

皮膚組織再生を目的とした生体組織類似コラーゲン組織体の作製

東京医科歯科大学生体材料工学研究所

南 広 祐

Most of the collagen matrix which is being used in tissue engineering and regenerative medicine is gel or sponge. This type of collagen matrix is good *in vitro* cell culture, but cannot be directly used in our body, for its high inflammatory response and poor mechanical property performance. Our goal is to prepare an artificial skin which possesses the same physical and biological property as that of native skin. As a first step for constructing an artificial skin, we tried to prepare a collagen matrix with similar structure of native skin. To achieve this goal, we executed fibrillogenesis of collagen triple helix in 0.9wt% NaCl and 0.02M Na₂HPO₄ aqueous solution using dialysis cassette. The resulting collagen matrix (F-Col) was composed of microfibrils which regulated D-periodicity. The collagen matrix prepared in this manner showed unfrangible mechanical strength and high swelling ratio. To make the collagen matrix much stronger, we executed air-drying to obtain a tougher collagen matrix (T-Col) which possesses viscoelastic property and high Young's modulus. The dry collagen matrix was composed of microlayers formed by the slow water evaporation. The lack in the collagen fibril triggered the macrophage invasion although the degradation was almost same as F-Col after implantation. Furthermore, the fibrous encapsulation promoted much faster for F-Col, leading to healing response. These indicate that the difference in the landscape (surface geometry) and morphology is crucial for the control of biological properties. These results also indicate that the constructing of a collagen matrix which possesses the resembling structure to that of native skin would able to lead us to apply the collagen in tissue engineering and regenerative medicine.

1. 緒 言

コラーゲンは人体組織を構成するポリペプチドであり、優れた生体適合性を有するため、種々なバイオマテリアル分野に広く応用されている。特に細胞培養用スキャフォードとして一般的に使われており、細胞の2次元細胞培養用としては優れた効果があるものの、3次元細胞培養用には未だ問題がある。問題の一つは、細胞を接着・増殖させるために多孔性構造をさせるが、その内部は直通孔ではないため、内部に浸透することが困難である。その結果、細胞は生着せずに死滅する。3次元細胞培養のために広く行われているエレクトロスピニング法は分解性と直通孔性の面では優れているものの、ポリマーとコラーゲンを混合する必要があるため、有機溶媒による毒性の問題や細胞培養に有効な作製条件を調節する必要がある。また、有機溶媒の毒性とコラーゲン構造破壊など種々の問題が存在する。現在、様々な応用分野にこの方法を用いているものの、まだ実用化されたものは数少ない。

コラーゲンの最大問題は低寸法安定性である。細胞培養時、収縮が起こる問題がある。これは、コラーゲンに細胞を培養した際、体積が変化することを意味する。コラーゲ

ン組織体を組織代替物として加工して生体に移植する場合、問題を起こす可能性が高い。また、移植したコラーゲン組織体が生体内で再構築 (remodeling) が行われる際、コラーゲン組織体の生分解が起きる。この生分解が組織の再構築より早く分解するのでデバイスの崩壊に繋がる可能性が高い。寸法安定性を解決するために行われている架橋法は、コラーゲン構造物の分解能力を低下させ、内部の細胞の生着性を低下させる¹⁾。現在使用されているコラーゲン組織体はほぼ架橋されたコラーゲンで構成されている。しかし、架橋のため、細胞接着および増殖に有効な官能基を化学的に反応させるので安定した組織層の生成が難しい。

これらの問題は人工皮膚の開発にバリアとして作用する。移植するコラーゲン組織体の寸法安定性と分解性の調節、細胞の定着、増殖、遊走の促進、炎症抑制、高機械的な物性など物理的・生物学的特性を同時に確保する必要がある。本研究グループでは、実用的な人工皮膚を開発するため、コラーゲン組織体の構造制御に着目した。コラーゲン組織体を生体に移植することはこれを細胞の足場として使用することを意味する。細胞足場は、細胞挙動をコントロールする重要な役割を有する。生体内での細胞挙動を制御する微小環境では、足場は不溶性因子として知られており、足場の地形 (landscape) や形態 (morphology) により細胞の運命が決定される²⁾。現在使用されているコラーゲン組織体は架橋されているゲル (3重らせん構造: 3次構造) が多く、その地形と形態が生体組織と異なる。生体組織は繊維構造を有するコラーゲン複合体であり、ゲルではない。そのため、本研究室ではコラーゲンゲル組織体作製ではなく、生体組織と同様あるいは類似構造を有するコラーゲン組織体



Preparation of a collagen matrix for regeneration of the skin tissue

Kwangwoo Nam

Institute of Biomaterials Bioengineering,
Tokyo Medical and Dental University

を作製し、生体組織の物理・生物学的特性を再現することを試みた。

生体組織類似構造はコラーゲン3重らせん構造を繊維化することから始まる。コラーゲン分子はpHと塩の濃度によって配列が変わると知られている^{3,4)}(Scheme 1)。特にNaClの濃度を調節することにより、生体内と類似条件でコラーゲンマイクロ繊維の配列を再現することができ、生体コラーゲン繊維と同じ構造を有するコラーゲン構造体を作製することも可能である。即ち、コラーゲンマイクロ繊維の配列を人体のコラーゲン配列を同様に作ることに、生体組織と近い構造を人工的に再現することができ、3次元細胞培養による組織再生が実現可能であると考えられる。また、生体組織類似構造を有するため、生体内での炎症反応などを抑えることが可能である。即ち、コラーゲンマイクロ繊維の配列を人体のコラーゲン配列を同様に作ることに、今まで作られたコラーゲン構造体の中でも生体組織と近い構造を人工的に再現することができ、3次元細胞培養による組織再生が実現可能であると考えられる。

