한국생물공학회지 제16권 제1호
*Korean J. Biotechnol. Bioeng.*
Vol. 16, No. 1, 24-29(2001)

# 다공성 폴리우레탄 충진형 생인공간의 체외 성능 평가

이 두 훈 · [1]이 지 현 · [1]김 성 구 · †박 정 극
동국대학교 공과대학 화학공학과, [1]부경대학교 수산과학대학 생물공학과
(접수 : 2000. 9. 29., 게재승인 : 2001. 2. 2.)

# *In Vitro* Performance Assessment of a Bioartificial Liver Packed with Polyurethane Foam

Doo-Hoon Lee, [1]Ji-Hyun Lee, [1]Sung-Koo Kim, and Jung Keug Park†
Department of Chemical Engineering, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea
[1]Division of Food and Biotechnology, Pukyung National University, Pusan 608-737, Korea
(Received : 2000. 9. 29., Accepted : 2001. 2. 2.)

Recently hepatocyte-based bioartificial liver (BAL) and hepatocyte transplantation have been actively investigated to treat acute hepatic failure. The BAL acts as a bridge to provide patients with more time until a donor organ becomes available for transplantation or until their own liver can be regenerated. In this study, we manufactured a polyurethane foam (PUF) using 15% NCO-prepolymer with a pore opening that allows it to be used as a hepatocyte immobilizing material. Cubes of PUF (3 mm dim.) were seeded with rat primary hepatocytes at a density of $5.5 \pm 1.1 \times 10^6$cells/$cm^3$PUF by centrifuging them together. The cell laden PUF cubes were packed into a prototype reactor and perfused with a hormonally defined medium for a week. Hepatocytes in the pores of the PUF formed spheroids that showed stable ammonia removal and urea synthesis activities. The albumin production level was comparable to other BAL systems. The PUF packed hepatocyte bioreactor has the potential to be used as a BAL.

**Key Words** : bioartificial liver, hepatocyte spheroid, polyurethane foam(PUF)

## 서 론

인간의 생체조직 및 기관 중 간은 혈장 단백질 합성대사, 당대사, 지질대사, 해독작용과 담즙산염이나 담즙색소를 합성하여 분비하는 등의 생존에 필요한 5백가지가 넘는 여러가지의 복합적인 기능을 가지고 있는 다목적 장기이며 심장이나 신장과 달리 펌프나 투석막이 있는 단순 대용품으로 대체할 수 없다(1,2). 최근 장기 이식 기술의 발전으로 간이식 치료를 받은 환가가 높은 생존율을 기록하고 있지만 최근 UNOS (United network for organ sharing) Scientific Registry 자료에 의하면 미국의 경우 약 10%의 환자만이 기증된 간을 이식받고 있는 실정으로 해마다 간이식 대기자의 수는 급격히 증가하고있는 추세이다. 또한, 최근의 의학 발달에도 불구하고 전격성 간손상(fulminant hepatic failure, FHF) 환자의 경우 치사율이 90%에 이르고 있으나 적당한 치료를 받으면 환자의 간이 재생되어 간이식을 받을 필요가 없어진다(3). 이와 같이 간이식 대기 기간 동안이나 간의 재생 기간 동안 간기능을 체외에서 보조하는 장치의 필요성이 높아졌으며 생물학적인 기능까지 수행하기 위하여 간세포(hepatocyte)를 이용하여 간 보조장치를 개발하고 있으며 이를 기존의 인공간과 구별하여 "생인공간(Bioartificial Liver)"이라 명명하고 있다(4-6).

이러한 생인공간의 개발을 위해서는 간세포를 간의 특이 기능 활성이 우수한 상태로 장기간 배양하는 기술이 필수적으로 선행되어야 한다. 일반적인 배양조건에서 간세포는 매우 짧은 시간 안에 간기능을 상실하며 빠른 속도로 괴사한다. 그러나, 일차 간세포가 3차원 구조를 가지는 구형의 꽉 짜여진 집합체(구상체, spheroid)를 재구성할 수 있다는 것이 알려졌으며(7,8), 구상체로 존재하는 간세포 사이에는 tight junction이 관찰되고 광범위한 세포 접촉과 담즙 세관과 비슷한 구조가 나타나는 등의 체내 간소엽 조직과 유사한 구조를 보이는 등 형태학적인 면, 생존력, 간 특이 기능의 활성 측면에서 간세포를 단층으로 배양하는 것 보다 우수하다는 것이 알려졌으며(7,8) 본 연구실에서도 이를 확인하였다(9). 생인공간에 사용하기 위한 대량의 간세포 구상체를 얻기 위하여 부유배양이나 polyurethane foam (PUF)을 사용하기도 하였다(9-11).

