

인공 간

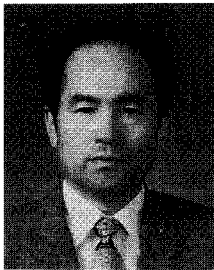
조종수 · 박영환 · 박인규

1. 개요

많은 질환으로 쇠약해지는 본래의 생체기능을 대체·보강하는 인공장기의 등장에 의해 의료의 질과 양은 크게 변해왔다.¹⁻³ 그러나, 현재의 공학적 기술과 재료에서는 펌프와 판막, 대구경의 혈관, 혹은 투석 등의 요소적 기능은 달성되어 가고 있지만 대사기능, 피드백 기능 등의 고차원적 생체기능을 지니는 인공장기에 대해서는 실현되지 못하고 있다.⁴ 인공재료(또는 생체유래재료)에 자기유래세포를 부가하여 그 인공재료의 '자기화'를 획득하게 되며 인공장기에서의 장애인 생체거절반응의 극복이 가능하게 된다. 또한 이들 하이브리드 조직체는 인공장기와 이식장기의 중간에 위치할 수 있는 제 3의 장기라고 할 수 있다. 이들의 목적을 달성하기 위해서는 장기 특유의 고차적 기능을 가지는 세포를 주로 하여 세

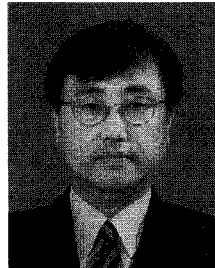
포의 환경을 인공적으로 설계하는 것보다 본래의 장기 기능과 구조를 발현하는 하이브리드 조직체를 생체외에서 형성한 뒤에 이를 생체내에 이식할 필요가 있다. 이러한 기술은 최근 생체조직공학이라고 불리우며, 고령화사회에 대처하는 혁신적 선진의료기술로서 기대되고 있다.

따라서, 조직을 생체외에서 재구축하기 위한 필요조건과 그의 요소 재료가 되는 세포, 생체기질재료·합성기질재료의 종류 및 구비해야 될 세포의 환경, 재구축 조직을 생체내에 이식하는 구체적 타겟이 되



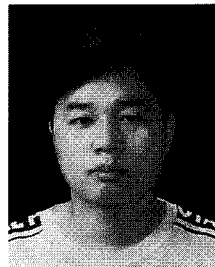
조종수

- 1970 서울대학교 농과대학 잠사학과 (학사)
- 1976 동경농공대학 공학부 고분자공학과 (석사)
- 1979 동경공업대학 고분자공학과 (박사)
- 1979~1998 전남대학교 교수
- 1982~1983 미국워싱턴대 박사후 연구원
- 1983~1984 미국 유타대 박사후 연구원
- 1998~ 현재 서울대학교 생물자원공학부 부교수



박영환

- 1975 서울대학교 공과대학 섬유공학과 (학사)
- 1980 Univ. of Mass 섬유화학 (석사)
- 1986 North Carolina State University 섬유고분자학 (박사)
- 1987~ 현재 서울대학교 생물자원공학부 교수



박인규

- 1991~1996 서울대학교 천연섬유학과 (학사)
- 1996~1998 서울대학교 천연섬유학과 (석사)
- 1998~ 현재 서울대학교 천연섬유학과 (박사과정)

Artificial Liver

서울대학교 농업생명과학대학 생물자원공학부 (Chong-Su Cho, Young-Hwan Park, and In-Kyu Park, Department of Natural Fiber Science, School of Biological Resources and Materials Engineering, College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, 103 Seodun-dong, Kwonsun-gu, Suwon 441-744, Korea)

는 조직·장기·질병, 부수적인 의료시스템을 연구할 필요가 있다.⁵⁻⁷

간장은 생체내에 있어서 대사의 중심장기이며 여러 종류의 복잡한 대사분해반응을 행함과 동시에 생체의 항상성 유지에 중요한 작용을 하고 있다. 또한, 정상인 간장은 꽤 여유있는 장기인데, 예를 들어 부하가 가해진다해도 그 예비력 때문에 자각증상이 나타나기 어려워서 침묵의 장기라고도 불려진다. 일반적으로 간장의 약 3/4을 절단하여도 왕성한 간의 재생이 일어나서 생존가능하다고 알려져 있지만 일단 균형이 깨어져 간장이 부하에 견딜 수 없는 상태가 된다면 중대한 생명의 위협에 빠지게 된다. 우리나라에 있어서 간질환자수는 상당한 수에 이르고 날로 증가추세에 있다. 이에 대하여 의료분야에 있어서는 많은 노력이 행해지고 있으며 혈장교환요법, 혈액투석요법 뿐만 아니라 인터페론 등을 이용한 치료 등에 의해 효과를 발휘하고 있지만 아직도 근본적인 것은 아니다. 따라서 현재의 위독한 간부전환자에 대한 유일한 치료법은 간장이식 뿐이지만 만성적인 제공자 부족은 피할 수가 없다.⁸ 그러므로, 간장기능을 완전히 대체하는 인공간장의 개발이 중요시됨과 동시에 그 전 단계로서 환자가 제공자를 얻기까지의 가교로서 사용가능한 인공장기의 개발도 또한 요구되고 있다.

2. 인공간의 개념

비생물학 인공간장에는 각종 물질에 대한 선택성을 가지고 있는 PAN막 투석에 의한 급성간염 치료가 행해지고 있으며 의식의 개선 및 구명률의 향상에 효과가 있다. 또한 활성탄과 합성수지재를 이용한 흡착형 인공간장은 혈액정화시에 혈중 유효성분까지 흡착하는 문제점이 있다. 그러나, 현재에는 혈장교환요법이 가장 일반적인 치료법으로서 이용되고 있다.

1970년대 후반부터 하이브리드형 인공장기의 개발이 행해져 왔다. 미국에서는 중공사형 인공장기를 간부전환자에 적용한 예가 보고되고 있다. 최근 스폰지 모양의 다공질담체인 polyurethane foam (PUF)를 이용한 쥐, 개 및 돼지의 초대간세포의 고밀도 배양에 있어서 원주형 PUF 블록에 혈관 모양의 배지유동용 세관을 다수 열어 다세포형 PUF 충전 배양장치를 개발하여 간부전환자에 대한 임상

응용 가능성을 보고하였다.

