



Safety Evaluation of Human Fibroblasts in Mice: Tumorigenicity, 13-week Toxicity and Distribution Studies

Hyung Jun Choi^{1,2}, Euna Kwon¹, Jeong-Hee Sohn¹, Jeong-Hwan Che¹, Kook Hyun Lee¹,
Jong Wan Kim³, Jaydo Choi³ and Byeong-Cheol Kang^{1,2*}

¹Department of Experimental Animal Research, Clinical Research Institute, Seoul National University Hospital, Seoul, Korea

²Department of Immunology and Laboratory Animal Medicine, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea

³S.BIOMEDICS Co., Ltd. Seoul, Korea

Human fibroblasts were developed for cellular therapy with the aim of correcting of depressed scars, but the safety of that *in vivo* is unclear. In this study, we assessed the safety of human fibroblasts by investigating the tumorigenicity, 13-week toxicity and through distribution studies. In the tumorigenicity test, nude mice were divided into three dosage level treatment groups with a negative/positive control group. At 6 months after intradermal transplantation, all of the treatment groups showed no development of a nodule on the injection sites and organs. Toxicity studies were performed using ICR and BALB/c mice for 13 weeks. The mice were divided into three dosage level treatment groups with a control and a syngeneic group. There was no treatment-related effect on clinical signs, mortality, body weight, food/water consumption, hematology, serum biochemistry, urine, necropsy findings and histopathological findings in any groups. These results suggest that the no-observed-effect level (NOEL) of the human fibroblasts was greater than 7.5×10^7 cells/kg for mice. In the distribution study, groups were treated with fibroblasts labeled with a fluorescent dye (CM-Dil) at low and high doses with a control and a syngeneic group. At 24 hours, a large percentage of the labeled fibroblasts were observed at the dermal layer. At 3 months, fluorescence of the labeled fibroblasts continued to be observed. Other tissues were not detected the fluorescence at any time. These studies demonstrate that the safety of human fibroblasts is reasonable with no toxic effect, no tumorigenicity and retention in the dermis. Our studies define preclinical safety testing standards relevant to the development of cellular therapeutics.

Key words: Fibroblast, tumorigenicity, toxicity, distribution, cell therapy

Received 26 November 2009; Revised version received 19 March 2010; Accepted 14 June 2010

세포치료제는 세포와 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가(autologus), 동종(allogenic), 또는 이종(xenogenic)세포를 체외에서 증식, 선별하거나 여타한 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 말한다. 그 중 피부세포치료제는 피부의 진피에 존재하는 성체줄기세포를 이용하여 노화나 햇빛에 의한 피부손상과 흉터를 근본적으로 치료하는 세포치료제이다. 섬유아세포(fibroblast) (Boss et al., 2000)는 진피에 존재하는 성체줄기세포(adult stem cell)의 일종으로 피부 함몰

부위에 주입하게 되면 보다 성숙한 피부세포로 분화하여 손상된 진피조직을 재생시켜준다. 특히 자가이식용 세포 치료제는 이식 시 거부반응이 없고 생착력과 피부조직 복원력이 뛰어난 장점이 있다.

최근 섬유아세포를 이용하여 전임상시험(Guerret et al., 2003) 및 임상시험(Watson et al., 1999; Boss et al., 2000)에서 피부재생 효능을 나타내는 연구보고에 따라 많은 연구기관에서 상용화를 준비하고 있는 상황이다. 미국에서는 Apligraf (Guerret et al., 2003)나 OrCel 등의 피부세포치료제가 FDA (Food and Drug Administration)의 승인을 받아 시판중이며, 국내에서는 자가유래 세포치료제인 Holoderm® (Lee et al., 2006), 동종유래 세포치료제 Kaloderm® (Seo et al., 2007; Yoon et al., 2008) 등이 이미 식품의약품안전청의 허가를 받았다. 이러한 줄기세포를 이용한 세포치료제의 경우, 임상시험 승인 전에 비임상시험을 통해 안전성을 확보하는 것이 필수적이다.

*Corresponding author: Byeong-Cheol Kang, Department of Experimental Animal Research, Clinical Research Institute, Seoul National University Hospital, 28 Yongon-dong, Jongno-gu, Seoul 110-744, Korea
Tel: +82-2-2072-0841
Fax: +82-2-741-7620
E-mail: bckang@snu.ac.kr

의약품 및 기능성 식품의 경우 [의약품 등의 독성시험법]의 정립에 따른 안전성 평가기술이 충분히 갖추어져 있는 반면, 정확한 세포치료제의 안전성 입증에 위한 기술 및 절차에 있어서는 많은 오류와 시행착오를 겪고 있다. 특히 줄기세포를 이용한 세포치료제의 평가를 위한 시험 모델이 정립되지 않아 의약품 유효성 평가모델을 준용함으로써 약에 버금가는 효능을 제시해야하는 실정이다. 그와 더불어 독성시험과 관련된 무해용량과 임상(예정)용량에 근거를 두고 적합동물모델을 통해 안전성 평가가 이루어져야 할 것이다. 또한 세포배양단계에서의 안전성도 중요하며, Galbraith (2004)는 세포 배양 등의 과정에 있어 발생할 수 있는 미생물 오염 등 세포에 대한 안전성에 대한 규제방안을 제시하였다. 줄기세포의 자가재생(self-renewal) 및 증식능(proliferative potential)에 의한 세포 이상분열로 발암성을 유발할 수 가능성(Rubio et al., 2005; Trosko et al., 2006)이 보고되므로 발암가능성이 없음을 실험적으로 증명하여야 한다. 일반적으로 화학의약품은 마우스 및 랫드 등을 이용하여 2년간의 발암성시험(carcinogenicity)을 수행하지만, 세포치료제의 경우에는 면역결핍동물인 누드마우스나 SCID (severe combined immunodeficiency) 마우스 등을 이용하여 6개월간의 종양원성시험(tumorigenicity) (Lawrenz et al., 2004; Lee et al., 2007)를 수행한다. 세포의 이식 후 발생할 수 있는 독성 반응을 예측하기 위해, 일반 동물을 대상으로 일반 건강 상태, 혈청 생화학, 혈액학적 프로파일을 모니터링해야 하며, 표적 조직의 조직병리학적 변화를 관찰함으로써 안전성 자료를 확보해야 할 것이다. 또한 원하지 않는 부위로 이동하여 원하지 않는 세포형태로의 분화여부를 확인하기 위한 이식한 세포의 분포 등에 대한 기초연구가 필요하다. 일부 중간엽줄기세포에 대한 발암성 시험(Lee et al., 2007), 독성(Liu et al., 2006; Kovacs-Bankowski et al., 2008; Vilalta et al., 2008) 및 분포시험(Cho et al., 2002; Allers et al., 2004; Benten et al., 2006; Meyerrose et al., 2007) 등이 발표되고 있지만, 피부세포치료제인 섬유아세포에 대한 이러한 독성자료는 극히 부족한 실정이다.

이에 본 실험에서는 인간 섬유아세포의 임상시험 적용에 앞서 안전성, 독성 및 분포 양상을 평가하기 위해, nude mouse를 이용한 *in vivo* 발암성 시험, ICR mouse를 이용한 13주 독성시험, ICR mouse에서의 CM-Dil 형광 라벨을 이용한 체내 분포시험을 실시하였다.

재료 및 방법

시험물질

현재 피부세포치료제로 개발 단계의 인간 섬유아세포(human fibroblasts)는 환자의 피부를 채취하여 체외 배양

시킨 후 환자의 피부 진피에 자가 이식하는 방법을 계획하고 있다. 본 시험에서는 S.BIOMEDICS Co., Ltd. (Seoul, Korea)에서 섬유아세포에 적합한 배양액을 이용하여 적정 세포수 용량으로 세포를 배양하여 세포생존률, 세포함량, 성장, 무균, 순도, 마이코플라즈마 시험 등에서 적합 판정을 받은 인간 섬유아세포를 투여 일에 세포혼탁액 상태로 제공받았으며, 투여 직전에 투여 농도 군 별 세포의 수를 계수하여 확인한 후 사용하였다. 한편, 13주 독성시험 및 분포시험에서는 인간세포의 마우스로의 이종이식으로 실험설계를 한 상황에서 이종이식의 영향을 평가하기 위해, 동종세포의 동종이식과 비교하고자 근교계 마우스(BALB/c)에서 채취하여 배양시킨 마우스 섬유아세포를 제공받아 근교계 마우스의 이식으로 사용하였다. 투여가 종료된 시험물질은 viability test를 실시하였다. 부형제 및 용매대조물질로 Ringer's Solution(중외제약(주), Seoul, Korea)를 사용하였다. 분포시험의 경우, 체내에서의 분포 양상을 평가하기 위하여 세포에 CellTracker™ CM-Dil (Molecular Probe inc., Eugene, Oregon, United States)를 사용하여 형광표지하였다. 형광표지방법은 제조업체 매뉴얼대로 배양중인 세포에 CM-Dil (2 µg/mL)을 첨가한 후 37°C에서 5분간 정치한 후, 4°C에서 15분간 정치하는 방법을 사용하였다.

실험동물

발암성시험은 7주령의 암컷 Nude mouse (BALB/c-nu)를 Harlan (Indianapolis, United States)으로부터 구입하였고, 13주 독성시험은 7주령의 암수 ICR mouse와 BALB/c mouse를 (주)오리엔트(성남, 한국)으로부터 구입하였으며, 분포시험의 경우는 7주령의 암컷 ICR mouse와 BALB/c mouse를 (주)오리엔트(성남, 한국)으로부터 구입하였다. 서울대학교병원 임상의학연구소 전임상실험부에서 순화기간을 거쳐 건강한 동물만을 시험에 사용하였다. 실험동물 사육환경은 온도 22±2°C, 상대습도 50±10%, 환기회수 12~18회/hr, 조명 12시간, 조도 150~300 Lux, 소음 55 dB 이하로 조절하였다. 사육기간 중 Individually Ventilated Caging System (IVCS) polysulfone 케이지에 군 별 5마리씩 사육하였으며 주 1회 멸균케이지로 교환하였다. 사료는 감마선조사 멸균된 실험동물용 고형사료(퓨리나 실험용 쥐사료 5057)를 급여하였으며, 음수는 상수도수를 고온고압멸균(autoclave)하여 자유롭게 섭취할 수 있도록 공급하였다. 본 실험은 서울대학교병원 임상의학연구소(AAALAC 인증기관) IACUC의 승인을 받아 National Research Council 실험동물사용관리 가이드라인에 따라 수행되었다.