본 연구실의 앞선 연구에서는 15% NCO-preploymer를 이

†Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea
Tel. : +82-2-2260-3365, Fax : +82-2-2271-3489
E-mail : jkpark@dongguk.edu

용하여 간세포 구상체 형성에 적합한 PUF를 직접 제조하였으며 여기에 간세포 구상체를 정치 배양 조건에서 형성시키고 간기능 활성을 관찰하였다(12). 그러나, 이를 생인공간으로 응용하기 위해서는 적합한 생물반응기를 제조하여야 한다. 본 연구에서는 앞서 제조된 PUF를 충진한 형태의 생물반응기를 제조하였으며 원심분리 방법을 이용하여 간세포를 고농도로 접종하고 이를 관류 반응기 형태로 운전하여 간기능 활성을 측정함으로서 생인공간으로서의 성능을 평가하였다.

## 재료 및 방법

### Polyurethane foam (PUF)

간세포 구상체 형성을 위한 PUF는 NCO-preploymer 방법으로 제조하였으며 앞서 발표한 논문에 자세한 방법을 서술하였다(12). 간단히 설명하면 다음과 같다. 먼저 polypropylene glycol(PPG, 분자량 3,000, (주)동성화학) 1 mol 당 crude MDI (diphenylmethane-4-4'-diisocyanate) 9.13 mol을 반응시켜 15%의 NCO- 잔기를 갖는 preploymer를 제조하였다. 여기에 촉매와 계면활성제를 넣고 발포제로 물 7.5%를 첨가하여 5000 rpm으로 10초간 교반하여 폼을 제조하였다. 제조된 PUF는 직경 3-4 mm 크기의 정육면체 형태로 절단하여 에탄올에 하루동안 방치한 다음 3차 증류수로 세 번 세척한다. 두 번의 PBS (phosphate buffered saline) 세척 후 가압 멸균하였다. 이 과정에서 PUF 내부의 기포는 거의 제거된다. 배양 배지로 다시 한번 세척한 후에 간세포를 접종하였다.

### 쥐 간세포의 일차배양

간 세포의 분리는 Seglen-method(13)에 기초를 두고 변형된 방법을 실행하는데, 이는 *in situ* 상태에서 collagenase로 간의 기질을 분해하여 간세포를 얻는 기술로서 앞서 발표한 논문에 자세히 기술하였으며(9), 보통 200 g 체중의 쥐로부터 약 2-3 × $10^8$개 정도의 간세포를 회수할 수 있으며 trypan blue dye exclusion 방법에 의한 측정 결과 viability는 85% 이상이었다.

간세포 배양에 사용한 배지는 무혈청 배지로서 기본 배지로는 Williams' Medium E(Gibco BRL)을 사용하였으며 여기에 epidermal growth factor(20 μg/L, Gibco BRL), Insulin (10 mg/L, Gibco BRL), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$(0.1 μM, Sigma Chem. Co), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$(50 pM, Sigma Chem. Co.), $H_2SeO_3$ (3 μg/L, Sigma Chem. Co.), Linoleic acid(50 mg/L, Sigma Chem. Co.), $NaHCO_3$(1.05 g/L, Gibco BRL), HEPES (1.19 g/L, Sigma Chem. Co), Penicillin(100 Unit/mL, Gibco BRL), Streptomycin(10 mg/mL, Gibco BRL), Amphotericin B(25 μg/mL, Gibco BRL)를 첨가하여 실험에 사용하였다.

### 폴리우레탄 생인공간 시스템

총 부피 4 $cm^3$ 직경 3-4 mm 크기의 정육면체형 PUF에 간세포를 고농도로 접종하기 위하여 원심분리 방법을 사용하였다. 폴리우레탄 폼 조각들과 간세포를 spinner flask에서 같이 교반하여 자발적인 접종을 시도하였으나 $1 \times 10^6$ cells/$cm^3$ PUF 이상으로는 접종되지 않아 인위적으로 고농도로 접종하기 위하여 원심분리를 사용하였다. 배지 mL당 $5 \times 10^6$개의 간세포가 포함된 용액 10 mL를 PUF 조각이 들어있는 50 mL 용량 원심분리 튜브에 골고루 넣어준 후 4℃에서 500 rpm으로 2분간 원심분리 하였다. 접종되지 않고 가라앉은 간세포를 부유시킨 후 다시 동일한 조건으로 원심분리 하였다. 총 3회의 실험에서 약 60~70%의 접종 효율을 보였으며 PUF $cm^3$당 $5.5 \pm 1.1 \times 10^6$ 개의 세포가 접종되었다. 이는 spinner flask에서 교반하였을 때 보다 5배 정도 높은 접종농도이다.

