

손상된 피부 재건을 위한 바이오인공피부의 개발 동향

¹서영권 · ²송계용 · †³박정극

¹동국대학교 생명과학연구원, ²중앙대학교 의과대학 병리학교실, ³동국대학교 생명화학공학과
(접수 : 2007. 12. 18., 게재승인 : 2007. 12. 31.)

Development of Bioartificial Skin for Skin Regeneration

Young-Kwon Seo¹, Kye-Yong Song², and Jung-Keug Park^{3†}

¹Dongguk University Research Institute of Biotechnology, Dongguk University 27-3, Choong-gu, Seoul 100-715, Korea

²Department of Pathology, Chung-Ang University, 221, Dongjak-gu, Seoul 156-756, Korea

³Department of Chemical and Biochemical Engineering, Dongguk University 3-26, Choong-gu, Seoul 100-715, Korea

(Received : 2007. 12. 18., Accepted : 2007. 12. 31.)

There are many different approaches to healing of acute and chronic ulcer and large skin defect, such as burn. Currently available wound covers fall into two categories. Permanent covering, such as autografts, and temporary ones, such as allograft including de-epidermized cadaver skin, bioartificial skin, xenografts, and synthetic dressings. Autologous skin grafting in the form of split- or full-thickness skin is still the good standard. Following on from developments in the 1980s involving the use of cultured keratinocyte grafts in wound healing, the last decade has been great progress in the fabrication of composite bioartificial skin grafts. However, two bottleneck on producing cultured bioartificial skin, whether of the simple epithelial cell sheet type, or the more complex composite type, continue to be the generation of sufficient keratinocytes cheaply and quickly and develop biocompatible dermal scaffolds. This article covers the development, clinical application, and current research directions associated with bioartificial skin.

Key Words : bioartificial skin, scaffolds, tissue engineering

서 론

체중 65 kg의 보통 사람의 총 피부는 2 m² 정도이고 무게는 체중의 16%, 약 10 kg이다. 피부의 가장 중요한 기능은 체내를 보호하고 체온을 조절하며 수분의 분비와 배출을 조절하는 것이다. 미국의 연간 화상 환자 200만 명 중 피부이식이 필요한 환자는 1만 명 정도이며 손상된 피부는 수분을 유지하는 기능을 상실하여 인체로부터 수분이 다량 방출되어 탈수에 빠지게 된다. 이 때 환자의 체액손실과 2차 감염을 막고 피부 재생을 촉진하기 위해 피사된 피부를 제거하고 상처 부위를 덮어 주는 상처 드레싱 (wound dressing) 처리는 상처 부위가 재생될 때까지 일시적으로 덮어 주는 치료법이다. 보통 화상환자 치료용으로 사용되는 천연 또는 합성재료를 이용한 인공피부는 드레싱으로서 조직손상부위를 감싸주어 감염과 탈수현상을 방지하는 목적으로 처치되고 있다.

더욱 적극적인 치료방법은 자가 이식 또는 동종이식을 하는 것이나 여러 문제점이 있다. 3도 이상의 심각한 화상을 입었을 때는 드레싱만으로는 부족하여 본인의 다른 부위의 피부를 도려내어 화상부위에 옮겨 이식하는 자가이식 치료법을 사용하고 있다. 그러나 이것은 새로운 상처를 유발할 뿐 아니라 전신의 30~40%에 달하는 넓은 부위의 화상을 입었을 때는 이 방법도 제약이 따르게 된다. 동종이식의 경우 피부의 공여자가 수혜자보다 적으며 이 공여자 역시 피부제공으로 인한 상처의 감염과 출혈 등의 문제가 있어 치료를 필요로 하게 되며 또한 수혜자의 면역 거부반응 문제도 있어 이식 후 지속적인 면역억제제를 투여해야 하는 문제도 발생하게 된다.

미국의 연간 화상 환자수는 200만 정도인데, 그 중 피부이식이 필요한 환자는 1만명 정도이다. 또한 최근 식생활의 변화와 인구의 노령화로 인하여 당뇨병 환자가 증가하고 있으며 이에 따른 합병증으로 당뇨병성 족부 궤양이 꾸준히 증가하고 있다. 미국의 당뇨병성 궤양환자는 60~80만 명이고 욕창환자는 100만 명 이중 정도가 심한 환자 20%(30만 명)가 인공피부이식 기술을 받고 있다. 또한 현재 피부 궤양의 전 세계 환자수는 약 1,800만 명으로 추정되며 피부

† Corresponding Author : Department of Chemical and Biochemical Engineering, Dongguk University 3-26, Seoul 100-715, Korea

Tel : +82-2-2260-3365, Fax : +82-2-2271-3489

E-mail : jkpark@dongguk.edu

창상치료제의 세계 시장규모는 약 25억 달러이며, 2004년부터 인공피부 및 바이오인공피부가 전체 창상치료 시장의 10%(3조원)를 점유 할 것으로 예측되고 있다. 국내 당뇨병성 궤양 환자수는 약 3만 명에 달하며 당뇨병성 족부 병변은 당뇨병환자의 2/3에서 일생동안 적어도 한번 이상 발생하며 이들 중 약 10~15%의 환자에서 족부궤양발생하고 이 궤양 환자의 10~30%가 족지 및 하지절단술을 시행 받음으로서 수술부위의 피부이식이 필요로 하게 된다. 이러한 화상, 욕창, 그리고 궤양 등의 치료에 있어 실제 피부와 같은 인공피부가 필요하게 되었으며(Fig. 1), 현재 조직공학 기술을 이용하여 생체적합성 고분자재료와 사람의 실제 세포를 접목시킨 바이오인공피부가 연구되어 지고 있다.

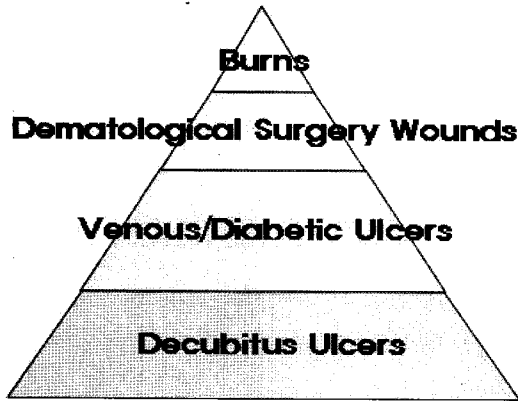


Figure 1. Applicable disease of artificial skin (Frost & Sullivan's report, Kalorama information, Wound care market vol. 1, 2003).

피부의 구조와 기능

표피의 95%는 각질형성세포로 그 안에 면역에 관여하는 랑게르한스 세포, 기계적인 자극을 느끼는 메르켈 (merkel's) 세포, 그리고 몸의 색에 관계되는 멜라닌색소를 생산하는 멜라닌세포가 존재한다. 표피의 구조는 중층 편평 상피이며 손바닥에서 1 mm, 발바닥에서 1.5 mm, 기타에서 약 0.1 mm 의 두께를 갖고 있으며 각질화현상을 보인다. 두꺼운 표피에서는 기저층, 가시층, 과립층, 투명층, 각질층으로 구분하지만 얇은 표피에서는 투명층은 볼 수 없다.

진피층은 대부분 섬유모세포 (fibroblast)와 콜라겐 섬유, 엘라스틴 (elastin)이 얽혀져 결합조직을 이루고 히아루론산, 더마탄설페이트 (dermatan sulphate), 콘드로이틴설페이트 (chondroitin-6-sulphate), 그리고 헤파란설페이트 (heparan sulphate) 등의 글루코사미노글리칸 (glycosaminoglycans)과 함께 세포주위기질을 형성한다. 진피는 표피하에 있는 두께 1~3 mm 의 치밀한 결합조직 층이며 맥관이나 신경이 많고 다수의 유극층 (dermal papilla)을 만들어 표피쪽으로 들어가 있다. 진피의 윗층은 한선과 혈관유두, 신경유두 등의 방향성 있는 발달로 피부부너를 형성한다. 진피의 아래층은 망상층 (reticular layer)이라고 하며 굵은 교원섬유가 서로 얽혀져 있다. 진피에는 탄성섬유가 망을 형성하고 있으며 모포나 한선의 주위에서 발달이 양호하다. 진피의 세포성분의 대부분은 섬유모세포이지만 신경세포, 대식세포

(macrophage), 림프세포 (lymphocyte) 등이 있으며 내피세포가 모세혈관을 만들고 있다.