本研究では、人工皮膚に応用可能なコラーゲン構造体の作製を目的とし、生体類似構造を有するコラーゲン構造体を作製する方法とその物性を検討した。人工皮膚作製の重要な要件として、抗収縮性、抗炎症性および生分解性の調節、高機械的物性に注目し、コラーゲン繊維化を利用するコラーゲン構造体を作製することで、最終的には人体の皮膚組織を代替可能な皮膚組織再生の基盤技術の確立を目指した。

2. 実験方法

2.1 コラーゲンマトリックスとコラーゲンゲルの作製

2.1.1 コラーゲンマトリックスの作製

コラーゲン0.5wt%と2wt%水溶液を用意し、透析カセットの中に注入(3mL)した後、4℃でNaCl/Na₂HPO₄水溶液に入れ、反応させた。24時間後、透析カセットを水で安定させた後(37℃)、コラーゲン構造体を透析カセット

から出し、コラーゲン構造体(F-Col)を得た。より緻密な構造を有するコラーゲン構造体を得るため、F-Colを48時間自然乾燥させた後、蒸留水で洗浄し、薄い膜のようなコラーゲン構造体(T-Col)を得た。本報告書では、F-ColとT-Colを同時に示す時にはコラーゲンマトリックスを称した。

2.1.2 コラーゲンゲルの作製

繊維化されていないコラーゲン組織体を得、コラーゲンマトリックスと比べるために、コラーゲン0.5wt%と2wt%水溶液を透析カセットの中に注入(2.5mL)した後、4℃で超純水に入れ3日間透析を行った(F-Gel)。得られたコラーゲンゲルを48時間自然乾燥させた後、pH7.4の水溶液に入れ、24時間安定させ、T-Gelを作製した。

また、化学的に架橋されたコラーゲンゲルを作製し、その特性を調べるためにT-Gelを1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-1-carbodiimide hydrochloride (EDC)とN-hydroxysuccinimide (NHS) 含有エタノール30%水溶液で24時間架橋した(ENゲル)⁶⁾。F-Col、T-Col、コラーゲンゲル、そしてENゲルを用いて表面特性、物理的特性と生物学的特性を調べた。

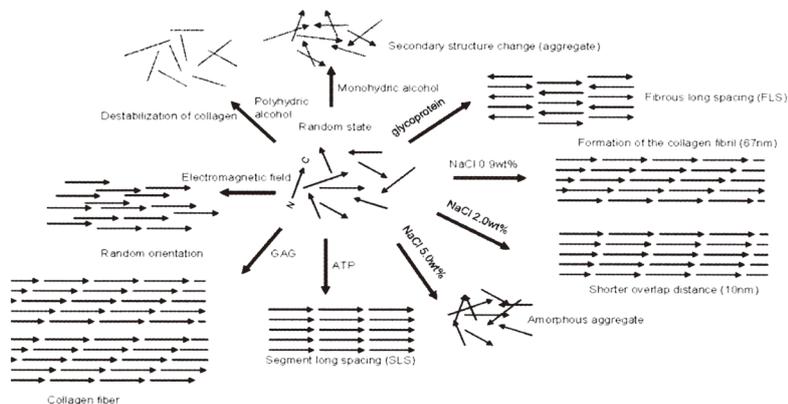
2.2 評価

2.2.1 構造特性観察

コラーゲンマトリックスのマイクロ構造観察は、走査型電子顕微鏡(SEM)原子間力顕微鏡(AFM)を用いて行った。SEMを利用してコラーゲンマトリックスの繊維形成を観察した。AFMはコラーゲン繊維のD-staggerの有無を確認するとともに繊維の直径を測定し、ナノ構造の観察に使用した。

収縮挙動は37℃での体積の変化を超純水と生理食塩水の中で2週間観察した。また、生理食塩水の中にコラーゲンマトリックス及びコラーゲンゲルをいれ徐々に温度を上昇させ、サンプルの収縮および分解を確認した。

コラーゲンマトリックスの膨潤度、収縮挙動、コラーゲナーゼによる生分解性を測定し、コラーゲンゲルと比較した。



Scheme1 Schematic image of change in the collagen alignment according to the solution conditions.