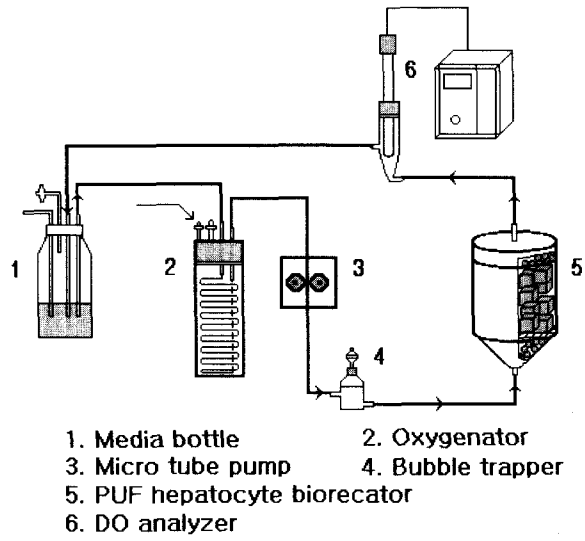


**Figure 1.** Schematic diagram of PUF bioartificial liver support system for *in vitro* performance test.

간세포가 접종된 PUF는 직경 1.5 cm 높이 5 cm의 플라스틱 반응기에 충진하여 아래에서 위쪽으로 배지를 관류시켰다. 전체 시스템을 Figure 1에 나타내었다. 유량은 7.0 mL/min으로 고정하였고 배지는 기체 교환 장치를 통과하는 동안 산소를 공급받으며 기포는 반응기로 들어가기 직전 제거된다. 반응기내에서 산소 고갈이 일어나는 지를 관찰하기 위하여 반응기 바로 뒤에 용존 산소 측정기 (Ingold, type 170, U.S.A.)를 연결하였다. 배지는 매일 교체하였으며 $5 \times 10^5$개의 초기 접종 세포 당 1 mL의 배지를 사용하여 총 접종되는 간세포의 양이 바뀌어도 알부민 분비량과 같은 간기능 활성을 비교할 수 있도록 하였다. 버려지는 배지는 매일 sampling 하여 분석전 까지 냉동실에 보관하였다. 배양 3일째 부터는 배지에 1 mM의 $NH_4Cl$을 첨가하여 암모니아 제거능을 확인할 수 있도록 하였다.

### 알부민 농도 측정

간의 특이 기능 중의 하나로서 중요한 대사기능의 하나인 알부민 분비능을 측정하여 간세포의 활성도를 예측하였다. 알부민 농도는 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 방법을 사용하였으며 앞서 발표한 논문에 자세히 기술하였다(9). 흡광도는 microplate (MicroReader 4 Plus, Hyperion Inc., U.S.A.)로 490 nm 파장에서 측정하였다.

### 암모니아 및 요소 농도 측정

간세포 구상체의 해독 능력을 알아보기 위하여 간의 주요

대사기능의 하나인 암모니아 분해능과 이에 따른 요소 분비량을 조사하였다. 배양 시작 48시간 경과 후 부터는 배지에 1mM $NH_4Cl$을 첨가하여 시간에 따른 암모니아 분해속도를 측정하였다. 암모니아는 assay kit(indophenol method, 아산제약)를 사용하여 측정하였는데 그 방법은 다음과 같다. 정색저해 성분을 제거하고 배지내 효소를 고정시키기 위한 제단백시약(텅스텐산나트륨 50 g/L) 640 $\mu$L에 간세포 배양 배지와 표준액을 각각 160 $\mu$L를 넣고 잘 섞은 후 발색시약 A(페놀 40 g/L), B(수산화나트륨 35.6 g/L), C(10% 차아염소산나트륨)를 각각 1 mL, 0.5 mL, 1 mL를 차례로 넣은 후 37℃에서 20분간 반응시키고 630 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

인위적으로 넣어준 암모니아와 간세포 자체가 배출하는 암모니아에 의해 생성되는 요소의 양은 Sigma assay kit(Sigma diagnostics 535)로 측정하였는데 그 방법은 다음과 같다. Bun acid(ferric chloride in phosphoric and sulfuric acids)와 Bun color(diacetyl monoxime 0.18(w/v)% and thiosemicarbazide)를 3:2 부피비로 섞은 용액 3mL에 배지와 요소 표준용액을 36 $\mu$L 씩 넣고 끓는 물에 10분간 반응시키면 분홍색을 띠게 되고 이를 530 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 간세포 구상체 배양용 PUF