기저막은 표피와 진피의 경계를 이루는 부분으로 콜라겐 성분과 비콜라겐 성분으로 구성되어 있는데 콜라겐 성분으로는 제 4형과 제 5형 콜라겐으로 되어있고 비콜라겐 성분으로는 라미닌 (laminin), 헤파란설페이트, 파이브로넥틴 (fibronectin) 등으로 구성되어 있다.

피하지방조직은 대부분 교원섬유의 격벽으로 둘러싸인 조직 덩어리고 이 안에는 혈관과 신경이 그물모양으로 뻗어 있으며 피하조직 (telasub-cutanea)은 혈관과 신경을 함유한 전형적인 소성결합조직으로 되어 있다. 피하조직은 진피에서 서서히 이행하며, 하부에 존재하는 근막이나 골막에 느슨히 결합한다. 그러나 진피의 이동성이 적은 손바닥, 두피 등에서는 다량의 섬유축이 수직으로 주행하고 심부조직과 밀접하게 결합되어 있다(Fig. 2).

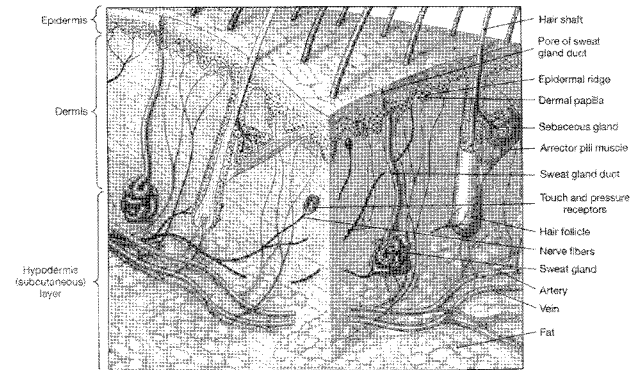


Figure 2. Structure of the skin. (Frederic H. Martini, Essentials of anatomy & physiology, 2nd, Prentice Hall, 2000).

드레싱제 및 인공 피부의 분류

환부에 드레싱 또는 피부이식법에는 이식은 크게 자가 이식과 같은 영구적인 이식 (permanet graft)과 일시적인 이식 (temporary graft)로 나눌 수 있다(Fig. 3). 일시적인 이식 물에는 표피층이 제거된 냉동 보존된 사체피부나 세포가 제거된 사체피부, 그리고 양막과 같은 동종이식물이 있으며, 돼지피부, 게 껍질에서 추출한 키토산, 해조류에서 추출한 알지네이트, 소의 피부 또는 건에서 추출한 콜라겐, 그리고 콜라겐을 변형시킨 젤라틴 등이 드레싱 제재로 개발되어 이용되고 있다. 그리고 조직공학 기술을 이용하여 상피세포만을 배양한 배양상피, 콜라겐 젤에 상피세포를 배양한 젤형 바이오인공피부(Fig. 4), 콜라겐 스폰지에 상피세포를 배양한 스폰지형 바이오인공피부, 폴리글라이콜산 (polyglycolic acid; PGA) 또는 나이론 메쉬에 섬유모세포를 배양한 바이오인공진피 등이 개발되어 현재 임상에 이용되고 있다(1-3).

자카이식은 가장 효과적이고 치료효과가 좋은 이식방법이나 한번에 넓은 부위를 이식하면 공여부위가 넓어져 주위로부터 감염 등의 위험이 있어 2~3회 시술을 해야 하며 한번 이식 후에는 2~3주간 공여부가 재생될 때까지 기다려야 한다. 따라서 이식이 필요로 하는 다른 환부가

수축되는 문제와 입원기간이 길어져 환자의 부담이 커지는 경제적 부담이 늘어나게 된다.

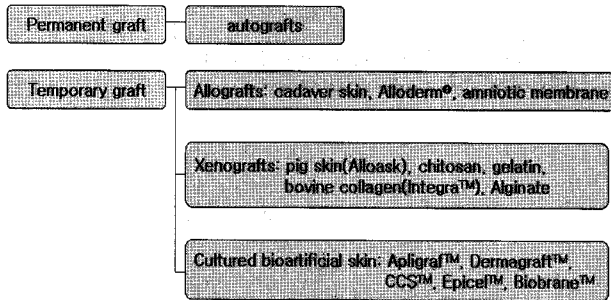


Figure 3. Dressing and wound cover materials.



Figure 4. Histology of reconstructed gel-type bioartificial skin composed of fibroblasts, keratinocytes and collagen. Original magnification: ×200, Scale bar = 50 μm.

자가이식이 부족할 경우 효과적인 방법은 사체피부를 이용하는 것으로서 사체피부를 냉동보존, 동결건조, 또는 글리세롤로 처리하여 세포를 제거하여 드레싱을 실시하고 환부의 바닥으로부터 혈관이 진입하면 드레싱한 사체피부를 제거하거나 더듬 (dermatome)으로 생착된 사체피부의 표피층과 진피층의 일부를 제거한 뒤 자가이식 또는 배양 표피 이식을 실시하게 되며 이렇게 이식을 하면 배양표피층의 생착률이 최대 95%까지 향상시킬 수 있다(4-6). 이러한 사체피부의 높은 치료 효과를 유지하면서 생착률을 높이고 다시 제거할 필요가 없이 가공된 이식물이 알로덤 (AlloDerm™)이라는 상품으로 표피층과 진피세포, 혈관내피세포를 완전 제거하고 기저막과 진피의 구조만을 남겨 동결 건조한 이식물이다(7). 깊은 화상의 경우 환부에 혈관 없어 생착이 잘 되지 않기 때문에 먼저 알로덤을 이식하여 혈관형성을 유도하고 생착된 알로덤 위에 메쉬형태의 자가 피부이식이 가장 좋은 치료효과를 보임이 관련 논문을 통해 보고되고 있다(8-10). 알로덤은 자가이식 다음으로 치료효과가 높으나 공급의 제한과 감염 및 에이즈와 같은 질병이 전파될 문제점은 아직 해결하지 못하고 있다.

양막은 임상적으로 피부화상, 욕창 그리고 궤양 등의 드레싱 및 복막조직 유착방지 등에 사용되어져 왔고, 안과영역에서도 스티븐-존슨 증후군과 각막 알칼리 화상 등의 질환에서 안구표면 드레싱으로 많이 이용되고 있다(11-16).

양막은 조직학적으로 단층인 양막세포 (amniotic cell)와 기저막 (basement membrane)으로 구성되어 있고 바닥막은 파이브로넥틴, 라미닌, 제 4형 콜라젠, 인테그린 α6β4 등이 포함되어 있다. 바닥막과 붙어 있는 간질층면 (stromal side)에는 주로 헤파란 설페이트 (heparan sulfate), 케라탄 설페이트 (keratan sulfate), 히알루론산 (hyaluronic acid), 제 1, 3형 콜라젠 등으로 구성되어 있다. 그 외에도 양막에는 상피성장인자 (EGF), 인슐린유사성장인자 (IGF), 형질전환성장인자 (TGF-α, 간세포성장인자 (HGF), 혈관내피성장인자 (VEGF), 단백질분해효소억제제 (TIMP-1, 2) 등의 많은 성장인자 (growth factor) 및 생리활성물질이 함유되어 있다(17, 18)

이러한 구조적인 특징과 구성 성분으로 인하여 드레싱으로 사용시 환부의 염증 감소, 물과 단백질 등의 전해물질의 손실 억제에 의한 반흔 감소 및 통증의 경감 등의 효과가 있고, 라미닌과 제4형 콜라젠 등의 기저막 성분들이 남아 있어 상피세포의 이동 및 재상피화를 촉진시켜준다. 양막 역시 생착되지 않고 일정기간이 지나면 분해되거나 건조되어 환부로부터 박리된다(19).