膨潤度の測定は蒸留水 (25℃) で行われ、1週間後の含水したコラーゲンマトリックスとコラーゲングル重さと乾燥した後の重さを量った。膨潤度は式 (1) を使用し計算した。

$$\text{膨潤度 (Q)} = \frac{W_h - W_d}{W_d} \quad (1)$$

W_h は含水した重さを、 W_d は乾燥した重さを表す。また、マトリックスとゲルの含水率を計算するため、式 (2) を使用した。

$$\text{含水率 (WR, \%)} = \frac{W_d - W_h}{W_h} \times 100 \quad (2)$$

2.2.2 機械的特性評価

機械的な物性を測定するために、2つの方法で応力・歪み挙動を調べた。F-Colの場合、圧縮実験を行い、圧力に対する機械的な強度を調べた。T-Colの場合、引張試験機を用いて、機械的な強度を測定した。得られたデータは応力・歪み曲線で再計算された後、ヤング率を計算した。

2.3 コラーゲン繊維組織体の生物学的評価

コラーゲン構造体とコラーゲングルの細胞挙動を調べるために、ラット由来のL929細胞を用いて *in vitro* 実験を行った。コラーゲンマトリックスの生体内での挙動を調べるため、ラットに皮下移植を行った。移植されたコラーゲンマトリックスを2週、8週、24週にて回収し、ヘマトキシリン・エオジン染色とKt-104染色を用いて、組織学的評価を行った。

3. 結果および考察

3.1 コラーゲンマトリックスの構造

コラーゲンマトリックスは水溶液で安定であり、加水分解することもなかった。SEMで観察した結果コラーゲングルとコラーゲンマトリックスの構造は異なることを見出した。Fig. 1に示したように、コラーゲングルの場合、大きな空を有する単一構造で構成されていることに対し、コ

ラーゲンマトリックスは緻密な繊維構造で構成されていることが判明された。AFMの結果から、コラーゲンマトリックスのナノ構造はコラーゲン繊維で構成されており、コラーゲングルとは異なる繊維構造を有することが明らかとなった。コラーゲン繊維は規則的なD-stagger構造を有すること確認された[Fig. 1 (a), 下]。これは、生体組織と同様なナノ構造を有することを意味する。T-Colを水およびPBSに入れてもF-Colに戻らないこと。また、この繊維構造は自然乾燥後、緻密なマイクロ層が形成されるものの、D-stagger構造に変化はない。これは、自然乾燥により自由水を増発され、構造再配列が起こるからである⁵⁾。即ち、水の増発はマトリックスの中にマイクロ層を構築させると思われる。このマイクロ層は皮膚組織など生体組織のマイクロ構造と似ている。

コラーゲンマトリックスのマクロ構造を見ると、2つの繊維層(コラーゲン繊維で構成された層)と1つのゲル層(コラーゲン繊維がない層)で構成されていることを見出した。即ち、2つの繊維層がゲル層を囲むサンドイッチ構造である。F-ColとT-Colのサンドイッチ構造は繊維化過程に深く関係する。F-Colの形成過程のスキームをFig. 3に示した。コラーゲン水溶液を含んだ透析膜をNaCl/Na₂HPO₄水溶液に入れたら外からNaClとNa₂HPO₄が浸透すると同時に中からはHClが漏洩される。HClの漏洩はゲル化をNaClとNa₂HPO₄の浸透は繊維化を起こす。この反応は外から段階的に中に向けて起こる。HClの漏洩が速い場合、ゲル化が先に発生され、繊維化が起こらずに透明なゲル層を形成する。その結果、真中の部分は透明なゲル層が形成され、外の繊維化層に囲まれたようなマトリックスが作製される。T-Colを作製する際、このゲル層が接着剤のような役割を果たし、繊維化層を強く接着させる。これらの結果から、本コラーゲンマトリックスのナノとマイクロ構造は生体組織と類似構造を有することを確認した。

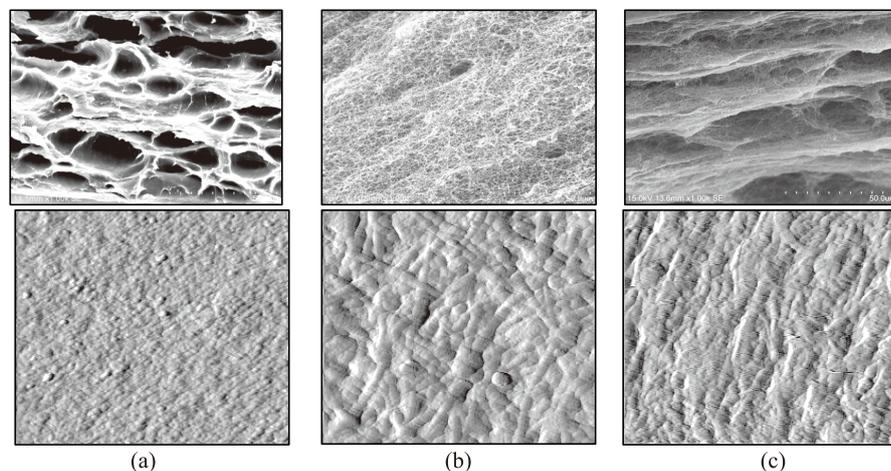


Fig.1 The SEM images (upper) and AFM images (below) of (a) F-Gel and (b) F-Col and (c) T-Col.