시험군의 구성 및 시험물질의 이식

발암성시험: 시험물질인 인간 섬유아세포는 임상예정용

량이 성인 1인(60 kg) 당 4.5×10^7 cells이므로, 이에 체중 당 세포수로 계산하여, 임상용량을 저용량으로 설정하고, 공비 10으로 단계별 희석하여 3단계의 시험물질투여군(7.5×10^5 , 7.5×10^6 , 7.5×10^7 cells/kg)과 용매대조군을 두었으며, 종양발생 비교를 위하여 양성대조군(A431 cell)을 두었다. 군 당 10마리로 구성하였으며 용매대조군에는 같은 부피의 부형제만을 투여하였다. 이식경로 및 횡수는 임상 적용 방법을 고려하여 진피 내에 2주에 1회씩 총 3회 이식하였다. 이식 시 체중을 측정할 결과를 토대로 투여량(0.05 mL/30 g B.W.)을 환산하여 투여하였다.

13주 독성시험: 발암성시험과 투여용량과 동일한 방법으로 3단계의 시험물질투여군(7.5×10^5 , 7.5×10^6 , 7.5×10^7 cells/kg)과 용매대조군을 두었으며, 이종세포 이식을 동종세포이식과 비교하기 위해 BALB/c syngeneic group (7.5×10^7 cells/kg)을 두었다. 각 군 당 암수 각각 20마리로 구성하였다. 용매대조군에는 같은 부피의 부형제만을 투여하였다. 이식경로 및 횡수는 진피 내에 주 1회 4주간 총 4회 이식하였다. 이식 시 체중을 측정할 결과를 토대로 투여량(0.05 mL/30 g B.W.)을 환산하여 투여하였다.

분포시험: 임상예정용량(성인 1인(60 kg) 당 4.5×10^7 cells)과 13주 독성시험의 투여용량군을 고려하여 저용량을 임상예정용량으로 설정하고, 공비 100으로 희석하여 2단계의 시험물질 투여군(7.5×10^5 , 7.5×10^7 cells/kg)과 용매대조군을 두었다. 동종세포의 영향과 비교하기 위하여 BALB/c mouse (7.5×10^7 cells/kg)를 이용하여 병행 실시하였다. 시간에 따른 세포의 분포양상을 관찰하기 위하여 마지막 투여 후 24시간, 4주, 13주 부검군을 두었으며, 군 당 6마리로 구성하였다. 이식경로, 횡수 및 투여량은 13주 독성시험에서의 방법과 동일하게 실시하였다.

관찰, 측정, 검사 및 분석방법

발암성시험: 일반 임상증상은 시험물질을 투여한 모든 동물에 대하여 매일 1일 2회 외관적 이상 및 임상증상, 사망동물 및 이상 징후의 발생여부와 그 정도를 관찰하고, 자세한 임상증상의 관찰은 1주일에 1회 실시 기록하였다. 체중은 모든 동물에 대하여 시험물질의 이식개시 전, 이식개시 후 시험 종료 시까지 매주 2회 측정하고, 부검일에 측정하였다.

종양발생의 확인은 이식 후 시험 종료 시까지 매주 2회 확인하였으며, 종양의 크기는 calipers를 이용하여 측정하여 ($\pi/6 \times \text{길이} \times \text{폭} \times \text{높이}$)의 공식으로 계산하였다. SNUH-IACUC 권고에 따라 종양의 직경이 25 mm 이상이 될 경우 안락사를 실시하였다.

육안적 관찰은 시험 종료 시 생존한 전 시험동물에 대하여 isoflurane로 마취한 다음 복대동맥을 절단하여 충분

히 방혈한 후 전 장기에 대하여 실시하였다. 장기중량 측정은 모든 시험동물에 대하여 심장, 간장, 폐장, 신장(좌·우), 부신(좌·우), 난소(좌·우), 뇌, 뇌하수체를 측정하였고, 체중에 대한 비(상대중량)를 계산하였다.

13주 독성시험: 본 시험은 「의약품등의 독성시험기준」(식품의약품안전청 고시)에 준하여 실시하였다.

일반 임상증상 관찰 및 체중 측정은 발암성시험과 동일하게 실시하였다. 사료 및 음수 섭취량은 케이지별로 급여총량과 잔량을 이식 후부터 시험 종료 시까지 매주 1회 측정하였다. 안검사 및 뇨검사는 시험기간 중 이식개시 후 13주째에 무작위로 각 군 당 암수 각각 5마리씩의 동물에 대하여 육안 및 검안경을 이용하여 전안부, 중간투광채 및 안저의 각각에 대하여 안과학적 검사를 실시하였고, metabolic cage를 사용하여 체노한 후, 뇨검사용 시험지(Combur10Test® M, Roche, Germany)를 사용하여 urine analyzer (Meditron Junior II, Roche, Germany)로 pH, specific gravity, leukocyte, nitrite, protein, ketone body, urobilinogen, bilirubin, glucose, 잠혈(occult blood) 검사를 실시하였다.

혈액학적 검사 및 혈액화학적 검사를 위하여 부검당일에 복대정맥에서 혈액을 채취하였다. 군 당 암·수 각각 20마리 중 10마리는 혈액화학적검사, 5마리는 혈액학적검사, 5마리는 혈액응고검사를 실시하였다. 일반 혈액학적 검사는 white blood cell (WBC), red blood cell (RBC), hemoglobin (Hb), hematocrit (HCT), platelet (PLT), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), leukocyte differential 등을 Animal Blood Counter (Melet schloesing laboratoires, MS 9-5, France)를 이용하여 검사하였다.

혈액화학적 검사는 채취한 혈액의 일부를 실온에 30분간 방치하여 응고 후 원심분리(3,000 rpm, 15 min)하여 얻은 혈청에 대해서 blood urea nitrogen (BUN), cholesterol (CHOL), total protein (TP), albumin (ALB), total bilirubin (TB), alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), creatinine (CRN), triglycerides (TG), glucose, K, Cl, Ca, P, Na, A/G ratio 등을 automatic chemistry analyzer (HITACHI, 7070, Japan)로 측정하였다.

혈액응고시간 prothrombin time (PT; turbidimetric method), partial thromboplastin time (PTT; turbidimetric method)은 coagulation Analyzer (ACL-100, Lexington, United States)를 이용하여 측정하였다.

군 당 암·수 각각 20마리 중 10마리에 대해서만 장기중량 측정 및 조직병리학적 검경을 실시하였으며, 나머지 10마리에 대해서는 부검 시 육안적 관찰만을 실시하였다.

동물의 부검 시 우선 피부, 구강 및 눈 등의 외표를 조사한 후 박피하여 피하조직의 상태를 관찰하였다. 그 후 복강, 흉강 및 두개강을 열고 내부기관 및 조직의 상태를 조사하였다.

관찰 장기·조직은 이식부위, 피부, 유선, 림프절, 타액선, 골 및 골수(홍골, 대퇴골), 흉선, 기관, 폐 및 기관지, 심장, 갑상선 및 부갑상선, 혀, 식도, 위 및 십이지장, 소장, 대장, 간, 췌장, 비장, 신장, 부신, 방광, 정낭, 전립선, 고환, 부고환, 난소, 자궁, 질, 뇌, 뇌하수체, 척수, 안구 및 그 부속기, 기타 육안적 병변이 관찰된 장기조직 등이다.

장기중량 측정은 모든 시험동물에 대하여 심장, 간, 폐, 흉선, 비장, 신장(좌·우), 부신(좌·우), 고환(좌·우), 난소(좌·우), 뇌, 뇌하수체를 측정하였고, 체중에 대한 비(상대중량)를 계산하였다. 병리조직학적 검사는 육안적 관찰 및 중량 측정이 끝난 모든 장기는 고환의 경우 Bouin액, 안구는 Davidson액, 기타 장기는 10% 중성 포르말린액에 1주 이상의 충분한 고정기간을 거쳤으며 대퇴골, 흉골, 비강은 탈회과정을 거쳐, 모든 시험군의 전 장기에 대하여 파라핀 포매기에 포매하여 마이크로톰으로 2~3 μm 절편을 만들었고 hematoxylin & eosin (H&E) 염색하였다. 병리조직학적 검사는 전 용량군에 대하여 실시하였다.

분포시험: 일반 임상증상 관찰 및 체중 측정은 발암성 시험과 13주 독성시험과 동일하다. 시험물질의 체내 분포 양상을 평가하기 위하여 세포막에 형광표지 (CellTracker™ CM-Dil, Molecular Probe Inc, Eugene, United States)를 하였으며, 슬라이드 제작 후 형광현미경 (Olympus IX71, Olympus Optical Co., Japan; TRITC filter)으로 관찰하였다. 시험물질 투여 개시 후 24시간, 4주, 13주에 부검을 실시하였으며, 이식부위, liver, lung, heart, thymus, kidney (left/right), adrenal gland (left/right), spleen를 10% 중성포르말린에 고정하여 슬라이드를 제작하였다. 각 장기별로 10 serial sections을 실시하였다.

통계처리

시험에서 얻은 측정치들은 SPSS (SPSS 12.0K)을 이용하여 ANOVA 분석을 실시한 후 $\alpha=0.05$ 수준에서 군간 유의성을 검정하였고, 유의성이 인정될 경우 Tukey-Kramer test 및 Dunnet t-test를 실행하여 대조군과 각 용량군 간의 통계학적 유의성을 검정하였다($P<0.05$). ICR mouse와 BALB/c mouse 간의 data는 strain 차이를 고려하여 통계 분석을 검정하지 않았다.

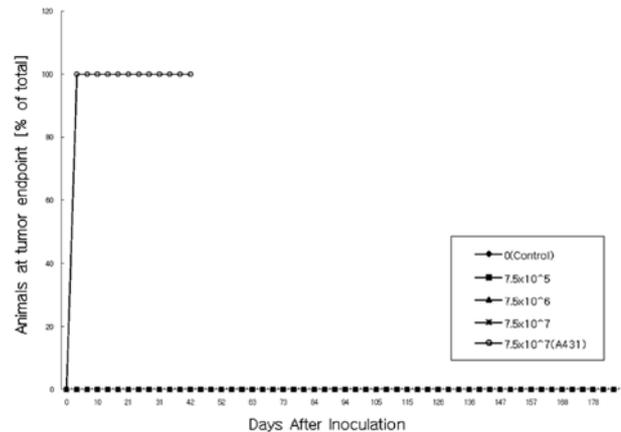


Figure 1. Tumor incidence rate of female BALB/c-nu mice intradermally treated with human fibroblasts in the tumorigenicity study.

