

생인공 간장 연구의 현황과 전망

강길선 · 이종문 · 이해방

1. 서론

건강한 간은 급성 질환 후에는 간단히 재생하는 것으로 알려져 있으나 알콜 중독이나 B 또는 C형 간염에 감염되는 등의 만성적 질환에 대하여서는 간장조직이 더 이상 재생하지 않는 것으로 알려져 있다.¹ 따라서 이러한 만성 질환에 의한 말기 간부전 환자에 대한 유일한 대안은 타인의 간장 이식인데 기증 장기의 부족이라는 심각한 문제가 남아있다. 따라서 대부분의 간장 질환 환자가 이식을 기다리다가 만성 증중에 의한 급성 간부전증으로 사망에 이르고 또한 운이 좋게 기증 이식을 받는다고 하더라도 이러한 만성 환자에게 이식 후에 생존율이 낮은 것이 문제점으로 대두되고 있다. 따라서 최근에 급성 간부전증 환자가 자기 자신의 간세포 또는 동물의 간세포로부터 대체할 수 있는 “유지시스템”이 간 이식에 대한 대안으로 떠오르게 되었다.^{2,3} 즉, 환자 자신의 간이 회복되던지 또

는 기증자의 간을 이식할 수 있을 때까지 기능을 연장해주는 “다리 역할을 해 주는” 이른바 bridging 디바이스의 디자인이 대두되게 되었다. 이러한 bridging 디바이스가 장기간 유지할 수 있다면 현재 신부전증으로 고통 받는 환자들이 주로 하는 신장 투석 등과 같은 형태로 발전될 것으로 기대되고 있다. 이러한 사회적 배경으로 하는 고객의 니즈가 생인공간장(bio-artificial liver, BAL) 디바이스 형태의 발전으로 이



이종문

1972 전북대학교 섬유공학과 (학사)
1976 전북대학교 섬유공학과 (석사)
1985 경희대학교 섬유공학과 (박사)
1977~1992 전북대학교 섬유공학과, 교수
1993~ 현재 전북대학교 고분자·나노공학과, 유기신물질공학과 교수



강길선

1977 인하대학교 고분자공학과 (학사)
1981 인하대학교 고분자공학과 (석사)
1987~1998 한국화학연구원 생체의료고분자팀 선임연구원
1991~ 아이오와 주립대학교
1995 생체의료공학과 (박사)
1998~ 전북대학교 고분자·나노공학과, 현재 유기신물질공학과 부교수



이해방

1964 동국대학교 화학과 (학사)
1966 동국대학교 화학과 (석사)
1974 유타대학교 재료공학과 (박사)
1974~1976 노스캐롤라이나 치과대학, 선임연구원
1976~ 밀턴로이사, 로드사, 캔달사, 책임연구원
1984 한국화학연구원 생체의료고분자팀, 석좌연구원

Recent Advances for the Development of Bioartificial Liver (BAL)

전북대학교 고분자·나노공학과 (Gilson Khang and John M. Rhee, Department of Polymer·Nano Science and Technology, Chonbuk National University, 664-14, Dukjin, Jeonju, 561-756 Korea)

한국화학연구원 나노생체재료연구실 (Hai Bang Lee, Nanobiomaterials Laboratory, Korea Research Institute of Chemical Technology, P.O. Box 107, Yuseong, Daejeon, 305-600 Korea)

e-mail: gskhang@chonbuk.ac.kr

어졌다. 이는 대사 활성을 갖는 간세포를 인공간 또는 인공적으로 만든 모세관 사이에서 배양하여 생물반응기를 제조하고 이에 환자의 혈장을 외부에서 통과시켜 간장의 역할을 대신하게 디자인되어 있다.