간세포 구상체 형성에 적합한 PUF는 배지의 흐름을 원활히 하고 세포 접종을 위해 pore가 open cell 형태여야 한다. 그러나 pore와 pore사이의 얇은 막(window)이 되도록 많이 존재하는 것이 구상체 형성을 위한 많은 표면적을 제공하고 많은 세포가 접종되는데 유리하다. 따라서, 적당한 cell opening을 가지는 PUF를 제조하는 것이 매우 중요하다. 일반 광학현미경으로는 pore의 opening 정도를 관찰할 수 없기 때문에 전자현미경으로 PUF를 관찰하였다. Figure 2(A)는 15% NCO-prepolymer를 물로 발포하여 제조한 PUF의 전자현미경 사진으로서 많은 수의 window가 존재한다는 것을 볼 수 있다. NCO- 농도가 15% 보다 낮은 prepolymer로 제조한 PUF는 골격이 굵고 pore가 모두 open되는 경향을 보이며 NCO- %가 20%인 경우는 pore가 닫히는 경향을 보였다(Figure 2(B)). 따라서, 배양 형태나 목적에 따라 NCO- 농도를 조절함으로써 적당한 pore opning을 가지는 PUF를 제조하여 이용할 수 있을 것으로 판단된다. 본 연구에서는 15% NCO-prepolymer로 제조한 PUF가 세포 접종 농도 및 구상체 형성면에서 가장 적합한 것으로 선정되어 이를 이용하여 생인공간 반응기 제조에 사용하였다(12). PUF는 직경 3~4 mm의 정육면체 형태로 절단하여 사용하였다.

### 간세포 접종 및 생인공간 반응기 운전

총 부피 4 $cm^3$의 PUF 조각들을 100mL 용량의 spinner flask에 넣고 $5\times10^5$ cells/mL의 농도의 세포 용액 100 mL을 첨가한 후 교반하였다. 간세포 용액의 농도가 $5\times10^5$ cells/mL 이상이면 산소가 고갈되어 오히려 부착이 저조하게 된다. 30분 간격으로 PUF에 부착되지 않은 세포농도를 측정하여 PUF에 접종된 간세포 수를 측정하였다. 1시간 이후로는 부착되지 않은 세포 농도가 일정하게 유지되었으며 이때 PUF

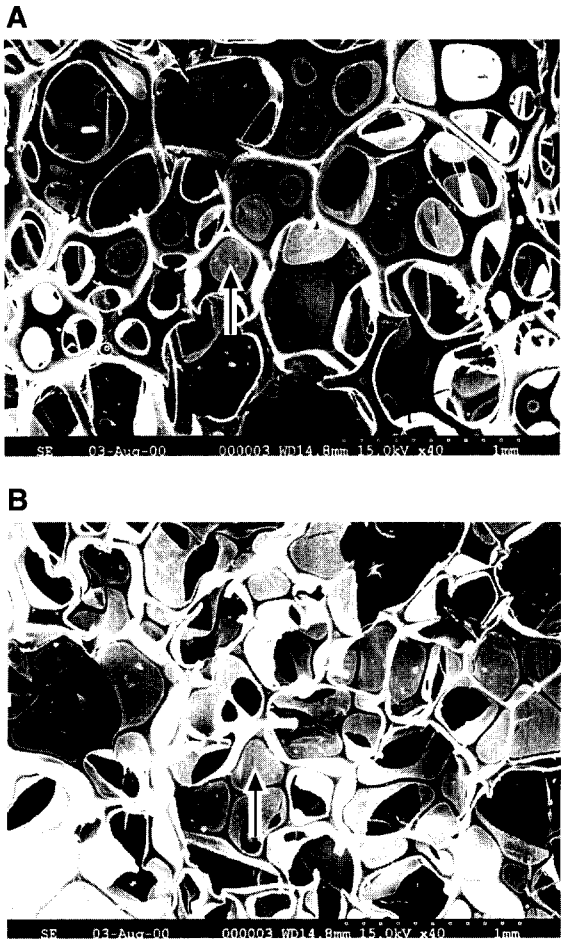


**Figure 2.** Scanning electron microscopic pictures of PUF manufactured by 15%(A) and 20%(B) NCO-prepolymers. PUF from 20% NCO-prepolymer have more thin membranes (bright areas) between adjacent pores so called 'windows' than that from 15% NCO-prepolymer. This means that the PUF from 20% NCO-prepolymer showed more closed windows. Arrows indicate windows and the bar indicates 500 $\mu$m.

