

발 간 등 록 번 호

안내서-0778-03

국민 안심이 기준입니다

건강기능식품 기능성 평가 가이드 (민원인 안내서)

-긴장완화 관련-

2022. 7.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

지침서 · 안내서 제 · 개정 점검표

명칭	건강기능식품 기능성 평가 가이드 (긴장완화 관련)
----	--------------------------------

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

등록대상 여부	☐ 이미 등록된 지침서 · 안내서 중 동일 · 유사한 내용의 지침서 · 안내서가 있습니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 기존의 지침서 · 안내서의 개정을 우선적으로 고려하시기 바랍니다. 그럼에도 불구하고 동 지침서 · 안내서의 제정이 필요한 경우 그 사유를 아래에 기재해 주시기 바랍니다. (사유 :)	
	☐ 법령(법 · 시행령 · 시행규칙) 또는 행정규칙(고시 · 훈령 · 예규)의 내용을 단순 편집 또는 나열한 것입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 단순한 사실을 대외적으로 알리는 공고의 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 1년 이내 한시적 적용 또는 일회성 지시 · 명령에 해당하는 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 외국 규정을 번역하거나 설명하는 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 신규 직원 교육을 위해 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 정리한 자료입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☞ 상기 사항 중 어느 하나라도 '예'에 해당되는 경우에 지침서 · 안내서 등록 대상이 아닙니다. 지침서 · 안내서 제 · 개정 절차를 적용하실 필요는 없습니다.	
지침서 · 안내서 구분	☐ 내부적으로 행정사무의 통일을 기하기 위하여 반복적으로 행정사무의 세부기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용)	☐ 예(☞지침서) ☒ 아니오
	☐ 대내외적으로 법령 또는 고시 · 훈령 · 예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것입니까? (민원인용)	☒ 예(☞지침서) ☐ 아니오
기타 확인 사항	☐ 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설 · 강화하거나 민원인을 구속하는 내용이 있습니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고 지침서 · 안내서 제 · 개정 절차를 진행하시기 바랍니다.	

상기 사항에 대하여 확인하였음.

2022년 7 월 일

담당자
확 인(부서장)

이 해 영

이 안내서는 건강기능식품 기능성 원료 평가에 대하여 이해를 돕고자, 현재의 과학기술 수준에서 일반적인 사항과 시험방법 등이 제시된 참고자료이며, 질병에 관련된 내용이 포함되는 경우 기능성에 대한 전반적인 이해를 돕기 위한 것이지, 질병의 치료 및 예방을 목적으로 기능성을 설명하는 것은 아닙니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술방식 (‘~하여야 한다’ 등)에도 불구하고 민원인 여러분께서 반드시 준수하셔야 하는 사항이 아님을 알려드립니다. 또한, 본 안내서는 2022년 현재의 과학적·기술적 사실 및 유효한 법규를 토대로 작성되었으므로 이후 최신 개정 법규 내용 및 구체적인 사실관계 등에 따라 달리 적용될 수 있음을 알려드립니다.

※ “민원인 안내서”란 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것(식품의약품 안전처 지침서등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 본 안내서에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전평가원 식품위해 평가부 영양기능연구과으로 문의하시기 바랍니다.

전화번호: 043-719-4402, 4409, 4416, 4417, 4419, 4422, 4428, 4429

팩스번호: 043-719-4420

제·개정 이력

연번	제·개정번호	승인일자	주요내용
1	안내서-0778-01	2014.12.	제정
2	안내서-0778-02	2020.9.	개정 (기능성 시험방법 등 업데이트)
3	안내서-0778-03	2022.7.	개정 (시험 설계 시 고려사항 등 업데이트)

※ 건강기능식품의 기능성 개요	1
------------------------	---

※ 약어	3
------------	---

I 서론	4
-------------	----------

II 일반적 사항	4
------------------	----------

1. 스트레스	4
2. 스트레스에 대한 반응	6
3. 스트레스 관련 호르몬	7
4. 스트레스와 사이토카인	9

III 기능성 시험 방법	10
----------------------	-----------

1. 바이오마커의 선정	10
2. 주요 바이오마커의 측정 방법	19
3. 시험 설계 시 고려사항	30

IV 참고문헌	37
----------------	-----------

건강기능식품의 기능성 개요

□ 기능성 정의

「건강기능식품에 관한 법률」 제3조(정의) : 기능성이란 인체의 구조와 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 말한다.