그러면 이러한 BAL의 성능에 충족되어야 되려면 어떠한 요인이 중요한 점으로 작용할 것인가? 간은 간세포에 의하여 수행되는 몇 가지 필수불가결한 기능이 있다. 이 세포는 혈액의 응고를 담당하는 인자 등을 포함하는 수많은 단백질을 합성하며, 담즙을 생산하고, 탄수화물, 지방과 단백질의 대사를 조절하기도 한다. 또한 알콜과 약물을 분해한 분해물과 질소대사물의 암모니아 생성물 등의 해독작용도 수행한다. 중요한 기능 중의 하나인 면역체계의 일부분을 담당하는 Kupffer 세포가 같이 자라고 있기도 하다. 이러한 문제들이 BAL 생물반응기에 의하여 해결되어야 할 가장 중요한 간 기능이기도 하다. BAL에서의 생합성 능력이 아마도 제일 중요한 기능인데, 이는 간에서 합성되는 대부분의 단백질은 환자에 외인성으로 작용하

기 때문이다. 또한 암모니아의 생성과 해독 또한 중요한 기능 중의 하나이다. 혈중에 암모니아의 농도가 증가하면 중추신경계에 독성을 끼친다.⁴ 이러한 인체에 큰 영향을 끼치는 여러 가지 기능을 해결하기 위하여 몇몇 연구 그룹들이 간세포가 최적으로 성장하게 하여 가능한 한 여러 가지 활성성을 동시에 유지하게 하는 BAL 디바이스를 개발하는 데 주력하고 있다.

2. BAL 생물반응기를 위한 최적의 세포 형태

간장의 구성성분은 70% 이상이 세포 성분이기 때문에 BAL 생물반응기를 위한 최적의 세포는 간장 기능의 대부분을 담당하고 있는 primary 간세포이다. 그러나 간세포가 간의 복잡한 구조에서 분리되면 간 특이성 유전자 표현을 급속히 상실하게 되며 동시에 배양 중에 형태학적으로 불안하게 된다. 이러한 불안정한 상태가 *in vitro*에서 세포외기질이나 성장 호르몬

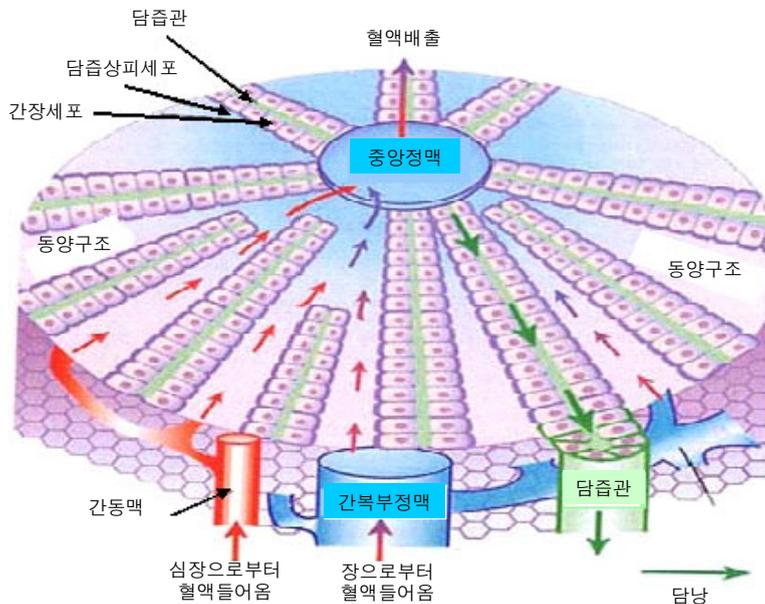


그림 1. 간장 내에서 이루고 있는 세포의 구조도. 간세포라고 불리는 간 상피세포는 간의 동양구조인 모세혈관 사이에 다발 형태로 질서정연하게 배열되어 있다. 산소를 머금은 혈액은 간동맥을 통하여 심장에서부터 그리고 간정맥을 통하여 장으로부터 들어오며 동양구조에서 혼합되어 간장 중앙 정맥을 통하여 심장으로 들어가게 된다. 혈관내피세포, Kupffer 세포와 이들의 위성세포로 이루어진 동양구조 세포는 동양구조에 나란히 정렬되어 있고 따라서 혈액으로부터 간세포가 분리된다. 따라서 간세포에는 단지 혈장만이 접촉하게 되어 혈장단백질, 영양물질 및 대사물질이 교환되게 된다. 담즙은 간세포에 의하여 합성되며 이웃하고 있는 세포 사이의 세관이라고 불리는 작은 도관으로 분비하게 된다. 담즙은 담즙 상피세포에 의하여 생성되는 도관으로 모이게 되고 간으로부터 담낭속으로 모이게 된다. 따라서 BAL 생물반응기로서 정상 간과 같은 역할을 하게 제조하려면 간의 복잡한 조직의 구성과 함께 수 많은 독특한 기능을 재창조하여야 된다.

