歯肉由来線維芽細胞様細胞および骨芽細胞に及ぼす キチンの脱アセチル化の影響

富永和宏*・富永尚宏・徳久道生・木船紘爾**
梅本俊夫***・福田仁一*・水野明夫

Influence of deacetylation of chitin on fibroblast-like cells and osteoblasts

Kazuhiro TOMINAGA*・Naohiro TOMINAGA・Michio TOKUHISA・Koji KIFUNE**
Toshio UMEMOTO***・Jinichi FUKUDA*・Akio MIZUNO

Abstract: In oral and maxillofacial surgery, we often require wound dressing materials to cover bone or soft tissue defects and promote healing. We previously showed that materials made of chitin are suitable for this purpose.

Chitin changes its physical and biological properties according to its deacetylation level. However, no report has described the influence of the deacetylation of chitin on biocompatibility. To evaluate this issue, we performed in-vitro experimental studies using materials containing various levels of deacetylated chitin.

Human gingival fibroblast-like cells (HGF) and mouse osteoblast cells (MC 3 T 3 -E 1) were cultured on sheets made of non-deacetylated chitin and, 35%, 50%, and 70% deacetylated chitin (DAC-0, DAC-35, DAC-50 and DAC-70, respectively). The growth of HGF and MC 3 T 3 -E 1, and alkaline phosphatase (ALPase) activity of MC 3 T 3 -E 1 were measured. The growth of these cells on the materials was also studied by SEM.

The biocompatibility of DAC-35 with these cells was high. Levels lower or higher than 35% deacetylated chitin were less biocompatible. Especially, DAC-50 and DAC-70 suppressed the growth and differentiation of these cells.

Key words: chitin (キチン), deacetylated chitin (脱アセチル化キチン), chitosan (キトサン), wound dressing material (創傷被覆材)

長崎大学歯学部第1口腔外科学教室

(主任：水野明夫教授)

*九州歯科大学口腔外科学第1講座

(主任：福田仁一教授)

**ユニチカ(株)新規開発本部メディカル開発事業部

(部長：木船紘爾)

***神奈川歯科大学口腔細菌学教室

(主任：梅本俊夫教授)

First Department of Oral and Maxillofacial
Surgery, Nagasaki University School of

Dentistry (Chief: Prof. Akio Mizuno)

*First Department of Oral and Maxillofacial
Surgery, Kyushu Dental College (Chief: Prof.
Jinichi Fukuda)

**Unitika LTD, Medical Development Department
(Chief: Koji Kifune)

***Department of Oral Microbiology, Kanagawa
Dental College (Chief: Prof. Toshio Umemoto)

受付日：平成9年11月25日

キチン

キトサン

図1 キチン、キトサンの化学構造

緒 言

キチンは甲殻類および昆虫類の外骨格成分として自然界に豊富に存在する天然高分子で、創傷治癒促進効果などから、皮膚、粘膜の創傷被覆材^{1~4)}などの医用材料としても、近年広く使用されている。

口腔外科領域では皮膚、粘膜ならびに骨欠損部に創傷被覆材を必要とすることが多く、創傷被覆材としてのベスキチン W® (ユニチカ (株)) を使用する機会もある。われわれは、ベスキチン W® を他の市販の創傷被覆材と *in vitro* の系で比較してその起炎性の低さを確認し、さらにキチンのフィブロネクチン、線維芽細胞遊走因子ならびに上皮成長因子の産生誘導に及ぼす影響についても検索し、キチンの生体親和性の良さおよび良好な組織修復効果について考察を加えた^{5~8)}。

キチンは化学名をポリ-N-アセチル-D-グルコサミンと言い、セルロースに似た構造をもつアミノ糖で、アミノアセチル基を脱アセチル化していくと脱アセチル化キチン (deacetylated chitin (DAC)) となり、物性が変化していく (図1)⁹⁾。生物学的な反応性も脱アセチル化していくことにより変化するとされており、生体内での分解吸収速度や免疫活性が変化することが確認されている^{10~13)}。