현재까지의 연구를 보면 단순히 세포를 주입한 고밀도 배양장치에서는 세포의 생존과 기능발현이 곤란하기 때문에 간세포만을 이용한 이점이 발휘될 수가 없다. 간세포에 조직모양의 구조체 형성을 시킨다면 고기능 발현과 그의 유지가 가능하지만 생체 장기 같은 충분한 혈관 등이 없기 때문에 대량배양을 행할 경우 물질교환에 나쁜 장애가 되고 있다. 현재 개발되고 있는 인공간은 합성물질로 만든 비생물학적 인공간, 간장조직과 간세포를 이용한 생물학적 인공간 그리고 두 가지를 배합한 하이브리드 인공간으로 나눌 수가 있다.

3. 인공간의 종류

3.1 비생물학적 인공간(Non-biological Artificial Liver Systems)

모든 간기능의 대체는 매우 어려운 일이기 때문에 많은 연구자들은 간의 해독 기능 같은 단일 간기능을 대체하는 연구에 집중해 왔다.⁹ 이러한 접근의 예는 혈액투석, 혈액여과, 고정화 효소를 이용한 혈액정화법이 행하여졌다. 인공간보조 시스템은 간의 한, 두 가지 기능을 대체한다는 점에서 여러 가지 단점과 한계들을 본질적으로 가지고 있다. 혈액이나 혈장의 해독 기능 대체를 위한 인공장기의 인공간보조 시스템을 예를 들어 보았을 때 polyacrylonitrile (PAN)을 이용한 혈액투석은 낮은 분자량($M_w=300\sim5,000$)의 용질을 확산·제거하는데 사용되지만 고분자량 용질의 제거는 용이하지 않으며 합성기능을 대체하지 못하는 단점이 있다. Charcoal 혈액여과는 환자의 피를 활성탄이나 음이온 교환수지 같은 solid support에 여과하여 혈액내의 불순물을 제거하는 방법이지만 분자 제거를 조절할 수 없으며 합성 기능을 대체할 수 없는 문제점을 가지고 있다. 효소 고정화는 친유성 및 단백질 부착 용질의 선택적인 제거에는 응용되지만 고정화된 효소의 단지 일부분만이 이용가능하다. 혈장교환요법은 현재 가장 일반적으로 사용되어 모든 혈장 용질의 제거를 할 수 있지만 대량의 혈장이 필요하다. Plasma fractionation(cryofiltration, thermofiltration)은 단백질에 부착되거나 고분자량의 용질을 선택적으로 제거가 가능하지만 효율이 처리 회수에 크게 의존하고 구명률이 거의 30% 정도에 그치고 있다.¹⁰

3.2 생물학적 인공간(Bioartificial Liver)

비생물학적 인공간을 사용할 경우 fulminant hepatitis 환자의 생존율은 30%를 초과하지 못한다.¹¹ 모든 이들 시스템은 혈액으로부터 독성 물질을 제거하기 위하여 개발되었기 때문에 간의 대사와 합성 기능이 결여되어 있다. 그러므로, 좀더 광범위한 간 특이적 대사 기능을 대체하기 위해서는 인공간보조 시스템을 위한 분리된 간실질세포의 이용이 요구된다. 간보조 시스템에서 간세포의 응용은 이식용 간세포계와 체외 간세포 bioreactors 등의 두 가지로 크게 분류될 수 있다. 이 두 가지의 다른 접근법에서 분리된 간세포는 현탁액 형태, 기질에 부착되거나 microspheres에 둘러싸인 다양한 형태로 사용된다.

3.2.1 이식용 간세포계

간이식은 말기 간 질병을 위해 확립된 치료법이나 제공자 장기의 부족으로 인해 제안받고 있기 때문에 간실질세포의 이식이 전체 장기 이식의 대안으로 제안되어 왔다. 단일 대사 결핍은 간증량의 12%를 교체함으로써 치료될 수 있으므로 하나의 간이 여러 환자에게 이용되거나 살아있는 제공자 간을 부분절제하여 다른 사람을 치료하는데 필요한 간세포 증량을 제공할 수 있다. 또한 환자 자신의 세포를 수집하여 단일 유전자 결함을 치료하기 위하여 유전자 변이를 행한 뒤 다시 이식할 수도 있다. 간실질세포는 현탁액, 피막형성, microsphere에 부착되거나 생분해성 또는 비생분해성 고분자 섬유에 부착하는 등의 형태로 이식되어 왔다.

Microcarriers, encapsulated implants와 생분해성 scaffolds 등의 이식용 간세포계가 간실질세포 이식을 위하여 연구되고 있다. Cai 등은¹² 내피세포와 혼합배양한 쥐 간실질세포를 alginate-polylysine 막으로 encapsulation하여 내피세포 없이 microcarrier만으로 쥐의 복강내에 이식하였으며 5주간 단백질과 대사산물이 생산되는 것을 관찰하였다. Dixit 등은^{13,14} 콜라겐 겔에 포착된 간실질세포를 alginate-polylysine-alginate 막으로 encapsulation하여 쥐의 복강내에 이식하였을 때 Gunn rat에서 8주까지 혈청 bilirubin 수준이 감소함을 보고하였으며, Mooney 등은¹⁵ 친수성을 높이기 위해 PVA로 침윤된 다공성 PVA 스폰지를 이용하여 쥐의 장간막에 이식하였을 때 이식된 device 내로 섬유혈관성 조직의 침투가 일어나서 composite tissue를 형성함을 보고하였다. 또한, Wintermantel 등은¹⁶ 간실질세포를 함유한 지름 1 mm 정도인 구모양의 중공사

PLGA scaffolds를 콜라겐으로 코팅하여 쥐의 장간막에 이식했으며 시험동물의 생존율이 증가하고 이식된 구 주위에 모세혈관이 형성됨을 관찰하였다.

일반적으로 이식용 간세포계의 문제점은 혈관 공급의 결여와 이식 후 세포 미세환경의 통제 불능으로 인한 수송의 한계에 기인하며 그 해결책으로 이식용 scaffolds의 *in vitro* 혈관형성이 제시되고 있으나 아직 실제적인 연구는 미비한 실정이다. 또한 전달가능한 간실질세포의 수가 한정되어 있으며 세포들이 전달되는 해부학적 특이성을 갖는 위치 조절이 불가능하며 delivery systems의 생분해가 안되는 성분들로 인한 만성적인 염증 반응을 일으키는 등의 문제점이 나타나고 있다.