의 조절 또는 여러 가지 다른 간세포형태와 간세포와의 공배양으로 해결할 수 있음이 최근에는 가능하게 되었다. 즉, 간의 실질세포를 형성하는 간세포, 비실질 간세포, 그리고 담즙관의 상피 세포들의 상호작용이 최적의 간장 활성도의 유지를 위하여 중요하다(그림 1).⁵

임상에 응용하기 위한 BAL 생물반응기로는 상당히 큰 사이즈로 스케일 업을 하여야 하는데 현실적으로 이것도 큰 문제이다. BAL 생물반응기에는 최소한 10¹⁰개의 간세포가 간부전증 환자의 유지에 필요하다. 현재 인간 간세포의 primary 세포계대배양과 이들의 냉동보관 등에 제한이 있기 때문에 이러한 수의 세포를 얻는 것에 심각한 문제가 있다. 세포수가 부족하여 BAL 생물반응기로서 인체의 간장 기능을 대신하는 데 제약이 있다. 따라서 이러한 문제의 대안으로써 이종동물의 간세포 특히 돼지의 간세포를 이용하는 연구도 진행되고 있다. 그러나 이 방법은 현재 이종간에 생길 수 있는 특수한 전염병의 문제로 인하여 아직도 논쟁 중에 있다.⁶ 현재 돼지세포를 이용한 간세포의 임상실험은 미국에서는 진행 중이지만 영국을 비롯한 유럽 각국에서는 이러한 연구에 대한 승인을 계속 미루고 있다.

또 다른 연구 예로는 불멸화된 간세포주들이 이러한 사람의 간세포의 부족한 것을 극복할 수 있으나 BAL 생물반응기로서의 역할을 할 수 있는 불멸화된 간세포주의 확보에 어려움이 있는 것도 사실이다. 또 다른 대안으로는 생물 반응기내에 여러 가지 다른 종류의 세포를 공배양하는 것으로서 기능적 향상을 꾀하고 있다. 또 다른 일련의 연구로는 유전공학적으로 클로닝되어 불멸화된 간세포주를 Cre-Lox 유전공학 시스템을 이용하여 불멸화된 유전자를 끼워 넣어가역적으로 불멸화시켜 암 형성의 가능성을 완전히 제거한 세포를 사용하였다.⁷ 잠재적으로 암 생성의 위험이라는 안정성 측면에서 임상적 응용은 아직도 계류 중이다. 이러한 잠재적인 위험성에도 불구하고 HepG2 간암세포를 클론한 C3A 불멸화 간세포를 함유하는 BAL 생물반응기가 현재 임상적으로 테스트되고 있다.⁸

최근 근본적 세포주인 간줄기세포 또는 다른 조직에서 추출된 줄기세포 등이 인간 간세포로서의 대안적 출처로 떠오르고 있다. 골수유래 간엽줄기세포를 포함한 간, 근육, 및 중추 신경계에서 추출 정제된 성체줄기세포는 약 5~7년 전에 생각하였던 것보다도 훨씬 더 유연성을 갖고 있는 것으로 밝혀져 원하는 세포 형태로 배양외부 조건을 여러 가지 사이토카인

등으로 조절하여 분화시킬 수 있다.^{9,10} 이러한 상태를 결정하는 결정적인 기술은 줄기세포를 미분화된 상태로 팽창시켰다가 원하는 형태의 세포로 분화시키는 것이다. *In vivo* 내에서 간세포로 분화한 것을 증명하였으나¹¹⁻¹³ *in vitro*에서는 골수유래 성체줄기세포가 이러한 현상을 확인하지 못 하였다. 일례로 간장유래 혈액 중간엽줄기세포는 담즙관 상피세포로 분화시킬 수 있음이 증명되었다.¹⁴ 최근 인간 난자의 복제세포인 배아줄기세포가 또 다른 대안세포로 떠오름에 따라서 ES 세포에 많은 관심이 쏟아지고 있다.¹⁵⁻¹⁷ 인간 ES 세포의 심근세포와 신경선조세포로의 분화가 보고되었고 이로써 인간의 간세포로 응용할 수 있는 길이 더욱 더 가까워진 것도 사실이다. 따라서 상기한 어떠한 세포원이라도 생체활성이 있는 최적의 간세포로 선정이 되어야만 대량 스케일로써 최적화되어 BAL 생물반응기로서의 배양조건이 결정될 것이다.