이종이식으로 이용되는 이식물은 젤라틴, 알지네이트, 키토산 등이 있으며 2도 이상의 깊은 화상에 진피 대체물로는 아직까지는 임상에 이용되지 못하고 있다(20-21). 현재 돼지의 진피를 동결 건조하여 드레싱으로 이용하는 연구는 현재 임상에 이용되고 있으며 동결 건조된 돼지 진피는 구조적으로 인체의 진피와 유사한 장점이 있고, 글리세롤처리, 동결건조와 감마 멸균을 처리함으로써 바이러스 등이 감염되는 문제를 최소화 하려는 연구들도 진행 중에 있다. 돼지의 진피는 2도 정도의 화상에 약 10일 정도 드레싱을 시켜주는 목적으로 이용되며, 메쉬 형태의 자가이식위에 덮어주는 드레싱제로도 사용되어지고 있다. 또한 그 위에 인체 각질형성세포를 배양하여 배양상피가 환부를 향하게 덮어주는 세포전달체 등 다양한 용도로 환부의 치료를 돕는데 이용되고 있으나 생착이 되지 않아 인체의 진피를 대체하여 이식하지는 못한다(22, 23).

영양공급세포 (NIH J2 3T3)를 이용한 각질형성세포의 배양법이 개발됨에 따라 배양상피세포층 (cultured epidermal sheets)을 이용한 화상치료가 가능하게 되었다. 마덴 (Madden) 등은 배양된 동종 상피세포층은 T세포가 배양되지 않기 때문에 사람 백혈구 항원 (human leukocyte antigen; HLA)을 발현하지 않으며 손상된 조직을 제거하고 이식하여야 치료효과가 높아짐을 보고하였으며, 필립스 (Phillips) 등은 동종 상피세포층도 궤양의 치료에 있어서 자가 상피세포층 이식부위만큼 치료효과를 향상시켰음을 보고하였다. 또한 버트 (Burt) 등은 남성의 각질형성세포로 배양된 배양 상피층이 여성 화상 환자에게 잘 생착되었으며, 브레인 (Brain) 등 역시 동종이식이 성공적으로 생착되었음을 보고하였다(24-26).

그러나 파브레 (Fabre) 등은 흰쥐의 각질형성세포를 배양하여 배양 상피층을 제조한 뒤 동종이식을 하였으나 생착이 되지 않았다고 보고하였으며, 오우백 (Aubock) 등은 이식후 2주후 분해되거나 박리되어 이식된 동종 상피세포층은 제거됨을 보고 하였다. 이러한 연구결과의 차이는 배양 상피층 제조시 사람 백혈구 항원을 유발하는 랑게르한스

세포가 제거되었는지와 면역억제방법, 그리고 환부의 깊이와 이식부위의 진피층이 제대로 형성되어 있는지에 따라 이식물의 생착 여부가 달라질 수 있다(27, 28). 또한 배양피부의 세포원으로 모낭의 외측모근초세포를 이용하여 상피세포층을 제조하여 케양치료에 이용하려는 연구도 진행중에 있다.

그러나 배양상피층은 배양기간이 2~3주정도 소요되고, 이식할 때 거즈에 붙여 이식한 뒤 배양상피가 생착 또는 일정 기간 후에 거즈를 제거해야하는 문제점이 있었다. 최근에 서(Seo)등은 이러한 문제점을 보완하기 위하여 상피세포를 동결건조된 양막위에 10일간 배양한 뒤 바로 환부에 양막이 위로 향하게 뒤집어 이식 (up and down)함으로써 배양상피층 이식의 새로운 방법을 개발하였다(Fig. 5). 이는 이식시 거즈를 대체하고 수분의 증발을 억제해 주며 배양상피층을 디쉬로부터 떨어뜨리기 위해 효소처리하는 단계를 생략할 수 있는 장점이 있으며, 가장 중요한 것은 배양기간을 기존의 절반정도로 줄임으로서 화상과 같이 응급한 수술을 필요로 하는 환자에게 매우 유용하게 이용될 수 있다(29).

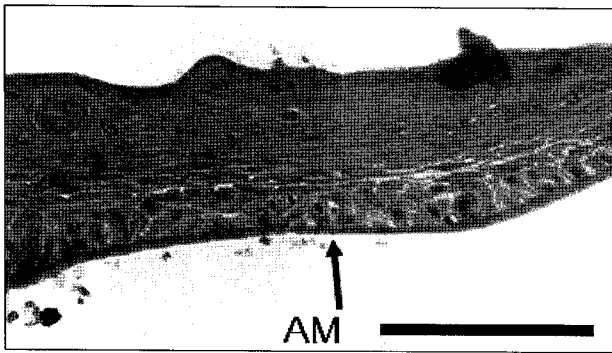


Figure 5. Histology of the cultured epithelial cell sheet on amniotic membrane (AM). Approximately 6~10 keratinocyte cell layers were formed on the deepithelialized AM. Original magnification: $\times 200$, Scale bar = 10 μm .

천연고분자인 콜라젠이나 생분해성 합성고분자인 폴리글라이콜산을 기질로 섬유모세포 및 각질형성세포를 배양한 바이오인공피부도 개발되어 현재 임상에 이용되고 있다(30). 소유래 콜라젠으로 제조된 인테그라 (IntegraTM, Integra Life Corp.)는 세포가 없는 콜라젠스폰지 형태의 인공피부로서 진피재생을 목적으로 이용되고 있고(31, 32), 이와 유사한 제품으로 콜라젠과 변성된 콜라젠으로 제조된 테루더미스 (Terudermis[®], Terumo Co., Japan)와 돼지콜라젠으로 제조된 펠락 (Pelnac[®], Gunze Ltd., Japan)이 현재 사용되고 있으며(33-35) 아플리그래프트 (ApligrafTM, Organogenesis, USA)는 전층 세포가 있는 젤형 바이오인공피부로서 케양치료용으로 허가를 받았다(36). 그리고 더마그레프트 (DermagraftTM, ATS, USA)는 바이크릴 (Vicryl)로 직조된 메쉬에 섬유모세포를 배양하여 당뇨병 케양 (diabetic ulcers)과 정맥성 케양 (venous ulcer) 치료용으로 승인을 받았으며 트랜스사이트 (TransCyteTM)는 화상치료용으로 승인추천을 받았다. 그리고 씨씨에스 (CCS[®], Oretec international, USA)는 콜라젠 스폰지에 섬유모세포와 각질세포가 배양되어 있는 전층 바이

오인공피부로 개발되어졌다(Fig. 6). 나거톤 (Naughton)등은 더미그레프트를 당뇨병 족부케양에 이식하여 치료효과를 확인하였으며(37-39), 사블린스키 (Sabolinski)등은 임상실험에서, 배양된 3차원 젤형 바이오인공피부인 그레프트스킨 (GraftskinTM)을 케양부위에 5회 반복 이식을 통하여 환부가 효과적으로 치료됨을 보고하였고(40), 이글스테인 (Eaglstein)등은 피부암 제거부위에 그레프트스킨을 이식하여 외과적 수술로 발생된 환부(지름 50 mm)에 치료효과가 있음을 관찰하였다(41). 그리고 코퍼 (Cooper)등은 인체의 조직에서 분리된 각질형성세포와 섬유모세포를 배양하여 콜라젠 스폰지에 전층 생인공피부를 제조한 뒤 누드마우스 이식실험을 통하여 치료효과를 검증하였으며(42), 보이스 (Boyce)등은 환자의 조직으로부터 세포를 배양하여 콜라젠 스폰지에 전층 바이오인공피부를 제조한 뒤 화상환자 본인에게 이식하여 자가이식 (autograft)과 유사한 치료 효과가 있으나 바이오인공피부를 여러 차례 이식해야하는 문제점이 있음을 보고하였다.

