

## N-Acetyl-D-glucosamine (NAG)의 피부주름 개선 효과

김 광 수<sup>†</sup> · 최 근 호 · 최 장 우 · 최 준 학 · 한 송 희 · 남 상 윤\* · 이 승 화

나드리화장품(주) 기술연구소, \*전주대학교 자연과학부

### Anti-wrinkle Effect of N-Acetyl-D-glucosamine (NAG)

Kwang Soo Kim<sup>†</sup>, Gun Ho Choi, Jang Woo Choi, Jun Hak Choi, Song Hee Han,  
Sang Yun Nam\*, and Seung Hwa Lee

R&D Center, Nadri Cosmetics Co., Ltd., 3, Kyunsan-ri, Chinwi-myun, Pyungtaek-si, Kyungki-do 451-863, Korea

\*Department of Biological Science, School of Science and Technology, Jeonju University

**요약:** N-Acetyl-D-glucosamine (NAG)는 보습제로 사용되어지는 히아루론산의 구성물질인 뮤코 다당류의 일종이며, 특히 화장품으로서 응용은 보습제로서의 사용이 최초이다. 본 실험에서는 게나 새우의 껍데기에서 추출된 키틴을 탈아세틸화 하여 얻은 NAG를 화장품 원료로서 적용하고자 하였다. 현재 기능성 주름 원료로 알려진 레티놀(retinol)과 NAG를 비교하기 위하여 섬유아세포의 활성능력 및 콜라겐 생성촉진 효과를 비교 실험하였으며, 제형 내에서의 안정성을 위하여 HPLC로 역가를 측정하였다. 실험결과, 게의 껍질로부터 유도된 NAG는 피부에 자극을 전혀 주지 않으면서 섬유아세포의 세포활성 및 콜라겐의 생성을 촉진시키는 효과를 나타내었으며, 헤어리스 마우스를 대상으로 실험을 실시한 결과 피부층의 변화를 통하여 주름의 감소 효능을 볼 수 있었다.

**Abstract:** Anti-wrinkle effect of N-acetyl-D-glucosamine (NAG) was evaluated by collagen synthesis and proliferation of normal human fibroblast. NAG was obtained by purifying deacetylated chitin which can be derived from chitin-rich crab shell. We studied in *in-vitro* cultures of human normal fibroblast, whether synthesis of collagens and fibroblast growth activation in these cells can be enhanced in the presence of NAG. It did not show any adverse effects in human skin irritation patch test. In *in-vivo* mouse test, it showed anti-wrinkle effect in hairless mouse (6W/F). From the HPLC analysis, the stability of NAG in the cosmetics product could be maintained for a long time. These results demonstrated that NAG can be useful anti-wrinkle cosmetic ingredient.

**Keywords:** anti-wrinkle, collagen synthesis, stable ingredient, hairless mouse.

### 1. 서 론

피부의 노화는 자연노화와 자외선 등에 의한 광 노화로 나눌 수 있다. 피부 노화 메카니즘은 어느 한 가지 학설로 설명되어지는 것이 아니다. 이미 밝혀진 연구결과나 진행중인 연구결과에 따르면 성장기가 멈춘 시기의 피부를 왕성한 상태의 피부 구조 재 구축에 의하여 재생하는 것은 거의 불가능에 가깝지만, 이미 생성된 주름에 대해서는 보다 적극적인 개선이 가능하여 보다 탄력적이고 매끄러운 피부로 가꿀 수 있는 것으로 밝혀지고 있다.

Glucosamine은 골관절염이나 상해로부터의 손상을 보수

하기 위해 필요한 물질을 관절에 제공한다. 특히 글루코사민은 연골에서 발견되는 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan (GAG))이라 불리는 뮤코다당류(mucopolysaccharide)를 만드는 물질이며, 그 외 소화기, 순환기 내의 기초점막, 관절부위의 활액, 인대, 건을 포함한 신체조직의 대부분을 이루는 물질이다. 또한 글루코사민은 상처치유의 역할을 한다.