결 과

발암성시험

사망률 및 일반 임상증상 관찰: 시험기간 중 시험물질 을 이식한 전 군에서 사망례는 관찰되지 않았다. 또한 관찰된 임상증상으로는 양성대조군 1례에서 겨드랑이 임파절이 종대된 것을 관찰하였으며, 저용량 투여군 및 중간 용량 투여군에서 각 1례씩 등 부위에 가피가 형성된 것을 관찰하였으나 이는 개체간의 공격으로 인한 것으로 사료된다. 그 외에 본 시험물질에 의한 것이라고 인정되는 임상증상, 행동이상 등은 관찰되지 않았다.

체중변화: 시험물질을 이식한 전 개체에서 시험기간 동안 용매대조군과 비교하여 유의한 체중 증감은 관찰되지 않았다.

종양발생율(Figure 1): 시험물질 이식 후 27주간 주 2회 종양의 발생유무를 관찰한 결과 시험물질 처치군의 전 개체에서는 종양 발생이 관찰되지 않았으며, 양성대조군에서는 전 개체에서 종양이 유발되었다.

장기무게: 부검 후 장기에 대한 절대중량 및 상대중량을 비교한 결과 전 투여용량군에서 음성대조군과 비교하여 유의한 증감은 관찰되지 않았다($P<0.05$).

결과의 판정: 인간 섬유아세포는 7.5×10^7 cells/kg B.W. 농도 이하에서 종양을 유발하지 않는 것으로 사료된다.

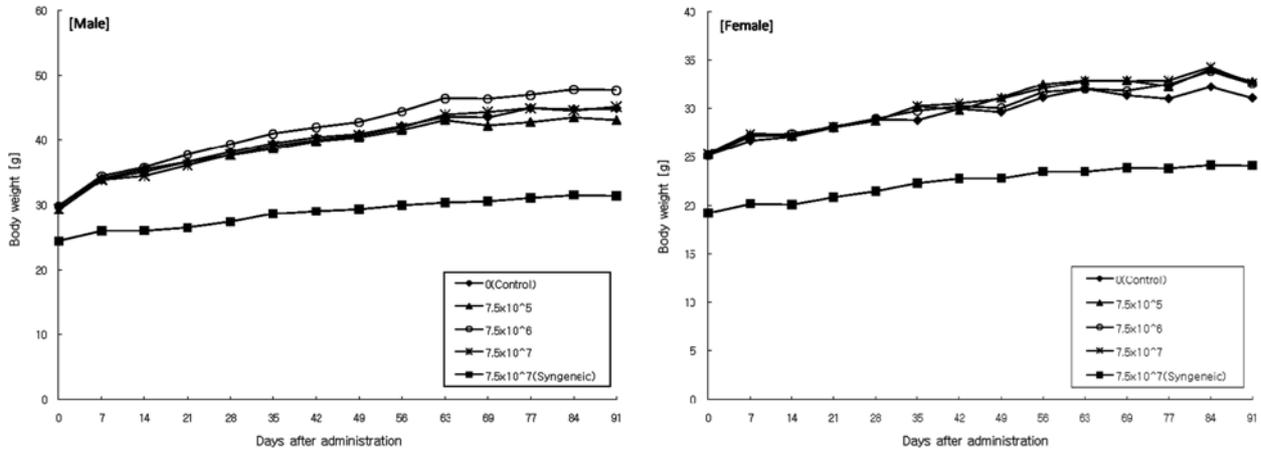


Figure 2. Body weight changes of male (left chart) and female (right chart) mice intradermally treated with human fibroblasts in the 13-week toxicity study.

13주 독성시험

사망률 및 일반 임상증상 관찰: 시험기간 중 시험물질을 이식한 전 군에서 사망률은 관찰되지 않았다. 또한 관찰된 임상증상으로는 수컷의 저용량 투여군 1례에서 투여 2주째부터 14주째까지, 1례에서 투여 12주째부터 14주째까지 생식기 주변에 가피가 형성되는 것을 관찰하였으나 이는 수컷 개체간의 공격으로 인한 것으로 사료된다. 그 외에 본 시험물질에 의한 것이라고 인정되는 임상증상, 행동이상 등은 관찰되지 않았다.

체중변화(Figure 2): 시험물질을 이식한 암수 전 개체에서 시험기간 동안 대조군과 비교하여 유의한 체중의 증감은 관찰되지 않았다.

사료섭취량, 사료효율 및 사료요구율: 사료섭취량에서는 수컷의 고용량 투여군에서 투여 2주째(4.57±0.219 vs 3.94±0.302 g)에 대조군에 비하여 유의한 감소가 관찰되었다(P<0.05). 암컷의 경우에는 시험기간 중 대조군과 비교하여 유의한 증감은 관찰되지 않았다.

사료효율에서는 수컷의 경우 투여 2주째에 고용량 투여군(0.05 vs 0.02 g)에서 유의한 감소가 관찰되었고, 암컷의 경우 투여 5주째에는 저용량 투여군 및 고용량 투여군(0.00 vs 0.05 vs 0.06 g)에서 유의한 증가가 관찰되었다. 투여 6주째에는 저용량 투여군(0.04 vs -0.02 g)에서 유의한 감소가 관찰되었다.

사료요구율에서는 수컷에서 투여 2주째에 고용량 투여군(101.98 vs 183.96 g)에서 유의한 증가가 관찰되었다. 암컷의 경우에는 대조군과 비교하여 유의한 증감이 관찰되지 않았다.

음수섭취량: 음수섭취량에서는 시험물질을 투여한 암수 전 개체에서 시험기간 동안 대조군과 비교하여 유의한 증

감은 관찰되지 않았다.

혈액학적 검사(Table 1): 수컷에서는 전 항목에서 유의한 변화가 관찰되지 않았으며, 암컷의 저용량 투여군의 경우 leukocytes 항목(2.67×10³/μL vs 5.42×10³/μL)에서 유의한 증가가 관찰되었으며, eosinophils 항목(3.0 vs 1.1%)에서 유의한 감소가 관찰되었다. 고용량 투여군의 경우 MCHC 항목(34.0 vs 31.3 g/dL)에서 유의한 감소가 관찰되었다(P<0.05).

혈액생화학적 검사(Table 2): 수컷의 경우 고용량 투여군의 ALT 항목(25 IU/L vs 17 IU/L)에서 유의한 감소가 관찰되었으며, 중간용량 투여군과 고용량 투여군의 Cl 항목(109.3 vs 113.0 vs 113.2 mmol/L)에서 유의한 증가, 고용량 투여군 Na 항목(149.9 vs 152.0 mmol/L)에서 유의한 증가가 관찰되었다. 암컷의 경우 고용량 투여군의 TP 항목(4.8 vs 5.0 g/dL)에서 유의한 증가, 저용량 투여군 및 중간용량 투여군의 CRE 항목(0.47 vs 0.39 vs 0.40 mg/dL)에서 유의한 감소가 관찰되었으며, 중간용량 투여군과 고용량 투여군의 K 항목(4.83 vs 5.29 vs 5.33 mmol/L)에서 유의한 증가가 관찰되었다.

노검사 및 안검사: 13주째 노검사를 실시한 결과, 암수 전 동물에서 대조군에 비하여 특이한 노 변화는 관찰할 수 없었으며, 안검사에서도 시험물질에 의한 특이한 변화는 관찰할 수 없었다.

혈액응고시간 검사: 혈액응고시간을 검사한 결과 시험물질을 투여한 암수 전 개체에서 대조군에 비하여 유의한 증감은 관찰되지 않았다.

부검소견(Table 3): 수컷의 저용량 투여군 2례에서 의

Table 1. Summary of the hematological values of mice intradermally treated with human fibroblasts in the 13-week toxicity study

Dosage in (cells/kg B.W.) Items		0 (Control)	7.5×10 ⁵	7.5×10 ⁶	7.5×10 ⁷	7.5×10 ⁷ (Syngeneic)
Male	Leukocytes (10 ³ /μL)	3.32±1.479	4.96±0.479	2.85±0.969	3.39±1.316	2.16±0.412
	Erythrocytes (10 ⁶ /μL)	7.8±0.43	7.9±0.19	7.6±0.47	8.2±0.59	8.9±0.62
	Hemoglobin (g/dL)	11.2±0.74	11.5±0.20	11.0±0.41	11.9±1.03	12.8±1.03
	Hematocrit (%)	33.7±2.18	35.6±0.69	33.9±1.90	37.0±4.07	42.1±3.11
	Platelets (10 ³ /μL)	953±140.0	1087±78.6	945±65.3	1018±83.3	669±131.5
	MCV (fl)	43.6±3.11	45.4±1.43	44.5±1.57	45.3±2.75	47.6±0.63
	MCH (pg)	14.4±0.18	14.7±0.45	14.5±0.43	14.6±0.54	14.4±0.54
	MCHC (g/dL)	33.2±2.40	32.4±0.73	32.6±0.64	32.3±1.30	30.3±0.80
	Neutrophils (%)	6.7±1.56	7.4±2.06	12.7±5.84	10.0±4.10	12.4±5.73
	Eosinophils (%)	3.1±1.99	1.2±0.56	2.8±0.77	2.6±1.11	5.4±2.80
	Basophils (%)	0.4±0.11	0.3±0.12	0.3±0.12	0.3±0.12	0.4±0.09
	Lymphocytes (%)	83.5±2.51	85.5±1.62	76.4±6.49	79.9±5.49	74.2±4.19
	Monocytes (%)	4.7±0.92	4.4±0.32	5.7±0.76	5.5±1.75	5.6±1.25
	Female	Leukocytes (10 ³ /μL)	2.67±1.006	5.42 ^a ±1.037	3.77±1.805	2.55±0.733
Erythrocytes (10 ⁶ /μL)		7.7±0.24	7.7±0.37	7.9±0.29	8.0±0.64	8.4±0.32
Hemoglobin (g/dL)		11.2±0.05	11.7±0.68	11.7±0.81	11.5±1.23	12.4±0.53
Hematocrit (%)		32.9±1.83	35.7±3.05	35.9±2.30	36.7±3.43	39.1±1.09
Platelets (10 ³ /μL)		896±144.6	869±131.3	1011±98.7	989±115.1	638±28.6
MCV (fl)		42.7±3.25	46.4±1.94	45.1±2.32	46.0±1.16	46.6±0.62
MCH (pg)		14.5±0.45	15.3±0.30	14.7±0.75	14.4±0.46	14.7±0.11
MCHC (g/dL)		34.0±1.84	32.9±1.08	32.7±0.49	31.3 ^a ±0.80	31.7±0.64
Neutrophils (%)		8.4±5.42	8.2±2.16	9.6±2.10	10.3±2.83	13.1±1.81
Eosinophils (%)		3.0±1.71	1.1 ^a ±0.24	1.5±0.67	2.0±0.67	2.3±1.21
Basophils (%)		0.3±0.13	0.4±0.16	0.4±0.11	0.2±0.09	0.3±0.11
Lymphocytes (%)		81.0±4.63	84.6±3.09	82.1±3.38	79.8±3.55	77.1±2.15
Monocytes (%)		5.5±0.83	4.6±1.17	5.2±1.00	6.3±1.23	5.5±0.91

All values are expressed as mean±SD, n=5

^aSignificantly different from the control group; *P*<0.05.