しかし、生体材料として使用する場合に重要な組織や細胞に対する親和性が脱アセチル化度の違いによりどう変化するかについては未だ十分な検討が行われておらず、基礎的試料が不足しているのが実状である。

今回、われわれは手術により欠損した軟組織創面と

骨創面へのキチンの適用を想定し、同一形状で脱アセチル化度の異なるキチンシートを作製し、脱アセチル化度の違いが線維芽細胞様細胞と骨芽細胞に与える影響について *in vitro* の系で検討し、興味ある知見を得たので報告する。

材料ならびに方法

1. 脱アセチル化キチンシートの作製

脱アセチル化度 0%, 35%, 50%, 70% (DAC-0, DAC-35, DAC-50, DAC-70) の細線維を、それぞれ不織布状にすることによりキチンシートを作製した⁹⁾。各キチンシートの形状は走査型電子顕微鏡 (SEM, S-4000型電界放射形走査型電子顕微鏡, 日立製作所) による観察で特に差がないことを確認した (写真1, 2)。

2. 培養皿の作製

培養皿は、細胞に対して、より自然な条件を与え、かつ材料シートを確実に培養皿に固定するために、以下の方法で行った。

35×φ10mmの培養皿 (FALCON, 3001) の基底面にコラーゲンゲル (Cellgen, KOKEN) を200μl滴下し均一層をつくり、その上に、各材料シートを培養皿と同じ径に調整したものを乗せ、貼付し、クリーンベンチ内で数時間乾燥させることによって作製した。

3. 培養細胞

実験には、線維芽細胞様細胞として石川の方法¹⁴⁾に準じて採取したヒト歯肉結合組織由来の線維芽細胞様細胞 (HGF) を、骨芽細胞としてマウス由来の株化細

写真1 脱アセチル化度35%のキチンシート (DAC-35) のSEM像 (左: $\times 300$, 右: $\times 3,000$).

写真2 脱アセチル化度50%のキチンシート (DAC-50) のSEM像 (左: $\times 300$, 右: $\times 3,000$).

写真1のDAC-35と形態的な差は認められない。

胞であるMC3T3-E1をそれぞれ使用した。

HGFは、下顎第3大臼歯抜歯後に臨床的に炎症のない第2大臼歯の遠心歯肉を採取し、Dispase溶液 (Dispase II, 三光純薬) 中で、上皮と結合組織を分離し、その結合組織部分から遊出した細胞を6-15回継代したものをを用いた。

4. 脱アセチル化キチンシート上での細胞培養

HGFを10%牛胎仔血清 (FBS) 含有のDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) に浮遊させ、細胞数が各培養皿に 1×10^4 個となるように分注して、 37°C 、5% CO_2 条件下で培養した。MC3T3-E1は10%FBS含有のAlpha modification of Eagle's minimal essential medium (α -MEM) に浮遊させ、同

図2 ヒト歯肉由来線維芽細胞様細胞 (HGF) の各材料上での増殖曲線

様の条件で培養した。

材料を貼付しない培養皿で培養を行ったものをコントロールとしたが、予備的に行った培養の結果、コントロールの培養皿で上記の細胞密度で培養した場合、HGFではおよそ96時間、MC3T3-E1ではおよそ120時間でコンフルエントになることを確認したので、コンフルエントに達した後も48時間培養することとし、HGFでは144時間まで、MC3T3-E1では168時間まで培養を継続した。

HGFでは培養開始後48, 72, 96, 120, 144時間後、MC3T3-E1では48, 72, 96, 120, 144, 168時間後にそれぞれ細胞数を測定し、細胞増殖曲線を作成した。MC3T3-E1については同経日の細胞内のアルカリフォスファターゼ (ALPase) 活性の変化も記録した。なお、すべての測定は各群、各経日3検体づつ行った。