NAG는 게나 새우의 껍데기에서 추출된 키틴을 탈아세틸화하여 얻은 염기성 다당류의 일종이다. 그 기본 구조는 셀룰로오스와 유사하지만 분자내의 양이온기를 가진 매우 특이한 천연고분자이며 이용방법에 따라서 상당히 우수한 특성을 가지고 있다. 히아루론산은 NAG와 D-glucuronic acid를 구성성분으로 하는 뮤코다당류로서,

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: fungi71@nadri.com)

천연에서는 닭뿔이나 사람의 땀줄에서 추출되며, 상처치유에 사용되어지며[11], 현재는 미생물에 의한 생산이 주류를 이루고 있다. 수분을 보유하고, 세포 밖의 공간을 유지, 이온 용질 및 영양분의 운반을 원활하게 한다[1,2]. 히아루론산은 세포 이동, 차이, 성장, 혈관 발생, 면역조절에 영향을 주고, 세포간질의 구조를 변경시키며, 세포 부착을 조절한다[3-7]. 모든 기관들 중에, 피부는 히아루론산 함량이 가장 높은 것 가운데 하나이며, 총 히아루론산의 약 50%에 해당한다[1]. 히아루론산의 함량은 알려진 바에 따르면 노화되는 동안 감소한다[8,9]. 그것은 주름형성 및 피부 탄성 감소에 기여할 수도 있다. 그러나 피부 히아루론산 대사의 조절은 적절히 연구되지 않았다[10].

본 연구에서는 게나 새우의 껍질에 다량 존재하는 키틴을 탈아세틸화 하여 히아루론산의 구성성분 중의 하나인 NAG를 확보하였으며, 이를 이용하여 섬유아세포의 활성화 및 콜라겐 합성능력을 비교하였다. 헤어리스 마우스(Balb c/nude)를 대상으로 NAG를 포함한 제품의 진피층 변화를 실험을 통하여 제품의 효능을 평가하였다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 2.1. 실험재료

본 연구에 사용되어진 NAG는 게의 껍질을 이용하여 산 및 염기에 의해 분해하여 키틴을 생산한 후 염산으로 결정화하여 이온교환수지 및 아세틸화와 결정화를 통해 백색 분말의 원료를 생산하여 사용하였으며, 성분분석을 위한 표준품은 시그마사(Sigma A3286)로부터 구입하여 사용하였다. *In-vitro*에 사용되어진 세포주는 사람유래의 섬유아세포(ATCC CCL-28)를 DMEM (Gibco)배지를 이용하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C, FBS (Gibco) 5% 조건하에서 배양하여 사용하였다. 비교대상의 원료로서 레티놀(all-trans retinol, Sigma)을 구입하여 사용하였다.

### 2.2. NAG의 제조

NAG는 게의 껍질로부터 HCl 및 NaOH를 처리하여 키틴을 얻었다. 위 조건에 의하여 얻어진 키틴에 염산을 이용하여 가수분해와 필터처리 후 물로 씻어내어 결정화에 의해 D-glucosamine HCl을 얻어내었다. D-Glucosamine HCl을 이온교환수지를 통과하여 HCl을 떼어 낸 후 아세틸화와 결정화를 통하여 백색의 NAG를 얻었다.

### 2.3. 섬유아세포 증식효과 측정

기능성 화장품의 효력부분의 검증법 중 하나로 사용되어 지는 사람 유래의 섬유아세포에 대한 원료의 증식효과를 실험하였다. MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma M5655] 실험법

Table 1. Marking of Human Patch Test

Response	Grade	Interpretation creatia
-	0	Negative
+/-	0.5	Doubtful Slight reaction and erythema
+	1	Erythema + Induration
++	2	Erythema + Induration + Vesicle
+++	3	Erythema + Induration + Bullae

을 실시 하였다.

섬유아세포를 -80°C 또는 액체질소(LN<sub>2</sub>)상에 보관하며 배양하여 실험에 이용하였으며, 96 well plate에 1 × 10<sup>4</sup> cells/well씩 동일하게 heamocytometer를 이용하여 계수한 후 분주하였다. DMEM (FBS 5%)배지로 24 h 배양 후 새로운 serum free 배지로 교환하여 주고 실험대상 원료를 적정농도로 단계별 희석하여 처리한다. 시험대상의 원료는 NAG, 레티놀을 사용하였다. 원료가 처리되어진 96 well plate를 다시 24 h 동안 배양하였다. 배양 후 MTT용액(5 mg/mL) 50 μL씩을 각 well에 첨가하여 3 h 동안 추가적으로 배양하고, 상등액을 모두 버린 후, 각 well에 DMSO (dimethyl sulfoxide, Sigma) 150 μL를 첨가하여 교반한 후 ELISA (μ Quant, Bio-Tek instruments, Inc.)로 흡광도 540 nm에서 측정하였다.