3.2 コラーゲンマトリックスの物理的特性

コラーゲンマトリックスの構造により、その膨潤度に変化が現れた。F-Gelの場合、膨潤度(Q)が50を超えることに対し、F-Colの21に達した(Fig. 2)。一方、T-Colの場合、約3.8であり、F-Colと比べて6倍低膨潤度を示した。前項に述べたように、自由水の蒸発により構造が変化し、低膨潤度を示したと考えられる。その結果、T-Colの全体コラーゲン濃度は21%まで増加し、機械的な強度も上昇すると予測される。一方、ENゲルの膨潤度をT-Colと比べて見ると、T-Colの方が高膨潤度を示していることが確認された(Table 1)。これは、ENゲルの分子内架橋が水の吸収を阻止しており、化学的に架橋されていないT-Colより低膨潤度を有すると考えられる⁴⁾。

コラーゲンゲルとコラーゲンマトリックスを37℃の超純水と生理食塩水に入れ、その安定性を観察した。コラーゲンゲルの場合、1週間でゲルの体積が低下することを確認した(Fig. 3)。一方、コラーゲンマトリックスの場合、体積の変化は見られなかった。これは、コラーゲン3重らせんの変性に起因する。コラーゲン3重らせんは45℃付近で変

性するものの、37℃では部分的な変性が見られる。3重らせん構造の変化はコラーゲン間分子間力を弱まり、結果的に分子再位置が発生し、ゲルが収縮する⁶⁾。しかし、コラーゲンマトリックスの場合、繊維構造である4次構造で構成されている。コラーゲンらせん構造に変化が発生しても、繊維の中での分子配列は抑えられると考えられる。

Fig. 4は熱に対するコラーゲンマトリックス(T-Col)の挙動を示している。一般的にコラーゲンは高温(ブタやウシコラーゲンの場合45℃)で変性しゼラチン化する特徴を有する⁶⁾。コラーゲンゲルの場合、高温でコラーゲン変性により、ゲル構造が崩壊する。一方、化学的に架橋したコラーゲンゲルは架橋剤によって異なるものの、65℃以上である⁴⁾。F-Colの場合、マトリックスの崩壊は約50℃で見られた。T-Colの場合、80℃以上の高温でも崩壊が観察されず、収縮された。実際の変性温度を調べた結果、コラーゲンマトリックスの収縮温度はF-Colの場合50℃で、T-Colの場合65℃であり、生体組織の収縮温度と同じである。これは、コラーゲン繊維形成はコラーゲン安定性に関係するからである。Fig. 1に示したように、T-Colのミク

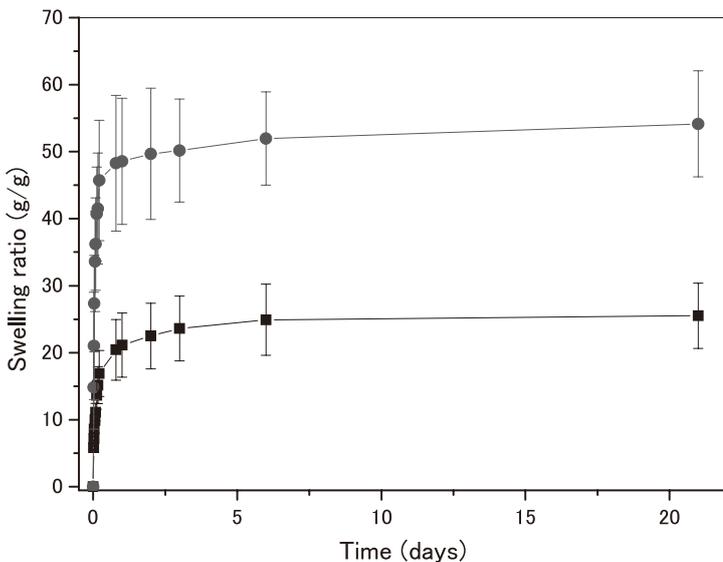


Fig. 2 The swelling ratio of F-Col (black line) and F-Gel (red line).

Table1 Swelling ratio (Q) and water content of F-Gel, F-Col and T-Col

Samples	Swelling ratio (Q)	water content (%)
F-Gel	55.6	99.2
F-Col	21.3	97.5
T-Col	3.8	79.0
EN gel	1.8	69.1

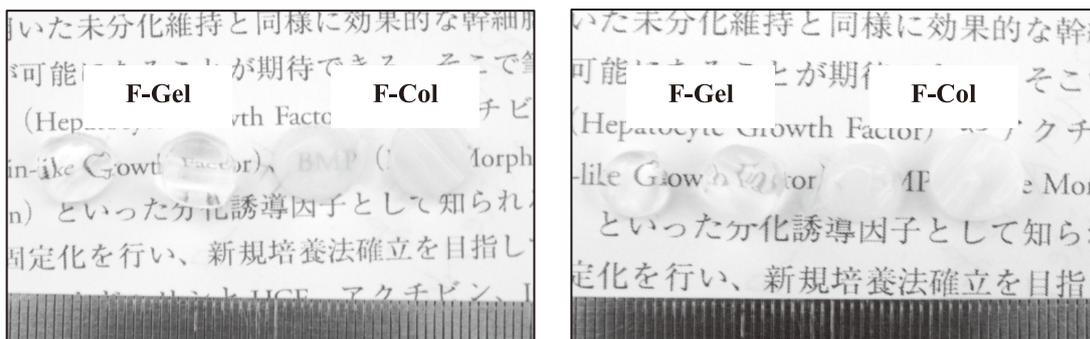


Fig. 3 Collagen gels and collagen matrices after 1 week in water (left) and pH 7.4 aqueous solution (right). Notice the change in the color and the size of collagen gels.