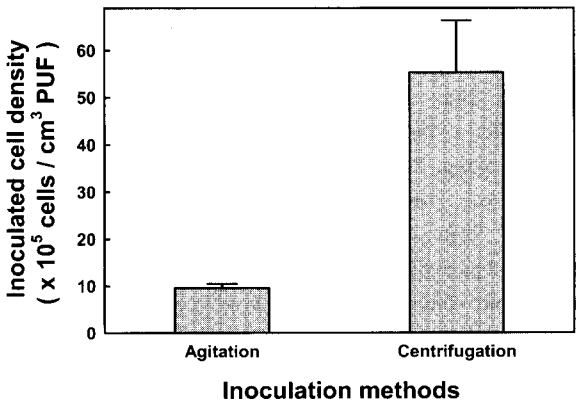


**Figure 3.** Hepatocyte cell densities inoculated in polyurethane foams by agitation and centrifugation methods. Data are shown as the mean ± the standard deviation for three independent set of experiments.

에 접종된 간세포의 수는 $9.6\pm0.8\times10^5$ cells/$cm^3$ PUF로 나타났다(Figure 3). 이 접종농도는 너무 낮아 생인공간에 요구

되는 약 $1\times10^{10}$개의 간세포를 수용하려면 반응기의 부피가 너무 커지게 된다. 따라서 훨씬 더 높은 접종 농도가 요구되며 이를 위하여 원심분리 방법을 시도하였다. 동일한 부피의 PUF조각들이 들어있는 50 mL 원심분리 튜브에 $5\times10^6$cells/mL 농도의 간세포 용액을 10 mL 넣고 골고루 혼합한 후 500 rpm으로 2분간 원심분리하여 간세포가 PUF의 pore에 들어가도록 유도하였다. 원심분리 후 PUF에 접종되지 않고 가라앉은 세포는 다시 부유시켜 동일한 조건으로 다시 원심분리하였으며 PUF를 제거한 후 튜브에 남아있는 간세포 수를 측정하여 부착된 간세포를 측정하였다. 교반에 의한 방법에 비하여 5배 이상 높은 접종 농도인 $5.5\pm1.1\times10^6$ cells/cm$^3$ PUF를 얻을 수 있었고(Figure 3) 또한, 세포 접종에 소요되는 시간도 1시간에서 10분 정도로 단축시킬 수 있었다. 따라서 원심분리를 이용한 간세포 접종은 매우 효과적인 방법으로 판단되며 이를 계속 사용하였다. 그러나, 접종되는 간세포의 농도는 PUF의 크기나 원심분리의 횟수에 따라 더욱 높일 수 있으리라 판단된다.

간세포는 산소의 소모량이 매우 높은 세포이다. 특히 초기 부착이나 구상체 형성시기에는 더욱 많은 양의 산소를 소모하는 것으로 알려져 있으며 초기의 최대 소모량은 0.4 nmol/s · $10^6$cells 정도인 것으로 보고되었다(14). 최대 산소 소모율(0.4 nmol/s · $10^6$cells), 접종된 세포의 수($2.2\times10^7$cells), 반응기 입구의 DO(4 ppm)와 반응기 출구의 DO가 1.5 ppm 이하로 내려가지 않도록 반응기의 배지 유속을 설계한 결과 6.8 mL/min.을 얻었다. 따라서, 반응기 배지 유속은 7.0 mL/min.으로 운전하였다. 실제로 반응기 출구의 DO는 초기 이틀을 제외하고는 2 ppm이상으로 유지되었는데 이는 유속 계산을 최대 산소 소모량을 기준으로 했기 때문으로 생각된다. 일반적으로 생인공간 시스템에는 혈장분리를 위한 순환과 간세포 반응기의 순환이 분리되어있으며 원활한 산소 공급을 위하여 간세포 반응기의 순환 유속이 혈장분리기 순환 유속보다 3-6배 가량 빠르며 대부분 혈장에 산소를 공급하는 장치를 따로 포함하고 있거나(15,16) 반응기 내의 위치에 따른 산소 농도의 차이를 줄이기 위해 산소 공급 장치가 간세포 반응기와 합쳐진 형태의 생인공간이 개발되기도 하였다(17). 본 연구에서는 실리콘 튜브를 이용하여 배지에 산소를 공급하였으나 실제 생인공간 시스템에서는 membrane oxygenator를 사용하여 반응기 내에 고농도로 존재하는 간세포에 충분한 양의 산소를 공급하여야 할 것이다.