3. BAL 생물반응기로서의 디자인

기본적으로 제안된 BAL 생물반응기는 중공사모세관 내로 환자의 혈액을 펌프하게 되고 이들의 끝에는 이러한 중공사를 모으는 컬럼으로 구성되어 있다(그림 2). 간세포는 중공사모세혈관의 외부의 틈새에서 파종되는데,¹⁸ 이 때 세포 홀로하던지 미세립구 표면에 부착시켜 배양한 것 등이¹⁹ 사용된다. 다른 부분에서는 환자 또는 실험 동물의 혈장이 분리되어 체온으로 유지하게 하고 산소를 불어 넣은 후 생물반응기 모세혈관의 중공부분으로 펌프되게 된다. 이렇게 중공사막을 통하여 간세포와 환자 혈장 사이의 물질 교환이 일어난다. 간세포를 혈장 내의 산소와 영양분을 받고 독성물질을 해독하여 이들의 대사물을 다시 혈장에 전달시킨다. 따라서 가장 이상적인 BAL 생물반응기의 디자인은 간세포의 *ex vivo*에서의 배양 및 유지의 최적조건을 유지하게 하여야 한다. 현재의 연구 결과로는 단순히 “흐르는(flow-through)” BAL 생물반응기가 이러한 조건을 갖출 것으로 예상하고 있다. 그러나 현재의 전통적인 단층 배양으로는 최적의 간세포 배양 상태를 유지할 수가 없어서 간세포의 분극을 재유도할 수 있는 세포 덩어리를 형성할 수 있도록 유도하여야 한다. 즉, 표면 단백질을 비대칭성 편재화하여 세포가 서로 다른 위치에서 서로 다른 기능을 할 수 있게 하여야만 한다.

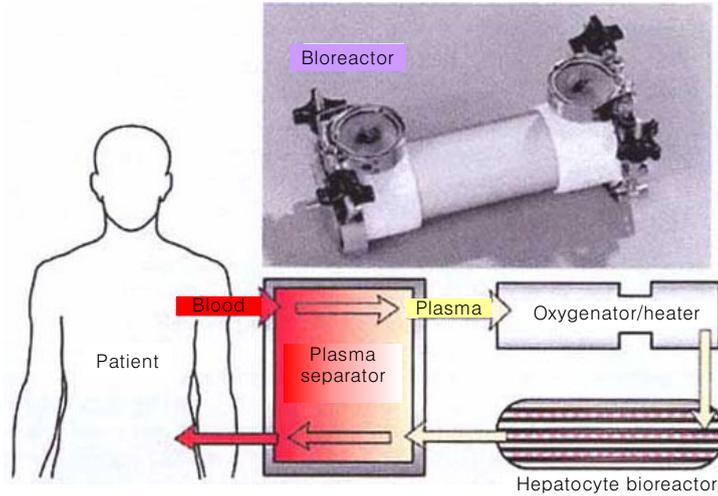


그림 2. 대표적 BAL 생물반응기의 구조도. 우선 앞의 구조물로서 정맥유치 카테타로부터 혈액을 채취하여 혈장 분리기로부터 혈장을 분리한다. 분리된 혈장은 열교환기를 거쳐서 산소부화기를 거친다. 이 혈장은 생물반응기의 컬럼 내에 모세혈관의 루멘을 통하여 된다. 이 생물반응기 컬럼 내의 모세혈관 이외의 공간에는 10^{10} 마리 이상의 사람 또는 돼지의 간세포가 들어가서 생존된다. 이렇게 제독 및 해독된 혈액이 환자의 몸에 들어가기 이전에 혈액세포들은 다시 혼합되게 된다.