5. 細胞数の測定

細胞数の測定はMTTアッセイ¹⁵⁾で行った。すなわち、測定6時間前に5mg/mlに調製した3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, 同仁化学)を培地に添加し、測定時、培地を吸引除去後、0.04N HCl-isopropanol 1.5mlを加えて、形成されたMTT Formazanを溶解し、測定波長570nmで吸光度を測定した。吸光度の測定にはマイクロプレート分光光度計 (Easy Reader EAR340AT, SLT-Labinstruments, Austria)を用いた。

6. ALPase 活性の測定

細胞内のALPase活性の測定のために、MC3T3-E1を所定の日数で培養後、培養皿をPBSで洗浄し、

50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH7.4)を加え、-80℃で測定時まで保存した。その後解凍し、細胞を破碎した後、これを検体とした。ALPase活性の測定は、アルカリ性フォスファテーストワコー® (和光純薬)によるフェニルリン酸基質法で行った。すなわち、検体にフェニルリン酸を含む炭酸塩緩衝液を2ml加えて37℃で15分間作用させた後、発色試薬を2ml加え、マイクロプレート分光光度計にて測定波長570nmで吸光度を測定し、検量線より活性値を求めた。

7. SEMによる観察

各材料シート上でHGFとMC3T3-E1を168時間培養した後、培地を吸引除去し、PBSで洗浄後、10%中性緩衝ホルマリンで材料ごと細胞を固定した。次いで固定した材料を真空凍結乾燥後、Au/Pdスパッターコーティングして試料調製し、SEMにより観察を行った。

結 果

1. 脱アセチル化キチンシート上でのHGFの増殖

DAC-35上でのHGFの増殖は良好で、コントロールよりも高い細胞増殖率を示し、コントロールが96時間でコンフルエントになった後も、さらに増殖を続け、144時間でもまだ増加傾向を示した。DAC-0もDAC-35ほどではないが、コントロールと同程度の増殖が認められた。一方、DAC-50と70では72時間で増殖が頭打ちとなり、コントロールの半分程度の細胞増殖しか認められなかった (図2)。

図3 骨芽細胞 (MC 3 T 3 -E 1) の各材料上での増殖曲線

図4 各材料上での骨芽細胞 (MC 3 T 3 -E 1) のアルカリフォスファターゼ活性の変化

2. 脱アセチル化キチンシートの MC 3 T 3 -E 1 に対する影響

1) 細胞増殖

MC 3 T 3 -E 1 の DAC-35 上での増殖はコントロールとはほぼ同程度であったが、コントロールが120時間でコンフルエントに達した後も増殖の継続がみられた。それに対して、DAC-0 上ではほとんど増殖が認められず、DAC-50 と 70 では元の細胞数より減少する傾向

もみられた (図3)。

2) ALPase 活性の変化

MC 3 T 3 -E 1 の細胞内の ALPase 活性は、コントロールでは96時間で急激な増加を示し、その後もそのレベルが維持されていた。

DAC 群の中では DAC-35 において最も高い活性が認められたが、コントロールに比べるとその活性値は低く、168時間の時点でもコントロールの 1 / 2 程度で

写真3 DAC-35上で168時間培養した HGF の SEM 像 (左: ×300, 右: ×3,000).
HGF は DAC-35 の細繊維を取り巻くように膜状に付着している.

写真4 DAC-50上で168時間培養した HGF の SEM 像 (左: ×300, 右: ×3,000).
HGF は島状の形態で散在しており, 細胞間の接合は乏しい.

あった. DAC-0 では DAC-35 のさらに 1/2 程度の活性値しか認められなかったが, 緩徐ながら上昇傾向は認められた. しかし, DAC-50 と DAC-70 においては MC 3T3-E1 の ALPase 活性の上昇はほとんど認められなかった (図 4).