口構造はF-Colと比べて緻密な構造を有する。この構造は収縮温度を上乗させ、変性を抑制し、熱に対して比較的安定な構造を維持させると考えられる。

3.3 コラーゲンマトリックスの機械的特性

圧縮実験結果をFig 5に示す。コラーゲンゲルの場合、コラーゲンマトリックスと比べ、低強度を有する。また、コラーゲンゲルの場合、90%以上圧縮させたら崩壊されるものの、F-Colの場合は崩壊しないことを見出した (Fig. 5 (a))。これは、コラーゲン構造に起因する現象であると考えられる。コラーゲンの繊維化によりコラーゲン組織体の強度増加は引張実験を行った際にも観察された。T-ColはT-Gelとほぼ同じ破断変形率を有するものの、ヤング率を大きな増加が確認された [Fig. 5 (b)]。これは、コラーゲンの繊維化はコラーゲンマトリックスの機械的な物性の増加に繋がることを意味する。これらの結果から、機械的な物性はその構造に起因することを示している。また、コラーゲンマトリックスの応力・歪み曲線は歪みの増加とともに上乗することを確認した (J-curve)⁷⁾。これは、コラーゲンマトリックスは生物由来素材としての特徴を有することを意味する。架橋されたコラーゲンの場合、J-curveの特徴を遺失し、プラスチックのように固い挙動を示す。これから安定で生物由来素材の特性を有するコラーゲンマト

リックスに架橋剤を使用せず得られることを意味する。

3.4 生物学的評価

コラーゲンゲルとコラーゲンマトリックスの表面での細胞定着と増殖を観察した (Fig. 6)。その結果、コラーゲンマトリックスとコラーゲンゲル表面に対し、細胞挙動に大きな差は見られなかった。コラーゲン組織体の表面の上に細胞による新規コラーゲン層が見られた。この結果から、*in vitro*でのコラーゲンゲルとコラーゲンマトリックスに対する細胞挙動は同じであることを見出した。

しかし、コラーゲンマトリックスとコラーゲンゲルに対する生体内での生体反応は異なることが分かった (Fig. 7, 8, 9)。コラーゲンゲルの場合、生体内での分解がコラーゲンマトリックスより速いことが判明された。分解はF-Gelの場合、炎症反応を伴うことに対し、F-ColとT-Colの場合、炎症反応が抑えられることが分かった。移植した2週間ではF-Gelの分解はF-Colと比べ変わらなかった。しかし、移植物の周辺にマクロファージの生成が確認された (Fig. 7)。しかし、移植2か月後にはコラーゲンゲルは殆ど残らず、分解した。この反応は組織再構築に必要な自然的反応である⁸⁾。一方、コラーゲンマトリックスの場合、移植2週間マクロファージの生成が抑えられていることを確認した。また、移植2か月後の結果を見ると、マトリックスの

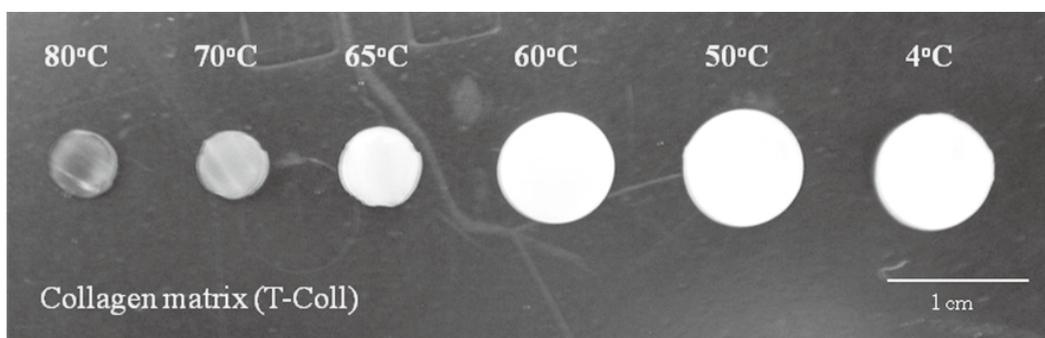


Fig. 4 Change in the size of T-Col according to the temperature.

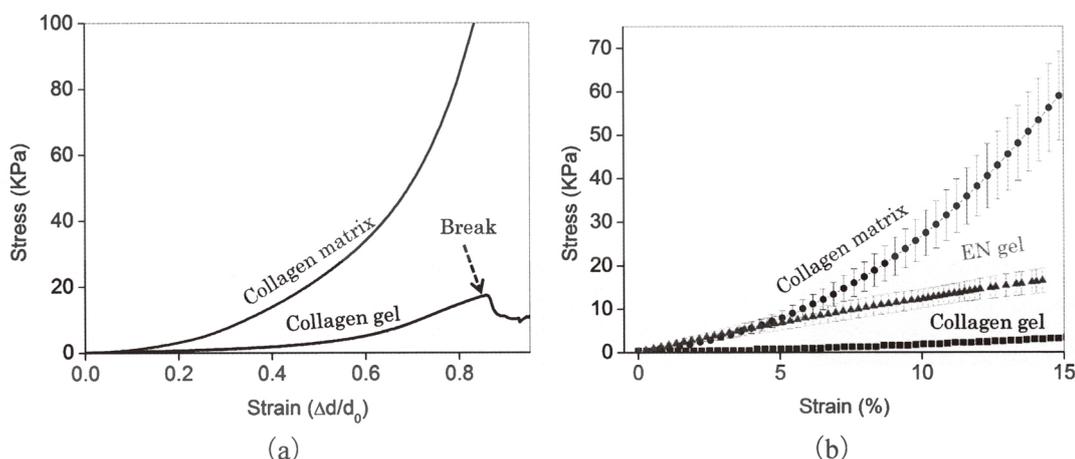


Fig. 5 The mechanical strength of F-Col and T-Col by compression test (a) and elongational test.