최근에 베를린 의대의 Gerlach 박사 등에 의해서 좀 더 정교한 BAL 생물반응기가 개발되었다.²⁰ 이 생물반응기는 세 세트의 내부 편직 형태의 모세관으로 되어 있는데 이는 모세관 이외의 3차원 공간에서 간세포가 안정되게 성장되는 이른바 “하우징”과 같은 역할을 한다. 모세관의 한 세트는 충분한 산소를 공급하고 나머지 두 세트는 각각 혈장의 입구와 출구를 담당하게 되어있다. 이 BAL 생물반응기는 기능적 세포 덩어리를 재조직화할 수 있도록 자극시킬 수 있게 설계되어 있어 간세포에 대한 최적화된 모듈로 이루어져 있다. 혈액의 출구가 복잡하게 구성되어 있는 것이 Gerlach 생물반응기의 특징이다. 암스테르담의 Chamuleau에 의하여 디자인된 다른 형태의 생물반응기는 산소공급을 위한 내부 중공사모듈을 포함하는 폴리에스터 매트릭스 직포가 나선형태로 되어 있다. 이 형태는 간세포의 최적 성장 상태를 유지하여 간장의 여러 기능에 더욱 가깝게 흉내낼 수 있도록 좀 더 이론적으로 접근된 환경을 제공하여 주는 것으로 평가되고 있다. Sussman 시스템,¹⁸ Demetriou 시스템,¹⁹ Chamuleau 시스템 및 Gerlach 시스템의 BAL 생물반응기가 현재 대표적으로 계속 연구 중이며 임상 중에 있다. 이 이외의 것으로 현재 연구 중에 있는 형태의 것으로는 간세포가 성장할 수 있도록 콜라겐 겔이 도포된 P 플랫-베드 모세관 형태의 것이 있으며, 이

들이 변형된 시리즈의 것으로는 flat staking plate 또는 혈액을 방사상으로 흐르게 하는 radial flow elements 등의 것들이 있다.²²⁻²⁴ 이와 함께 여러 형태의 BAL 생물반응기가 실험실 형태로 계속 개선되고 있으나 임상적으로 응용되기에는 많은 연구가 필요하다.

최근 BAL 생물반응기의 체외 및 동물 실험 등에 대하여 많은 연구들이 소개되고 있다. 이들 연구들의 주요 관점으로는 간세포의 생체 활성력과 기능, 알부민 또는 혈액응고인자의 생성량, 요소 합성, 담즙 피그먼트 빌리루빈의 결합정도, 약물의 대사 및 타 관계되는 여러 대사 반응 경로 등의 메카니즘 등이었다. 또한 BAL 생물반응기는 간부전증이 있는 소동물 또는 대동물 등에 테스트되었다. 예를 들면 Flendrig 등은 혈액 공급 계통의 수술로 유발된 국소빈혈 돼지의 수명 연장을 위하여 실험하였는데²⁵ 1.4×10^{10} 개의 돼지 간세포가 과중된 Chamuleau 생물반응기로 치료를 하였더니 혈중 내의 암모니아와 빌리루빈 레벨이 확실히 감소하였으며, 이 돼지는 63시간 동안 생존함을 확인하였다. 따라서 간세포가 여러 형태의 BAL 생물반응기내에서 여러 기능을 만족할만하게 할 수 있는 것으로 나타났으나 이러한 연구 데이터만으로는 임상이 성공할지에 대한 예측에 대해서는 아직 의문이 많은 것도 사실이다.

4. 임상 실험 예들

BAL 생물반응기를 이용한 최근의 임상실험은 급성 간부전증에 처해 있는 환자의 치료였다. 환자의 혈장 빌리루빈 수치는 감소하였고 동시에 신경계통의 상태 또한 호전되어 병원으로 안전하게 후송되었다.²⁶ 이로써 이러한 접근법으로써의 잠재성이 있음이 밝혀졌다. 이러한 BAL 생물반응기는 냉동 보존되었던 토끼의 간세포가 충전된 인공 신장 투석기와 동일하게 구성되었다. 이 이후로 임상 실험을 위한 디자인과 여러 가지 기본 조건들과 관계되는 여러 가지 어려움과 임상적으로 추구되어야 할 최종 선택 실험사항 등의 선택 등에도 불구하고 몇몇 성공적인 케이스들이 보고되었다. 최근 Sussman 그룹 등에 의하여 사람의 C3A 간암세포주를 사용한 임상과 Demetriou 등이 돼지의 primary 간세포를 이용한 BAL 생물반응기 등이 좋은 결과 등을 얻고 있음이 보고되었다.^{27,28} 현재의 BAL 생물반응기에 의한 가장 이상적인 대상 환자는 급성 간부전증 환자로 고통 받는 환자들에게 간 이식을 받을 때까지 또는 완전 회복할 때까지 기간 동안에 “bridge” 받은 것이다.