### 2.4. 콜라겐 생성량 측정

섬유아세포를 -80°C 또는 액체질소(LN<sub>2</sub>)상에 보관하며 배양하여 실험에 이용 하였으며, 90 well plate에 1 × 10<sup>4</sup> cells/well씩 동일하게 Heamocytometer를 이용하여 계수한 후 분주하였다. DMEM (FBS 5%)배지로 24 h 배양 후 새로운 serum free 배지로 교환하여주고 실험대상 원료인 레티놀과 NAG를 적정농도로 단계별 희석하여 처리한다. 원료가 처리 되어진 96 well plate를 다시 24 h 동안 배양하였다. 배양되어진 배양 상등액을 시판되어지는 콜라겐 측정용 kit (procollagen type-I C-peptide MK101, Takara)를 이용하여 생성되어진 콜라겐의 양을 측정하였다.

### 2.5. 자극도 실험

NAG의 피부 안전성 측정을 위하여 피부 일차 자극도를 20세 이상 40세 미만의 성인 남·녀 20명을 선정하여 테스트하였다. Finn chamber에 NAG 2% 함유의 제품과 자사 레티놀 2500 IU 함유의 제품을 대상으로 20 μL 처리하여 첩포 시험을 실시하였다. 첩포시험은 등의 정중양을 피하여 양측 등에 부착하였으며 48 h 동안 부착 후 제거하였다. Table 1의 판정 기준에 의하여 판독된 데이터를 처리하였다.

## 2.6. NAG 함유 제품의 안정성 평가

제품에 들어있는 NAG의 농도 및 시간에 따른 안정성을 확인하기 위해서 HPLC를 이용하여 역가의 측정을 실험하였다. 표준물질로 NAG 10 mg을 정밀하게 계량하여 용매(아세트나이트릴 : 정제수 = 80 : 20)를 넣어 100 mL로 정량하여 표준액으로 하였다. NAG를 2% 함유한 제품 500 mg에 용매 50 mL를 넣고 10 min간 초음파 진탕하여 검체를 충분히 용해시킨 후 100 mL로 정량하여 검액으로 사용하였다. Liquid chromatography system은 solvent delivery module, UV detector, auto sampler가 장착된 Agilent 1100 series 장비를 사용하였다.

사용된 컬럼은 안지름 4.6 mm, 길이 25 cm인 스테인레스강관에 5  $\mu$ m의 액체 크로마토그래프용 polyamino화된 polyvinyl alcohol로 충전된 제품을 사용하였다(Asahipak NH2P-50 4E S5 4.6  $\times$  250 mm). 이동상은 acetonitrile (HPLC Grade, Fisher Scientific), H<sub>2</sub>O (HPLC Grade, Fisher Scientific)를 80 : 20(v/v)로 혼합하여 사용하였으며, 이동속도는 1 mL/min, 파장은 200 nm에서 측정하였다. 컬럼의 온도는 30 $^{\circ}$ C를 유지시켰다. NAG의 안정도를 확인하기 위해서 시간에 따른 [AA]m/[AA]s의 비율을 계산하였다. [AA]m : NAG 2%를 함유하고 있는 제형의 peak 면적/[AA]s : 표준액의 peak 면적 - 수식(1) NAG 함유 제품과 자사 레티놀 함유 제품과의 안정성 비교를 위해 시간에 따른 레티놀의 안정성을 HPLC로 측정하였다. 레티놀(sigma) 0.01 g을 100 mL IPA에 완전히 용해시킨 후, 2 mL를 분취하여 IPA로 50 mL 정량하여 표준액으로 사용하였다. 이 용액을 UV 측정하여 순수 레티놀의 함량을 확인하였다. 상기의 레티놀을 7.509 ppm이 되도록 IPA 용매를 사용하여 준비한 다음 분석시료로 시험하였다. 사용된 컬럼은 안지름 4.6 mm, 길이 25 cm인 스테인레스강관에 5  $\mu$ m의 액체 크로마토그래프용 옥틸실린화한 실리카겔이 충전된 제품을 사용하였다. 이동상은 메탄올(HPLC Grade, Fisher Scientific), H<sub>2</sub>O (HPLC Grade, Fisher Scientific)를 93 : 07(v/v)로 혼합하여 사용하였으며 이동속도는 0.8 mL/min, 파장은 325 nm에서 측정하였다. 컬럼의 온도는 25 $^{\circ}$ C를 유지시켰다.