□ 기능성 구분

건강기능식품의 기능성은 3가지로 구분할 수 있다.

○ 건강기능식품의 기능성 구분

기능성 구분	기능성 내용	기능성을 가진 원료 또는 성분
영양소 기능	인체의 정상적인 기능이나 생물학적 활동에 대한 영양소의 생리학적 작용	영양소
생리활성 기능	인체의 정상기능이나 생물학적 활동에 특별한 효과가 있어 건강상의 기여나 기능 향상 또는 건강유지·개선을 나타내는 기능	기능성 원료
질병발생 위험감소 기능	질병의 발생 또는 건강상태의 위험감소와 관련한 기능	

□ 건강기능식품 기능성 원료의 기능성 내용과 인정기준

건강기능식품 기능성 원료의 기능성 내용과 인정기준은 다음과 같다.

○ 건강기능식품 기능성 원료의 기능성 내용과 인정기준

구분	기능성 내용	인정기준
질병발생 위험 감소 기능 ¹⁾	○○발생위험 감소에 도움을 줌	기반연구 자료를 통해 생리화학적 효과 또는 기전이 명확하게 입증되어야 하고 일관성 있는 바이오마커의 개선효과가 다수의 인체적용시험(RCT)에서 확보 되어야 함 ※ 질병 관련 바이오마커의 확인
생리활성 기능 ²⁾	○○에 도움을 줄 수 있음	기반연구 자료를 통해 기능성 있는 생리화학적 효과 또는 기전을 추측할 수 있어야 하고 일관성 있는 바이오마커의 개선효과가 최소 1건 이상의 인체적용시험(RCT)에서 확보되어야 함(추측 제안기전과 관련한 바이오마커가 기반연구시험과 인체적용시험에서 일관성 있게 확인 되어야 함) ※ 생리활성 관련 바이오마커의 확인

- 1) 제출된 기능성 자료가 질병의 발생 위험 감소를 나타내며, 확보된 과학적 근거 자료의 수준이
상당한 과학적 합의(Significant Scientific Agreement)에 이를 수 있을 정도로 높을 경우
인정. 상당한 과학적 합의(Significant Scientific Agreement)란 성분 또는 원료와 건강효과
간의 상관성이 새로운 과학에 의해 뒤집어지지 않을 정도의 수준으로 관련 분야의 전문가들에
의한 만장일치에 가까운 합의 수준을 말함
- 2) 제출된 기능성 자료가 인체의 정상기능이나 생물학적 활동에 특별한 효과가 있어 건강상의 기여나
기능향상 또는 건강유지개선을 나타내는 경우 인정

약 어

5-HIAA	5-hydroxyindolacetic acid
ACTH	Adrenocorticotrophic hormone
BAI	Beck anxiety inventory
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BDI	Beck depression inventory
CLIA	Chemiluminescent immunoassay
CRF	Corticotropin releasing factor
CRH	Corticotropin releasing hormone
DHEA	Dehydroepiandrosterone
DOPAC	3,4-dihydroxyphenylacetic acid
EEG	Electroencephalogram
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
HAM-A	Hamilton anxiety rating scale
HAM-D	Hamilton depression rating scale
HPA	Hypothalamic pituitary adrenal
HPLC	High performance liquid chromatography
HVA	Homovanillic acid
HPA	Hypothalamic-pituitaryadrenal axis
HRV	Heart rate variability
IFN	Interferon
IgE	Immunoglobulin E
IHC	Immunohistochemistry
IL	Interleukin
LDH	Lactate dehydrogenase
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MAO	Monoamine oxidase
NGF	Nerve growth factor
NSF	Novelty suppression of feeding
PSS	Perceived stress scale
POMS	Profile of mood states
RIA	Radio immune assay
SRI	Stress response inventory
STAI	State trait anxiety inventory
TNF	Tumor necrosis factor
VAS	Visual analogue stress