BAL 생물반응기의 안전성과 가능성에도 불구하고 효율이라는 측면에서는 아직도 갈 길이 멀다. 현재 공정하고 좀 더 정확한 임상 시험의 결과를 기다리고 있는 중이다. 24명의 급성 간부전증 환자로 구성된 1차 임상이 영국에서 시도 되었는데 12명의 대조군과 12명의 C3A 세포주가 함유하고 있는 Sussman BAL 생물반응기가 실험되었다.²⁹ 이 BAL 생물반응기에 대한 안정성과 가능성은 증명이 되었지만 임상적 생존율에 대한 명확한 유의성이 있는지에 대한 증명을 하지 못 하였다. 단지 대조군의 생존율에 비하여 높은 것이 증명되었다. 따라서 계속되는 연구로는 적용되는 임상에 있어서 환자 수가 대폭적으로 증가되어 좀 더 효율에 대한 의문이 풀릴 수 있을 것이다. 현재 Vitagen사에 의하여 C3A 세포주에 의한 임상실험이 미국과 영국에서 행하여지고 있다.

또 다른 대규모 임상실험이 Demetriou 형태의 돼지 간세포를 이용한 형태의 인공간이 연구되었다.³⁰ 이는 Circe Biomedical사에 의하여 수행이 되었는데 170명 이상의 급성 간부전증 환자에게 임상 시험되었다. 이 연구의 중요성은 미국과 유럽에서 동시에 수행되는 대규모의 첫 번째 시도으로써 주로 치료효율을 밝히려 하였다. 예비결과는 현재의 연구에 용기를 북돋워주는 것은 확실하나 세세한 자료는 현재 분석중

인 것으로 알려졌다. 또 다른 두 BAL 생물반응기인 Amsterdam과 Berlin 시스템들이 예비 임상 수행중이며 가까운 시일 내에 결과가 발표될 예정이며 다른 형태와 유사하게 돼지 간세포가 사용되었다.

5. BAL 생물반응기의 장래

상기한 바와 같이 현재 생물반응기으로써의 BAL의 풀어야 할 가장 큰 숙제는 체외에서 어떻게 살아있는 간세포가 고유의 기능을 그대로 간직하느냐에 달려있다. 따라서 생체재료 학자들이 간세포의 상피세포분극을 유지할 수 있는 생체재료를 개발하거나³¹ 조직공학의 기본 원리를 이용하여 3차원 세포 응집체의 기능을 재조직화할 수 있는 방법을 개발한다든지³² 등에 의하여 해결될 수도 있다. 간 기능을 온전하게 하기 위한 근본적인 필수충분 조건이 여러 가지 형태의 간세포들간의 상호작용을 유지시키는 것이다. 따라서 이러한 간세포들의 공배양이 또 다른 해결 방안이 될 수 있을 것이다. 따라서 이러한 간세포들과 비실질세포들의 공배양이 또 다른 해결 방안이 될 수 있을 것이다. 이렇게 되면 또 다른 문제로 BAL 디자인, 구성, 조작 등이 좀 더 복잡해지는 것은 두 말할 나위 없지만 어쨌든 풀어야 될 것임은 틀림없다.