## 2.7. NAG 함유 제품의 피부조직 변화 측정

실험동물은 체중 20  $\pm$  1.5 g의 무모생쥐를 사육실에서 일주일간 예비 사육하여 순화시킨 후 각 군당 3마리씩 총 4개 군으로 나누어 10일간 실험하였다. 사육실의 온도는 25  $\pm$  1 $^{\circ}$ C를 유지하였고 실내조명은 12 h 주기로 조절하여 실험하였다. 각 실험 동물군은 I군은 정상군, II군은 제형 베이스, III군은 레티놀 함유 제형, IV군은 NAG 함유 제형으로 처리 하였다. 각 개체의 조직을 1 mm<sup>2</sup>의 크기로 적출한 후 2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde,

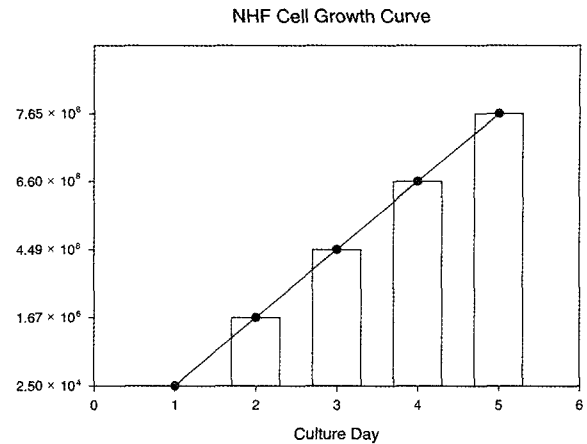


Figure 1. Growth curve of normal human fibroblast.

0.06% calcium chloride, 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)로 조성된 modified karnovsky 용액에 고정하였다. 고정된 조직은 실온에서 1 h 방치 후 4 $^{\circ}$ C 냉장으로 보관하였다. Modified karnovsky 용액을 제거한 후 0.1 M phosphate buffer로 40 min씩 3회 세척한 다음 후 고정을 1% OsO<sub>4</sub> (0.1 M phosphate buffer)용액에 빛을 차단한 상태로 실온에서 90 min간 1회 세척 후 50%, 70%, 90%, 95% 에탄올 농도 상승 순으로 각 15 min씩, 100% 에탄올로 각 20 min씩 4회 탈수하였다. 탈수 후 100% 프로펠렌 옥사이드로 15 min간(2회) 조직을 침투시키고 통상적인 방법으로 만든 epon을 이용하여 24 h 동안 70 $^{\circ}$ C에서 resin을 중합화 하였다. 초박절기(Leica UCT)를 이용하여 약 800 nm 두께로 semi-thin section하여 toluidin blue로 염색하고, 광학현미경(Olipus BX51, DP-50 digital camera)으로 관찰하였다.

## 3. 결 과

### 3.1. 섬유아세포 증식 효과

세포의 상태를 파악하기 위하여 예비실험으로 ATCC로부터 분양받은 normal human fibroblast (ATCC CCL-28)의 성장곡선을 측정하기 위하여 초기 배양 세포수를 2.5  $\times 10^4$  ea로 하여 5일 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 배양하여 그 결과를 Figure 1에 표기하였다. 5일 동안의 성장 속도는 일정한 속도를 유지하면서 세포의 증식이 일어남을 볼 수 있었다.