3.2.2 체외 간세포 Bioreactors

Hepatocyte-based support의 다른 접근은 기능성 간실질세포를 가지는 체외 bioreactors를 고안하는 것이며 제안된 간실질세포 bioreactor를 그림 1에 나타냈다. 이 bioartificial 장치는 환자와 혈장 성분을 교환하는 외부 회로를 통해 간기능을 보조한다. 현재까지 보고된 hollow-fiber bioreactors를 이용한 체외 생물학적 인공간 시스템을 살펴보면 초기에 Wolf와 Munkelt는¹⁷ 세포를 반투과성 모세관 중공사막의 외부 표면에서 증식시키고 숙주동물 혈액으로 여과시켰을 때 bilirubin uptake와 conjugation 효과를 관찰하였다. Dixit 등은^{13,14} 두 종류의 평행하게 배열된 중공사 다발을 이용하여 polysulfone으로 이루어진 것 중 한 다발에는 영양분을 순환시키고 다른 한 다발은 화학적으로 개질하여 간실질세포 부착에 저항성을 가지게 하여 섬유 망상조직을 형성한 다음 숙주 혈액을 여과하는 실험을 행하였으며 Moscioni 등은¹⁸ 냉동보관된 사람의 간실질세포를 사용하여 microcarrier에 부착된 세포를 중공사의 모세관의 공간에 배치하여 cyclosporine의 대사를 보고하였다. 또한, Shiraha 등은¹⁹ 다세포 구상체를 5% agarose의 micro-droplets에 encapsulation하여 중공사 module의 모세관의 공간에 배치하여 실험을 행한 결과 알부민 합성과 아미노산 제거의 효과를 관찰하였으며 Wu 등은²⁰ 3차원 콜라겐 기질에 돼지 간실질세포를 포착하여 중공사 관의 관강사이 공간에 배치하였을 때 알부민 합성, ureagenesis와 P450 cytochrome 활성을 보고하였다.

체외 bioreactors는 특히 수송 문제의 측면에서는 이식용 간세포계와 비교하여 세포 환경을 좀 더 조

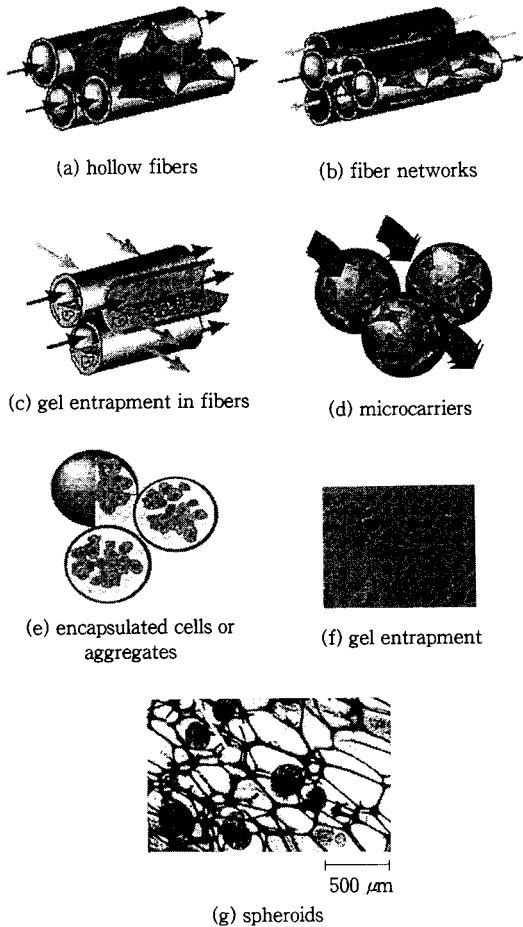


그림 1. Basic concepts for the use of hepatocytes bioreactors.

질할 수 있고 산소 전달과 고분자 교환 등 몇 가지 장점을 가지고 있으며 반면에 체내 이식체는 복막과 주위 환경의 특성에 의존해야 한다. 게다가 혈장분리반출법에 의해 외인성 간실질세포로부터 피이식자의 림프구를 분리해 낼 수 있기 때문에 면역 거부반응이 덜 문제가 된다. 그러나, 체외계는 혈관 접근이 필요하며 혈전색전증 등의 합병증이 일어날 가능성이 있다.

3.3 A Textile Composite Scaffold system

Composite scaffold는 간세포 공학을 위해 제안되었다. 이 scaffold는 생분해성 고분자 기질로 한 쪽면이 덮여는 균일한 세공(pore)을 가진 고분자 직물로 되어 있다. 얇은 다공성 필름은 제조과정에서 생분해속도, 다공성과 표면 화학성을 조절할 수 있기 때문에 조직공학을 위한 결정적 특성을 제공

하며 이들을 직물 등의 섬유 구조와 결합함으로써 *in vivo*와 bioreactor에서 대량으로 응용이 가능하다. 결합된 직물과 고분자 필름은 각각의 특이적 성질을 composite scaffold에 부여한다. 고분자 직물은 강직함(stiffness), 거시 다공성(macroscopic porosity), 거시적 표면 국부해부적 특성, 표면 단위, 중공사 직물을 통한 산소와 영양분 공급 등의 특성을 가진 반면 고분자 필름 기질은 미시 다공성(microscopic porosity), 투과성, 수용체-특이적 세포외기질(ECM) 코팅에 의한 세포 친화성 등의 특성을 가지고 있기 때문에 두 가지의 장점을 조합함으로써 향상된 기능의 scaffold를 만들 수 있을 것으로 기대된다.

4. 간기능에 영향을 주는 인자

인공간에서 간세포의 높은 기능을 유지하기 위해서는 배양 환경의 최적화를 피하고 배양매지에 호르몬이나 성장인자 등을 첨가하는 등의 여러 가지 방법이 사용되고 있는데 간세포의 기능에 영향을 주는 인자들을 살펴보면 다음과 같다.