BAL 생물반응기내의 간세포에 의한 담즙재생산 또한 쉬운 일이 아니다. 담즙 생산물과 대사산물의 분비에 의한 모든 생산물이 제거되지 않으면 간세포에 독이 될 가능성이 높다. 따라서 가능한 한 이러한 잠재적 독성이 있는 물질들은 간세포에 영향을 주지 않은 조건 내에서 독성이 있는 중간 물질들을 간단한 방법으로 세척해내든지 충분히 뭍혀야 한다. 따라서 이러한 개념 하에 차세대의 생물반응기에서는 담즙산도관을 장치한 것이 연구 중이다. 이러한 일련의 연구로 담도관 상피세포를 배양하였더니 담즙산도관과 같이 생긴 구조를 갖는 것이 최초로 확인되었다.^{33,34}

이러한 여러 가지의 생물반응기의 디자인에 있어서 문제점을 계속 개선해 나간다고 하더라도 가장 중요하고 심각한 문제가 세포 공급원이다. 따라서 이상적으로는 가까운 미래에 줄기세포의 접종 및 배양이 BAL 생물반응기에 응용될 것이며 배양액중의 적당한 생체 문제가 활성화되기 이전에 대량 배양되어 많은 양의 세포가 얻어질 것이다. 이렇게 유도된 세포는 간세포로서의 전형적인 표현형으로 유도가 되고 이렇게 변

환된 간세포는 다른 형태의 간세포와 공배양되어 간장조직으로써 조직화될 것이다.

마지막으로 생각되어야 될 또 다른 중요한 인자는 조직의 용이성이다. 급성 간부전증인 경우에는 생물반응기 간장기계는 준비 기간이 아주 짧게 바로 환자에 응용되어야 됨은 물론이다. 즉, 급성 환자들을 다루는 의료진과 간호원들이 이들의 사용을 결정하는 시간이 짧도록 하는 “현장사용자가 편하게” 해 주어야 됨은 물론이다. 이렇게 상기한 모든 도전들은 생체의 공학자, 세포생물학자 및 의사들이 서로 공동 협력하여 해결하면 머지 않은 날에 임상의학에 BAL 생물반응기가 손쉽게 쓰이는 날이 멀지 않을 것이다.

감사의 글: 본 총설은 보건복지부 및 과학기술부의 지원으로 이루어졌으므로 이에 감사 드립니다.