예비 실험을 통하여 NAG의 최적 농도 및 최적 배양시간을 각각 1.0E-3%부터 1.0E-1%의 농도와 24 h의 배양시간을 도출하였다. 이에 양성 대조군인 레티놀과 음성 대조군인 무첨가군과의 상관관계를 실험하기 위하여 각 시험군 및 대조군의 시료를 NAG의 경우 1.0E-5%부터

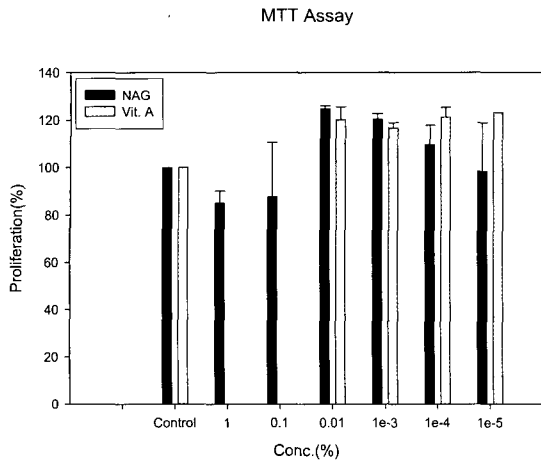


Figure 2. Growth activation effect of NAG and retinol for normal human fibroblast.

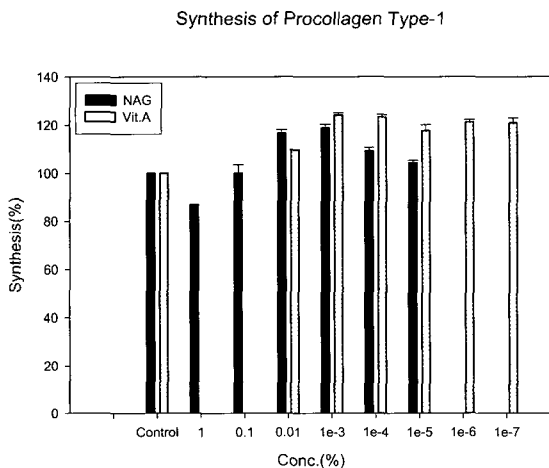


Figure 3. The effect of procollagen type-I synthesis.

1%까지, 레티놀의 경우 1.0E-7%부터 1.0E-2%까지로 단계별 희석하여 처리하고 기 서술한 실험 방법에 의하여 그 실험을 진행하였으며, 예비 실험의 결과를 토대로 그 배양시간은 24 h으로 제한하여 실시하였다.

결과에서 볼 수 있듯이 시험군인 NAG와 양성대조군인 레티놀 모두에서 무 첨가군에 비하여 세포 증식능을 나타내었다. 1.0E-3%부터 1.0E-1%의 경우 NAG와 레티놀은 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다(p < 0.05). 무첨가군을 100%로 보았을 경우, NAG는 1.0E-2%의 농도에서 약 125%의 세포 증식능을 나타내는 것을 볼 수 있었으며, 양성대조군인 레티놀의 경우 동일 농도에서 약 120%의 세포 증식능을 보였다(Figure 2).

3.2. 콜라겐 생합성 촉진효과

세포 증식능에 따른 결과를 토대로 하여 세포의 증식

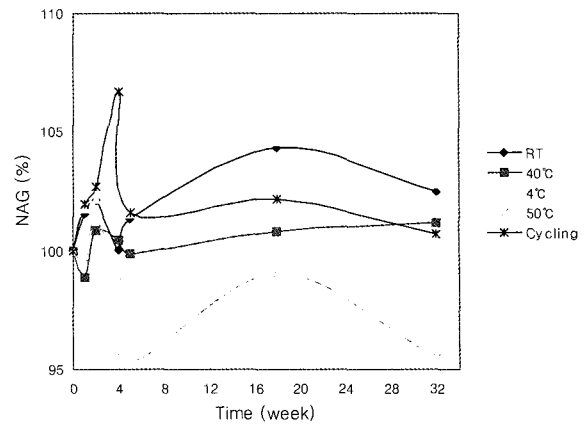


Figure 4. Efficacy of stability by included NAG cosmetics products.