I 서론

이 가이드는 건강기능식품 기능성원료를 개발하는 연구자 및 영업자에게 식품의약품 안전처의 기능성(긴장완화 관련) 평가 원칙 및 기준 등을 알림으로써 산업체의 기능성원료 연구개발에 적정을 기하고 효율성을 높이고자 작성되었다.

II 일반적 사항

1. 스트레스

스트레스의 어원은 ‘Strictus: 팽팽한 혹은 좁은’ 또는 ‘Stringere: 팽팽하다’이며 심리학에서 스트레스(stress)는 스트레스 요인에 대항하기 위한 심신의 변화과정을 뜻하고 우리말로로는 정신압박(精神壓迫)이라고도 한다. 감정적 또는 물리적 위협이나 위험 등 외부의 압력을 스트레스 요인(stressor)이라고 하며 스트레스 요인에 의해서 긴장, 흥분, 각성 또는 불안과 같은 생리적 반응이 일어나게 되는데 이러한 반응으로부터 원상태로 돌아가려는 반작용을 스트레스라고 한다.

스트레스 요인 또는 외부로부터 오는 자극에 체내가 노출되면 자극에 대응하기 위해 아래와 같이 스스로를 변화시키는 작용을 하여 스트레스 요인으로 인한 체내 항상성을 유지하려고 한다. 이와 같은 사실에 기초하여 한스 셀리에(Hans Selye)는 ‘일반 적응 증후군(general adaptation syndrome; GAS)’이라는 개념을 발표했다. 여기서 일반(general)이란 스트레스의 결과가 신체 부위에 영향을 준다는 뜻이고, 적응(adaptation)이란 스트레스의 원인으로부터 신체를 대처 또는 적응시킨다는 의미이며, 증후군(syndrome)이란 스트레스 결과에 의해 어떤 반응이 일어난다는 의미이다. 스트레스에 대한 반응은 경보반응(alarm reaction), 저항단계(resistance stage), 탈진단계(exhaustion stage)의 3단계로 나타난다. 경보반응은 스트레스 요인이 처음 나타날 때 일어나며, 이때 신체의 저항력은 정상 수준보다 떨어지게 되고 신체는 빠르게 방어적인 반응을 나타낸다. 신체의 방어반응에도 스트레스가 지속되면, 신체는 스트레스 원인을 제거하기 위해 다양한 호르몬 등을 분비시켜서 스트레스

자극에 저항하고 신체를 균형 상태로 유지시키는 데 이를 저항단계라고 한다. 만약 스트레스가 지속된다면 신체는 에너지를 더 소진시켜 저항력은 완전히 고갈되는 탈진단계가 나타난다.