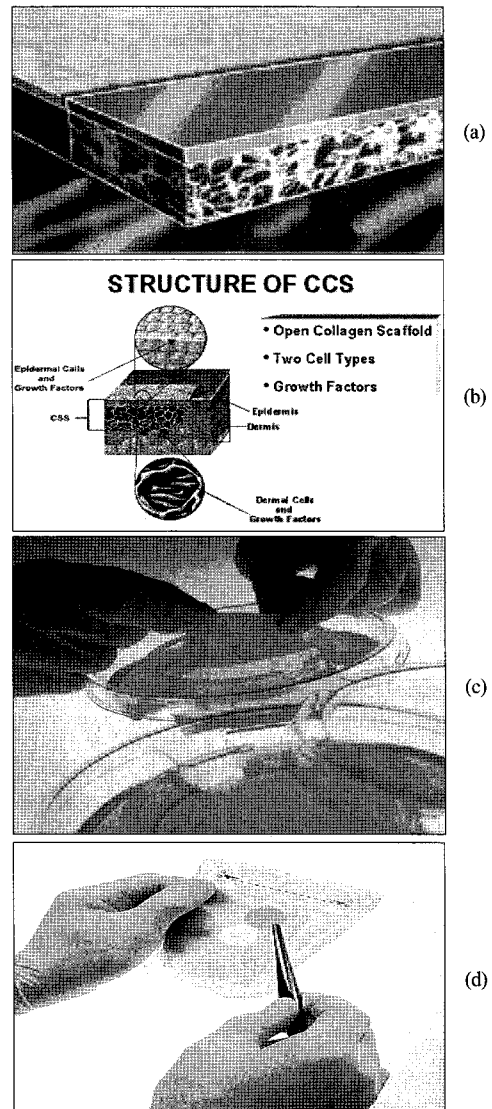


Figure 6. Commercial bioartificial skin, (a) IntegraTM (Integra Life Corp.), (9) OrCel-CCS[®] (ortec.), (c) ApligrafTM (Organogenesis Inc.), (d) DermagraftTM (Advanced Tissue Science Inc.).

이와 같이 환부의 치료를 위한 드레싱제 및 바이오인공피부는 더 효과가 우수한 제품의 개발을 위해 많은 연구자들에 의해 계속적인 연구가 진행중에 있다.

인공피부 제조를 위한 콜라젠과 히아루론산 스캐폴드

인공합성 스캐폴드는 천연 재료를 이용한 스캐폴드에 비해 세포적합성이 떨어지고 체내에서 염증반응 유발정도가 높다. 따라서 인공합성재료보다 천연재료가 현재 임상에 많이 이용되고 있으며, 천연재료를 이용한 스캐폴드의 물성 및 생체적합성을 향상시키려는 연구들이 진행되어 왔다.

스캐폴드 제조에 있어 스캐폴드가 너무 강직하면 상처 부위에 밀착되지 않아 수술 후 생착률이 떨어진다. 그리고 인공피부의 경우 이식부위의 최적의 수분 투과율 (moisture flux rate)은 $0.5 \text{ mg/cm}^2/\text{hr}$ 인데 이식부위가 건조하게 되면 수축을 하거나 환부와의 경계부위가 생착되지 못하며 이로 인해 혈관이 들어오지 못해서 영양과 수분공급이 이루어지지 못하면서 이식한 인공피부가 괴사되어 수술 실패의 원인이 된다. 따라서 인공피부를 제조하기 위해서는 굴곡강도 (bending rigidity), 수분투과율 (moisture flux rate), 혈액 적합성, 강도, 감염조절 (infection control), 합출물 조절 (fluid loss control), 분해속도, 면역거부반응, 공극 및 두께 조절 등에 역점을 두어야 한다(43).

콜라젠 겔에 섬유모세포를 배양하면 단백질 및 콜라젠 합성이 단층배양에 비해 현저히 줄어들며, 과도하게 수축된 겔은 화상환자치료용으로 이용하기에 크기가 작은 문제점이 있다. 따라서, 겔 형태의 스캐폴드에서 다공성 스폰지 형태의 스캐폴드로 연구의 방향이 전환되었다.

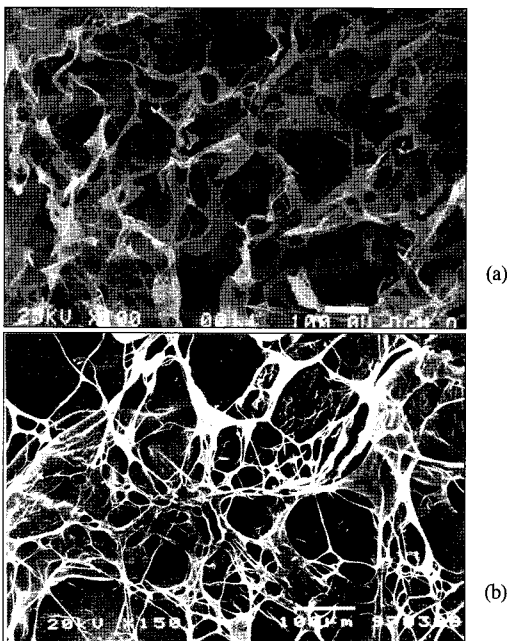


Figure 7. Scanning electron microscopy of cross-section of collagen sponge after cross-linking agent treatment. (a) with DHT treatment, (b) without DHT treatment. Scale bar = 100 μm .

야나스 (Yannas) 등은 송아지 건으로부터 추출한 불용성 제 1형 콜라젠을 0.05 M 초산에 넣어 60분간 분쇄기에 녹였고 이때 콘드로이틴-6-설페이트를 초산에 녹여 1.375 mg/ml/min 의 속도로 첨가하여 응집을 최소화하였다. 이를 동결 건조한 스폰지는 다공성 형태이고 수용액의 가교시약에 넣으면 구조가 파괴될 수 있으므로 먼저 진공오븐에 넣고 먼저 2시간정도 진공을 걸어 스폰지내의 미량의 수분을 제거한 뒤 105°C 까지 온도를 상승시켜 24시간동안 진공을 걸어주어 1차적으로 약한 가교결합을 형성하였다 (Fig. 7). 그리고 콜라젠과 글루코사미노글리칸의 결합률은 pH가 낮을수록 (pH 3.0) 높았으며 보관액의 종류에 따라 글루코사미노글리칸 용출량에 차이가 있었으며 콜라젠의 종류에 따라서도 글루코사미노글리칸 결합력에도 차이를 보이며 열처리(DHT) 가교결합시에 온도와 시간에 따라 가교정도가 달라지며 가교가 될수록 분자량이 줄어든다고 보고하였다(44-47).

실버 (Silver) 등은 불용성 콜라젠을 소가죽으로부터 추출하여, 콜라젠의 농도 (0.5~1.0%, w/v)와 pH (2.0~3.75)를 변화시켜 공극의 크기를 조절하였다(Fig. 8). 특히냉동 및 동결건조과정에서 공기접촉면과 용기접촉면의 온도 차이가 표면의 형태학적 차이를 만들게 되며 공기접촉면은 동결건조과정에서 비다공성 구조가 형성되며, 이는 용기접촉면 쪽으로 콜라젠 근원섬유 (fibril)가 이동되어 형성된 구조라고 보고하였다. 그리고 냉동시에 -80°C 이하로 급속하게 냉각시키면 균열이 생기기 때문에 이를 해결하기 위해 -60°C 와 -80°C로 단계적인 냉각방법으로 흠 없는 스폰지를 제조하였으며 냉동시간을 오랫동안 방치하면 시료중 약 25%는 균열이 발생함을 관찰하였다. 그리고 낮은 점도의 용액은 섬유형태 (fibrous)와 통로 (channel)가 있으며 약 300 μm 크기의 구조를 형성하며 높은 점도의 용액을 이용하면 통로와 층 (sheet)구조가 적으며 약 30 μm 크기의 공극구조를 형성함을 관찰하였다. 냉동 온도와 냉각속도는 얼음결정형성 (ice crystal growth)에 중요한 역할을 하게 되며 pH가 증가될수록 큰 통로와 공극의 섬유질 (fiber)구조가 관찰되며 pH가 낮으면 콜라젠의 용해 정도가 증가하여 물분자와의 결합이 증가되기 때문에, 물분자와 경계층의 물분자의 비율 그리고 pH의 변화가 구조에 영향을 미친다고 보고하였다(48).