부생식기 주변에 가피가 관찰되었으며, 유선 피부 조직하에 cyst 1례, 음경꺼풀샘 cyst 1례가 관찰되었다. 수컷 대조군 정낭선/응고선 위축 1례, 신장 cyst 1례, 음경꺼풀샘 cyst 1례, 신장 위축 1례가 관찰되었다. 암컷의 경우에는 저용량 투여군에서 자궁각 cyst 1례, 난소 cyst 1례가 관찰되었으며, 중간용량 투여군에서 난소 cyst 1례가 관찰되었다. 이외의 전 동물에서는 특이할 만한 육안 소견은 관찰되지 않았다.

장기중량 관찰(Table 4 and Table 5): 부검 후 장기에 대한 절대중량을 측정한 결과, 수컷의 경우 우측 부신의 중간용량 투여군(0.0022 vs 0.0014 g)에서 유의한 감소가 관찰되었으며, 암컷의 좌측 신장중량에 있어서 고용량 투여군(0.2319 vs 0.1937 g)에서 유의한 감소가 관찰되었고, 우측 신장중량에서는 고용량 투여군(0.2344 vs 0.2013 g)에서 유의한 감소가 관찰되었다. 뇌 중량(0.5660 vs 0.5164 vs 0.5243 g)에서 중간용량 투여군 및 고용량 투여군에서 유의한 감소가 관찰되었다.

상대중량을 관찰한 결과, 수컷의 경우에는 우측 부신의

중간용량 투여군(0.0053 vs 0.0031 g)에서 유의한 감소가, 뇌의 중간용량 투여군(1.3035 vs 1.1638 g)에서 유의한 감소가 관찰되었다. 암컷의 비장 중량에서 저용량 투여군 및 중간용량 투여군(0.4246 vs 0.3569 vs 0.3538 g)에서 유의한 감소가 관찰되었으며, 간장 중량에 있어서 저용량 투여군, 중간용량 투여군, 고용량 투여군(5.0767 vs 4.5122 vs 4.3447 vs 4.3048 g)에서 유의한 감소가 관찰되었다. 좌우측 신장 중량에서 중간용량(0.7822 vs 0.6385, 0.7899 vs 0.6453 g) 및 고용량 투여군(0.7822 vs 0.6467, 0.7899 vs 0.6718 g)에서 유의한 감소가 관찰되었으며, 뇌 중량의 경우 저용량 투여군 및 중간용량 투여군(1.9093 vs 1.7064 vs 1.6069 g)에서 유의하게 감소하였다.

병리조직학적 검사(Table 6 and Figure 3): 병리조직학적 검사결과 대조군 및 고용량군의 암수 모두에서 다양한 병변이 관찰되었으나, 이 같은 소견들은 장기 특이성이 없을 뿐 아니라 용량의존성도 인정되지 않았다. 육안적 관찰에서 인정되었던 이상 소견들도 병리조직학적 검

Table 2. Summary of the serum biochemical values of mice intradermally treated with human fibroblasts in the 13-week toxicity study

Dosage in (cells/kg B.W.) Items		0 (Control)	7.5×10 ⁵	7.5×10 ⁶	7.5×10 ⁷	7.5×10 ⁷ (Syngeneic)
Male	Urea Nitrogen (mg/dL)	27.9±6.02	29.8±5.06	29.7±3.74	28.5±3.05	28.9±4.36
	Cholesterol (mg/dL)	145±26.8	131±27.8	149±23.9	144±23.4	130±14.8
	Total Protein (g/dL)	4.7±0.28	4.7±0.35	4.8±0.25	4.7±0.11	4.8±0.10
	Albumin (g/dL)	1.5±0.07	1.5±0.14	1.6±0.09	1.5±0.08	1.6±0.03
	Total Bilirubin (mg/dL)	0.1±0.06	0.1±0.04	0.1±0.05	0.1±0.04	0.0±0.04
	Alkaline Phosphatase (IU/L)	37±10.5	38±11.1	35±7.6	40±17.1	83±6.0
	Aspartate Aminotransferase (IU/L)	54±16.9	48±13.5	49±9.0	41±4.9	54±29.9
	Alanine Aminotransferase (IU/L)	25±10.0	19±4.9	20±5.8	17 ^a ±2.2	29±9.7
	Creatinine (mg/dL)	0.5±0.17	0.4±0.08	0.4±0.06	0.4±0.05	0.3±0.05
	Triglycerides (mg/dL)	67±41.0	45±18.4	52±18.0	50±23.3	62±27.7
	Glucose (mg/L)	173±35.9	170±29.4	178±19.2	187±30.4	173±15.8
	A/G ratio	0.5±0.03	0.5±0.06	0.5±0.03	0.5±0.03	0.5±0.00
	Potassium (mmol/L)	5.65±0.367	5.76±0.527	5.62±0.379	5.85±0.568	5.75±0.355
	Chlorine (mmol/L)	109.3±3.25	111.9±2.68	113.0 ^a ±1.91	113.2 ^a ±1.48	119.5±1.15
	Calcium (mg/dL)	8.3±0.29	8.5±0.22	8.4±0.24	8.2±0.29	8.4±0.23
	Phosphorus (mg/dL)	6.5±0.66	6.0±0.86	6.4±0.70	6.4±0.53	5.7±0.76
	Sodium (mmol/L)	149.9±2.39	150.4±1.03	151.5±0.95	152.0 ^a ±1.89	153.9±1.12
Female	Urea Nitrogen (mg/dL)	23.3±4.23	25.3±5.29	23.0±5.67	23.2±5.49	23.9±4.47
	Cholesterol (mg/dL)	90±16.3	93±19.7	101±13.7	102±15.5	89±8.0
	Total Protein (g/dL)	4.8±0.17	4.8±0.14	4.9±0.18	5.0 ^a ±0.20	4.7±0.15
	Albumin (g/dL)	1.6±0.06	1.6±0.07	1.7±0.08	1.6±0.07	1.6±0.08
	Total Bilirubin (mg/dL)	0.0±0.05	0.0±0.05	0.0±0.05	0.1±0.05	0.0±0.03
	Alkaline Phosphatase (IU/L)	66±11.3	80±31.2	61±13.8	70±20.2	92±4.7
	Aspartate Aminotransferase (IU/L)	60±8.8	57±8.1	54±5.2	57±10.9	80±28.2
	Alanine Aminotransferase (IU/L)	18±2.2	20±3.1	17±2.9	17±2.0	38±19.1
	Creatinine (mg/dL)	0.47±0.07	0.39 ^a ±0.06	0.40 ^a ±0.05	0.44±0.05	0.47±0.13
	Triglycerides (mg/dL)	67±21.5	75±48.6	79±48.4	63±30.4	86±29.7
	Glucose (mg/L)	182±15.1	198±36.6	203±24.8	189±24.7	181±35.7
	A/G ratio	0.5±0.00	0.5±0.00	0.5±0.00	0.5±0.00	0.5±0.00
	Potassium (mmol/L)	4.83±0.302	5.11±0.212	5.29 ^a ±0.465	5.33 ^a ±0.349	5.55±0.369
	Chlorine (mmol/L)	115.0±2.10	116.8±2.78	115.9±1.88	115.0±1.68	120.7±1.48
	Calcium (mg/dL)	8.1±0.35	8.3±0.12	8.1±0.23	8.0±0.42	8.1±0.21
	Phosphorus (mg/dL)	6.4±1.76	6.0±0.99	6.3±0.96	6.9±0.69	6.2±0.83
	Sodium (mmol/L)	150.0±1.32	149.7±1.76	150.0±1.62	150.9±1.79	152.1±1.90

All values are expressed as mean±SD, n=10
^aSignificantly different from the control group; P<0.05.

사에서 특이적인 이상을 나타내지 않았다. 따라서, 본 시험에서는 시험물질의 영향으로 인한 병리학적 소견은 관찰되지 않았다고 판단된다. 종양성 병변으로는 암컷 저용량 투여군 1례에서 자궁의 탈락막종(deciduoma)이 발견되었으나 투여와 관련된 병변은 아닌 것으로 판단된다 (Figure 3A). 시험물질 투여관련 비종양성 변화는 투여부위 (injection site)에서 발견되었다. 고용량(7.5×10⁷ cells/kg)을 투여한 ICR 마우스 암수와 BALB/c 수컷에서 투여부위의 이물 육아종성 염증 (foreign body granulomatous inflammation)이 발견되었다. 육아종은 유사피세포와 섬유세포로 둘러싸여 있었고, 육아종의 중심부위는 괴사되어 있었으며, 중심부위에 바늘모양의 결정 (needle-like crystals)

이 다수 발견되는 형태였다 (Figure 3B). 육아종은 투여물질의 잔류로 형성된 병변으로 판단된다. 수컷 BALB/c 마우스 간에서 중심 소엽성 공포 (centrilobular vacuolation)의 발생빈도가 증가된 채 관찰되었지만 수컷 BALB/c 마우스의 자연발생적인 배경병변으로 판단된다 (Figure 3C).

결과의 판정: 이상의 결과를 종합하면, 인간 섬유아세포의 ICR mouse에서 13주 독성시험 결과 무해용량 (NOEL)은 7.5×10⁷ cells/kg 이상으로 사료된다.

분포시험

사망률 및 일반 임상증상 관찰: 시험기간 중 시험물질

Table 3. Summary incidence of the gross findings of mice intradermally treated with human fibroblasts in the 13-week toxicity study

Sex	Male					Female					
	Dosage in (cells/kg B.W.)	0 (Control)	7.5×10 ⁵	7.5×10 ⁶	7.5×10 ⁷ (Syngeneic)	7.5×10 ⁷ (Syngeneic)	0 (Control)	7.5×10 ⁵	7.5×10 ⁶	7.5×10 ⁷	7.5×10 ⁷ (Syngeneic)
Tissue/Observation											
Skin											
scab around genitalia	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
Seminal vesicle/Coagulation gland											
atrophy	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
Kidney											
cyst	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
atrophy	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Preputial gland											
cyst	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
Mammary gland											
subcutaneous, mass	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
Uterus											
uterine horn, cyst	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
Ovary											
cyst	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	

을 이식한 전 군에서 사망례는 관찰되지 않았다. 또한 본 시험물질에 의한 것이라고 인정되는 임상증상 및 행동이상 등은 관찰되지 않았다.