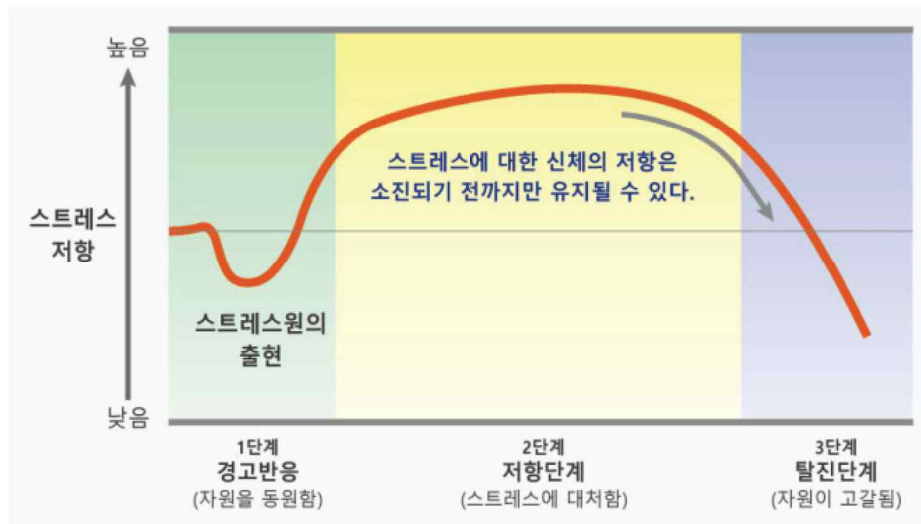


그림 1. 일반 적응 증후군

[출처: Selye H, The stress of life, McGraw-Hill; 1956]

2. 스트레스에 대한 반응

스트레스 반응 초기에는 교감신경계와 부신수질로부터 에피네프린과 노르에피네프린의 분비가 증가한다. 이 시스템은 신경전달물질인 카테콜라민을 수 초 내에 분비함으로써 항상성을 위협하는 상황에 반응을 한다. 이후 시상하부-뇌하수체-부신수질(HPA; Hypothalamus-pituitary-adrenal) 축 시스템으로 뇌의 시상하부에서 부신피질호르몬 유리 호르몬(CRH; Corticotropin releasing hormone)이 분비되고 CRH가 뇌하수체를 자극하면 뇌하수체에서 부신피질 자극 호르몬(ACTH; Adrenocorticotrophic hormone)이 분비되고 ACTH가 부신에서 에피네프린과 코르티코이드를 분비하게 만든다.

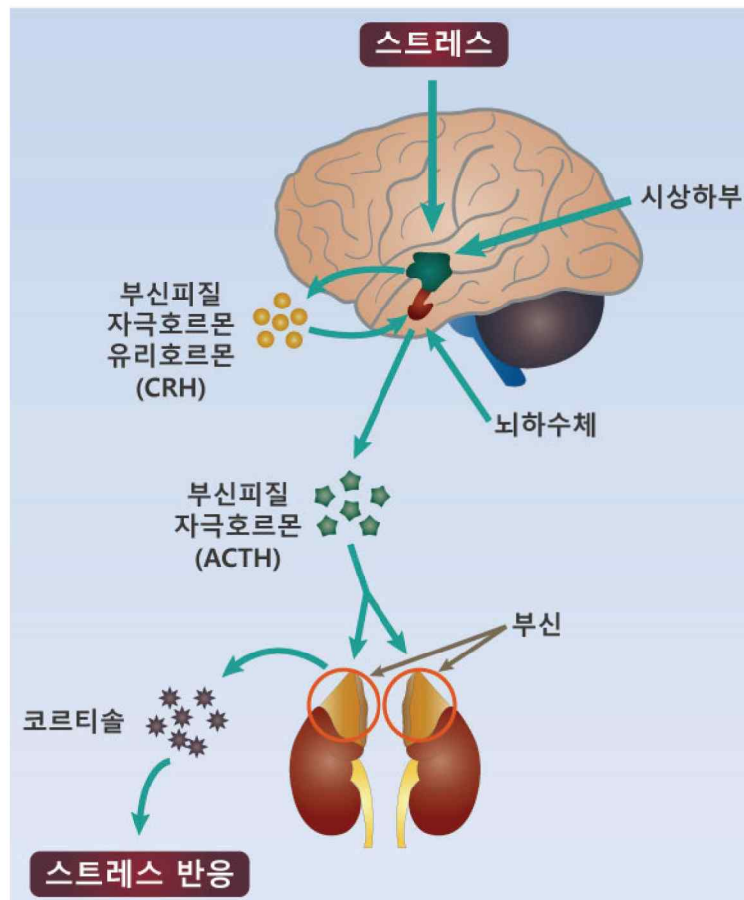


그림 2. 코르티코이드의 분비

[출처: Prehosp Disaster Med, 27:401-408, 2012]