에 따른 콜라겐의 합성능에 대한 실험을 실시하였다. 시판 되어지고 있는 Takara사의 MK-101 procollagen type-1 EIA kit를 이용하여 세포를 배양한 상등액을 통하여 기 서술되어진 실험방법에 의거하여 실험을 실시하였다. 3회 반복 실험을 통하여 시험군인 NAG와 양성 대조군인 레티놀의 콜라겐 합성능을 비교하여 세포 증식능과의 상관관계를 통계적으로 분석하였을 때 시험농도 1.0E-3%부터 1.0E-2%의 농도에서 NAG와 레티놀은 통계적(p < 0.05)으로 유의한 차이를 나타내었으며, NAG와 레티놀 모두 control과 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다(p < 0.05). Figure 3의 경우 실험 결과에 대한 흡광도 수치에 대하여 하기의 수식에 의하여 백분율로 환산하여 구한 값에 의하여 결과를 도시 하였다.

$$\% = ((\text{NAG OD값} - \text{Control OD값}) / \text{NAG OD 값}) \times 100$$

$$\% = ((\text{레티놀 Control OD값}) / \text{레티놀 OD 값}) \times 100$$

수식(2)

1.0E-3%의 농도를 단일 비교 하였을 때 NAG의 경우 약 119%의 콜라겐 합성능을, 레티놀의 경우 약 124%의 콜라겐 합성능을 나타내었으며, 1.0E-2% 농도에서부터 콜라겐의 합성능이 무첨가군에 비하여 크게 차이나는 것을 볼 수 있었다.

3.3. 피부일차자극 시험

피험자 20명에 대하여 실시한 피부 철포 시험을 실시 하였다. 시험결과 레티놀을 함유한 제품에 대하여는 피험자 대부분에서 경자극도를 나타내었으며, NAG함유 제품의 경우 무자극으로 판정되었다.

**Table 2.** Stability of Cosmetics Products by NAG and Retinol

Month	Products	Include of NAG (%)	Include of Retinol (%)	
			4°C	RT
0	102	106.6	104	
1	101	105.8	100	
3	100	102.1	95	
6	101	93.2	91.9	
12	100	90	76.5	
18	99	ND	ND	
24	99	ND	ND	
30	98	ND	ND	

ND : Not Detection

### 3.4. 제형의 안정성

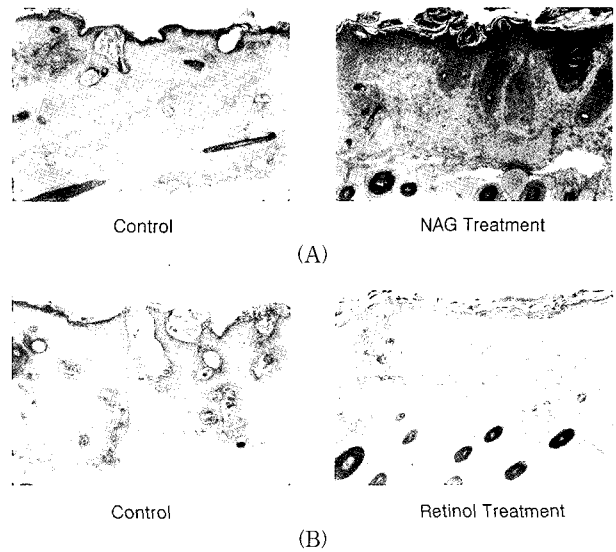
화장품 제형에 원료를 첨가하여 제조 후 제형내의 원료 안정성을 측정하기 위하여 현재 기능성 화장품 중 주름개선 화장품의 원료로 통상 사용되고 있는 레티놀을 대조군으로 하여 각각 제형을 제조하여 30개월간 보관하면서 그 역가를 HPLC를 이용하여 측정하여 Table 2에 나타내었다. 결과에서 볼 수 있듯이 레티놀의 경우 밤과 낮의 사용에 제약을 받으면서 그 역가의 측정 가능 기간이 최대 12개월까지 측정 가능하였으며 4°C에서 보관시에 최대로 약 90%만을 제형내에서 유지하였다. 반면, 본 연구에 사용되어진 NAG의 경우 최대 30개월까지 그 역가를 보존하면서 98% 이상의 역가를 유지하는 안정성을 보였다.

### 3.5. 피부조직의 변화

헤어리스마우스(Blab/c-nu)를 구입하여 4개의 군으로 나누어 10일간 피부에 제품을 도포하여 생검에 의한 조직 염색에 의하여 조직의 변화 형태를 광학 현미경으로 관찰하였다. 관찰 결과 조직 염색층의 변화가 무처리 군에 비하여 NAG함유 제품을 사용하였을 때 그 층이 좀더 조밀해 지는 것을 볼 수 있었으며, 자사의 레티놀 제품과의 비교에서도 우위를 나타내었다(Figure 5).