체중변화: 체중변화에 있어 시험물질을 이식한 전 개체에서 시험기간 동안 대조군과 비교하여 유의한 체중의 증감은 관찰되지 않았다. 12주째에 대조군 전 개체에서 체중이 감소하는 양상이 관찰되었으나, 이는 사료공급의 오류로 인한 일시적인 체중감소로 시험물질에 의한 영향이 아닌 것으로 사료되며, 사료 공급 후 다시 회복됨을 확인하였다.

부검소견: 부검 시 특이할 만한 육안소견은 없었다.

체내분포양상평가(Figure 4): 인간 섬유아세포의 체내 분포 양상을 비교한 결과 이식부위에서 24시간, 4주, 13주까지 모두 관찰되었다. 13주에서는 저용량 투여군, Syngeneic 군의 경우, 고용량 투여군에 비해 적게 관찰되었다. 이식부위 이외의 장기에서는 시험물질의 분포를 관찰할 수 없었다.

결과의 판정: 본 시험 조건하에서 인간 섬유아세포는 이식부위에서 13주까지 잔존하는 것을 확인하였으며, 이식 부위 이외의 장기로는 분포되지 않는 것으로 확인되었다.

고 찰

피부세포치료제는 주름이나 여드름 흉터, 외상, 화상이

나 족부궤양 치료 이외에 각막재생이나 미용성형에 나아가 유전자치료의 도구로 사용할 수 있어 그 수요의 성장이 가속화될 전망이다. 이러한 인식에 따라 국내에서는 세포치료제의 활발한 개발이 이루어지고 있다. 세포치료제로서 개발을 위해서는 임상시험 전에 비임상시험 동물 모델에서의 안전성 평가는 필수적이다. 그러나 줄기 세포의 특성을 고려한 적절한 안전성 평가체계가 아직 확립되지 않고 있는 실정이다. 이에 본 연구에서는 세포치료제로 개발 단계의 인간 섬유아세포의 안전성을 평가하기 위해 발암성, 13주 독성 그리고 분포시험을 실시하였다.

세포치료제의 발암성 시험은 Lawrenz *et al.* (2004)에 의해 소개되고 있는 방법을 참고로 하여, A375 cell line을 양성 대조군으로 두고 종양 발생을 시험물질 이식군과 비교하였다. 투여방식 및 용량은 임상(예정)투여 경로 및 용량을 근거로 하여 진피 내에 2주에 1회씩 총 3회 이식하였다. 인간 섬유아세포의 BALB/c-nu mouse를 이용한 발암성시험 결과 인간 섬유아세포는 7.5×10⁷ cells/kg B.W. 농도 이하에서 종양을 유발하지 않는 것으로 사료된다. 이번 실험을 통해 세포치료제의 발암성 평가를 위한 실험 프로토콜을 설계하고 수립할 수 있었고, 인간 섬유아세포의 실험동물에서의 종양형성여부를 확인함으로써 안전성을 확보할 수 있었다. 유사한 발암성시험으로, 개의 지방세포 유래 성체 중간엽줄기세포의 발암성시험에서도 줄기세포를 통한 발암성이 존재하지 않음을 확인하였다(Lee *et al.*, 2007).

보통 세포치료제가 치료목적으로 사용될 경우, 효력을 발휘하기 위해 많은 수의 세포가 투여되는데, 이에 대한 독성 연구가 미비하다. 많은 동물실험을 통한 연구(Liu *et al.*, 2006; Kovacsovics-Bankowski *et al.*, 2008; Vilata

Table 4. Summary of the absolute organ weight values of mice intradermally treated with human fibroblasts in the 13-week toxicity study

	Dosage in (cells/kg B.W.) Items	0 (Control)	7.5×10 ⁵	7.5×10 ⁶	7.5×10 ⁷	7.5×10 ⁷ (Syngeneic)	
Male	Necropsy B.W.	40.762±4.0029	41.344±3.6593	44.974±3.6543	42.974±2.0398	30.104±1.1436	
	Liver	1.7901±0.16666	1.7511±0.27671	1.8204±0.22916	1.7679±0.18372	1.2883±0.07363	
	Spleen	0.1055±0.01088	0.1369±0.10339	0.1171±0.01905	0.1218±0.03607	0.1047±0.00763	
	Kidney (R)	0.3868±0.03910	0.3332±0.04844	0.3847±0.04270	0.3762±0.07540	0.2558±0.01737	
	Kidney (L)	0.3397±0.10191	0.3352±0.04346	0.3772±0.04318	0.3754±0.05737	0.2552±0.02100	
	Adrenal gland (R)	0.0022±0.00078	0.0018±0.00029	0.0014 ^a ±0.00036	0.0023±0.00087	0.0016±0.00037	
	Adrenal gland (L)	0.0019±0.00067	0.0017±0.00051	0.0018±0.00054	0.0019±0.00033	0.0017±0.00054	
	Testis (R)	0.1227±0.01143	0.1356±0.03263	0.1279±0.02309	0.1410±0.02902	0.0869±0.00636	
	Testis (L)	0.1166±0.01088	0.1336±0.02572	0.1220±0.02002	0.1340±0.02722	0.0871±0.00601	
	Thymus	0.0265±0.00761	0.0236±0.00891	0.0252±0.00560	0.0264±0.00644	0.0329±0.00628	
	Heart	0.2007±0.01231	0.1952±0.01432	0.2072±0.01557	0.2116±0.01665	0.1601±0.00675	
	Lung	0.2187±0.01975	0.2200±0.02618	0.2294±0.02111	0.2240±0.03275	0.1739±0.00676	
	Brain	0.5278±0.03416	0.5284±0.02479	0.5207±0.02861	0.5158±0.03345	0.4621±0.01730	
	Pituitary gland	0.0022±0.00119	0.0019±0.00078	0.0023±0.00077	0.0025±0.00065	0.0011±0.00043	
	Female	Necropsy B.W.	29.766±2.1488	31.732±4.7132	32.533±4.2496	29.952±1.6575	22.826±0.8165
		Liver	1.5100±0.18402	1.4322±0.25739	1.4174±0.24199	1.2905±0.15086	1.0378±0.10895
Spleen		0.1267±0.02137	0.1127±0.02482	0.1143±0.01428	0.1107±0.01865	0.1043±0.00845	
Kidney (R)		0.2344±0.02964	0.2211±0.02669	0.2072±0.02336	0.2013 ^a ±0.02411	0.1532±0.01738	
Kidney (L)		0.2319±0.02718	0.2200±0.02989	0.2056±0.02367	0.1937 ^a ±0.02295	0.1521±0.01735	
Adrenal gland (R)		0.0032±0.00078	0.0034±0.00058	0.0034±0.00081	0.0032±0.00081	0.0038±0.00046	
Adrenal gland (L)		0.0034±0.00102	0.0036±0.00095	0.0036±0.00082	0.0036±0.00102	0.0038±0.00051	
Ovary (R)		0.0141±0.00378	0.0137±0.00429	0.0164±0.00954	0.0129±0.00291	0.0087±0.00226	
Ovary (L)		0.0134±0.00471	0.0137±0.00452	0.0140±0.00296	0.0128±0.00264	0.0090±0.00186	
Thymus		0.0314±0.00655	0.0307±0.00858	0.0363±0.00957	0.0328±0.00830	0.0302±0.00515	
Heart		0.1548±0.01067	0.1483±0.01253	0.1534±0.01285	0.1436±0.00928	0.1217±0.00795	
Lung		0.2033±0.03259	0.2024±0.01867	0.2107±0.02600	0.1897±0.01596	0.1683±0.03073	
Brain		0.5660±0.02970	0.5328±0.03978	0.5164 ^a ±0.01997	0.5243 ^a ±0.03318	0.4573±0.02700	
Pituitary gland		0.0021±0.00079	0.0025±0.00101	0.0027±0.00082	0.0026±0.00051	0.0016±0.00079	

All values are expressed as mean±SD, n=10
^aSignificantly different from the control group; *P*<0.05.

et al., 2008)에서 치료 목적의 세포에 대한 안전성 평가를 실시하였는데, 이는 의약품등의 독성시험 기준에 비교할 때 많은 항목들이 간과되고 있다. 비임상시험 독성시험의 디자인은 노출 경로, 투여방법, 기간과 관련하여 제품의 예정 임상 농도를 최대한 반영해야 한다. 따라서 실험동물, 투여방식, 투여용량, 암수 성별 등을 고려한 세포치료제에 적합한 독성 평가항목을 정립하는 것이 중요한 과제이다. 이에 ICR mouse에서의 13주 독성시험은 임상예정용량을 저용량 투여군(7.5×10⁵ cells/kg B.W.)으로 설정하였고, 공비 10으로 중간용량 투여군(7.5×10⁶ cells/kg B.W.), 고용량 투여군(7.5×10⁷ cells/kg B.W.)을 두었으며, 동일한 부피의 부형제(Ringer's solution)만을 투여하는 용매대조군을 두어 각 군 당 암수 각각 20마리로 구성하였다. 동종의 세포에 대한 영향을 비교하기 위하여 BALB/c mouse에서 분리한 세포를 동종마우스에 피내 투여하여 병행 실시하였다. 시험물질의 투여는 주 1회 4주간 총 4회 투여하였다. 시험 기간 중 사망례는 없었으며, 수컷

저용량 투여군 2례에서 외부생식기 주변에 가피가 관찰되었으나 이는 개체간의 공격에 의한 것으로 사료되며, 이외의 동물은 시험물질에 의한 사망이나 특징적인 임상 증상은 관찰되지 않았다. 체중변화에 있어서 암수 전 개체에서 대조군과 비교하여 유의한 체중변화는 관찰되지 않았다. 사료음수 섭취량, 혈액학적 및 혈청 생화학적 검사, 노검사, 안검사에서는 일부 유의성 있는 변화가 관찰되었으나, 용량의존적 변화는 관찰되지 않았고 정상적인 범위에서 변화되어 시험물질에 의한 직접적인 변화로는 인정되지 않았다. 장기중량에서는 수컷의 경우 부신, 뇌, 암컷의 경우 비장, 간장, 신장, 뇌 등에서 대조군에 비하여 유의한 감소를 보였으나 조직병리학적 검사에서는 이상 소견이 관찰되지 않았다. 부검 시 육안 병변은 일부 장기에서 경미한 병변들이 관찰되었으나, 시험물질투여와 관련이 없는 우발적 병변들로서 독성학적인 중요성이 인정되지 않는 병변들이 대부분이었다. 또한, 병리조직학적 관찰에서도 시험물질 투여로 인한 병변은 관찰되지 않았

Table 5. Summary of the relative organ weight values of mice intradermally treated with human fibroblasts in the 13-week toxicity study