4.1 간실질세포와 다른 세포와의 혼합배양

생체를 구성하는 장기와 조직은 단일한 세포로부터 구성되어 있는 것은 아니며 주요한 기능을 맡는 실질세포와 그 주위를 둘러싸며 다양한 영향을 끼치는 비실질세포로 구성되어 있다. 예를 들면, 생체내 대사의 중심장기이며 생체의 항상성 유지에 빠질 수 없는 간장에서는 총세포수의 약 70%는 간실질세포이며 나머지 30%는 비실질세포이다. 이들이 1mm³ 정도의 간소엽이라고 불리는 기본단위를 형성하며 구성되어 있다. 이 생체에 불가결한 간장의 기능과 그 제어기구를 연구하면서 간실질세포의 초기배양계는 오늘날 가장 중요한 모델을 제공해 왔다고 말할 수 있다. 그러나, 지금까지 알려져 있는 초대배양계의 간세포(단층배양간세포)는 극히 단기간내에 특이적 기능을 잃어서 충분한 연구모델로 될 수가 없다.

따라서 간실질세포의 배양환경의 향상(간기능유지)을 위해서 여러 관점에서 검토가 행해졌다. 하나는 배양매지에의 첨가성분(호르몬이나 성장인자 등)이고 또 하나는 배양담체에 관한 검토이다. 더욱이 생체간장과 비슷하게, 실질세포와 그를 둘러싸는 비실질세포에 의해서 배양환경의 최적화를 피하고자 하는 것이 간세포와 다른 세포종에 의한 혼합배양의

연구이다.

지금까지의 간실험세포와 다른 세포와의 혼합배양은 단층배양계가 많으며 또한 쥐 초대간세포를 이용한 연구예가 대부분이다. 실험세포와 혼합하는 세포종은 간실험세포, 간유래 상피세포, 혹은 그 외에 다른 세포이다. 혼합배양의 연구예를 표 1에 나타냈다.

최초로 효과를 거둔 간세포 혼합배양에 관한 연구는 Guguen-Guillouzo 등에²¹ 의해서 시도되었다.

이들은 생체간장의 환경에 근접한 것이 최적의 간세포 배양조건이라는 생각을 기초로 간실험세포와 간유래상피세포주와의 혼합배양을 시도하였고 그 결과, 간세포는 8주이상 생존하면서 그 기간동안 양호한 알부민분비능을 유지하였다. 또한 실험세포만으로 배양한 경우에는 배양 3일에 알부민분비능은 급격하게 저하되었지만 여기에 간유래상피세포를 첨가하면 다시 분비활성이 상승하는 것을 보여주었다.

표 1. 간실험세포를 이용한 혼합배양의 연구예

사용세포	배양방법	배양배지 (기초배지 + 첨가물)	실험세포에의 영향	참고문헌
간유래 상피세포주	플라스틱상에서 단층배양	Ham's F12 insulin(10 µg/mL) BSA(200 µg/mL) FCS(10%)	알부민 분비활성의 향상, 유지(배양40일간) 간유래이외의 상피세포에서는 효과가 없다.	Gugen-Guillouzo C. et al ²¹ (1983)
간실험세포	collagen(type I) 상에서 단층배양	William's medium E insulin(100 µg/mL) dexamethasone(10 ⁻⁶ M) FCS(5%)	알부민 분비활성의 향상, 유지(배양3주간) 간유래내피세포에도 효과 있다.	Morin O. et al ²² (1986)
간실험세포	collagen 상에서 단층배양	L-15 insulin(10 ⁻⁹ M) dexamethasone(10 ⁻⁹ M) proline(30 µg/mL) aprotinin(5 µg/mL) calf serum(5%)	DNA 합성 촉진 효과는 비실험세포에 특이적 feeder layer에도 효과있다.	Shimaoka S. et al ²³ (1987)
간유래 상피세포주	플라스틱상에서 단층배양	MEM+ medium199 insulin(0.11 U/mL) glutamine(2 mM) hydrocortisone-hemisuccinate(10 ⁻⁶ M)	약물대사활성의 향상, 유지 (배양10일간)	Niemann C. et al ²⁴ (1991)
원숭이신장 유래상피세포주	feeder layer	Ham's F12+L-15 insulin(10 ⁻⁸ M) BSA(0.2%) nicotinamide(10 mM) glucose(5 mM)	약물대사활성의 향상, 유지(배양1주간)	Donato, M. et al ²⁵ (1994)
돼지대동맥유래 내피세포	PVF다공질수지의 공극내 배양	William's medium E insulin(10 ⁻⁸ M) dexamethasone(10 ⁻⁸ M) aprotinin(5000 KU/L) FBS(10%)	알부민분비활성의 향상	Miyoshi, H. et al ²⁶ (1994)
간실험세포	collagen + collagen gel sandwich 배양	William's medium E insulin(10 ⁻⁸ M) dexamethasone(10 ⁻⁸ M) aprotinin(5000 KU/L) FCS(10%)	요소합성활성의 향상	Koike, M. et al ²⁷ (1996)

그 이유는 배양담체상에서 간실질세포와 상피세포가 가까이 접촉한 상태에 있기 때문으로 상피세포의 추출물 및 conditioned medium에서는 그 효과가 보여지지 않는다. 또한, 간유래가 아닌 상피세포와의 혼합배양에서는 이러한 효과가 보여지지 않는 것으로부터 세포와 세포간의 협조가 조직특이적인 것으로 생각된다.

한편, 실제 간소엽을 구성하고 있는 간실질세포와 비실질세포와의 혼합배양 연구도 시작되었다. Morin 등은²² 간실질세포와 비실질세포(類洞내피세포)와의 혼합배양에 의해 장기(3주간 이상)에 걸쳐 알부민분비능 유지를 보고하였다. 또한 앞의 Guguen-Guillouzo 등의 연구와 마찬가지로 저하된 실질세포의 알부민분비활성이 類洞내피세포를 첨가할 경우 일시적이지만 회복되는 것을 보고하였다. 이들은 간유래 내피세포주에서도 어느 정도 효과를 볼 수 있는 것으로부터 엄밀한 조직특이성은 없고 실질세포의 기능발현을 안정화시키는 효과가 내피유래세포에 있는 것으로 생각되고 있다.