3. 形態的变化 (SEM 所見)

DAC-0 上で 168 時間培養した HGF の SEM 像では, 細胞がキチンの細繊維を取り巻くように膜状に付着しており, 互いの細胞が細胞質突起で接合した像が観察された. DAC-35 においては DAC-0 より多くの細胞が細繊維に付着しており, 細胞の接合もより密となっ

写真5 DAC-35上で168時間培養したMC3T3-E1のSEM像(左:×300, 右:×3,000).
MC3T3-E1はDAC-35に膜状に付着している。

写真6 DAC-50上で168時間培養したMC3T3-E1のSEM像(左:×300, 右:×3,000).
島状の細胞が孤立性に散在している。

た状態が観察された(写真3). DAC-50では島状の形態の細胞が孤立した状態で散在しており, 細胞間の接合が乏しい状態が観察された(写真4). DAC-70もDAC-50と類似の所見を呈していた。

MC3T3-E1においても168時間培養したSEM像では, HGFの場合と全く同様の所見が認められた(写真5, 6)。

考 察

キチンには創傷治癒促進効果があり, 生体材料としての優れた可能性をもつという報告は, 1970年のPruddenらの文献¹⁶⁾に遡る。しかし, キチンに良い溶剤がなかったことから, その後の生体材料としての研究はしばらく頓挫した状態となっていた。その後, キチンを溶解する方法の開発^{17~19)}により高品質なキチ

ンの成形体の製作が可能となり、この分野の研究が飛躍的に進展し、その結果として、創傷被覆材¹⁻⁴⁾や上顎洞手術の際のタンポン材料²⁰⁾、止血剤²¹⁾、人工鼓膜²²⁾などの医用材料としての利用も可能となってきた。さらに最近では生体吸収性縫合糸²³⁾や人工靱帯²⁴⁾、抗癌剤の徐放化のための基剤としての応用²⁵⁾なども試みられるなど幅広い応用が期待されている。

キチンは分子内に存在するアミノアセチル基の結晶構造のため、ほとんどの無機、有機溶剤に溶けないが、キチンを苛性ソーダなどで処理するとアミノアセチル基からアセチル基が脱離してアミノ基となる。この脱アセチル化が80%以上進んだものを一般にキトサンという。キトサンはキチンと異なり、希酢酸など多くの溶剤に溶け、比較的容易に成形体を得ることができるが、非常に耐水性が悪く、吸水すると急速にもろくなり、物性を失う。しかし、キトサンのもつフリーのアミノ基がタンパク質、コレステロールなどの吸着に優れているなどの利点を有しており、機能性材料としての期待がもたれている^{9, 26, 27)}。

このようにキチンは脱アセチル化により物性が変化するが、この脱アセチル化度の違いによる生物活性の変化を検討した報告は少なく、脱アセチル化度の違いによるリゾチームによる消化速度の変化を検討した報告¹⁰⁾と、脱アセチル化度の違いによる免疫活性の変化を検討した報告¹⁰⁻¹³⁾がみられるにすぎない。

現在さまざまな創傷の被覆材として使用されている不織布状のベスキチン W[®] (ユニチカ (株)) は脱アセチル化度35%であり、綿状のベスキチン W-A[®] (ユニチカ (株)) および上顎洞手術などの際のスポンジ状のベスキチン F[®] (ユニチカ (株)) は脱アセチル化度0%である。これらの脱アセチル化度の決定は、まず材料の物性、すなわち、滲出液の吸着性や創への密着性を中心に決定され、その後にその決定された脱アセチル化度の材料の創傷治癒促進効果などを動物実験²⁸⁾と臨床的評価^{1-4, 9, 20)}で確認するという方法が採られてきた。そのため、今回の実験のように、同一形状の材料でさまざまな脱アセチル化度のものを作製し、脱アセチル化の影響を検討するということはなされておらず、キチンの脱アセチル化が組織、細胞にどのように影響するかという基礎的データが不足しているのが実状である。

