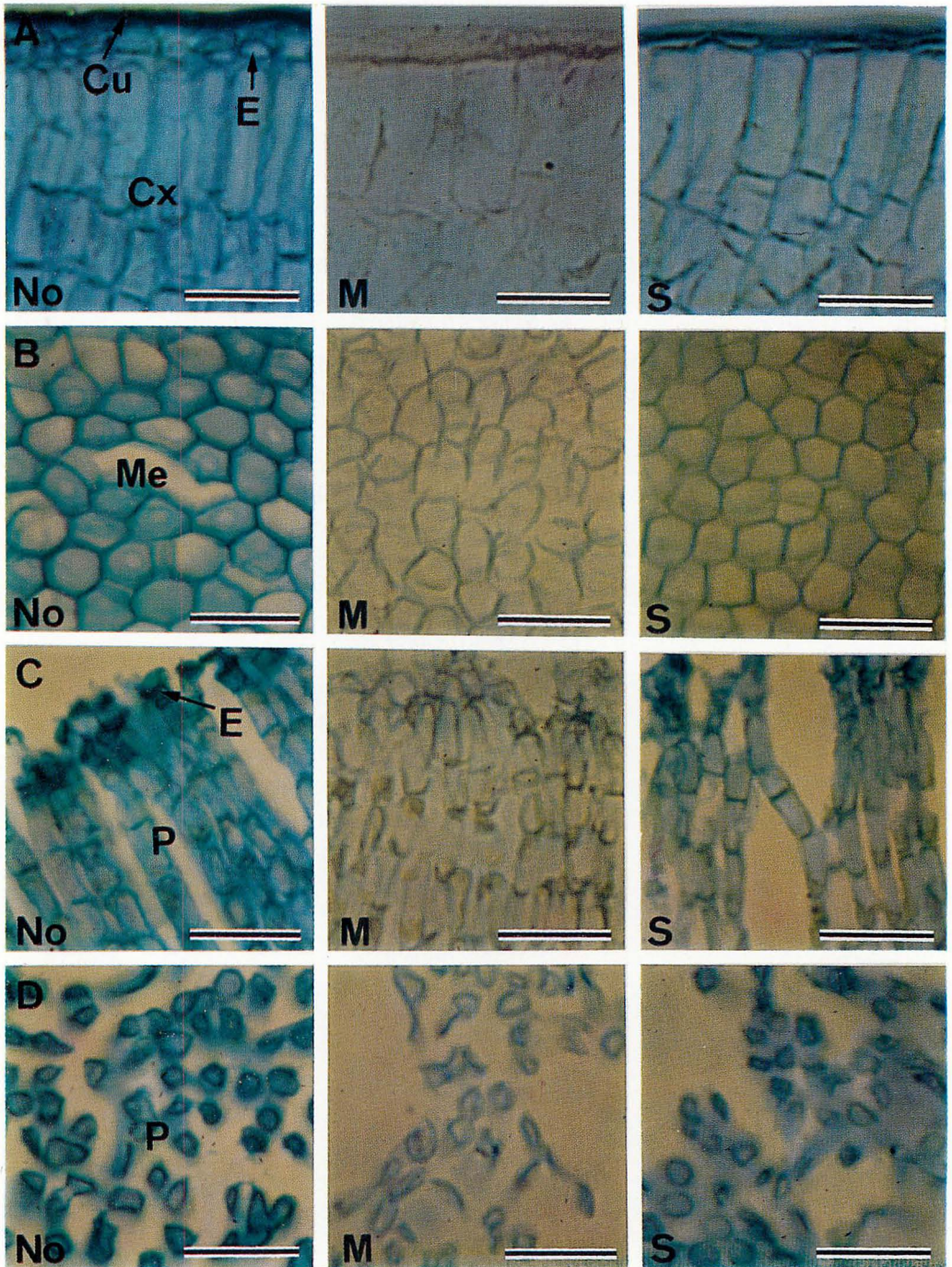


Fig. 3. Alcian blue-staining of sections of *S. maxima* and *L. japonica*. A-B. sections of intergeniculum of *S. maxima*; C-D. sections of perithallum of *L. japonica*; A-C. longitudinal sections; B-D. transverse sections; A symbol No shows staining without any treatment of tissue sections. For other symbols see Fig. 2. Note blockade of basophilia by methylation (M) and restoration of it by saponification (S). Scale=20 μ m.