### 생인공간의 간기능 활성

배지에 첨가된 암모니아의 제거 능력, 요소 분비 능력 및 혈청 단백질인 알부민의 분비율과 같은 간의 대표적 고유 기능을 측정함으로서 생인공간으로서의 성능을 측정하였다. Figure 4의 결과는 모두 24시간 동안 배양된 배지를 분석하여 얻어진 결과로서 $10^6$개의 세포가 하루동안에 나타내는 활성이다. 배지에 첨가된 1 mM(14 $\mu$g 암모니아 질소/mL)의 암모니아는 초기에는 90% 이상 제거되었고 배양 일주일 후에도 75% 이상 제거하는 능력을 나타내어 간부전 환자의 혈액에 축적된 암모니아도 효과적으로 제거될 수 있음을 확인하였다(Figure 4(a)). 배양 이틀째부터 암모니아를 첨가하였기 때문에 Figure 4(a)의 제거율 결과는 3일째부터 표시되었으며

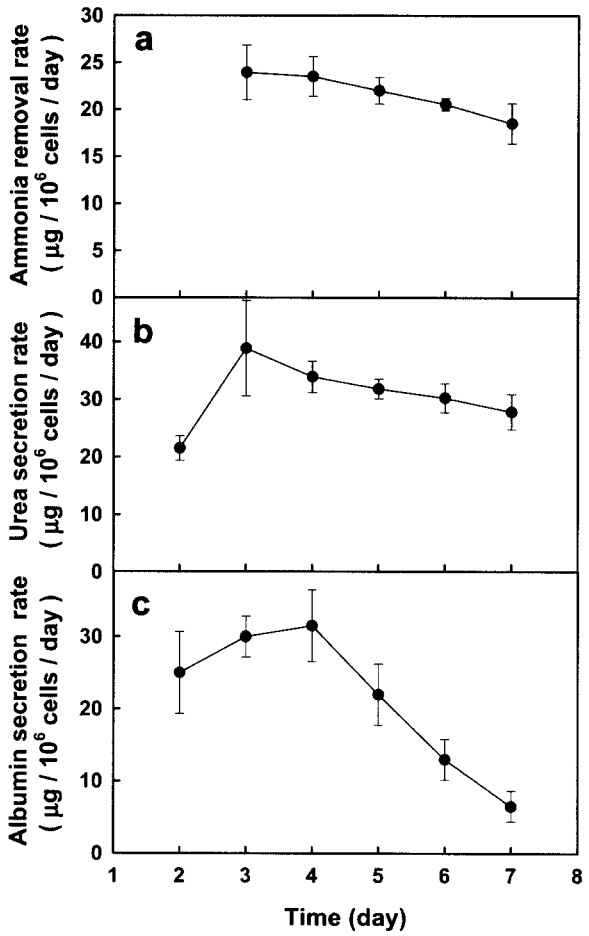


**Figure 4.** The profiles of liver specific activities i.e., ammonia removal rate (a), urea secretion rate (b), and albumin secretion rate (C) of a PUF hepatocyte bioreactor are shown. Data are obtained the mean ± the standard deviation for three independent experiments.

첨가된 암모니아 농도는 실제 간성 혼수 상태인 환자에게서 나타날 수 있는 혈중 암모니아 농도 0.3 mM 보다 훨씬 높은 농도의 악조건에서 시험된 결과이므로 본 생인공간 시스템의 암모니아 제거능력은 상당히 우수할 것으로 예상된다.

요소의 분비량은 본 연구자들이 앞서 보고한 단층으로 배양된 간세포와 비슷한 수준을 나타냈으며 비교적 안정적인 경향을 나타내어 일주일의 배양 기간 동안 요소 분비 기능이 유지됨을 알 수 있었다(Figure 4(b)). 배양 3일째 요소 분비량이 급격히 증가하는 것은 배양 2일째부터 첨가하는 암모니아가 요소로 전환되기 때문에 나타나는 현상으로 판된된다.

알부민 분비율은 대부분의 연구자들이 배양 간세포 활성의 지표로서 분석하는 간의 특이 기능이며 주요 기능 중에 하나이다. 배양 4일째에 약 32 $\mu$g/$10^6$cells/day의 최고 분비율을 나타냈으며 (Figure 4(c)) 그 후로는 계속 감소하였다. 본 시스템의 알부민 분비율은 독성이나 약물 대사 연구에 사용되는 복층 콜라젠 배양의 경우에 보고되는 72 $\mu$g/$10^6$cells/day(18) 보다는 낮은 수준이지만 중공사막을 사용하는 다른 생인공간 시스템의 14.4 $\mu$g/$10^6$cells/day(19) 보다는 상당히 높은 수준의 알부민 분비율을 나타내었다. 알부민 분비율이 암모니아의 제거능이나 요소 분비능보다 안정되게 유지되지는 못하였지