3. 스트레스 관련 호르몬

스트레스 상황에 신체가 반응할 때 2가지 스트레스 호르몬 즉, 카테콜라민(catecholamine)과 코르티코이드(corticosteroid)가 분비된다. 교감신경계-부신수질에 대한 것으로 에피네프린과 노르에피네프린과 같은 카테콜라민 분비에 관여하고, 다른 하나는 시상하부-뇌하수체-부신수질(HPA) 축으로 당류코르티코이드 중 코르티솔의 분비에 관여한다.

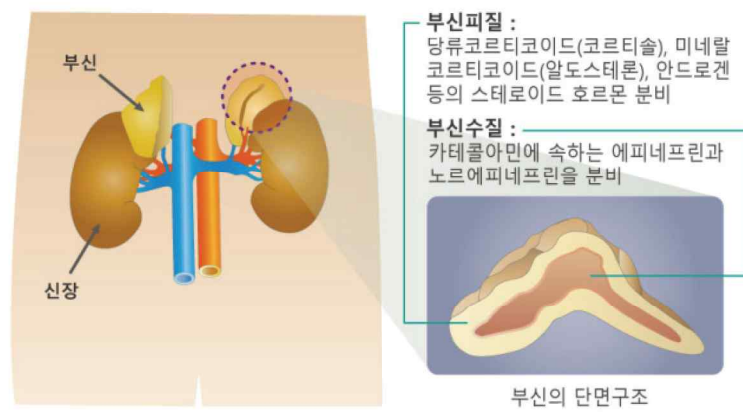


그림 3. 코르티코이드의 분비

[출처: 질병관리본부 국가건강정보포털]

(1) 카테콜라민(catecholamine)

트립토판(tryptophan)으로부터 생성되는 세로토닌(serotonin)과 티로신(tyrosine)으로부터 생성되는 에피네프린(epinephrine), 노르에피네프린(norepinephrine), 도파민(dopamine)과 같은 모노아민(monoamine)들을 카테콜라민이라고 부른다. 부신수질은 교감신경자극에 의해 활성화되어 카테콜라민을 합성하고 분비한다.

(가) 세로토닌(serotonin)

세로토닌은 뇌줄기(brainstem) 가운데 솔기핵(raphe nucleus)에 위치하며 그 수는 수만 개 정도이다. 이는 뇌 전체 신경세포에 비해 적은 수이지만 세로토닌은 뇌 전체에 광범위한 영향을 미친다. 세로토닌의 생리적 기능으로는 기분, 행동, 식욕, 대뇌 순환 등의 조절을 들 수 있다. 세로토닌은 스트레스 반응에 중요한 역할을 하며 지금까지 연구결과에 따르면, 뇌의 세로토닌 감소는 불안을 증가시킨다.

(나) 도파민(dopamine)

도파민은 중추신경계의 신경전달물질로 노르에피네프린의 전구물질이다. 인지와 주의 집중력, 보상, 운동기능 조절 등에 관여한다. 도파민 경로에는 중피질(mesocortical), 중변연계(mesolimbic), 흑질선조체(nigrostriatal) 세 가지 경로가 있다. 중변연계 도파민 경로는 중뇌에서 유래하여 축삭을 대뇌변연계(limbic system)의 일부분인 전뇌(forebrain)에 보내는 뉴런을 갖고 있다. 이 경로에 의해 유리된 도파민은 행동과 보상에 관여한다.

(다) 노르에피네프린(norepinephrine)

노르에피네프린은 뇌에 광범위하게 퍼져있는 카테콜라민이다. 노르에피네프린은 중추신경계와 말초신경계 모두 신경전달물질로 사용된다. 말초신경계의 교감신경뉴런은 평활근, 심근, 선과 시냅스에서 신경전달물질로 노르에피네프린을 사용한다. 중추신경계의 뉴런도 노르에피네프린을 신경전달물질로 사용하는데, 이들은 일반적인 행동 각성(behavioral arousal)에 관여한다.