は認められなかった。またオオシコロの細胞壁と同様に、メチル化処理により細胞壁のアルシアンブルーに対する染色性は著しく低下した (C-M, D-M)。さら

にメチル化した切片を鹼化すると、明らかに染色性の回復が見られること (C-S, D-S) から、オオシコロの場合と同様ウロン酸多糖の存在を示している。しかし両種においてメチル化切片の鹼化後の染色性は未処理の切片と比較して幾分劣り、鹼化処理で染色性が完全に回復しているとは言えない。これは標準物質の結果 (Fig. 1) についても言えるが、組織切片の場合には硫酸多糖の共存を示すとも考えられる。

3. 走査型電顕観察

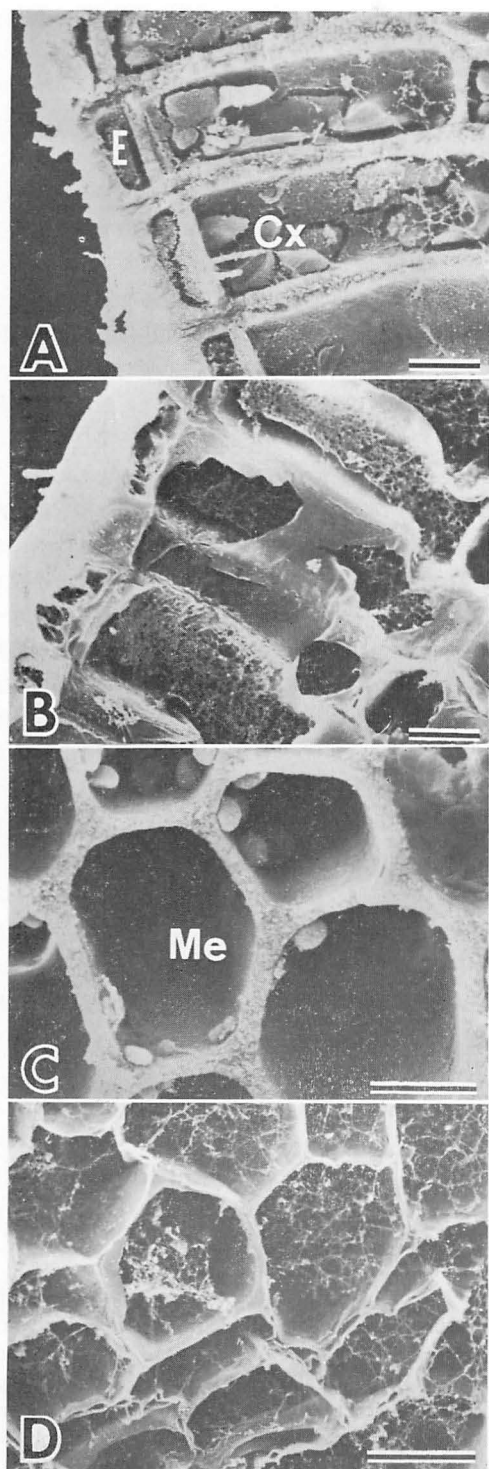
藻体の石灰化部位を知る目的で、酸による脱灰試料と未脱灰試料について走査型電顕で観察した。Fig. 4 はオオシコロの表皮、皮層及び髓部の電顕像である。Fig. 4A (未脱灰像) と 4B (脱灰像) の比較から、脱灰像での表皮及び皮層細胞の細胞壁及び細胞間隙が著しく収縮し CaCO_3 の消失がうかがわせる。同様に髓においても髓細胞壁及び細胞間隙が石灰化していることがわかる (Fig. 4C, 4D)。脱灰像 (4D) において、細胞壁または間隙から剥離したと思われる繊維状物質が確認された。

次にミヤベオコシについての観察結果を Fig. 5 に示した。Fig. 5A は突起周辺部の未脱灰中層細胞の電顕像 (縦断面像) で 5B はその脱灰像、また Fig. 5C は突起中央部の未脱灰中層細胞 (横断面像) を示し、5D はその脱灰像である。これらの未脱灰、脱灰像を比較すると、オオシコロの場合と同様に脱灰像 (5B, 5D) では細胞間隙及び壁が著しく収縮しており、これらの部位が石灰化していたことを示している。また壁中の CaCO_3 結晶は両部位とも細胞表面に対して垂直で放射状に配列していると思われる (Fig. 5A, 5C)。これらの2種の石灰藻で得られた石灰化部位の知見は、既に報告されている他のサンゴモ科石灰藻の知見と良く一致するものである (BOROWITZKA and VESK 1978 1979)。

考 察

紅藻植物の細胞壁及び細胞間隙の多糖類としては、今回の実験に標準物質として用いたカラゲナン、セルロースの他に寒天、キシラン、マンナン、フノラン、

Fig. 4. Scanning electron micrographs of the fractured surface of calcified and decalcified tip segments of *S. maxima*. A, C. calcified specimens; B, D. decalcified specimens; A, B. longitudinally fractured epithallum and cortex; C, D. transversely fractured medulla. For symbols see Fig. 2. Scale = 5 μm .