Dosage in (cells/kg B.W.) Items		0 (Control)	7.5×10 ⁵	7.5×10 ⁶	7.5×10 ⁷	7.5×10 ⁷ (Syngeneic)
Male	Liver	4.4074±0.37572	4.2472±0.68045	4.0524±0.42968	4.1148±0.39717	4.2811±0.21926
	Spleen	0.2615±0.03979	0.3333±0.25253	0.2616±0.04547	0.2846±0.08752	0.3482±0.02867
	Kidney (R)	0.9580±0.14322	0.8092±0.12505	0.8599±0.11004	0.8762±0.17409	0.8512±0.07282
	Kidney (L)	0.8234±0.23827	0.8139±0.10962	0.8418±0.10106	0.8754±0.14099	0.8487±0.07948
	Adrenal gl. (R)	0.0053±0.00210	0.0045±0.00083	0.0031 ^a ±0.00088	0.0054±0.00199	0.0052±0.00130
	Adrenal gl. (L)	0.0047±0.00174	0.0043±0.00136	0.0040±0.00108	0.0045±0.00074	0.0055±0.00179
	Testis (R)	0.3029±0.03427	0.3297±0.08319	0.2849±0.05186	0.3282±0.06661	0.2886±0.01859
	Testis (L)	0.2875±0.03110	0.3249±0.06666	0.2723±0.04779	0.3116±0.06120	0.2894±0.02088
	Thymus	0.0643±0.01552	0.0570±0.01997	0.0559±0.01079	0.0609±0.01226	0.1096±0.02202
	Heart	0.4973±0.06634	0.4745±0.06620	0.4628±0.04435	0.4929±0.03958	0.5321±0.02012
	Lung	0.5388±0.04699	0.5331±0.05693	0.5120±0.05202	0.5216±0.07454	0.5779±0.01863
	Brain	1.3031±0.12197	1.2847±0.10116	1.1638 ^a ±0.10608	1.2024±0.08977	1.5366±0.07300
	Pitui gl.	0.0056±0.00296	0.0046±0.00166	0.0052±0.00173	0.0058±0.00147	0.0036±0.00147
	Female	Liver	5.0767±0.53478	4.5122 ^a ±0.46906	4.3447 ^a ±0.33141	4.3048 ^a ±0.40825
Spleen		0.4246±0.05509	0.3569 ^a ±0.07185	0.3538 ^a ±0.04581	0.3690±0.05488	0.4566±0.02726
Kidney (R)		0.7899±0.10581	0.7030±0.08251	0.6453 ^a ±0.10106	0.6718 ^a ±0.06802	0.6705±0.06607
Kidney (L)		0.7822±0.10155	0.6986±0.08591	0.6385 ^a ±0.08979	0.6467 ^a ±0.06338	0.6655±0.06240
Adrenal gl. (R)		0.0108±0.00250	0.0109±0.00282	0.0107±0.00274	0.0109±0.00320	0.0166±0.00228
Adrenal gl. (L)		0.0116±0.00346	0.0116±0.00397	0.0114±0.00286	0.0122±0.00384	0.0166±0.00234
Ovary (R)		0.0472±0.01197	0.0440±0.01504	0.0514±0.03374	0.0433±0.01102	0.0381±0.00941
Ovary (L)		0.0452±0.01522	0.0436±0.01383	0.0432±0.00835	0.0427±0.00962	0.0394±0.00829
Thymus		0.1057±0.02227	0.0970±0.02412	0.1109±0.02395	0.1097±0.02702	0.1326±0.02355
Heart		0.5214±0.04078	0.4727±0.05139	0.4772±0.06159	0.4808±0.04046	0.5337±0.03907
Lung		0.6860±0.12016	0.6466±0.08533	0.6580±0.12504	0.6359±0.07578	0.7358±0.12210
Brain		1.9093±0.15899	1.7064 ^a ±0.24086	1.6069 ^a ±0.17705	1.7546±0.13659	2.0028±0.08342
Pitui gl.		0.0070±0.00270	0.0077±0.00310	0.0084±0.00238	0.0086±0.00203	0.0068±0.00339

All values are expressed as mean±SD, n=10

^aSignificantly different from the control group; *P*<0.05.

다. 동종의 세포에 대한 영향을 비교하기 위하여 BABL/c mouse에서 분리한 세포를 동종마우스에 피내 투여하여 병행 실시한 결과, 계통간의 차이는(ICR vs BALB/c) 관찰되었으나 시험물질 투여에 의한 독성학적 변화는 관찰되지 않았다. 결론적으로 인간 섬유아세포의 ICR mouse에서 13주 독성시험 결과, 인간 섬유아세포의 무해용량(NOEL)은 7.5×10⁷ cells/kg B.W. 이상일 것으로 판단된다.

이식한 세포의 생존이나 원하는 부위에서의 생착 확인, 다른 장기로의 이동 및 분화 등에 대한 연구는 동물모델에서의 분포시험으로 평가할 수 있다. 세포치료제의 분포 시험의 방법으로는 이식한 세포를 dye로 염색하여 형광현미경을 통해 확인하는 방법(Hebda *et al.*, 1999; Ferrari *et al.*, 2001; Moeller *et al.*, 2003; Sandulache *et al.*, 2003), 방사선동위원소를 처리하고 이를 감마 카메라로 검색하는 방법(Allers *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2005), enhanced green fluorescent protein (eGFP)의 발현을 확인하는 방법(Meyerrose *et al.*, 2007), 이식세포의 특이 gene의 검색을 통한 PCR (Vilata *et al.*, 2008) 및 in situ hybridization 방법(Cho *et al.*, 2002; Bente *et*

al., 2006), 또한 bioluminescence imaging(Vilata *et al.*, 2008), MRI (Bulte *et al.*, 2002)나 PET (Adonai *et al.*, 2002) 등의 진단영상 장비를 활용한 방법 등이 다양한 방법을 통해 실시되고 있다. 특히 섬유아세포의 분포시험은 토끼의 CM-Dil로 세포막을 염색한 자가, 동종, 이종 섬유아세포를 피부 상처를 만든 후 이식한 실험에서 24 일간의 관찰기간동안 세포가 생존함을 형광현미경을 통해 관찰한 문헌이 있다(Hebda *et al.*, 1999; Sandulache *et al.*, 2003). 본 연구의 인간 섬유아세포의 체내 분포 양상을 평가하기 위하여 실시한 ICR mouse를 이용한 분포 시험은 세포막에 형광표지(CellTracker™CM-Dil)를 하였으며, 슬라이드 제작 후 형광현미경으로 관찰하는 방법을 사용하였다. 이 방법은 고가의 장비가 필요없으며 세포 염색법이 간단한 장점이 있지만, 많은 슬라이드를 제작함으로써 그에 대한 노력과 비용이 드는 단점이 있었다. 임상예정용량(4.5×10⁷ cells/60kg) 및 13주 독성시험의 투여 용량을 고려하여 저용량 투여군(7.5×10⁵ cells/kg B.W.) 및 고용량 투여군(7.5×10⁷ cells/kg B.W.)을 두었으며, 동일한 부피의 부형제(Ringer's solution)만을 투여하는 용매대조군

Table 6. Summary incidence of the microscopic observations of mice intradermally treated with human fibroblasts in the 13-week toxicity study

Dosage in (cells/kg B.W.) Tissue/Observation	Male					Female				
	0 (Control)	7.5×10 ⁵	7.5×10 ⁶	7.5×10 ⁷	7.5×10 ⁷ (syngeneic)	0 (Control)	7.5×10 ⁵	7.5×10 ⁶	7.5×10 ⁷	7.5×10 ⁷ (syngeneic)
Liver										
Number examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Glycogen vacuolation	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Centrilobular vacuolation	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0
Parenchymal inflam cell foci	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
Eosinophilic focus	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Kidneys										
Number examined	10	10	10	10	10	10	9	10	10	10
Cortical cyst	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pelvic dilatation	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cortical vacuolation	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nephropathy	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Subtransi. epi. inflam. infil	3	5	5	3	2	5	7	5	4	4
Interstitial inflam cells	2	4	2	0	1	1	4	1	0	1
Tubular cast(s)	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0
Tubular basophilia	0	1	2	1	1	1	0	1	0	0
Tubular hypertrophy, focal	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Adrenal glands										
Number examined	8	10	9	10	10	10	9	10	10	10
Cortical inflammatory cells	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0
Pigmentation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Subcapsular cell focus	0	0	1	2	8	5	8	5	6	9
Urinary bladder										
Number examined	10	10	10	10	10	10	9	10	10	10
Transi epi-subepi inflam cells	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Spleen										
Number examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Haemopoiesis	2	6	5	7	8	8	7	8	6	2
Pancreas										
Number examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
No abnormalities detected	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Thymus										
Number examined	2	0	3	4	10	10	10	10	10	9
Involution/atrophy	2	0	3	4	3	6	7	4	7	5
Thyroid										
Number examined	5	7	8	8	9	10	7	8	5	9
Ectopic thymus	0	0	0	0	0	1	0	2	3	0
Follicular distension	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Parathyroid glands										
Number examined	1	3	2	1	2	3	0	6	3	1
Lymphoid cells	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Trachea										
Number examined	8	9	10	9	10	9	8	9	6	9
Inflam cell debris in lumen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Subepithelial inflam cells	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
Oesophagus										
Number examined	9	10	10	10	10	10	8	8	9	10
Submucosal inflammatory cells	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Tongue										
Number examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Mast cells	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

Table 6. Continued

Dosage in (cells/kg B.W.) Tissue/Observation	Male					Female				
	0 (Control)	7.5×10 ⁵	7.5×10 ⁶	7.5×10 ⁷	7.5×10 ⁷ (syngeneic)	0 (Control)	7.5×10 ⁵	7.5×10 ⁶	7.5×10 ⁷	7.5×10 ⁷ (syngeneic)
Lung										
Number examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Perivascular inflam cells	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
Alveolar macrophages	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Osseous metaplasia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Heart										
Number examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Myocardial inflam cells	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Epicardial inflammatory cells	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Salivary gland										
Number examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Perivascular inflam cells	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Cervical lymph nodes										
Number examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
No abnormalities detected	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Forestomach										
Number examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Submucosal inflammatory cells	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
Epithelial inflam cells	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Glandular stomach										
Number examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Glandular cyst(s)	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
Submucosal inflammatory cells	0	2	3	1	1	0	1	0	0	0
Epithelial hyperplasia	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Small intestine										
Number examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
No abnormalities detected	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Large intestine										
Number examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
No abnormalities detected	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Mesenteric lymph nodes										
Number examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
No abnormalities detected	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Preputial/Clitoral glands										
Number examined	10	10	10	10	10	9	9	9	9	10
Inflammation	1	0	1	2	2	2	1	0	0	0
Skin/mammary gland										
Number examined	10	10	10	9	10	10	10	10	10	10
Scab	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pannicu muscle-inflam cells	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Epidermal hyperplasia	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Deep dermal inflam cells	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Pannicu muscle-degeneration	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Subcutaneous granuloma	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
Eye										
Number examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
No abnormalities detected	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Haderian gland										
Number examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Inflammatory cell infiltration	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