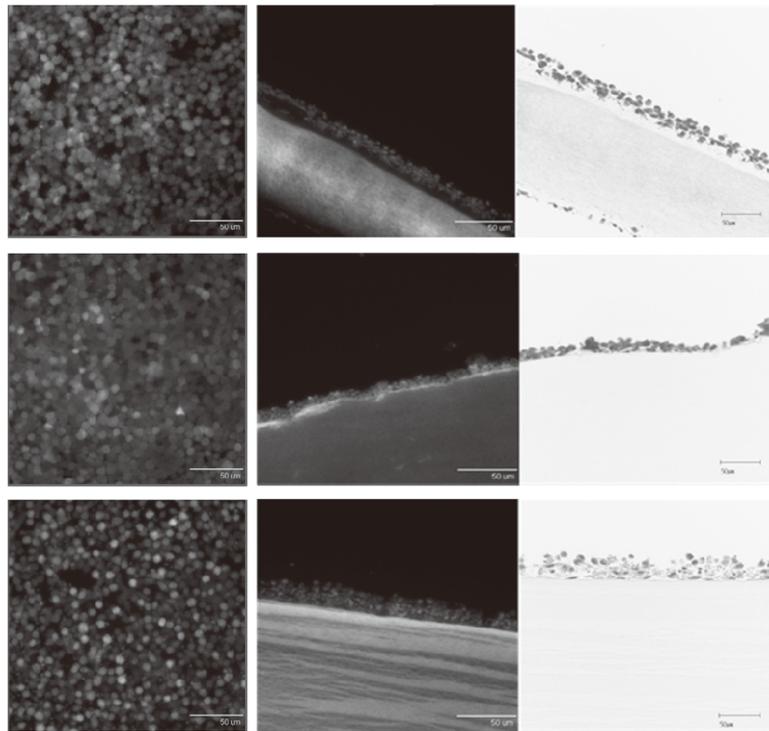


Fig. 6 (Left) Live/dead stained images of cell adhered on the F-Gel (top), F-Coll (middle), and T-Col (below). (Right) H-E-stained histological images of the collagen gel after 2 weeks of implantation. F-Gel (top), F-Coll (middle), and T-Col (below). Magnification, $\times 200$.

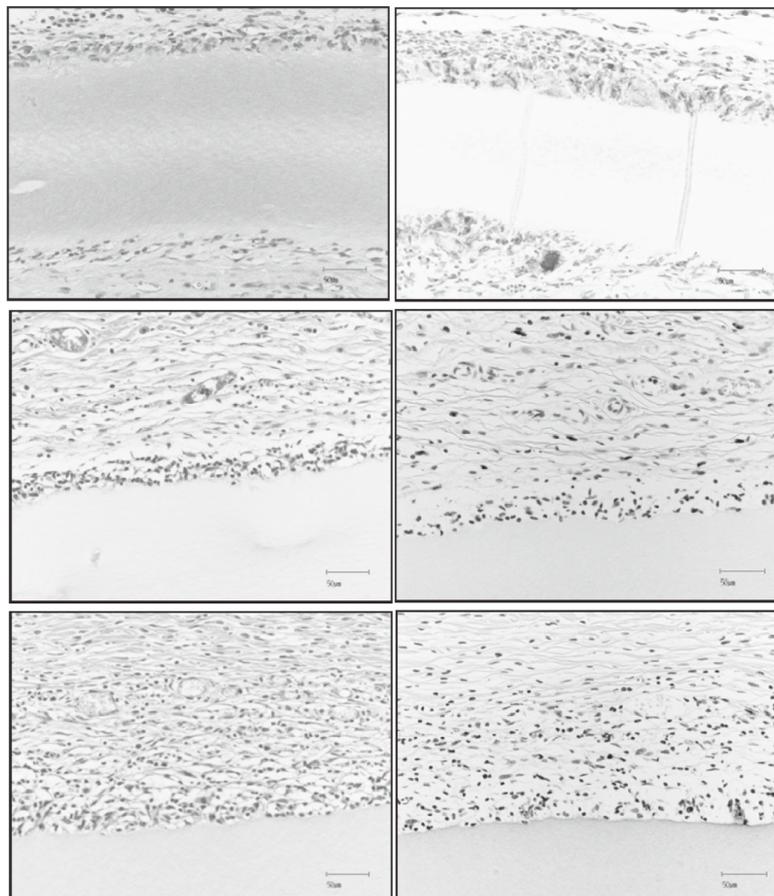


Fig. 7 H-E stained (left) and kt-014 stained (right) images of F-Gel (A,B), F-Coll (C,D), and T-Col (E,F) after 2 weeks of implantation.