ポルフィラン型ガラクトタン等が知られている (前田・西澤 1974, 西澤 1977)。今回は後者の5物質についてはアルシアンブルーに対する染色性を検討していな

いが、酸性基をもたぬキシラン、マンナン及びほとんど硫酸基をもたず(1%以下)、酸性多糖とは言い難い寒天は今回の実験対象から除いた。またフノランとポルフィラン型ガラクトタンは、それぞれ硫酸基を約19%及び8%を含有する硫酸多糖であるため、アルシアンブルー染色に陽性であると考えられるが、メチル化処理後の鹼化処理でも染色性の回復は認められないはずである。

今回の実験から2種のサンゴモ科石灰藻の組織にはアルシアンブルー染色に陽性の酸性多糖が存在すること、またメチル化処理後鹼化処理によりアルシアンブルーに対する染色性を著しく回復する物質が存在することが明らかになった。この様な染色傾向を示す多糖をサンゴモ科石灰藻の中で探すと、現時点では OKAZAKI *et al.* (1982) が単離したアルギン酸の存在が最も有力である。今回のアルシアンブルー染色法によって、このアルギン酸あるいはそれを主体とした酸性多糖は、オオシコロでは藻体表面のクチクラ層と節間部を構成する各種細胞の細胞壁、またミヤベオコシにおいては中層細胞の細胞壁に分布することが強く示唆された。既に MATTY and JOHANSEN (1981) はサンゴモ (*Corallina officinalis*) のクチクラ層及び上述の細胞壁にルテニウムレッドに陽性のペクチン様物質の存在を、また YENDO (1904) もカニノテ属の一種 (*Amphiroa tuberculosa*) の皮層及び髓部の細胞壁が同色素で染色されることを報告している。これらの研究で、ルテニウムレッドで染色される物質はペクチン様物質と呼ばれているが、サンゴモ科にペクチンが存在することは未だ証明されていない。OKAZAKI *et al.* (1982) がサンゴモ科石灰藻で発見したアルギン酸はウロン酸多糖という点ではペクチンと似ており、従って従来からサンゴモ科の組織化学的研究でペクチン様物質と呼ばれている物質はこのアルギン酸である可能性が高い。

次にこのアルシアンブルーで染まるアルギン酸もしくはそれに類似した酸性多糖の組織における分布と石灰化部位との関連について考察したい。既に結果の項で述べた様に、走査型電顕による脱灰及び未脱灰試料の比較観察から、2種の石灰藻において節間細胞(表皮、皮層、髓の各細胞を含む)の細胞壁(オオシコ