## 4. 고 찰

상기의 모든 실험을 통하여 보습제로 사용되어지며 히아루론산의 주요 구성물질의 하나인 NAG는 안전성 및 안정성 그리고 세포증식효과와 콜라겐의 생합성능을 증가시키는 우수한 물질임을 알 수 있었다. 현재 기능성 화장품 중 주름 개선 물질 원료로 주로 사용되어지고 있는 레티놀에 비하여 원료 자체의 안정성 및 제형내에 첨가하였을 때의 안정성 모두 탁월한 효과를 보였으며, 최대



**Figure 5.** Photomicrographs of cultured mouse skin stained hematoxylin and eosin. (A) is treatment consist of NAG cosmetics and (B) is consist of retinol cosmetics.

30개월 동안에 98% 이상의 역가를 보존하는 것을 볼 수 있었다. 섬유 아세포를 이용한 세포의 증식활성 및 프로콜라겐의 생성능력 역시 각각 125% 및 119%의 결과를 얻을 수 있었다.

더불어 직접적인 인체 대상의 효과 실험 및 콜라게나아제(MMP-1) 및 엘라스타아제 저해능 등의 추가 실험에 의해서 고갈되어진 기능성 화장품 시장의 주원료로서 각광 받을 수 있는 물질로 생각되며, 원천적인 기원이 계의 껍질 등의 천연유래이기 때문에 폐자원의 활용도에도 큰 영향을 미칠 것으로 사료된다.

## 참고 문헌

1. T. Sayo, S. Sakai, and S. Inoue, Regulation of hyaluronan synthesis in keratinocytes and its modulator, *IFSCC* (2002).
2. V. James, E. G. Suzanne, J. Gary, and J. V. John, Inhibition of type I procollagen production in photodamage: correlation between presence of high molecular weight collagen fragments and reduced procollagen synthesis, *J. Inv. Der.*, **119**(1), 122 (2002).
3. A. A. Van de Loosdrecht, E. Nennie, G. J. Ossenkoppele, and R. H. Beelen, Langenhuijsen MM. cell mediated cytotoxicity against U937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay, A methodological study, *J. Immunol. Methods*, **141**(1), 15 (1991).

4. F. De Marchis, D. Ribatti, C. Giampietri, A. Lentini, D. Faraone, M. Scoccianti, M. C. Capogrossi, and A. Facchiano, Platelet-derived growth factor inhibits basic fibroblast growth factor angiogenic properties *in vitro* and *in vivo* through its alpha receptor, *Blood*, **99**(6), 2045 (2002).
5. Y. Tsukada, K. Miyazawa, and N. Kitamura, High intensity ERK signal mediates hepatocyte growth factor-induced proliferation inhibition of the human hepatocellular carcinoma cell line HepG2, *J. Biol. Chem.*, **276**, 40968 (2001).
6. M. B. Taubman, B. Goldberg, and C. Sherr, Radioimmunoassay for human procollagen, *Science*, **186** (4169), 11150 (1974).
7. A. M. Parfitt, L. S. Simon, A. R. Villanueva, and S. M. Krane, Procollagen type I carboxy-terminal extension peptide in serum as a marker of collagen biosynthesis in bone, Correlation with iliac bone formation rates and comparison with total alkaline phosphatase, *J. Bone Miner Res.*, **2**(5), 427 (2000).
8. E. R. Savolainen, B. Goldberg, M. A. Leo, M. Velez, and C. S. Lieber, Diagnostic value of serum procollagen peptide measurements in alcoholic liver disease, *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **8**(4), 384 (1984).
9. Y. Niitsu, N. Ito, K. Kohda, M. Owada, K. Morita, S. Sato, N. Watanabe, Y. Kohgo, and I. Urushizaki, Immunohistochemical identification of type I procollagen in tumor cells of scirrhous adenocarcinoma of the stomach, *Br. J. Cancer*, **57**(1), 79 (1988).
10. U. Hiroshi, Y. Haruo, T. Ichiro, K. Naoki, M. Mitsunobu, O. Masahiro, K. Tsuyoshi, and F. Toru, Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs, *Bio-materials*, **20**, 1407 (1999).