또한 보이스 (Boyce) 등도 제조된 다공성 콜라젠 스폰지의 공극 크기를 콜라젠 용액의 농도 및 냉동온도에 의해 조절하였으며, 스폰지 표면의 막 제조를 위해 콜라젠과 글루코사미노글리칸 그리고 3%(v/v) 디메틸설폭옥사이드 (DMSO)를 섞어 부드러운 표면에 $40 \mu\text{l/cm}^2$ 로 바른 후 스폰지를 덮고 동결 건조하여 한쪽면에 각질형성세포를 배양하기 위한 막을 형성시킨 콜라젠 스캐폴드를 개발하였다(49).

기존의 연구에서는 대부분 글루타르알데하이드 (glutaraldehyde) 가교시약을 사용하였으나, 세척후에도 염증반응을 유발하는 문제가 남아있었다. 따라서 이를 대체할 수 있는 가교방법이 필요하게 되었으며, 에틸디메틸아미노프로필 카보디이미드 (1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide; EDC)가 도입되기 시작하였다. 파이프 (Piper)와 쿠페벨 (Kuppevelt)은 1.6% 제 1형 불용성 콜라젠 용액을 동결 건조하여 스폰지를 제조하고 가교시약으로 카보디이미드를 사용하여 가교유무에

따른 특성과 콘드로이틴설페이트를 스폰지에 첨가했을 경우의 물리적 변화에 대해 연구하였다. 카보다이마이드 시약으로 가교결합전후 표면의 구조적 특징을 전자현미경으로 관찰한 결과 가교전 열처리를 한 스폰지는 전처리를 하지 않은 스폰지보다 공극구조가 많이 파괴되었음을 보여주었고 가교시에 40%에탄올에 카보다이마이드시약을 넣어 처리한 것은 원래구조를 잘 유지하며 콘드로이틴설페이트의 부착력도 높일 수 있었다. 가교처리는 수분과의 결합 (water-binding capacity)을 감소시키나 콘드로이틴설페이트를 함께 가교처리를 하면 오히려 수분과의 결합력을 향상시키고, 변성온도 (Td)와 인장강도는 약해진다고 보고 하였다(50).

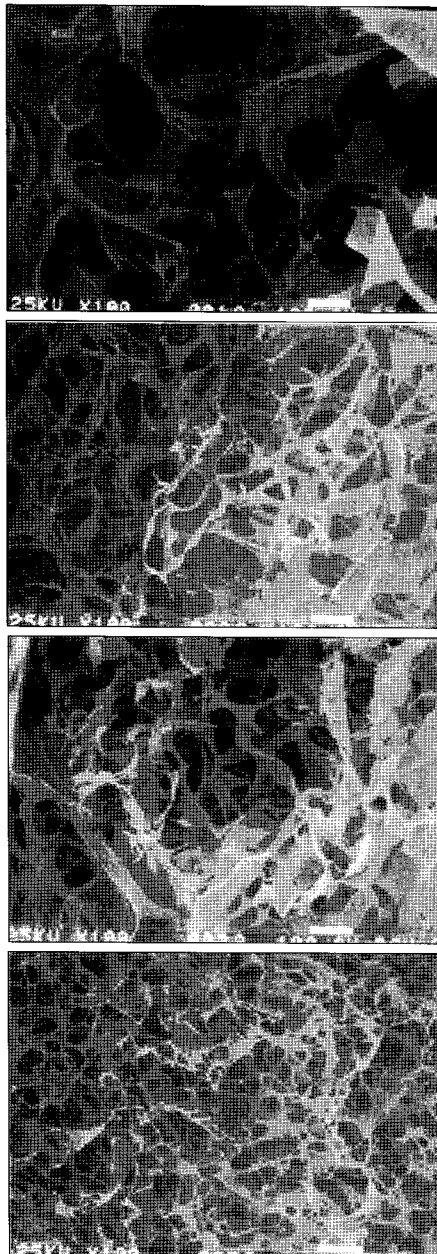


Figure 8. Control of pore size by regulation of collagen concentration and freezing temperature. (a) 0.75% solution at -20°C ($200\pm 20\ \mu\text{m}$), (b) 1.0% solution at -20°C ($150\pm 20\ \mu\text{m}$), (c) 0.75% solution at -70°C ($150\pm 20\ \mu\text{m}$), (d) 1.0% solution at -70°C ($80\pm 20\ \mu\text{m}$). Original magnification: $\times 100$, Scale bar = $100\ \mu\text{m}$.

또한 프랭시오스 브레스드 (Francios Brethod) 등은 제 1, 3형 콜라젠과 콘드로이틴 설페이트 그리고 키토산을 혼합하여 콜라젠-키토산 스폰지를 제조하였으며, 여기에 섬유모세포를 배양하면 섬유모세포가 이동 및 증식하며 높은 콜라젠 합성능력을 보여주며 배양 후 4주 후에는 체내와 유사하게 콜라젠 합성이 감소됨을 보고하였다(51). 이러한 콜라젠스폰지에 대한 다양한 연구를 통하여 인테그라, 테루더미스, 그리고 펠락 등이 개발되었으며, 콜라젠스폰지에 섬유모세포와 각질형성세포가 배양된 씨씨에스도 제품화되어 임상에 이용되고 있다.

최근에 와서 콜라젠에 동종 섬유모세포가 배양되어 있는 경우 자가 섬유모세포에 비해 염증세포, 섬유화, 그리고 환부의 수축이 증가하는 연구결과들이 보고(52, 53)되면서 새로운 형태의 바이오인공피부의 개발이 시도되고 있다. 박 (Park) 등은 기존의 인공피부의 개념을 바꾸어 세포가 함유되지 않아도 환부의 치료효과가, 세포가 있는 바이오인공피부와 유사한 효과가 나도록 고안하였다. 이들은 섬유모세포를 콜라젠스폰지에 배양한 뒤 세포만을 제거하는 공정을 도입하여 섬유모세포를 제거함으로써 세포가 분비된 세포외기질만을 함유한 바이오인공피부를 개발하였다 (Fig. 9). 이는 환부의 재생을 촉진시키는 것이 세포에서 분비된 성장인자와 사이토카인 뿐 만 아니라 다양한 세포외기질에 의해서도 치료가 촉진된다는 원리를 이용하여 새로운 개념의 바이오인공피부를 개발 중에 있다(54).

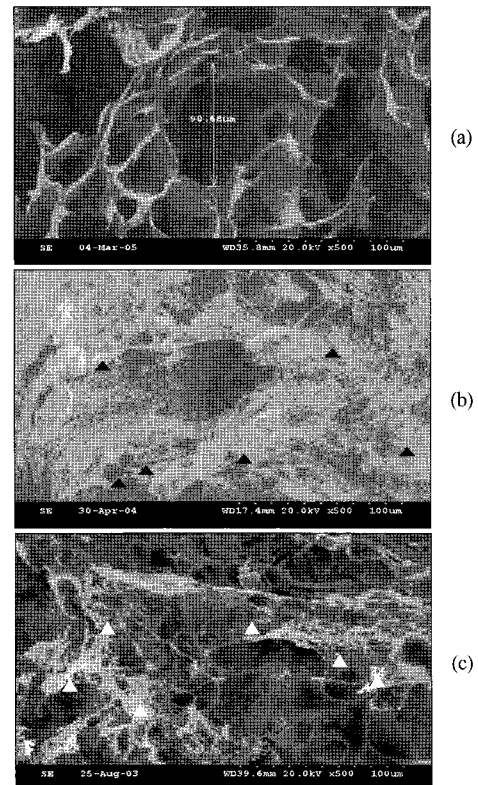


Figure 9. Scanning electron microscopy of collagen sponge (a), bioartificial dermis (b) and acellular artificial dermis (c) before transplantation. Collagen sponge is highly porous and with a loose network of collagen fibrils (a), and the pores in the sponge become filled with fibroblasts (b) and presence of newly secreted ECM after the removal of cells (c). (Black arrow head: fibroblasts, white arrow head: new secreted ECM by fibroblasts).