Table 6. Continued

Dosage in (cells/kg B.W.) Tissue/Observation	Male					Female				
	0 (Control)	7.5×10 ⁵	7.5×10 ⁶	7.5×10 ⁷	7.5×10 ⁷ (syngeneic)	0 (Control)	7.5×10 ⁵	7.5×10 ⁶	7.5×10 ⁷	7.5×10 ⁷ (syngeneic)
Brain										
Number examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
No abnormalities detected	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Pituitary										
Number examined	8	9	10	9	10	9	10	9	10	10
Cyst	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Femur/Bone marrow										
Number examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Granulocyte hyperplasia	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Nasal turbinates										
Number examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Olf epi-eosinophilic inclusion	4	6	2	3	1	4	7	5	5	5
Inflam cell debris in lumen	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0
Olf epi-inflammatory cells	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Olf epi-subepi inflam cells	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resp epi-inflammatory cells	1	3	0	3	0	1	0	0	0	0
Resp epi-subepi inflam cells	1	5	2	3	4	4	3	2	1	2
Resp epi-eosinophilic inclusio	2	3	1	2	1	1	5	3	4	7
Transi epi-inflam cells	0	3	1	3	1	0	0	0	0	0
Transi epi-subepi inflam cells	0	3	0	3	1	1	1	0	0	0
Resp epi-erosin	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Resp epi-hyperplasia	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Sternum+marrow										
Number examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Granulocyte hyperplasia	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Sciatic nerve										
Number examined	9	10	9	10	9	10	10	10	10	10
Perivascular inflam cells	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Testis										
Number examined	10	10	10	10	10	-	-	-	-	-
Seminiferous tubular degenerat	0	1	0	1	1	-	-	-	-	-
Seminiferous tubular vacuolati	0	0	0	0	1	-	-	-	-	-
Rete tubular hyperplasia	1	0	0	0	0	-	-	-	-	-
Epididymis										
Number examined	10	10	10	10	10	-	-	-	-	-
Sperm granuloma	0	0	0	1	0	-	-	-	-	-
Degenerate germ cells in lumen	0	0	0	0	2	-	-	-	-	-
Prostate										
Number examined	10	10	10	10	10	-	-	-	-	-
No abnormalities detected	10	10	10	10	10	-	-	-	-	-
Seminal vesicle										
Number examined	10	10	10	10	10	-	-	-	-	-
No abnormalities detected	10	10	10	10	10	-	-	-	-	-
Ovary										
Number examined	-	-	-	-	-	10	10	10	10	10
Cyst	-	-	-	-	-	0	3	1	2	0
Follicular cyst	-	-	-	-	-	1	0	0	0	0
Prominent corpus leuteum	-	-	-	-	-	0	0	0	2	0
Endometriosis	-	-	-	-	-	0	0	0	0	1

Table 6. Continued

Dosage in (cells/kg B.W.) Tissue/Observation	Male					Female				
	0 (Control)	7.5×10 ⁵	7.5×10 ⁶	7.5×10 ⁷	7.5×10 ⁷ (syngeneic)	0 (Control)	7.5×10 ⁵	7.5×10 ⁶	7.5×10 ⁷	7.5×10 ⁷ (syngeneic)
Uterus										
Number examined	-	-	-	-	-	10	10	10	10	10
Cystic glands	-	-	-	-	-	2	1	0	0	2
Luminal dilatation	-	-	-	-	-	4	5	6	3	3
Deciduoma	-	-	-	-	-	0	1	0	0	0
Vagina										
Number examined	-	-	-	-	-	10	10	10	10	10
Inflam cell debris in lumen	-	-	-	-	-	0	0	0	1	0
Injection site										
Number examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Scab	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
Pannicu muscle-regeneration	2	1	5	3	1	0	0	0	0	0
Pannicu muscle-inflam cells	2	1	5	4	1	0	0	0	0	1
Epidermal hyperplasia	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Deep dermal inflam cells	1	3	2	0	5	2	2	1	1	0
Pannicu muscle fibrosis	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
moderate	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Pannicu muscle-degeneration	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
Deep derm foreign body granulo	0	0	0	5	2	0	0	0	6	0
Subcutaneous inflam cells	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1

을 두었다. 이식경로 및 횡수는 임상 적용시와 동일하게 진피 내에 주 1회 4주간 총 4회 이식하였다. 동종의 세포에 대한 영향을 비교하기 위하여 BALB/c mouse에서 분리한 세포를 동종마우스에 피내 투여하여 병행 실시하였으며, 투여 개시 후 24시간, 4주, 13주에 부검하여 시간에 따른 분포 양상을 평가하였다. 체내 분포양상을 관찰한 결과, 24시간에서는 저용량 투여군, 고용량 투여군의 피내에서 이식한 세포가 강하게 붉은 빛으로 발현하는 것을 형광현미경을 통해 확인할 수 있었다. 형광의 강도는 투여한 세포의 용량에 비례하였다. 4주에서는 이식한 세포가 24시간의 관찰때보다 약한 강도의 형광을 나타내며, 역시 피내에서 관찰되었다. 13주에서도 비슷한 경향으로 좀더 약한 강도의 형광을 피내에서 관찰할 수

있었다. 형광 정도의 감소는 세포의 분열에 따라 형광이 반감된다(Hebda *et al.*, 1999; Sandulache *et al.*, 2003). BALB/c mouse에서의 동종 세포의 분포 시험 결과는 인간 섬유아세포 고용량 투여군과 같은 경향으로 관찰되었다. 이종 세포와 동종 세포의 피내 분포 경향은 차이가 없었다. 문헌(Schrepfer *et al.*, 2007; Vilalta *et al.*, 2008; Fischer *et al.*, 2009)에 의하면 정맥 투여시 폐 및 간 등으로의 이동이 관찰되는데, 본 시험에서는 다른 장기로의 이동은 관찰되지 않았다. 이는 투여경로의 차이에 의한 것으로, 정맥내 투여는 전신순환을 통해 폐의 모세혈관 및 간의 많은 소혈관에 이식세포가 걸리게되는 반면, 피내투여의 경우 이식한 부위에 한정하여 세포가 잔존함에 따른 것이라 고려된다.

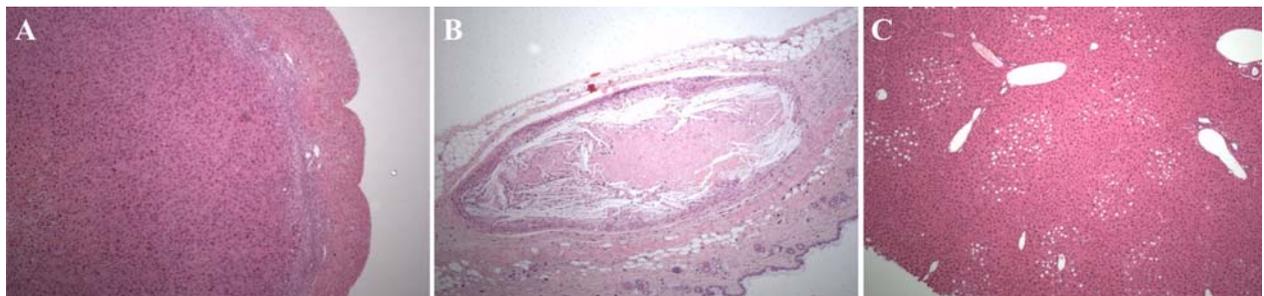


Figure 3. Microscopic findings of ICR mice intradermally treated with human fibroblasts in the 13-week toxicity study. (A) Deciduoma in uterus. ×40, (B) Granulomatous inflammation in the dermis. Note the needle-like crystals and necrosis. ×40, (C) Centrilobular vacuolation in liver. ×40. H&E.

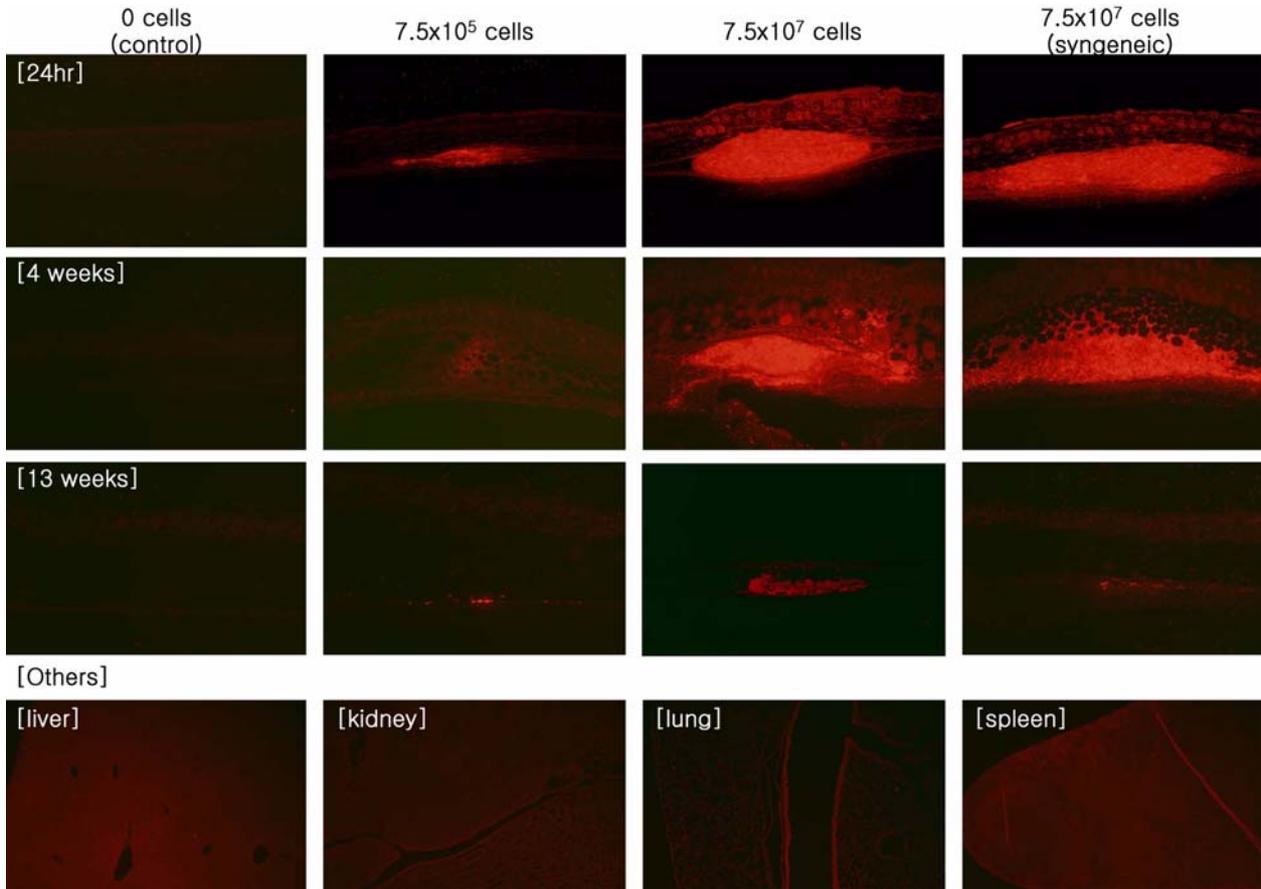


Figure 4. Photomicrographs of the skin and other organs of mice Intradermally treated with labeled human fibroblasts in the distribution study. The images from the first layer to the third layer are each skin sample at 24 hours, 4 weeks and 13 weeks (×100). The images of the fourth layer are other organs that were not detected with the labeled fibroblasts (×40).