周辺組織は炎症反応が抑えられたまま組織再構築が始まっていることが確認された (Fig. 8)。移植されたコラーゲンゲルは生体内では異物として認識されるので炎症反応が発生する。炎症反応を起こすマクロファージはコラーゲンの3重らせんを特定し反応するインテグリン受容体を有するため、コラーゲンゲルを分解しながら中に浸潤する⁹⁾。そのため、ゲルの周辺は激しい炎症反応が見られるとともにゲルの分解は加速される。結局、ゲルの周辺組織の再構築、定着および機能化を遅延させる。

しかし、繊維化されたコラーゲン組織体は炎症反応が抑えられたまま周辺組織の再構築が見られた。F-Colの場合、細胞浸潤が見られたものの、炎症細胞 (マクロファージと異物巨細胞) が見られなかった。また、周辺組織のコラーゲン繊維は成熟されていることが確認されていることから、治癒過程に入っていると考えられる。コラーゲンマトリックスが炎症反応を抑える理由は、コラーゲンゲルと異なる

表面構造を有することに起因すると考える。コラーゲンゲルとコラーゲンマトリックスは架橋されていないため、同様の化学的性質を有する。しかしながら、コラーゲン繊維構造を有することで、生体は異物として反応しないので異物反応が発生しないと考えられる。これは、微小環境でのコラーゲン表面構造が非常に重要であることを意味する。この結果は、脱細胞組織の皮下移植結果とよく似ていることから、コラーゲン組織体の表面地形と形態により生体の異物反応が制御されると考えられる¹⁰⁾。即ち、材料の生体組織構造や表面特性は生物学的機能と関連性があることを示している¹¹⁾。また、Fig. 3に示したようにコラーゲンの収縮が起きないため、人工皮膚として移植しても収縮する問題はないと思われる。

T-Colの場合、コラーゲンマトリックスの分解が起きなかった。しかし、炎症細胞による周辺組織のカプセル化が発生せず、コラーゲン繊維が生成されていることが明らか

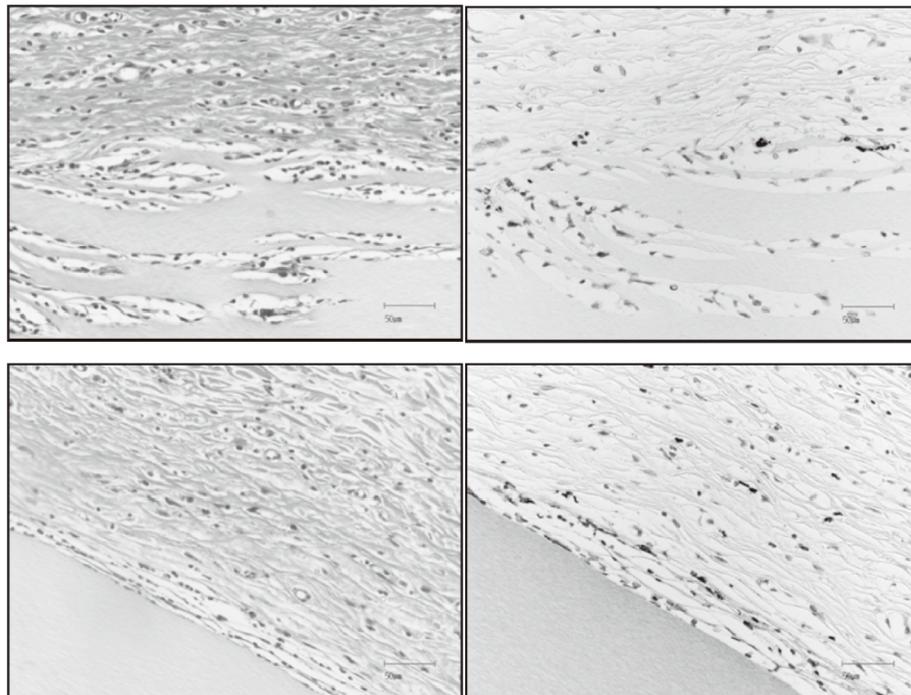


Fig. 8 H-E stained (left) and kt-014 stained (right) images of F-Col (A, B), and T-Col (C, D) after 8 weeks of implantation.

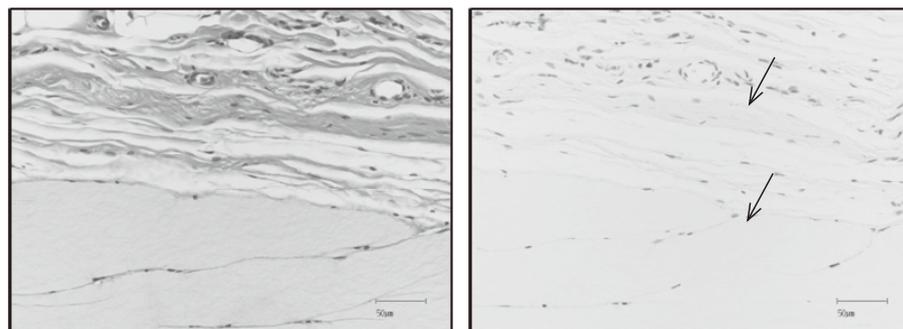


Fig. 9 H-E stained (left) and kt-014 stained (right) F-Col after 6 months of implantation.