콜라젠과 더불어 현재 임상에 이용되는 히알루론산은 점탄성력이 좋으며 윤활작용이 있어 안과 및 관절치료제등 여러 분야에서 의료용으로 이용되고 있다. 히알루론산은 배아의 피부발생단계에 있어 고농도로 발현되며, 환부의 치료에 있어 세포의 이동과 분화와 관련되는 중요한 세포의 기질로 보고되었다(55). 쥐의 전층 피부 결손을 제조 후 에스테르화된 히알루론산 용액으로 결손부위를 채워 환부의 재생이 촉진되고, 비이식군에 비해 형질전환성장인자(TGF)-β1의 생성이 저해되어 흉터가 감소됨이 보고되었으며, 콜라젠 스폰지를 0.3% 히알루론산 용액에 담근 뒤 전층 피부가 제거된 쥐의 환부에 이식한 결과 섬유모세포의 이동과 신생혈관이 콜라젠 스폰지만 이식한 것보다 빠르게 진행됨이 보고되었다(56, 57). 또한 섬유모세포가 포함된 3차원 콜라젠 젤에 히알루론산을 첨가하여 섬유모세포가 빠르게 증식되고 튜블린의 농도가 증가됨이 밝혀졌으며, 액틴 세포 골격에 영향을 준다는 것이 알려져 있다(58, 59).

이러한 히알루론산의 장점을 이용하여 인공피부의 재료로도 개발되어 현재 판매 중에 있으며 그 효과도 입증되었다(60, 61). 히알루론산이 혼합된 콜라젠 스폰지를 제조한 뒤 섬유모세포를 배양하여 콜라젠만으로 제조된 스폰지에 비해 세포의 증식과 콜라젠의 생성이 증가되었음을 관찰하였고, 흰쥐의 등에 전층으로 이식하여 환부 주변으로부터 섬유모세포의 이동성이 향상되었음을 확인하였으며 특히 5% (w/w)의 히알루론산에서 세포의 이동성 및 콜라젠 생성량이 향상되었음이 보고되었다(62, 63).

최근에는 히알루론산 스폰지를 제조한 후 콜라젠으로 얇은 층을 형성하여 콜라젠과 히알루론산의 2층으로 구성된 인공피부가 연구되었다(64-68). 일반적인 콜라젠-히알루론산 스폰지는 전체적으로 균일하게 콜라젠과 히알루론산이 섞여 있으나 2층의 콜라젠-히알루론산 스폰지는 콜라젠 층과 히알루론산 층이 따로 존재하며 접촉되는 면에서만 콜라젠과 히알루론산이 혼합되어 있다. 또한 히알루론산 및 히알루론산 유도체를 필름형태로 제조하여 각질형성세포를 배양하여 배양상피층 (Laserskin®, FIDIA advanced Biopolymers, Italy)을 제조하고, 부직포형태 (HYAFF®, FIDIA advanced Biopolymers, Italy)로 제조하여 섬유모세포의 배양함으로서 바이오인공진피 (Hyalograft® 3D, FIDIA advanced Biopolymers, Italy)로 제조되어 임상에 이용되고 있다(69).

이와 같이 콜라젠과 히알루론산을 스캐폴드로 이용하려는 다양한 연구들이 진행되고 있으나 손상된 피부를 완전히 재생시키는 바이오인공피부는 좀 더 연구가 필요하다.

결론

지금까지 다양한 바이오인공피부에 관련된 연구와 임상적결과에 대하여 살펴보았다. 초기의 드레싱제로부터 조직공학기법으로 제조된 바이오인공피부에 이르기까지 많은 연구자들의 노력에 의해 화상과 욕창 등과 같은 피부 질환을 치료하기 위한 결과물들이 개발되었다. 그린 (Green) 박사 등에 의한 배양상피층이 개발되기 시작하고, 야나스 (Yannas) 등에 의해 스폰지형 인공피부가 상업화되면서 바이오

인공피부는 놀랄만한 발전을 이룩하고 있다.

그러나 배양된 상피세포층의 경우 혈청이 포함된 배지로 배양할 경우 공급원세포 (feeder cells)가 필요하고, 이 공급세포가 배양 후 완전히 제거되었는지에 대한 안정성 문제가 남아있다. 이를 해결하고자 공급원세포가 필요없는 무혈청 배지가 개발되었으나 여기에 첨가되어지는 뇌하수체 추출물 (bovine pituitary extract)은 광우병과 관련된 안정성 문제가 남아 있으며, 더욱이 각질형성세포의 성장 속도가 느리고 장기간 계대배양을 하면 데스모솜이 소실되는 문제점이 있어 충분한 세포를 확보하기가 어렵다(70).

또한 현재 순수 분리된 콜라젠 및 히알루론산으로 제조된 바이오인공피부들이 이용되어 좋은 임상적인 결과를 얻고 있으나, 화상과 같이 감염률이 높은 경우 매트릭스 메탈로프로테아제 (matrix metalloprotease : MMPs)의 증가로 이식된 바이오인공피부가 쉽게 분해되고는 문제점이 있다. 또한 아직까지 가격이 비싼 문제가 남아있어 환자들의 경제적인 문제가 바이오인공피부의 대중화를 저해하고 있다.

그러나 새로운 재료들이 합성되거나 천연고분자들이 발견되어 생체재료로 연구되어지고 있어 앞으로 실제 피부와 좀 더 유사하면서 가격이 저렴한 바이오인공피부가 개발될 것으로 예상된다.

Table 1. Commercial artificial skin and dressing materials(71)

Trade Name (Company)	Components	Distinguishing Mark	
Foreign	Algiderm (Convatec /BM-S)	- calcium alginate dressing - more expensive than hydrocolloid dressing	
	TerMax (CytRx Corporation)	- bovine/ porcine tissue - xenografts dressing	- applied in ulcers & burns
	AlloDerm (Life Cell Corporation)	- using of human cadaver skin	- using of freeze drying technology - applied in full thickness wound
	Integra (Integra LifeScience)	- bovine collagen sponge	- covered with silicon membrane
	Teruderm (Terumo)	- bovine collagen sponge	- covered with silicon membrane
	Dermagraft (ATS)	- 3-D tissue - foreskin in new-born baby	- bioartificial dermis - PLGA+allogenic fibroblast
	Biobrane (Dow Hickam Pharmaceutical)	- skin substitutes dressing - animal collagen	- applied in burn and full thickness wound
	EPICEL-CEA (Biosurface Technology)	- autografts - epithelial cell culturing technology	- not demand FDA approval
	Apigraf (Organogenesis)	- collagen gel	- applied in ulcers - fibroblasts / keratinocyte
	OrCel-CCS (Ortec.)	- collagen sponge	- fibroblasts / keratinocyte - applied in ulcers
Korea	HoloDerm (Tego sciencs)	- human keratinocyte	- auto epithelial cell sheet
	AutoCel (MCTT)	- human keratinocyte	- auto epithelial cell
	SureDerm (Hans Biomed)	- using of human cadaver skin	- applied in full thickness wound

Table 2. Current research status for collagen scaffolds

Author (reference)	Methods	Results
Yannas (46-49)	- dry methods research - binding of CS by pH - dehydrothermal temperature and time	- beginning of research for porous collagen sponge - crosslinked with 0.25% glutaraldehyde - insoluble collagen + CS
	- type I/type II +GAG	- cell morphology - evaluation of GAG content
Silver (50)	- insoluble collagen - regulation of pore size	- regulation of pore size by control of pH, concentration, and freezing temperature - crosslinked with 1% cyanamide
Boyce (51)	- soluble collagen + CS - important of storage solution	- addition of Biotin for cell growth - estimation of CS elution
Piper (52)	- insoluble collagen - mechanical property of collagen sponge + CS - estimation of degradation & denature temperature	- GAG content assay - water binding capacity - crosslinked with carbodiimide - cell morphology and viability

감 사

본 과제는 교육인적자원부, 산업자원부, 노동부의 출연금으로 수행한 최우수실험실 지원사업의 연구결과입니다.