今回、われわれは脱アセチル化度の違いによる細胞への親和性の変化を、細胞を直接材料に接触させて培養する直接接合法により評価した。本法は材料のより微細な影響を明らかにでき、また、材料上での細胞の形態や接触状態を観察することで材料と細胞の“なじみ”が検討できるという利点をもつ²⁹⁾。その結果として、細胞増殖の面では HGF に対しては DAC-0 と DAC-35 が良好な親和性を示し、MC 3 T 3-E 1 に対しては DAC-35 のみでコントロールと同等の増殖が認め

られた。なお、DAC 群においてコントロールがコンフルエントになった後も細胞の増加傾向がみられたのは、SEM で観察されたように、細胞がキチンの細繊維の表面を取り巻くように増殖するため、コントロールに比較して明らかに細胞の生育する面積が増大したためと考えられる。しかし、DAC-35 と他の DAC 群は同等の培養面積を有するにも拘わらず細胞の増殖数や増殖形態に差が生じており、形態的な相違がみられない材料上でのこのような細胞の増殖様態の差はきわめて興味ある結果と思われる。

MC 3 T 3-E 1 細胞内の ALPase 活性は DAC-35 と DAC-0 で活性が認められたが、今回の培養期間においてはその活性値はコントロールの半分以下であった。しかし、アルカリフォスファターゼのような分泌蛋白は、培養細胞がコンフルエントになり、細胞の分化が急速に進行する頃より合成が活発化するため、コントロールではコンフルエントにほぼ達するところで ALPase 活性が急上昇したもので、DAC 群では168時間でもコンフルエントに達しておらず、ALPase 活性がまだ上昇しない段階であった可能性も考えられる。

いずれにしても、以上の結果から *in vitro* では HGF や MC 3 T 3-E 1 に対しては、DAC-35 が最も親和性が高く、それよりも脱アセチル化度が高くても、低くても親和性の低下がみられることが判明した。

Nishimura らは一連の研究^{12, 13, 30)}で、キチンの脱アセチル化度の違いによる免疫活性の変化を報告しており、DAC-70 が最も強い免疫増強活性を示し、脱アセチル化度がそれ以上でも以下でも免疫活性が減弱する傾向にあったと述べている。すなわち、DAC-70 はマクロファージを活性化させ、細胞障害性マクロファージを誘導するが、キチンにはマクロファージの活性化作用はなく、キトサンも中等度の活性化作用しか示さず、また、腫瘍細胞の増殖抑制効果は、DAC-70 で高く、DAC-30 では中等度、キチン、キトサンには増殖抑制効果はなかったと述べている¹²⁾。さらに DAC-70 にはヘルパー T 細胞と細胞障害性 T 細胞の機能増強効果が認められることを報告し、他の DAC 群ではアジュバント活性が低いとも述べている¹³⁾。彼らはさらにその後、DAC-70 だけを取り上げ、その免疫賦活作用の機序を明らかにするための研究を行い、DAC-70 によるマクロファージからのインターロイキン 1 (IL-1) およびコロニー刺激因子の産生亢進を報告し、DAC-70 がマクロファージに主として作用するアジュバントであることを示した³⁰⁾。

一方、Tokuhisa ら⁵⁾ならびに徳久ら⁶⁾は DAC-35 のシートを *in vitro* の系で凍結乾燥豚真皮 (アロアスク D[®]、大鵬薬品 (株))、牛真皮由来アテロコラーゲン (メイバック[®]、明治製菓 (株)) と比較している。すなわち、それぞれの材料がヒト末梢血単球と HGF に与える影響を検討し、その結果、DAC-35 は他の材料と比