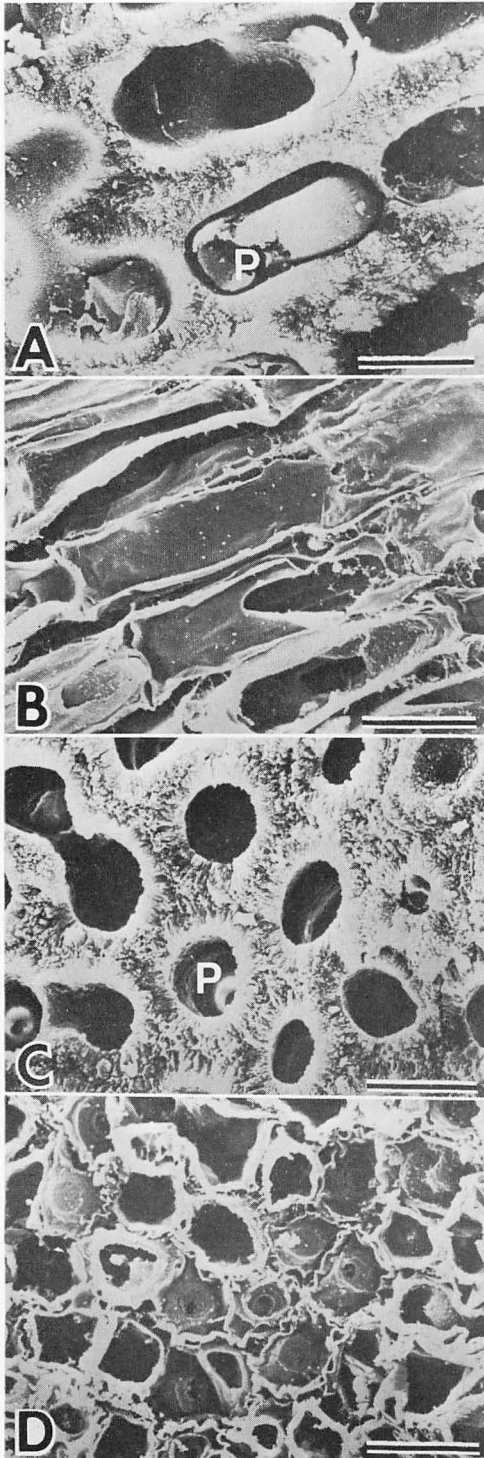


Fig. 5. Scanning electron micrographs of the fractured surface of calcified and decalcified protuberance of *L. japonica*. A, C. calcified specimens; B, D. decalcified specimens; A, B. longitudinally fractured perithallum; C, D. transversely fractured perithallum. For symbols see Fig. 2. Scale=5 μ m.

ロ), または中層細胞の細胞壁, 細胞間隙 (ミヤベオコン) に CaCO_3 が沈着していることが明らかになった。この2つの石灰化部位のうち, 細胞壁にはウロン酸多糖が局在していることは上述の通り明らかである。またクチクラ層にもこの酸性多糖が含まれていることがわかったが, GIRAUD and CABIOCH (1979) はこの部位も石灰化していることを報告しており大変興味深い。ただ今回の研究では石灰藻の主要な石灰化部位の1つである細胞間隙には酸性多糖の存在を認めることができなかった。これはオオソコロの細胞間隙は光顕切片では認め難い程狭く, またミヤベオコンにおいては脱灰処理によって細胞間隙が異常に拡張するので, この部位での物質の存在を組織化学的に検出し難いためと, 脱灰に伴う剥離に対する疑問が残るためである。しかし今回得られた結果は少なくとも, アルギン酸を主体とした酸性多糖が存在する部位では必ず石灰化が見られることを示すもので, OKAZAKI *et al.* (1982) が指摘した様に紅藻のアルギン酸と石灰化機構の間には何らかの関係があることを暗示するものである。OKAZAKI *et al.* (1982) はサンゴモ科石灰藻から抽出したアルギン酸はCaを特異的に結合するので, Caの供与体として CaCO_3 沈着に関与するか, また同時に CaCO_3 結晶の核としてその結晶型を決定する鋳型として働くものと考えている。褐藻にアルギン酸が存在することは周知であるが, 褐藻ではウミウチワ属の数種のみが石灰化することが知られているに過ぎない (BOROWITZKA 1982)。これは石灰化機構にはアルギン酸等の有機基質 (Organic matrix) 以外の要因, 例えば藻の構造, 炭酸イオンの供給及び CaCO_3 結晶成長の阻害物質 (フェノール化合物等) の有無等が密接に関連していることを意味する。