또한, Shimaoka 등은²³ 실질세포와 비실질세포의 혼합배양을 행하면 증식인자를 전혀 포함하지 않은 배지 중에서도 많은 실질세포가 DNA 합성을 개시하는 것을 발견하였다. 이와같은 혼합배양에 의한 증식촉진 효과는 비실질세포의 conditioned medium에서는 일어나지 않았고 사멸된 비실질세포를 세포지지층으로 한 배양에서도 일어나지 않는 것으로 보아 어떤 세포간기질의 물질에 의한 효과라고 생각된다. 또한 3T3 세포주 등과의 혼합배양에서는 간실질세포의 증식촉진 효과를 볼 수 없는 것으로서 이 효과는 비실질세포에서 특이적으로 작용한다는 것을 알 수 있다. 이 증식촉진 효과는 다른 연구자들에 의하여서도 보고되었으며^{28,29} 또한, 비실질세포의 실질세포 기능발현에의 영향으로서 지질대사 활성의 유지가 보고되었다.³⁰ 한편, Goulet 등은³¹ 3T3 세포와 그 밖의 상피세포, 비실질세포, 간소엽세포를 이용한 혼합배양에 의해서도 간실질세포의 알부민분비능이 유지됨이 보고되었으며 Kuri-Harcuch 등은³² 3T3 세포를 세포지지층으로 하였을 때 간실질세포의 DNA 합성과 간특이적 기능의 발현이 일어남을 보고하고 있고 간유래 상피세포주에 의한 DNA 합성 촉진도 돼지 간세포에 있어서 연구되고 있다.

잘 알려져있는 간특이적 기능인 해독활성(cytocrome P-450 활성)에 관해서도 혼합배양의 연구가 행해져왔다. Niemann 등은²⁴ 간유래 상피세

포주와 혼합배양을 행하는 것에 의해 실질세포에 의한 수종의 약물대사 활성이 10일 정도 유지될 수 있다는 것을 보여주었다. 또한, Donato 등은²⁵ 원숭이 신장유래 상피세포주를 세포지지층으로 한 경우에 실질세포에서 수종의 P-450 활성이 10일 정도 유지되고 또한 유도체에 의한 활성의 유도효과가 향상되는 것을 보고하였으며 그 밖에 3T3 세포와 혼합배양에 의하여 실질세포의 약물대사 활성 유지도 보고되고 있다.^{33,34}

4.2 삼차원 배양

삼차원 배양이란 적당한 지지체를 이용하여 생체 유사한 조직구조를 취하는 것으로 지지체에는 천연물과 합성물이 있다. 천연물의 경우도 생체에서 분리한 조직을 처리하여 그대로 사용하거나, 세포의 생산물 자체를 이동하거나, 천연분자를 그대로 이용하는 것 등으로 나눌 수 있다. 구체적인 지지체의 예를 들면 Miyoshi 등은²⁶ polyvinyl formal(PVF) 수지다공질 담체를 배양담체로 하여 간실질세포 및 돼지 대동맥유래 내피세포와의 혼합배양에 있어서는 명확한 효과를 볼 수 없었지만 알부민분비능에 관해서는 내피세포와의 혼합배양에 의해서 그 기능 유지의 효과가 어느 정도 있는 것으로 결론짓고 있다. 또한 polyurethane foam(PUF) 다공내에서 초대간세포는 직경 100 μm 정도의 spheroid(구상체)를 자발적으로 형성하였고 PUF/구상체 배양 간세포는 알부민합성능과 암모니아 해독능, 약물해독능에서도 높은 활성을 장기간 유지하는 것이 보고되었으며,^{35,36} 더욱이 혼합배양에 대해서도 양호한 구상체가 형성되면 간실질세포의 기능이 향상되는 것이 발견되었다. Koike 등은²⁷ 콜라겐 겔 상에서 단층배양된 간세포위에 다시 콜라겐 겔로 피복한 sandwich 배양법에 있어서도 실질세포와 비실질세포와의 혼합배양을 행하였다. 혼합배양에 의한 알부민분비능 활성의 향상유지 뿐만 아니라 요소 합성능도 실질세포 단독보다 높은 활성을 유지하는 것을 보여주었다.

알긴산 겔은 조류(algae)나 bacteria에 따라 다양한 비율로 β -D-mannuronic acid와 α -L-glucuronic acid 잔기가 연결된 선형 다당류이다. 낮은 농도에서도 높은 점도를 가지며 쉽게 겔을 형성하기 때문에 chondrocytes 등의 특정세포를 삼차원 배양하는데 널리 사용되어 왔다. 알긴산의 겔 형성능은 carboxylate group과 complex를 형성할 수 있는 Ca^{2+} 등의 2가 양이온을 첨가함으로써 크게 증가된다.³⁷

Calcium alginate내에 포착된 간신택세포는 다른 포착겔내의 세포보다 높은 ammonia 제거와 urea 합성 활성을 가지며 간성혼수(hepatic coma)를 일으키는 indole, phenol과 short-chain fatty acid 등의 물질들을 해독하는 기능을 가진다.³⁸ 또한 포착된 세포는 dexamethasone과 dibutyryl cyclic AMP의 존재시에 tyrosine aminotransferase (TAT)를 유도하며 이 유도능은 7일 동안 지속된다. 게다가 포착된 세포는 응고인자 II prothrombin, cholesterol acyltransferase와 cholinesterase를 합성, 분비할 수 있다.³⁹

가장 광범위하게 사용되는 콜라겐은 type I 이 많이 사용되고 있지만 type III를 혼합하는 경우도 있고 기저막 성분인 type IV도 사용된다. 겔 중에 단순히 세포를 주입하여 배양해도 불완전하지만 어떤 조직구조가 생겨 선회배양과 비슷하게 단층배양으로 볼 수 없는 분화 기능이 발현된다. 겔의 표면에 상피세포를 파종하면 polarity를 가지는 상피조직이 형성된다. 콜라겐 겔 중에 선유아세포를 주입하여 상피-간질간 상호작용을 모방하는 것도 가능하다. 다른 지지체로서는 matrigel이 있는데 matrigel은 종양세포주를 생산하는 기저막 성분으로 겔 상태로 박층막 성분으로 사용가능하다. 다양한 상피세포의 배양에 이용되어 일반적으로 플라스틱 면상의 배양과 비교하여 증식에는 억제적으로 작용하며 생체내에서 갖는 본래의 기능을 발현시키는 방향으로 작용한다. Agarose는 세포증식의 기반의존성을 검정하는 목적으로 사용되지만 그 중에서 증식가능한 세포가 있다면 선회배양과 유사하게 세포간 상호작용에 의해 일종의 입체구조를 얻을 수 있다. 그 밖에 fibronectin과 laminin은 콜라겐과 같이 단층배양시에 배양면의 코팅에 주로 이용되어 세포 접착을 촉진함과 동시에 증식과 분화에도 영향을 끼친다.