REFERENCES

- Hansbrough, J. F., and E. S. Franco (1998), Skin replacements, *Clin. Plast. Surg.* **25**, 407-423.
- Ruszczak, Z., and R. A. Schwartz (2000), Modern aspects of wound healing, *Dermatol. Surg.* **26**, 219-229.
- Horch, R. E., J. Kopp, J. Beier, and A. D. Bach (2005), Tissue engineering of cultured skin substitutes, *J. Cell. Mol.* **9**, 592-608.
- Cuono, C., R. Langdon, and J. McGuire (1986), Use of cultured epidermal autografts and dermal allografts as skin replacement after burn injury, *Lancet* **17**, 1123-1124.
- Abbott, W. M., and J. S. Hembree (1970), Absence of antigenicity in freeze-dried skin allografts, *Cryobiology* **6**, 416-418.
- Hussmann, J., R. C. Russell, J. O. Kucan, D. Hebebrand, T. Bradley, and H. U. Steinau (1994), Use of glycerolized human allografts as temporary and permanent cover in adults and children, *Burns* **20**, S61-65.
- Kuroyanagi, Y. N., Yamada, R. Yamashita, and E. Uchinuma (2001), Tissue-engineered product: allogenic cultured dermal substitute composed of spongy collagen with fibroblast. *Artif. Organs* **25**, 180-186.
- Wainwright, D. J. (1995), Use of acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns, *Burns* **21**, 243-248.
- Calicut, R. A., M. J. Schurr, M. Sloan, and L. D. Faucher (2006), Clinical experience with AlloDerm: a one-staged composite dermal/epidermal replacement utilizing processed cadaver dermis and thin autografts, *Burns* **32**, 583-588.
- Rennekampff, H. O., V. Kiessig, S. Griffey, G. Greenleaf, and J. F. Hansbrough (1997), Acellular human dermis promotes cultured keratinocyte engraftment, *J. Burn Care Rehabil.* **18**, 535-544.
- Jasinkowski, N. L., and J. L. Cullum (1984), Human amniotic membrane as a wound dressing, *AORN J.* **39**, 894-895.
- Tyszkiewicz, J. T., I. A. Uhrynowska-Tyszkiewicz, A. Kaminski and A. Dziedzic-Goclawska (1999), Amnion allografts prepared in the central tissue bank in warsaw, *Ann. Transplant.* **4**, 85-90.

- Quinby W. C., H. C. Hoover, M. Scheflan, P. T. Walters, S. A. Slaviv, and C. C. Bondoc (1982), Clinical trials of amniotic membranes in burn wound care, *Plast. Reconstr. Surg.* **70**, 711-717.
- Subrahmanyam, M. (1995), Amniotic membrane as a cover for microskin grafts, *Br. J. Plast. Surg.* **48**, 477-478.
- Honavar, S. G., S. K. Bansal, V. S. Sangwan, and G. N. Rao (2000), Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in Stevens-Johnson Syndrome, *Ophthalmology* **107**, 975-979.
- Kim, J. S., J. C. Kim, B. K. Na, J. M. Jeong, and C. Y. Song (2000), Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits proteinase activity on wound healing following acute corneal alkali burn, *Exp. Eye Res.* **70**, 329-337.
- Ward, D. J., J. P. Bennett, H. Burgos, and J. Fabre (1989), The healing of chronic venous leg ulcers with prepared human amnion, *Br. J. Plast. Surg.* **42**, 463-467.
- Ahn, J. I., I. K. Jang, D. H. Lee, Y. K. Seo, H. H. Yoon, Y. H. Shin, C. H. Kim, K. Y. Song, H. G. Lee, E. K. Yang, K. H. Kim, and J. K. Park (2005), A comparison of lyophilized amniotic membrane with cryopreserved amniotic membrane for the reconstruction of rabbit corneal epithelium. *Biotech. and Biopro. Eng.* **10**, 262-269.
- Badylak, S. F. (2007), The extracellular matrix as a biologic scaffold material, *Biomaterials* **28**, 3587-3593.
- Hodde, J. (2002), Naturally occurring scaffolds for soft tissue repair and regeneration. *Tissue Eng.* **8**, 295-308.
- Kawai, K., S. Suzuki, Y. Tabata, Y. Ikada, and Y. Nishimura (2000), Accelerated tissue regeneration through incorporation of basic fibroblast growth factor-impregnated gelatin microspheres into artificial dermis. *Biomaterials* **21**, 489-499.
- Lin, S. D., C. S. Lai, C. K. Chou, C. W. Tsai, K. F. Wu, and C. W. Chang (1992), Microskin autograft with pigskin xenograft overlay; a preliminary report of studies on patients, *Burn* **18**, 321-325.
- Basile, A. R. (1982), A comparative study of glycerinized and lyophilized porcine skin in dressings for third-degree burns, *Plast. Reconstruct Surg.* **69**, 969-974.
- Madden, M. R., J. L. Finkelstein, L. Staiano-Coico, C. W. Goodwin, G. T. Shires, E. E. Nolan, and J. M. Hefton (1986), Grafting of cultured allogeneic epidermis on second- and third- degree burn wounds on 26 patients, *J. Trauma* **26**, 955-962.
- Phillips, T. J., J. Bhawon, I. M. Leigh, H. J. Baum, and B. A. Gilchrist (1990), Cultured epidermal autografts and allografts: a study of differentiation and allograft survival, *J. AM. Acad. Dermatol.* **23**, 189-198.
- Burt, A. M., C. D. Pallett, J. P. Sloane, M. J. O'Hare, K. F. Schafner, P. Yardeni, A. Eldad, J. A. Clarke, and B. A. gusterson (1989), Survival of cultured allografts in patients with burns assessed with probe specific for Y chromosome, *BMJ.* **298**, 915-917.
- Aubock, J., E. Irschick E, N. Romani, P. Kompatscher, R. Hopfl, M. Herold, G. Schuler, M. Bauer, C. Huber, and P. Fritsch (1988), *Transplantation* **45**, 730-737.
- Horch, R. E., M. Debus, G. Wagner, and G. B. Stark (2006), Cultured human keratinocytes on type I collagen membranes to reconstitute the epidermis, *Tissue Eng.* **6**, 53-67.
- Seo, Y. K., J. I. Ahn, D. H. Lee, S. Y. Kwon, D. H. Jung, Y. S. Park, K. Y. Song, E. K. Yang, Y. J. Kim, and J. K. Park (2004), The wound healing effects of human deepithelialized amniotic membrane with skin keratinocyte. *Tissue Eng. Regen. Med.* **1**, 178-183.
- Kearney, J. N. (2001), Clinical evaluation of skin substitutes, *Burns* **27**, 545-551.
- Burke, J. F., I. V. Yannas, W. C. Quinby, C. C. Bondoc, and W. K. Jung (1981), Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury, *Ann. Surg.* **194**, 413-428.