最後に, 稿を終わるにあたり, 英文要旨の御校閲を賜った南カロライナ大学電子顕微鏡センターの渡部哲光教授に厚くお礼申し上げる。

引用文献

- BAILY, A. and BISALPUTRA, T. 1970. A preliminary account of application of thin-sectioning, freeze-etching and scanning electron microscopy to the study of coralline algae. *Phycologia* 9: 83-101.
- BÖHM, L. 1978. Application of ^{45}Ca tracer methods for determination of calcium exchange and differential saturation of algal calcium pools. *Mar. Biol.* 47: 9-14.
- BOROWITZKA, M. A. 1979. Calcium exchange and the measurement of calcification rates in the calcareous coralline red alga *Amphiroa foliacea*. *Mar. Biol.* 50: 339-347.
- BOROWITZKA, M. A. 1982. Mechanisms in algal calcification. p. 137-177. *In*. F. E. Round and D. J. Chapman [ed.] *Progress in phycological research*. Vol. 1. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- BOROWITZKA, M. A. and VESK, M. 1978. Ultrastructure of Corallinaceae. I. The vegetative cells of *Corallina officinalis* and *C. cuvierii*. *Mar. Biol.* 46: 295-304.
- BOROWITZKA, M. A. and VESK, M. 1979. Ultrastructure of Corallinaceae (Rhodophyta). II. Vegetative cells of *Lithothrix aspergillum*. *J. Phycol.* 15: 146-153.
- FISHER, E. R. and LILLIE, R. D. 1954. The effect of methylation on basophilia. *J. Histochem. Cytochem.* 2: 81-87.
- GIRAUD, G. and CABIOCH, J. 1979. Ultrastructure and elaboration of calcification of cell-walls in the coralline algae (Rhodophyta, Cryptonemiales). *Biol. Cellulaire* 36: 81-86.
- KANTOR, T. G. and SCHUBERT, M. 1957. A method for the desulfation of chondroitin sulfate. *J. Am. Chem. Soc.* 79: 152-153.
- LILLIE, R. D. 1958. Methylation and alkali demethylation. *J. Histochem. Cytochem.* 6: 398-399.
- LISON, L. 1960. *Histochimie et cytochimie animales. Principes et methodes.* Gauthier-Villars, Paris. L. リゾン「組織化学および細胞化学—理論と方法」今泉正訳, p. 380, 白水社, 1962.
- 前田昌徹・西澤一俊 1974. 海藻多糖類. p. 289-348. 原田篤也・三崎 旭編, 総合多糖科学下. 講談社サイエンティフィック社, 東京.
- MATTY, P. J. and JOHANSEN, H. W. 1981. A histochemical study of *Corallina officinalis*. *Phycologia* 20: 46-55.
- MIYATA, M., OKAZAKI, M. and FURUYA, K. 1980. Initial calcification site of the calcareous red alga *Serraticardia maxima* (YENDO) Silva. (Studies on the calcium carbonate deposition of algae III). p. 205-210. *In* M. OMORI and N. [WATABE [ed.] *The mechanism of biomineralization in animals and plants.* Tokai Univ. Press, Tokyo.
- 西澤一俊 1977. 多糖類. p. 430-464. 林孝三編, 植物遺伝学II 核酸と生合成産物, 裳華房, 東京.
- OKAZAKI, M., FURUYA, K., TSUKAYAMA, K. and NISIZAWA, K. 1982. Isolation and identification of alginic acid from a calcareous red alga *Serraticardia maxima*. *Bot. Mar.* 25: 123-131.

- SHIMADA, T., OTA, K., YAMAMOTO, M. and MURAKAMI, M. 1976. Epon-freeze cracking for scanning electron microscopy. *Kurume Med. Jour.* 23: 139-143.
- SPICER, S.S. and LILLIE, R.D. 1957. Saponification as a means of selectively reversing the methylation blockade of tissue basophilic. *J. Histochem. Cytochem.* 7: 123-125.
- STEEDMAN, H.F. 1950. Alcian blue 8GS: A new stain for mucin. *Quart. J. Micro. Sci.* 91: 477-479.
- YENDO, K. 1904. A study of the genicula of *Corallinae*. *Coll. Sci. Imp. Univ.* 19 (art 14), 44 pp.

 賛助会員

- 北海道栽培漁業振興公社 060 札幌市中央区北4西6 毎日札幌会館内
- 阿寒観光汽船株式会社 085-04 北海道阿寒郡阿寒町字阿寒湖畔
- 有限会社 シロク商会 260 千葉市春日1-12-9-103
- 海藻資源開発株式会社 160 東京都新宿区新宿1-29-8 財団法人公衆衛生ビル内
- 協和醗酵工業株式会社 バイオ事業本部 バイオ開発部
100 東京都千代田区大手町 1-6-1 大手町ビル
- 全国海苔貝類漁業協同組合連合会 108 東京都港区高輪 2-16-5
- K.K.白壽保健科学研究所・原 昭 邦 173 東京都板橋区大山東町 32-17
- 有限会社 浜野顕微鏡 113 東京都文京区本郷 5-25-18
- 株式会社ヤクルト本社研究所 189 東京都国立市谷保 1769
- 山本海苔研究所 143 東京都大田区大森東 5-2-12
- 秋山 茂商店 150 東京都渋谷区神宮前 1-21-9
- 弘学出版株式会社 森田悦郎 214 川崎市多摩区生田 8580-61
- 神協産業株式会社 742-15 山口県熊毛郡田布施町波野 962-1
-