となった。これは、組織の再構築には移植物の分解が伴う必要はないことを示している。また、F-ColとT-Colは細胞の定着が見られ、生体組織との融合が示唆された。これを6か月まで延長するとコラーゲンマトリックスは分解が進まず、そのまま残っていることを確認した (Fig. 9)。この時、コラーゲンマトリックスの周辺組織は既に再構築され熟成されたコラーゲン繊維 (太い繊維) が見られた。また、コラーゲンマトリックスと生成されたコラーゲン繊維は完全に融合されていることが分かった (矢印)。これは、コラーゲンマトリックスの移植後、移植部位にそのマトリックスは分解せず、生体組織と融合し、その機能を果たすことが可能であることを意味する。類似挙動が移植した脱細胞組織でも見られることから、組織再構築には移植物の分解が伴う必要はないことを示している^{10, 12)}。即ち、生体内での機能化と周辺組織の再生が同時に得られることを意味する。この時、移植物と生体組織間相互作用は必修である。これは、細胞の定着が不可能な表面を有する移植物 (例：架橋コラーゲン) は生体組織から遊離され、機能化できないからである。

これは、人工皮膚として移植した場合、ケロイド (傷痕) の抑制が可能であると期待される。ケロイドの発生は組織再構築と収縮に関係がある^{13, 14)}。移植後の周辺組織の再構築の際、コラーゲン繊維の過生成と収縮による周辺組織への機械的張力は生体によるコラーゲン繊維形成調節機能を低下させる。コラーゲンマトリックスの場合、寸法安定性を有すると同時に (Fig. 3)、マトリックスの崩壊やマクロファージによる異物反応が見られず、周辺組織の正常な構築と早期治癒が予測される (Fig. 7-9) ことから、皮膚ケロイド生成を抑制するとともに周辺組織との融合が起る可能であると考えられる。

4. 総括

本研究では、繊維化がコラーゲンマトリックスの作製にとっても重要であることを見出した。コラーゲンの繊維化と同時にゲル化が発生し、コラーゲンマトリックスを安定させると考えられる。また、コラーゲンマトリックスの物性は含水率を調節することにより制御可能である。このコラーゲンマトリックスは水と熱に対しての安定性と高機械的な物性を有する。コラーゲン組織体の構造調節の効果は移植実験で明らかとなった。生体組織に近い構造 (繊維構造) を有することで炎症反応が抑えられるとともに、治癒過程が速くなることが分かった。本研究で開発したコラーゲンマトリックスを人工皮膚として応用することにより、移植した部位でのケロイドの抑制、早期組織再構築、機能回復が可能であると考えられる。

(参考文献)

- 1) Nam K, Kimura T, Kishida A. Physical and biological properties of collagen-phospholipid polymer hybrid gels, *Biomaterials*, 28, 3153-3162, 2007.
- 2) Warren Sands R, Mooney DJ. Polymers to direct cell fate by controlling the microenvironment. *Curr Opin Biotech* 18, 448-453, 2007.
- 3) Wood GC, Keech ML. The formation of fibrils from collagen solutions. The effect of experimental conditions: kinetics and electron microscopic studies. *Biochem. J.*, 75, 588-598, 1960.
- 4) Kadler KE, Holmes DF, Trotter JA, Chapman JA. Collagen fibril formation. *Biochem. J.*, 316, 1-11, 1996.
- 5) Nam K, Kimura T, Kishida A. Controlling coupling reaction of EDC and NHS for preparation of collagen gels using ethanol/water co-solvents. *Macromol. Biosci.*, 8, 32-37, 2008.
- 6) Miles CA, Ghelashvili M. Polymer-in-a-box mechanism for the thermal stabilization of collagen molecules in fibers. *Biophys. J.*, 76, 3243-3252, 1999.
- 7) Kuznetsova N, Chi SL, Leikin S. Type I collagen is thermally unstable at body temperature. *Biochem.*, 37, 11888-11895, 1998.
- 8) Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature* 420, 846-852, 2002.
- 9) Kao WJ, Zhao QH, Hiltner A, Anderson JM. Theoretical analysis of in vivo macrophage adhesion and foreign body giant cell formation on polydimethylsiloxane, low density polyethylene, and polyetherurethanes. *J Biomed Mater Res*; 28, 73-79, 1994.
- 10) Funamoto S, Nam K, Kimura T, Murakoshi A, Hashimoto Y, Niwaya K, Kitamura S, Fujisato T, Kishida A. The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels. *Biomaterials* 31, 3590-3595, 2010.
- 11) Yip C. Biomaterials in Reparative Medicine: Biorelevant Structure-Property Analysis. *Ann N Y Acad Sci* 961, 109-111, 2002.
- 12) Allan B. Closer to nature: new biomaterials and tissue engineering in ophthalmology. *Br J Ophthalmol* 83, 1235-1240, 1999.
- 13) Sussman MD, Effect of increased tissue traction upon tensile strength of cutaneous incisions in rats, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 123, 38-41, 1996.
- 14) Tuan T-L and Nichten LS. The molecular basis of keloid and hypertonic scar formation. *Mol. Med. Today*, 4, 19-24, 1998.