32. Matsui, R., N. Okura, K. Osaki, J. Konishi, K. Ikegami, and M. Koide (1996), Histological evaluation of skin reconstruction using artificial dermis, *Biomaterials* **17**, 995-1000.
33. Kremer, M., E. Lang, and A. C. Berger (2000), Evaluation of dermal-epidermal skin equivalents ('composite-skin') of human keratinocytes in a collagen-glycosaminoglycan matrix (Integra™ Artificial Skin), *Br. J. Plast. Surg.* **53**, 459-465.
34. Matsui, R., K. Osaki, J. Konishi, K. Ikegami, and M. Koide (1996), Evaluation of an artificial dermis full-thickness skin defect model in the rat, *Biomaterials* **17**, 989-994.
35. Suzuki, S., K. Kawai, F. Ashoori, N. Morimoto, Y. Nishimura, and Y. Ikada (2000), Long-term follow-up study of artificial dermis composed of outer silicone layer and inner collagen sponge, *Br. J. Plast. Surg.* **53**, 659-666.
36. Guerret, S., E. Govignon, D. J. Hartmann, and V. Ronfard (2003) Long-term remodeling of a bilayered living human skin equivalent (Apligraf®) grafted onto the nude mice: immunolocalization of human cells and characterization of extracellular matrix, *Wound Rep. Reg.* **11**, 35-45.
37. Naughton, G., J. Mansbridge, and G. Gentzkow (1997), A metabolically active human dermal replacement for the treatment of diabetic foot ulcers, *Artif. Organs* **21**, 1203-1210.
38. Hanbrough, J. F., D. W. Mazingo, P. Kealey, M. Davis, A. Gidner, and G. D. Gentzkow (1997), Clinical trials of a biosynthetic temporary skin replacement, Dermagraft-transitional covering, compared with cryopreserved human cadaver skin for temporary coverage of excised burn wounds, *J. Burn Care Rehabil.* **18**, 43-51.
39. Hanbrough, J. F., M. L. Cooper, R. Cohen, R. Spielvogel, G. Greenleaf, R. L. Bartel, and G. Naughton (1992), Evaluation of a biodegradable matrix containing cultured human fibroblasts as a dermal replacement beneath meshed skin grafts on athymic mice. *Surgery* **111**, 438-446.
40. Sabofinski M. L., O. Alvarez, M. Auletta, G. Mulder, and N. L. Parenteau (1996), Cultured skin as a smart material for healing wounds: experience in venous ulcers, *Biomaterials* **17**, 311-320.
41. Eaglstein, W. H., M. Iriondo, and K. Laszlo (1995), A composite skin substitute (Graftskin) for surgical wounds, *Dermatol. Surg.* **21**, 839-843.
42. Cooper, M. L., and J. F. Hansbrough (1991), Use of a composite skin graft composed of cultured human keratinocytes and fibroblasts and a collagen-GAG matrix to cover full-thickness wounds on athymic mice, *Surgery* **109**, 198-207.
43. Yannas, I. V., and J. F. Burke (1980), Design of an artificial skin I. Basic design principles, *J. Biomed. Mater. Res.* **14**, 65-81.
44. Dagalakis, N., J. Flink, P. Stasikelis, J. F. Burke, and I. V. Yannas (1980), Design of an artificial skin III. Control of pore structure, *J. Biomed. Mater. Res.* **14**, 511-528.
45. Yannas, I. V., J. F. Burke, P. L. Gordon, C. Huang, and R. H. Rubenstein (1980), Design of an artificial skin II. Control of chemical composition, *J. Biomed. Mater. Res.* **14**, 107-132.
46. Nehrer, S., H. A. Breinan, A. Ramappa, G. Young, S. Shortkroff, L. K. Louse, C. B. Sledge, I. V. Yannas, and M. Spector (1997), Matrix collagen type and pore size influence behaviour of seeded canine chondrocytes, *Biomaterials* **18**, 769-776.
47. Orgill, D. P., and I. V. Yannas (1998), Design of an artificial skin IV. Use of island graft to isolate organ regeneration from scar synthesis and other processes leading to skin wound closure, *J. Biomed. Mater. Res.* **39**, 531-535.
48. Doillon, C. J., C. F. Whyne, S. Brandwein, and F. H. Silver (1986), Collagen-based wound dressing: Control of the pore structure and morphology. *J. Biomed. Mater. Res.* **20**, 1219-1228.
49. Boyce, S. T., D. J. Christianson, and J. F. Hansbrough (1988), Structure of a collagen-GAG dermal skin substitute optimized for cultured human epidermal keratinocytes, *J. Biomed. Mater. Res.* **22**, 939-957.
50. Pieper, J. S., A. Oosterhof, P. J. Dijkstra, J. H. Veerkamp, and T. H. Van Kuppevelt (1996), Preparation and characterization of porous crosslinked collagenous matrices containing bioavailable chondroitin sulphate, *Biomaterials* **20**, 847-858.
51. Berthod, F., F. Sahuc, D. Hayek, O. Damour, and C. Collombel (1996), Deposition of collagen fibrils bundles by long-term culture of fibroblast in a collagen sponge, *J. Biomed. Mater. Res.* **32**, 87-93.
52. Lamme E. N., R. T. van Leeuwen, J. R. Mekker, E. Middelkoop (2002), Allogeneic fibroblasts in dermal substitutes induce inflammation and scar formation, *Wound Repair Regen.* **10**, 152-160.
53. Morimoto, N., Y. Saso, K. Tomihata, T. Taira, Y. Takahashi, M. Ohta, and S. Suzuki (2005), Viability and function of autologous and allogeneic fibroblasts seeded in dermal substitutes after implantation, *J. Surg. Res.* **125**, 56-67.
54. Seo Y. K., K. Y. Song, Y. J. Kim, and J. K. Park (2007), Wound healing effect of acellular artificial dermis containing extracellular matrix secreted by human skin fibroblast, *Artif. Organs* **31**, 509-520.
55. Alexander, S. A., and R. B. Donoff (1980), The glycosaminoglycans of open wound, *J. Surg. Res.* **29**, 422-429.
56. Hu, M., E. E. Sabelman, Y. Gao, J. Chang, and V. R. Hentz (2003), Three-dimensional hyaluronic acid grafts promote healing and reduce scar formation in skin incision wounds, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **67**, 586-592.
57. Murashita, T., Y. Nakayama, T. Hirano, and S. Ohashi (1997), Acceleration of granulation tissue ingrowth by hyaluronic acid in artificial skin, *Br. J. Plast. Surg.* **49**, 58-63.
58. Greco, R. M., J. A. Iacono, and H. P. Ehrlich (1998), Hyaluronic acid stimulates human fibroblast proliferation within a collagen matrix, *J. Cell. Physiol.* **177**, 465-473.
59. Boralidi, F., M. A. Croce, D. Quagliano, R. Sammarco, E. Carnevali, R. Tiozzo, and I. Pasquali-Ronchetti (2003), Cell-matrix interactions of in vitro human skin fibroblasts upon addition of hyaluronan, *Tissue Cell* **35**, 37-45.
60. Caplan, A. I. (2000), Tissue engineering designs for the future: New logics, old molecules, *Tissue Eng.* **6**, 1-8.
61. Galassi, G., P. Brun, G. Abatangelo, M. Radice, R. Cortivo, G. F. Zanon, P. Genovese, and G. Abatangelo (2000), In vitro reconstructed dermis implanted in human Wounds: degradation studies of the HA-based Supporting scaffold, *Biomaterials* **21**, 2183-2191.
62. Doillon, C. J., F. H. Silver, and R. A. Berg (1987), Fibroblasts growth on a porous collagen sponge containing hyaluronic acid and fibronectin, *Biomaterials* **8**, 195-200.
63. Doillon, C. J., and F. H. Silver (1986), Collagen-based wound dressing: Effect of hyaluronic acid and fibronectin on wound healing, *Biomaterials* **7**, 3-8.
64. Kubo, K., and Y. Kuroyanagi (2003), Characterization of a cultured dermal Substitute composed of a spongy matrix of hyaluronic acid and collagen combined with fibroblasts, *J. Artif. Organs* **6**, 138-144.
65. Kuroyanagi, Y., K. Kubo, S. Kagawa, H. Matsui, H. J. Kim, S. Numari, and Y. Mabuchi (2004), Establishment of banking system for allogeneic cultured dermal substitute, *J. Artif. Organs* **1**, 13-21.
66. Kashiwa, N., O. Ito, T. Ueda, K. Kubo, H. Matsui, and Y. Kuroyanagi (2004), Treatment of full-thickness skin defect with concomitant grafting of 6-fold extended mesh auto-skin and allogeneic cultured dermal substitute, *Artif. Organs* **5**, 444-450.
67. Kubo, K., and Y. Kuroyanagi (2004), Development of a cultured dermal substitute composed of a spongy matrix of hyaluronic acid and atelo-collagen combined with fibroblasts: cryopreservation, *Artif. Organs* **2**, 182-188.

68. Kubo, K., and Y. Kuroyanagi (2003), Spongy matrix of hyaluronic acid and collagen as a cultured dermal substitute: evaluation in an animal test, *Artif. Organs* **6**, 64-70.
69. Caravaggi, C., R. De Giglio, C. Pritelli, M. Sommara, S. Dalla Noce, E. Faglia, M. Mantero, G. Clerici, P. Fratino, L. Dalla Paola, G. Mariani, R. Mingardi, and A. Morabito (2003), HYAFF 11-based autologous dermal and epidermal grafts in the treatment of noninfected diabetic plantar and dorsal foot ulcers: a prospective, multicenter, controlled, randomized clinical trial, *Diabetes Care* **26**, 2853-2859.
70. Navsaria, H. A., S. R. Myers, I. M. Leigh, and I. A. McKay (1995), Culturing skin in vitro for wound therapy, *TIBIOTECH.* **13**, 91-100.
71. Lee, J. H., Y. S. Cho, H. H. Kim and J. S. Lee (1998), Wound dressing, *Biomaterials Res.* **2**, 180-191.