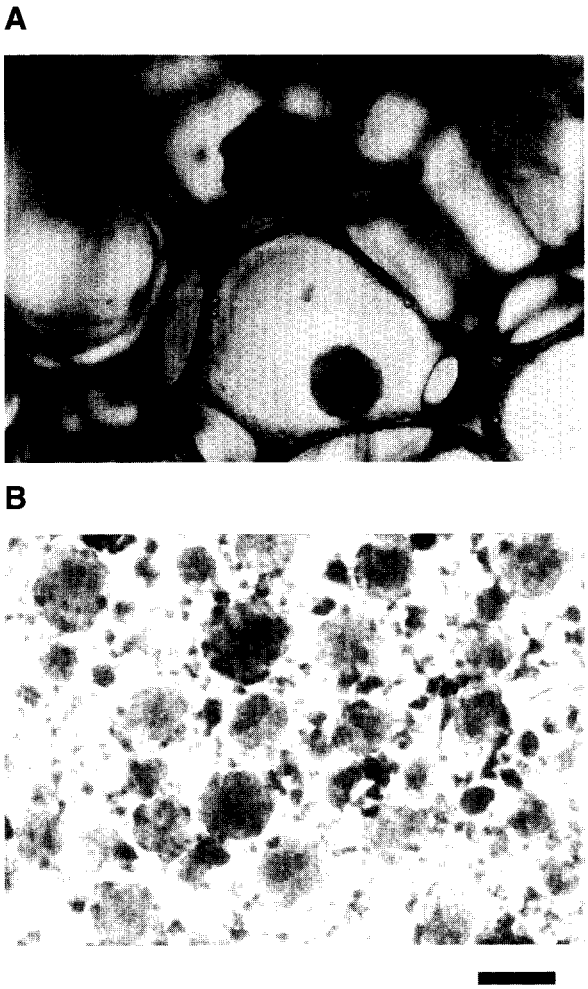


**Figure 5.** Light microscopic pictures of hepatocyte spheroids formed in PUF (A) and detached hepatocyte spheroids (B). Photographs were taken from the sample after 14 days of perfusion culture. Spheroids in (B) stained with trypan blue 4% solution to observe a viability of the hepatocytes qualitatively. Since only a few spheroids were stained by the dye solution (dark spheroids), it was shown that most of the spheroids were viable. Bar indicates 200 $\mu$m.

만 현재 임상이나 동물에 적용되고 있는 생인공간의 경우 대부분 하루 이내의 단시간만 환자의 혈액을 순환시키므로(15) 5일 이후에 알부민 분비능력이 급격히 감소하는 것은 생인공간 시스템의 전체적 성능에는 영향을 미치지 않을 것으로 판단된다. 다만, 배양 환경이 불완전하기 때문에 나타나는 현상이므로 추가로 개선하려는 노력을 해야할 것이다.

배양을 종료한 후 반응기 속의 PUF를 회수하여 pore 내에 형성된 간세포 구상체를 관찰하였다. PUF의 pore 속에 많은 간세포 구상체가 형성되어 있는 것을 알 수 있었다(Figure 5(A)). 구상체를 PUF로부터 떨어뜨려 trypan blue 용액으로 염색한 결과 거의 대부분의 구상체가 살아있는 것으로 확인되었다 (Figure 5(B)).

이상의 결과로 볼 때 적당한 cell opning을 가지는 PUF가 충진된 형태의 반응기는 간세포를 구상체 형태로 고농도로 배양하는데 적합하며 또한 생인공간으로 개발될 충분한 가능성을 가지고 있다고 판단된다.

## 요 약

급성 간부전 환자나 간이식 대기 상태의 환자의 생명을 간이 재생되거나 간 이식때 까지 연장시키기 위하여 생인공간이 많이 연구되고 있다. 본 연구에서는 적당한 cell opening을 가지는 폴리우레탄 폼을 15% NCO-prepolymer를 이용하여 직접 제조하였으며 이를 직경 3~4 mm 크기의 정육면체로 절단하여 충진형 반응기를 제조하였다. 분리된 일차간세포를 원심분리 방법을 이용하여 PUF 1 $cm^3$ 당 $5.5\pm1.1\times10^6$개의 세포를 접종하였으며 일주일간 관류 배양하면서 생인공간으로서의 성능을 측정하였다. 접종된 간세포는 구상체를 형성하였고 안정된 암모니아 제거능력과 요소 분비율을 나타내었다. 알부민 분비율은 배양 4일 이후 감소하는 경향을 보였다. 이상의 결과를 볼 때 PUF 충진형 간세포 반응기는 생인공간으로 개발되기에 충분한 가능성을 가진 것으로 판단된다.