세포치료제의 경우 임상적으로 인체 유래의 세포를 사람에게 다시 투여하므로 자가(autologous) 또는 동종(allogenic) 이식이 되나, 인간 유래의 세포치료제를 실험 동물에서 안전성 평가를 수행하게 되면, 이는 이종이식(xenogeneic transplantation)이 된다. 따라서, 사람과 동물 간의 면역반응의 차이로 인해 서로 다른 반응의 결과를 초래할 수 있다고 예측할 수 있어서, 동물실험시 실험동물의 선택이 중요하게 된다. 본 실험에서는 BALB/c mouse에서 분리한 세포를 동종마우스(BALB/c)에 이식(syngeneic transplantation)함으로써, 인간 섬유아세포를 ICR mouse를 이식한 이종이식군과 비교하여 면역학적 거부반응 등 이종이식에 따른 영향을 간접적으로 해석하였다. 앞으로 이러한 이종이식의 경우, 면역결핍동물인 누드마우스, SCID 마우스, transgenic 마우스를 이용하여 면역학적인 반응을 최소화하여 결과 해석을 원활히 할 수 있는 실험설계를 고려해야 할 것으로 사료된다.

결론적으로 본 시험 조건 하에서 인간 섬유아세포는 7.5×10⁷ cells/kg B.W. 농도 이하에서 종양을 유발하지 않으며, 무해용량(NOEL)은 7.5×10⁷ cells/kg B.W. 이상일 것

으로 판단되고, 이식부위에서 13주까지 잔존하며, 이식 부위 이외의 장기로는 분포되지 않는 것으로 확인되었다.

본 연구를 통해 발암성시험, 독성시험 그리고 분포시험으로 세포치료제의 안전성을 연구하였고, 이러한 전임상 안전성 평가 시스템은 세포치료제 평가 체제의 표준화 및 국제적인 조화에 기여할 것으로 기대된다.

참고문헌

Adonai, N., Nguyen, K.N., Walsh, J., Iyer, M., Toyokuni, T., Phelps, M.E., McCarthy, T., McCarthy, D.W. and Gambhir, S.S. (2002) *Ex vivo* cell labeling with ⁶⁴Cu-pyruvaldehyde-bis(N4-methylthiosemicarbazone) for imaging cell trafficking in mice with positron-emission tomography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(5), 3030-3035.

Allers, C., Sierralta, W.D., Neubauer, S., Rivera, F., Minguell, J.J. and Conget, P.A. (2004) Dynamic of distribution of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells after transplantation into adult unconditioned mice. *Transplantation* 78(4), 503-508.

Benten, D., Cheng, K. and Gupta, S. (2006) Identification of transplanted human cells in animal tissues. *Methods Mol.* 326, 189-201.

Boss, W.K., Jr., Usal, H., Chernoff, G., Keller, G.S., Lask, G.P. and

- Fodor, P.B. (2000) Autologous cultured fibroblasts as cellular therapy in plastic surgery. *Clin. Plast. Surg.* 27(4), 613-626.
- Bulte, J.W., Duncan, I.D. and Frank, J.A. (2002) *In vivo* magnetic resonance tracking of magnetically labeled cells after transplantation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22(8), 899-907.
- Cho, J.J., Malhi, H., Wang, R., Joseph, B., Ludlow, J.W., Susick, R. and Gupta, S. (2002) Enzymatically labeled chromosomal probes for *in situ* identification of human cells in xenogeneic transplant models. *Nat. Med.* 8(9), 1033-1036.
- Ferrari, A., Hannouche, D., Oudina, K., Bourguignon, M., Meunier, A., Sedel, L. and Petite, H. (2001) *In vivo* tracking of bone marrow fibroblasts with fluorescent carbocyanine dye. *J. Biomed. Mater. Res.* 56(3), 361-367.
- Fischer, U.M., Harting, M.T., Jimenez, F., Monzon-Posadas, W.O., Xue, H., Savitz, S.I., Laine, G.A. and Cox, C.S., Jr. (2009) Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. *Stem Cells Dev.* 18(5), 683-692.
- Galbraith, D.N. (2004) Regulatory and microbiological safety issues surrounding cell and tissue-engineering products. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 40(Pt 1), 35-39.
- Guerret, S., Govignon, E., Hartmann, D.J. and Ronfard, V. (2003) Long-term remodeling of a bilayered living human skin equivalent (Apligraf) grafted onto nude mice: immunolocalization of human cells and characterization of extracellular matrix. *Wound Repair Regen.* 11(1), 35-45.
- Hebda, P.A. and Dohar, J.E. (1999) Transplanted fetal fibroblasts: survival and distribution over time in normal adult dermis compared with autogenic, allogenic, and xenogenic adult fibroblasts. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 121(3), 245-251.
- Kovacsovics-Bankowski, M., Mauch, K., Raber, A., Streeter, P.R., Deans, R.J., Maziarz, R.T. and Van't Hof, W. (2008) Pre-clinical safety testing supporting clinical use of allogeneic multipotent adult progenitor cells. *Cytotherapy* 10(7), 730-742.
- Lawrenz, B., Schiller, H., Willbold, E., Ruediger, M., Muhs, A. and Esser, S. (2004) Highly sensitive biosafety model for stem-cell-derived grafts. *Cytotherapy* 6(3), 212-222.
- Lee, E.S., Kwon, E.A., Park, J.R., Kang, B.C., Kang, K.S. and Cho, M.H. (2007) Tumorigenesis study of canine adipose derived-mesenchymal stem cell. *J. Toxicol. Pub. Health* 23(3), 271-278.
- Lee, J.H., Kim, Y.K. and Lee, S.J. (2006) Treatment of Aplasia Cuti Congenita using allogenic dermal matrix and cultured epithelial autograft : A Case Report. *J. Korean Soc. Plast. Reconstr. Surg.* 33(5), 672-675.
- Liu, L., Sun, Z., Chen, B., Han, Q., Liao, L., Jia, M., Cao, Y., Ma, J., Sun, Q., Guo, M., Liu, Z., Ai, H. and Zhao, R.C. (2006) *Ex vivo* expansion and *in vivo* infusion of bone marrow-derived Flk-1+CD31-CD34- mesenchymal stem cells: feasibility and safety from monkey to human. *Stem Cells Dev.* 15(3), 349-357.
- Meyerrose, T.E., De Ugarte, D.A., Hofling, A.A., Herrbrich, P.E., Cordonnier, T.D., Shultz, L.D., Eagon, J.C., Wirthlin, L., Sands, M.S., Hedrick, M.A. and Nolte, J.A. (2007) *In vivo* distribution of human adipose-derived mesenchymal stem cells in novel xenotransplantation models. *Stem Cells* 25(1), 220-227.
- Moeller, F., Nielsen, F.C. and Nielsen, L.B. (2003) New tools for quantifying and visualizing adoptively transferred cells in recipient mice. *J. Immunol. Methods* 282(1-2), 73-82.
- Rubio, D., Garcia-Castro, J., Martin, M.C., de la Fuente, R., Cigudosa, J.C., Lloyd, A.C. and Bernad, A. (2005) Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res.* 65(8), 3035-3039.
- Sandulache, V.C., Zhou, Z., Sherman, A., Dohar, J.E. and Hebda, P.A. (2003) Impact of transplanted fibroblasts on rabbit skin wounds. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 129(3), 345-350.
- Schrepfer, S., Deuse, T., Reichenspurner, H., Fischbein, M.P., Robbins, R.C. and Pelletier, M.P. (2007) Stem cell transplantation: the lung barrier. *Transplant. Proc.* 39(2), 573-576.
- Seo, S.W., Chang, C.H., Cho, M.S., Hong, Y.G. and Jeon, S.W. (2007) Treatment of partial thickness skin defect with cultured allogenic keratinocytes (Kaloderm). *J. Korean Soc. Traumatol.* 20(1), 1-5.
- Thompson, M., Wall, D.M., Hicks, R.J. and Prince, H.M. (2005) *In vivo* tracking for cell therapies. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 49(4), 339-348.
- Trosko, J.E. and Tai, M.H. (2006) Adult stem cell theory of the multi-stage, multi-mechanism theory of carcinogenesis: role of inflammation on the promotion of initiated stem cells. *Contrib. Microbiol.* 13, 45-65.
- Vilalta, M., Degano, I.R., Bago, J., Gould, D., Santos, M., Garcia-Arranz, M., Ayats, R., Fuster, C., Chernajovsky, Y., Garcia-Olmo, D., Rubio, N. and Blanco, J. (2008) Biodistribution, long-term survival, and safety of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells transplanted in nude mice by high sensitivity non-invasive bioluminescence imaging. *Stem Cells Dev.* 17(5), 993-1003.
- Watson, D., Keller, G.S., Lacombe, V., Fodor, P.B., Rawnsley, J. and Lask, G.P. (1999) Autologous fibroblasts for treatment of facial rhytids and dermal depressions. A pilot study. *Arch. Facial Plast. Surg.* 1(3), 165-170.
- Yoon, S.H., Shim, J.S., Jung, J.M., Park, D.H. and Song, C.H. (2008) The usefulness of cultured allogenic keratinocyte for burn treatment. *J. Korean Soc. Plast. Reconstr. Surg.* 35(4), 413-418.