4.3 Cytokine의 첨가

Cytokine은 생체 여러 조직의 세포로부터 유래하고 면역응답의 발현이나 조절 등 세포간 상호작용에 관여하는 생물활성인자를 의미한다. 간신택세포 이식은 충분한 수의 이식된 간세포가 장기간에 걸쳐 생존하는 경우에는 다양한 간질환 치료를 위한 새로운 접근을 제공할 수도 있다. 간은 부분절제 후에도 반복적으로 재생할 수 있기 때문에 올바른 환경이 이식된 세포에 제공된다면 간세포의 증식과 장기간의 생존이 가능해진다. 그러므로, 세포를 이식하기 위하여 어떤 방법이 사용되더라도 간세포의 en-

graftment를 유도할 수 있는 환경을 제공하는 것이 중요하다. 간신택세포 성장을 유도하는 다양한 인자들이 확인되었으며 표피성장인자(epidermal growth factor), 알파섬유아세포성장인자(alpha-fibroblastic growth factor), 간신택세포성장인자(hepatocyte growth factor), 변형성장인자-알파(transforming growth factor-alpha) 등이 여기에 포함되는데 이들 분열촉진인자의 효과는 인슐린과 글루카곤 등의 인자로 조절가능하다.⁴⁰ Mooney 등은⁴¹ lactic acid와 glycolic acid의 공중합체로 만든 microsphere에 표피성장인자를 투입하여 *in vitro*에서 한달 동안 지속적으로 표피성장인자를 방출되었을 때 이식된 간신택세포의 생존율이 향상됨을 보고하였다.

4.4 선회배양

선회배양은 세포부유액을 일정평면위에서 선회배양하는 것에 의해 중심부에서 접촉하는 세포가 자율적으로 조직유사 구조를 이루게 하는 배양법이다. 서로 다른 종류의 세포를 혼합하여 배양하면 접촉인자를 중심으로 하여 상호간의 차이에 의해 서로 분리하여 집합한다. 형성된 세포집합체의 크기는 세포의 종류와 배양조건에 따라 좌우되지만, 확산에 의해 영양분과 노폐물이 배출되기 때문에 지나치게 커지면 중심부가 폐사하게 된다. 현재 여러 가지 세포에 적용되고 있는데, 예를 들면 간신택세포에서는 단층배양으로 상실되는 간장특이적 기능이 선회배양에 의해 조직유사구조를 가지게 되면 부분적으로 회복된다.

쥐 간신택세포의 다세포 구상체는 장기간에 걸쳐 알부민분비능을 유지하는 것으로 알려져 있으며,^{42,43} Yagi 등은⁴⁴ 쥐 신택세포의 단층배양과 선회배양을 행하여 구상체 형성을 실험하였을 때 단층배양보다 선회배양에서 구상체 형성 시간이 급격히 줄어들어 24시간 이내에 거의 100 μm 크기의 구상체가 형성되었으며 장기간 안정하게 높은 tyrosine aminotransferase 유도와 알부민분비능을 가짐을 보고하였다.

4.5 다공질체의 다공성

장기유래의 동물세포는 벽부착성이고 배양담체에 부착하지 않으면 증식이나 기능발현이 어렵다. 종래의 단층배양으로는 생체장기에 필적할 높은 세포밀도나 이들 세포의 분화한 기능발현이 어렵기 때문에 다공성 물질을 배양담체로서 사용하여 세포의 기능을 높이고 있다. 다공질 물질은 체적당 표면적이 아

표 2. 시판되는 다공질담체의 종류 및 특성

Type	Material	Diameter (μm)	Pore Size (μm)	Excluded Volume(%)
Cultispher	Gelatin	170~270	10~20	50.5
Informatrix	Collagen	300~500	10~20	50.5
Informatrix	Hyaluronic acid	500	40	99.5
Microsphere	Collagen	500~600	20~40	75.0
Siran	Glass	300~5000	10~400	60.0
Cell snow	Cellulose	500~3000	-	97.0
CytoCELL	Cellulose	180~210	30	95.0

주 높고, 세포의 고밀도배양이 가능할 뿐만 아니라 가는 구멍내에 고정되어 있는 세포는 담체의 세공구조에 의하여 부분적으로 막힌 공간이 되어 세포 주위의 미소환경의 최적화가 행하여질 가능성이 있다. 또한 배지교환에 있어서 세포와 배지를 분리할 수 있는 장점과 관류배양이 쉽다는 것이다. 시판되고 있는 다공질담체의 종류 및 특성에 대하여 살펴보면 표 2와 같다.

4.6 세포밀도

다공질담체를 사용할 때에 가급적 높은 세포밀도로 세포배양을 하여야 세포의 충분한 기능을 발휘할 수 있지만 세포의 생존율, 다공질담체의 종류 및 크기, 세포의 종류에 따라서 최고로 도달할 수 있는 세포밀도가 있을 수 있는데 표 3에 여러 종류의 다공질담체를 사용한 경우 최고도달 세포밀도 값을 비교하였다.

4.7 간세포 다층집합체 형성

간장은 복잡다단한 생화학반응에 의하여 여러 가지의 단백질과 지질 등의 생체물질 합성기능을 시작으로 배출기능, 해독기능, 순환조절기능 등 수천 종류의 생화학반응을 수행하는 생체내의 최대 대사장 기이기 때문에 간세포가 가지고 있는 특이적 기능을 질 및 양으로 생체내에 가까운 정도 수준까지 유지

하기 위하여 여러 가지 하이브리드형 인공간장 개발을 시도하고 있다.