## 감 사

본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임. (HMP-00-B-31400-0159)

## REFERENCES

1. Moslen, M. T. (1996), Toxic responses of the liver. p. 403-416 In: C. D. Klaassen, M. O. Amdur, and J. Doull (ed.), *Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons.* 5th ed., McGraw-Hill, New York.
2. Dixit, V. and G. Gitnick (1996), Artificial liver support: state of the art. *Scand J Gastroenterol. Suppl.* **220**, 101-14.
3. Hoofnagle, J. H, R. L. Carithers, Jr, C. Shapiro, and N. Ascher (1995), Fulminant hepatic failure: Summary of a workshop, *Hepatology* **21**, 240-252.
4. Kamlot, A., J. Rozga, F. D. Watanabe, and A. A. Demetriou (1996), Review: Artificial Liver Support System, *Biotechnol. Bioeng.* **50**, 382-391.
5. Demetriou, A. A., J. Roaga, L. Podesta, E. Lepage, E. Morsiani, A. D. Moscioni, A. Hoffman, M. McGrath, L. Kong, H. Rosen, F. Villamil, G. Woolf, J. Vierling, and L. Makowka (1995), Early clinical experience with a hybrid bioartificial liver, *Scand. J. Gastroenterol.* **30** Suppl. 208, 111-117.
6. Nyberg, S. L., R. A. Shatford, W. S. Hu, W. D. Payne, and F. B. Cerra (1992), Hepatocyte culture systems for artificial liver support: implications for critical care medicine (bioartificial liver support), *Crit Care Med* **20**, 1157-1168.
7. Li, A. P., S. M. Colburn, and D. J. Beck (1992), A Simplified Method for the Culturing of Primary Adult Rat and Human Hepatocytes as Multicellular Spheroids, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **28A**, 673-677.
8. Koide, N., K. Skaguchi, Y. Koide, K Asano, M. Kawaguchi, H. Matsushima, T. Takenami, T. Shinji, M. Mori, and T. Tsuji (1990), Formation of Multicellular Spheroids Composed of Adult Rat Hepatocytes in Dishes with Positively Charged Surfaces and under Other Nonadherent Environments, *Exp. Cell. Res.* **186**, 227-235.
9. Lee, D. H., J. N. Ryu, E. K. Yang, M. K. Chung, S. N.

Park, and J. K. Park (1997), Spheroid culture of primary rat hepatocytes in spinner vessel, *Korean J. Biotech. Bioeng.* **12**, 449-455.
10. Wu, F. J., J. R. Friend, D. D. Hsiao, M. J. Zilliox, W. J. Ko, F. B. Cerra, and W. S. Hu (1996), Efficient Assembly of Rat Hepatocyte Spheroids for Tissue Engineering Applications, *Biotechnol. Bioeng.* **50**, 404-415.
11. Matsushita, T., H. Ijima, N. Koide, and K. Funatsu (1991), High albumin production by multicellular spheroids of adult rat hepatocytes formed in the pores of polyurethane foam, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36,** 324-326.
12. Ahn, J. I., D. H. Lee, Y. S. Lee, J. S. Lee, Y. S. Choi, and J. K. Park (1998), Formation of spheroids of adult rat primary hepatocytes in polyurethane foam, *J. KOSOMBE* **19**, 215-223.
13. Seglen P.O. (1975), Preparation of Isolated Rat Liver Cells, *Meth. Cell. Biol.* **13**, 29-83.
14. Foy, B. D., J. Lee, J. Morgan, M. Torner, R. G. Tompkins, and M. L. Yarmush (1993), Optimization of hepatocyte attachment to microcarriers: Importance of oxygen, *Biotech. Bioeng.* **42**, 579-588.
15. Rozga, J., E. Morsiani, E. LePage, A. D. Moscioni, T. Giorgio, and A. A. Demetriou (1994), Isolated Hepatocytes in a Bioartificial Liver: A Single Group View and Experience, *Biotechnol. Bioeng.* **43**, 645-653.
16. Sussman, N. L. J. H. Kelly (1993), Improved liver function following treatment with an extracorporeal liver assist device, *Artif. Org.* **17**, 27-30.
17. Flendrig, L. M., J. W. la Soe, G. A. Jorning, A Steenbeek, O. T. Karlsen, W. M. Bovee, N. J. J. Ladiges, A. te Velde, and R. F. M. Chamuleau (1997), *In vitro* evaluation of a novel bioreactor based on an integral oxygenator and a spirally wound nonwoven polyester matrix for hepatocyte culture as small aggregates, *J. Hepatology* **26**, 1379-1392.
18. Dunn, J. C. Y., R. G. Tompkins, and M. L. Yarmush (1991), Long-term *in vitro* function of adult hepatocytes in a collagen sandwich configuration, *Biotechnol. Prog.* **7**, 237-245.
19. Shatford, R. A., S. L. Nyberg, S. J. Meier, J. G. White, W. D. Payne, W. S. Hu, and F. B. Cerra (1992), Hepatocytes Function in a Hollow Fiber Bioreactor: A Potential Bioartificial Liver, *J. of Surgical Research* **53**, 549-557.