참고문헌

1. A. J. Strain and A. Diehl, Eds., *Liver Growth and Repair*, Chapman & Hall, London, pp 3-27 and 558-576 (1988).
2. S. L. Nyberg, M. V. Peshwa, W. D. Payne, W. S. Hu, and F. B. Cerra, *Am. J. Surg.*, **166**, 512 (1993).
3. J. W. Allen, T. Hassanein, and S. N. Bhatia, *Hepatology*, **34**, 447 (2001).
4. A. S. Hazell, and R. F. Butterworth, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **222**, 99 (1999).
5. A. J. Strain, *Gut*, **35**, 433 (1994).
6. R. A. Weiss, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B*, **356**, 957 (2001).
7. N. Kobayashi, T. Fujiwara, K. A. Westerman, Y. Inoue, M. Sakaguchi, H. Noguchi, M. Miyazaki, J. Cai, N. Tanaka, I. J. Fox, and P. Le Boulch, *Science*, **287**, 1258 (2000).
8. N. L. Sussman, M. G. Chong, T. Loussayer, D. E. He, T. A. Shang, and J. H. Kelly, *Hepatology*, **16**, 60 (1992).
9. J. M. W. Slack, *Science*, **287**, 1431 (2000).
10. D. J. Anderson, F. H. Gage, and I. L. Weissman, *Nat. Med.*, **4**, 393 (2001).
11. B. E. Petersen, W. C. Bowen, K. D. Patrene, W. M. Mars, A. K. Sullivan, N. Murase, S. S. Boggs, J. S. Greenberger, and J. P. Goff, *Science*, **284**, 1168 (1999).
12. N. D. Theise, M. Nimmakayalu, R. Gardner, P. B. Illei, G. Morgan, L. Teperman, O. Henegariu, and D. S. Krause, *Hepatology*, **32**, 11 (2000).
13. E. Lagasse, H. Connors, M. Al-Dhalimy, M. Reitsma, M. Dohse, L. Osborne, X. Wang, M. Finegold, I. L. Weissman, and M. Grompe, *Nat. Med.*, **6**, 1229 (2000).
14. H. A. Crosby, D. A. Kelly, and A. J. Strain, *Gastroenterology*, **120**, 534 (2001).
15. M. Amit, M. K. Carpenter, M. S. Inokuma, C. P. Chiu, C. P. Harris, M. A. Waknitz, J. I. Eldor, and J. A. Thomson, *Dev. Biol.*, **227**, 271 (2000).
16. B. E. Reubinoff, M. F. Pera, C. Y. Fong, A. Trounson, and A. Bongso, *Nature Biotechnol.*, **18**, 399 (2000).
17. I. Kehat, D. Kenyagin-Karsenti, M. Snir, H. Segev, M. Amit, A. Gepstein, E. Livne, O. Binah, J. Itskovitz-Eldor, and L. Gepstein, *J. Clin. Invest.*, **108**, 407 (2001).
18. H. O. Jauregui, C. J. P. Mullon, D. Trenkler, S. Naik, H. Santangini, T. E. Muller, and B. A. Solomon, *Hepatology*, **21**, 460 (1995).
19. J. Rozga, F. Williams, M. S. Ro, D. F. Neuzil, T. D. Giorgio, G. Backfisch, A. D. Moscioni, R. Hakim, and A. A. Demetriou, *Hepatology*, **17**, 258 (1993).
20. J. C. Gerlach, N. Schnoy, J. Encke, M. D. Smith, C. Muller, and P. Neuhaus, *Hepatology*, **22**, 546 (1995).
21. M. F. Leonard, W. John, G. A. Jörning, A. Steenbeek, O. T. Karlsen, W. M. M. J. Bovée, N. C. J. J. Ladiges, A. A. te Velde, and R. A. F. M. Chamuleau, *J. Hepatology*, **26**, 1379 (1997).
22. L. D. Bartolo, G. J. V. Schweder, A. Haverich, and A. Bader, *Biotechnol. Prog.*, **16**, 102 (2000).
23. P. D. Hay, A. R. Veitch, M. D. Smith, R. B. Cousins, and J. D. S. Gaylor, *Artif. Organs*, **24**, 278 (2000).
24. M. Kawada, S. Nagamori, H. Aizaki, K. Fukaya, M. Niiya, T. Matsuura, H. Sujino, S. Hasumura, H. Yashida, S. Mizutani, and H. Ikenaga, *In Vitro Cell Dev. Biol.*, **34**, 109 (1998).
25. L. M. Flendrig, F. Calise, E. Di Florio, A. Mancini, A. Ceriello, W. Santaniello, E. Mezza, F. Sicoli, G. Belleza, A. Bracco, S. Cozzolino, D. Scala, M. Mazzone, M. Fattore, E. Gonzales, and R. A. Chamuleau, *Int. J. Artif. Organs*, **22**, 701 (1999).
26. K. N. Matsumura, G. R. Guevara, H. Huston, W. L. Hamilton, M. Rikimaru, G. Yamasaki, and M.

- S. Matsumura, *Surgery*, **101**, 99 (1987).
27. N. L. Sussman, G. T. Gislason, and J. H. Kelly, *J. Clin. Gastroenterol.*, **18**, 320 (1994).
28. F. D. Watanabe, C. J. Mullon, W. R. Hewitt, N. Arkadopoulos, E. Kahaku, S. Eguchi, T. Khalili, W. Arnaout, C. R. Shackleton, J. Rozga, B. Solomon, and A. A. Demetriou, *Ann. Surg.*, **225**, 484 (1997).
29. A. J. Ellis, R. D. Hughes, J. A. Wendon, J. Dunne, P. G. Langley, J. H. Kelly, G. T. Gislason, N. L. Sussman, and R. Williams, *Hepatology*, **24**, 1446 (1996).
30. L. Mendoza, T. Carrascal, M. D. Luca, A. M. Fuentes, C. Salado, J. Blanco, and F. Vidal-Vanaclocha, *Hepatology*, **34**, 299A (2001).
31. L. L. Hench and J. M. Polak, *Science*, **295**, 1014 (2002).
32. L. G. Griffith and G. Naughton, *Science*, **295**, 1009 (2002).
33. A. E. Sirica and T. W. Gaaney, *Hepatology*, **26**, 537 (1997).
34. M. K. H. Auth, R. E. Joplin, M. Okamoto, Y. Ishida, P. McMaster, J. M. Neuberger, R. A. Blaheta, T. Voit, and A. J. Strain, *Hepatology*, **33**, 519 (2001).