べてIL-1 α , β やプロスタグランディンE₂などの炎症性メディエーターの産生誘導が低く、起炎性の低い材料であることを明らかにした。

上記の両者の実験は同じ系で行われたものではないので、その結果をそのまま比較することはできないが、DAC-35は単球系への刺激性が少なく、起炎性が低いのにに対し、DAC-70は単球系を刺激するアジュバント活性をもち、起炎性が高いことが窺われる。これは今回のわれわれの結果でDAC-35とDAC-70で親和性に差が認められたのに一致しており、この起炎性が細胞への親和性に差を生じさせる結果となった原因ではないかと思われる。

このような単球系への刺激性の違いがなぜ生じるかは、今後の検討課題であるが、キチンの脱アセチル化による抗菌、抗カビ作用の増強を報告した内田³¹⁾は脱アセチル化により表面にアミノ基の陽イオンが露出するため抗菌、抗カビ作用が生じると述べており、免疫活性や単球系への刺激性に関してもこのような影響が考えられるかもしれない。

生体内では複雑な細胞間相互作用があり、in vitroの結果をそのまま臨床に結び付けることはできないが、今回の結果から、細胞への親和性のみを考慮すれば、骨にキチンを適用する場合は脱アセチル化度35%の物を用いる方が好ましく、軟組織に適用する場合にも脱アセチル化度の高い物は避けた方が良いように思われた。

結 語

脱アセチル化度の異なるキチンシートのヒト歯肉由来線維芽細胞様細胞(HGF)と骨芽細胞(MC3T3-E1)に対する影響を検討し、以下の結果を得た。

1. 脱アセチル化度50%と70%のキチンシート(DAC-50, DAC-70)は、HGFとMC3T3-E1の細胞増殖に関して抑制的であった。

2. 脱アセチル化度0%のキチンシート(DAC-0)は、HGFではコントロールと同程度の細胞増殖を示したが、MC3T3-E1の細胞増殖にはやや抑制的に作用した。

3. 脱アセチル化度35%のキチンシート(DAC-35)は、今回検討した脱アセチル化キチンの中では、両細胞の細胞増殖率が最も高く、MC3T3-E1細胞内のアルカリフォスファターゼ活性も比較的高値を示した。

4. これらの結果からDAC-35がHGFとMC3T3-E1に対して最も親和性が高いことが明らかになり、軟組織創面や骨創面への適用にDAC-35が適する可能性が示唆された。

本論文の要旨は第49回日本口腔科学会総会(1995年4月、岐阜)において発表した。

引 用 文 献

- 1) 木船紘爾：キチン人工皮膚。化学工業 42: 800-804 1991.
- 2) 松永若利：採皮創におけるキチン膜(創傷被覆保護材)の有効性-LPDSとキチン膜のハーフサイドテストによる一。新薬と臨床 39: 216-220 1990.
- 3) 古谷昌裕, 飯田正人, 他：キチンスポンジの口腔外科領域における臨床使用経験。歯科ジャーナル 24: 451-454 1986.
- 4) 大月佳代子, 大西正俊, 他：キチン創傷被覆保護材の口腔粘膜欠損部への臨床応用。日口外誌 36: 2103-2110 1990.
- 5) Tokuhisa, M. and Tominaga, N.: Effects of chitin on the production of chemical mediators by peripheral monocytes. Jpn J Oral Biol 36: 591-597 1994.
- 6) 徳久道生, 富永尚宏, 他：キチン上で培養したマクロファージ産生物のヒト歯肉由来線維芽細胞様細胞に及ぼす影響。日口外誌 42: 56-64 1996.
- 7) 中村 幹：In vitroにおけるキチンのフィブロネクチンおよび線維芽細胞遊走因子の産生誘導に及ぼす影響。日口外誌 43: 148-156 1997.
- 8) 中村 幹, 徳久道生, 富永尚宏, 空閑祥浩, 水野明夫, 梅本俊夫：キチンの線維芽細胞増殖および上皮成長因子産生に及ぼす影響。日口外誌 43: 157-164 1997.
- 9) 木船紘爾：キチン, キトサンのメディカルへの応用。第1版, 技報堂出版, 東京, 1994, 7-13頁.
- 10) 戸倉清一, 西村紳一郎：非哺乳類多糖の新しい展開—新素材としてのキチンの医学領域での利用を中心に—。蛋白質 核酸 酵素 31: 1621-1631 1986.
- 11) 西村恵子, 東 市郎：キチン誘導体の免疫活性。免疫薬理 4: 522-525 1986.
- 12) Nishimura, K., Nishimura, S., et al.: Immunological activity of chitin and its derivatives. Vaccine 2: 93-99 1984.
- 13) Nishimura, K., Nishimura, S., et al.: Adjuvant activity of chitin derivatives in mice and guinea-pigs. Vaccine 3: 379-384 1985.
- 14) 石川圭子：ヒドロキシアパタイトの生体適合性に関する細胞生物学的研究—ヒト歯肉細胞の株化による実験系の確立とヒドロキシアパタイト表面での細胞行動の解析—。歯基医誌 33: 513-533 1991.
- 15) 菅原 勇, 石坂重昭, 他：MTT アッセイ細胞増殖能および細胞障害試験に応用可能な迅速比色定量法。医学のあゆみ 128: 733-735 1984.
- 16) Prudden, J.F. and Nishihara, G.: The acceleration of wound healing with cartilage-I. Surgery Gynecology Obstet-