최근에 간세포의 특징적 형태학적 구조를 가진 삼차원 고밀도의 다층집합체인 구상체가 큰 관심을 끌고 있다. 간실질세포 구상체는 단층배양에 비하여 장기간 동안 강화된 간기능 활성을 보이는 것으로 보고되고 있으며,⁴⁵ 열반용성 고분자,⁴⁶ 양이온성 polystyrene 이나,⁴⁷ glycosaminoglycans 과 proteoglycans에 의한 표면의 화학적 개질 등 다양한 부착 기질을 사용하여 간실질세포 구상체를 형성하는 간세포를 형성시키는 방법들이 개발되었다. 이들 부착 기질에서 분산된 세포는 초기에 부착, 넓게 퍼진 후 multicellular islands로 덩어리를 이루고 부유 구상체를 형성하기 때문에 초기 세포 부착에서 큰 표면적이 필요하게 된다. Akaike 등은⁴⁸ lactose를 측쇄에 갖는 폴리스티렌 유도체인 PVL(A(poly-*N*-vinylbenzyl-*D*-lactonamide)를 개발하여 그것이 간세포특이적 기능발현성이 있는 것을 보고하였고 여기에 인슐린이나 표피성장인자 등을 첨가하면 간세포 다층집합체를 형성하여 간세포 특이적 기능 발현성이 높아지고 간세포의 장기생존성이 높아지는 것을 보고하였다. 또한 지금까지 플라스틱 배양판과 콜라겐으로 코팅한 배양판에서 배양한 간세포는 생체에 있어서의 형태와는 다른 평편한 매우 신장된 형태를 나타내어 초기에 간세포 특이성이 저하되는 반면 기저막과 유사한 성분으로 구성되어 있는 EHS(Engelbreth Holm-Swarm) 겔 위에서 간세포를 배양한 경우에는 구형의 형태가 유지되며 다층 집합체를 형성하여 그 결과 단층배양에 비하여 증식능은 저하되지만 알부민분비능 등의 간세포 특이적 기능이 발현, 유지가 양호하게 보존됨을 보고하였으며,⁴⁹ 이는 세포 부착 기질이 세포와 세포간의 접촉과 세포의 형태학적 구조에 영향을 주고 이러한 구

표 3. 다양한 다공질담체의 최고도달 세포밀도 값

Substratum	Cell Line	Cell Density
Collagen	r-CHO	$1.6 \sim 5 \times 10^8$ cells/mL-microsphere
Collagen	CHO	3×10^8 cells/mL-microsphere
Polyvinyl formal(PVF)	MPC-11	1×10^7 cells/mL-PVF
Cellulose	16-3F	5×10^7 cells/mL-substratum
Cellulose	# -3	2.2×10^7 cells/mL-substratum
Glass(Siran)	CHO	4×10^7 cells/mL-substratum
Polyurethane foam(PUF)	Vero	1.1×10^8 cells/mL-PUF
Polyurethane foam(PUF)	CHO-K1	4.2×10^8 cells/mL-PUF
Polyurethane foam(PUF)	293	3.0×10^8 cells/mL-PUF

조의 변화에 의해서 높은 간기능이 유도되는 것으로 생각된다.⁵⁰⁻⁵² 또한 Yamada 등은⁵³ 0.1% Eudragit (methacrylic acid와 methylmethacrylate의 공중합체)를 culture medium에 첨가하였을 때 세포독성 없이 세포 응집이 촉진되고 유도된 구상체는 알부민분비, ammonia제거, urea 합성 등 높은 간기능을 나타냄을 보고하였다.

5. 결 론

금후 21세기에 우리나라에서도 고령사회에 자주 발생하는 질병에 대응하기 위하여 필수적인 하이브리드형 인공장기(또는 바이오 인공장기)의 기반을 형성하는 기술을 개발이 절실히 요구되고 있다. 특히 간장은 생체내에 있어서 대사의 중심장기로서 여러 가지 해독작용은 물론 생체의 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 장기이다. 간부전환자를 위한 하이브리드형 인공간장에 의하여 구멍률 향상에 기대를 걸고 있으나 아직도 수일 정도의 간기능보조로서 기능만 유지시킬 수 있는 인공간장장치에 대한 개발이 이루어지고 있다. 이러한 기능을 할 수 있는 인공간장의 개발을 위해서는 치밀한 간세포의 고밀도 배양장치 개발 연구, 현재 사람의 간세포 대량 입수나 장기 배양이 거의 불가능하기 때문에 초대돼지간세포를 가지고 전임상시험을 행하는 연구, 돼지간세포를 사용할 경우의 면역억제에 관한 연구 또는 임상용 하이브리드형 인공간장보조용 시스템에 관한 연구가 우선적으로 진행되어야 한다

참 고 문 헌

1. L. Cima, J. Vacanti, C. Vacanti, D. Ingber, D. Mooney, and R. Langer, *J. Biomech. Eng.*, **113**, 143 (1991).
2. M. Cooper, J. Hansbrough, R. Spielvogel, R. Cohen, R. Bartel, and G. Naughton, *Biomaterials*, **12**, 243 (1991).
3. D. Mooney, D. Organ, J. Vacanti, and R. Langer, *Cell Transplant.*, **3**, 203 (1994).
4. A. Kamlot, J. Rozga, F. Watanabe, and A. Demetriou, *Biotechnology and Bioengineering*, **50**, 382 (1996).
5. B. Fuller, *J. Hepatol.*, **7**, 368 (1988).
6. P. Rivas, A. Fabrega, D. Schwartz, W. Digiantis, and R. Pollak, *Transplant. Proc.*, **24**, 1833 (1992).
7. P. Sandbichler, P. Then, W. Vogel, R. Erhart, O. Dietze, H. Philadelphly, L. Fridrich, G. Kilima, and R. Margreiter, *Gastroenterology*, **2**, 121 (1992).
8. W. Lee, *N. Engl. J. Med.*, **329**, 1862 (1993).
9. M. Yarmush, J. Dunn, and R. Tompkins, *Cell Trans.*, **1**, 323 (1992).
10. P. Malchesky, *Artificial Organs*, **18**, 342 (1994).
11. S. Kasai, M. Sawa, and M. Mito, *Artificial Organs*, **18**, 348 (1994).
12. A. Cai, Z. Shi, M. Sherman, and A. Sun, *Hepatology*, **10**, 855 (1989).
13. V. Dixit, *Artificial Organs*, **18**, 371 (1994).
14. V. Dixit, E. Pishkin, M. Arthur, A. Denizli, S. Tuncel, E. Denkbaz, and G. Gitnick, *Cell Transplantation*, **1**, 391 (1992).
15. D. Mooney, S. Park, P. Kaufmann, K. Sano, K. McNamara, D. Hern, J. Vacanti, and R. Langer, *J. Biomed. Mat. Res.*, **29**, 959 (1995).
16. E. Wintermantel, L. Cima, B. Schloo, and R. Langer, *Transactions of the Society for Artificial Internal Organs*, July/September, 1991.
17. C. Wolf and B. Munkelt, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, **21**, 16 (1975).
18. A. Moscioni, G. Backfisch, T. Bellew, D. Black, and A. Demetriou, *Surgery Forum*, **41**, 3 (1990).
19. H. Shiraha, N. Koide, H. Hada, K. Ujike, M. Nakamura, T. Shinji, S. Gotoh, and T. Tsuji, *Biotechnology and Bioengineering*, **50**, 416 (1996).
20. F. Wu, M. Peshwa, F. Cerra, and W. Hu, *Tissue Engineering*, **1**, 29 (1995).
21. C. Guguen-Guillouzo, B. Clement, G. Baffet, C. Beaumont, E. Morel-Chany, D. Glaise, and A. Guillouzo, *Exp. Cell Res.*, **143**, 47 (1983).
22. O. Morin and C. Normand, *J. Cell Physiol.*, **143**, 103 (1986).
23. S. Shimaoka, T. Nakamura, and A. Ichihara, *Exp. Cell Res.*, **172**, 228 (1987).
24. C. Niemann, J. Gauthier, L. Richert, M. Ivanov, C. Melcion, and A. Cordier, *Biochem. Pharmacol.*, **42**, 373 (1991).
25. M. Donato, J. Gastell, and M. Gomez-Lechon, *In Vitro Cell Dev. Biol.*, **30A**, 825 (1994).
26. H. Miyoshi, K. Yagi, and N. Oshima, *Jpn. J. Artif. Organs*, **23**, 479 (1994).
27. M. Koike, T. Matsushita, K. Taguchi, and J. Uchino, *Artificial Organs*, **20**, 186 (1996).
28. A. Mabuchi, E. Watari, M. Ikeda, Y. Watanabe, and K. Yokomuro, *Journal of Nippon Medical School*, **61**, 120 (1994).
29. N. Yamamoto, K. Imazato, and A. Masumoto, *Cell Struct. Funct.*, **14**, 217 (1989).
30. D. Pepid, J. Cahmbaz, M. Rissel, A. Guillouzo, and G. Berezziat, *Lipids*, **23**, 784 (1988).
31. G. Goulet, C. Normand, and O. Morin, *Hepatology*, **8**, 1010 (1988).
32. W. Kuri-Harcuch and T. Mendoza-Figueroa,

- Differentiation*, **41**, 148 (1989).
33. M. Donato, M. Gomez-Lechon, and J. Castell, *In Vitro Cell Dev. Biol.*, **26**, 1057 (1990).
 34. M. Jurima-Romet M. Casely, J. Neu, and H. Huang, *Cell Biol. Toxicol.*, **11**, 313 (1955).
 35. T. Matsushita, H. Ijima, N. Koide, and K. Funatsu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 324 (1991).
 36. K. Nakazawa, T. Natsushita, and K. Funatsu, *Cytotechnology*, **24**, 235 (1997).
 37. S. Oerther, H. Gall, E. Payan, F. Lapique, N. Presle, P. Hubert, J. Dexheimer, P. Netter, and F. Lapique, *Biotechnology and Bioengineering*, **63**, 206 (1999).
 38. T. Akimoto, Y. Ikeda, R. Izumi, H. Kanazawa, M. Okazaki, and Y. Miura, *Jpn. J. Artif. Organs*, **14**, 249 (1985).
 39. Y. Miura, T. Akimoto, H. Kanazawa, and K. Yagi, *Artificial Organs*, **10**, 460 (1986).
 40. N. Fausto, *Prog. Growth Factor Res.*, **3**, 219 (1991).
 41. D. Mooney, P. Kaufmann, K. Sano, S. Schwendeman, K. Majahod, B. Schloo, J. Vacanti, and R. Langer, *Biotechnology and Bioengineering*, **50**, 422 (1996).
 42. N. Koide, T. Shinji, T. Tanabe, K. Asano, M. Kawaguchi, K. Sakaguchi, Y. Koide, M. Mori, and T. Tsuji, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **161**, 385 (1989).
 43. J. Tong, O. Bernard, and F. Alvarez, *Exp. Cell Res.*, **186**, 227 (1990).
 44. K. Yagi, K. Tsuda, M. Serada, C. Yamada, A. Kondoh, and Y. Miura, *Artificial Organs*, **17**, 929 (1993).
 45. J. Landry, D. Bernier, C. Ouellet, R. Goyette, and N. Marceau, *J. Cell Biol.*, **101**, 914 (1985).
 46. K. Ueno, A. Miyashita, K. Endoh, T. Takezawa, M. Yamazaki, Y. Mori, and T. Satoh, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **77**, 107 (1992).
 47. N. Koide, K. Sakaguchi, Y. Koide, K. Asano, M. Kawaguchi, H. Matsushima, T. Takenami, U. Shinji, M. Mori, and T. Tsuji, *Exp. Cell Res.*, **186**, 227 (1990).
 48. S. Tobe, Y. Takei, K. Kobayashi, and T. Akaike, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**, 57 (1992).
 49. E. Scheuetz, D. Li, C. Ormiecinski, U. Muller-Eberhard, H. Kleinman, B. Elswick, and P. Guzelian, *J. Cell Physiol.*, **134**, 309 (1988).
 50. L. Hansen, D. Mooney, J. Vacanti, and D. Ingber, *Mol. Biol. Cell*, **5**, 967 (1994).
 51. A. Ben-Ze'ev, G. Robinson, N. Bucher, and S. Farmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 2161 (1988).
 52. J. Dunn, G. Tompkins, and M. Yarmush, *Biotechnol. Prog.*, **7**, 237 (1991).
 53. K. Yamada, M. Kamihira, R. Hamamoto, and S. Ijima, *J. Biochem.*, **123**, 1017 (1998).