- rics 105: 283-286 1970.
- 17) 野口順蔵, 戸倉清一: キチン線維およびキチンをブレンドしたセルロース線維の研究. 高分子化学 30: 320 1973.
- 18) 戸倉清一, 西 則雄: 天然多糖類の新しい利用法. 化学と生物 15: 766-773 1977.
- 19) Deschamps, J.R. and Castle, J. E.: Microcry stalline chitin: its preparation and properties. Proceedings of the Second International Conference on Chitin and Chitosan 1982, p63-65.
- 20) 永島知明, 坂元晴彦, 他: 上顎洞手術にキチンスポンジ付きガーゼタンポンを用いた臨床経験. 日口外誌 37: 492-498 1991.
- 21) 宮原 透: キチン止血剤の使用経験. 診療と新薬 28: 1703-1710 1991.
- 22) 千葉恭久: 鼓膜穿孔閉鎖におけるキチン膜の有用性について. 耳喉, 頭頸部外科 65: 739-743 1993.
- 23) 中島正治, 藤正 巖, 他: キチンの医用材料への応用. 人工臓器 14: 868-871 1985.
- 24) 前田睦浩, 井上幸雄, 他: 生体材料としてのキチン (poly-N-acetyl-D-Glucosamine) - その基礎的性質と臨床応用について. 別冊整形外科 18: 196-200 1990.
- 25) 鈴木賢二, 田原英樹, 他: 消化器癌の術中取り残しに対する CDDP を用いた徐放性局所抗癌剤の開発. 癌と化学療法 19: 1728-1730 1992.
- 26) 佐藤道淳: キトサンの凝集剤としての応用. キチン, キトサン研究会編; キチン, キトサンの応用. 技報堂出版, 東京, 1990, 211-235頁.
- 27) 橋本正憲: 高分子凝集剤, 核酸, エンドトキシン除去剤への応用, キチン・キトサンの開発と応用. 工業技術会, 1987, 288-311頁.
- 28) 岸本三郎, 玉置公一: 創傷治癒に対するキチン膜の作用機序について. 皮膚科紀要 82: 471-479 1987.
- 29) 今井庸二: 組織培養法による生体適合性試験. 病態生理 3: 366-371 1984.
- 30) Nishimura, K., Ishihara, C., et al.: Stimulation of cytokine production in mice using deacetylated chitin. Vaccine 4: 151-156 1986.
- 31) 内田 泰: キチン, キトサンおよびオリゴ糖の抗菌性とその応用. キチン, キトサン研究会編; キチン, キトサンの応用. 技報堂出版, 東京, 1990, 71-98頁.