(2) 코르티코이드(corticosteroid)

코르티코이드는 부신피질에서 분비되는 스테로이드 호르몬이다. 당류코르티코이드(glucocorticoid)인 코르티솔(cortisol)이 스트레스 상황에 반응한다. 코르티솔의 분비는 뇌하수체 전엽의 부신피질자극호르몬에 의해 촉진되고 음성 피드백에 의해 스트레스 반응을 종료시키는 데 있어서 중요한 역할을 한다.

코르티솔은 당신생 과정을 자극하고 포도당 이용을 억제하여 혈당량을 증가시킨다. 그리고 지방 분해를 촉진하여 혈액 속 지방산 유리를 증가시키는 이화작용 촉진 물질이다. 이를 통해 코르티솔은 면역세포, 뼈, 근육, 피부 및 수많은 기타 조직에 에너지를 공급한다. 이러한 작용이 단기간인 경우 신체에 별 영향을 끼치지 않으나 만성 스트레스의 경우 골밀도, 면역기능 및 생식 기능의 저하를 유발할 수 있다.

4. 스트레스와 사이토카인(cytokine)

청반핵, 해마, 전전두엽 피질 그리고 시상하부 등의 중추신경계는 사이토카인의 영향을 받는다. 이러한 구조물은 심리학적 변화를 일으키는 생물학적 과정과 관련이 있다. 사이토카인은 면역세포에서 분비되는 펩타이드이며, 면역세포 간의 정보를 매개하는 역할을 한다. 사이토카인은 단핵 혹은 대식세포와 림프구에서 주로 분비되지만, 신경원, 내피세포, 성상세포 혹은 소교세포 등의 뇌세포에서도 분비된다. 사이토카인에 대한 수용체들은 면역계뿐만 아니라 말초신경계와 중추신경계를 포함한 다양한 조직에 위치하고 있다.

사이토카인은 부신피질자극호르몬을 자극하여 시상하부-뇌하수체-부신수질 축(HPA)을 활성화시켜 코르티솔 분비를 촉진하여 우울증을 유발한다. 또한, 염증성 사이토카인은 신경영양성 인자(예: BDNF)와 모노아민 신경전달인자를 감소시켜 신경세포 자멸사와 신경교 손상을 유발한다.

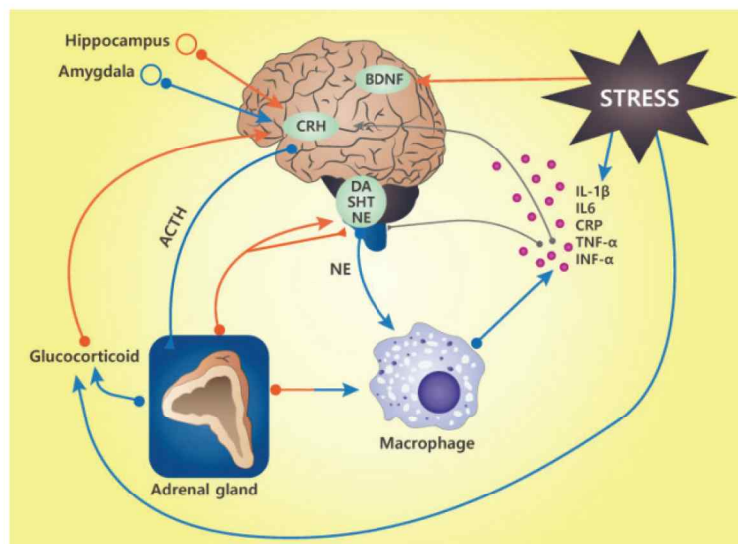


그림 4. 스트레스와 사이토카인

[출처: Front Cell Neurosci 9:1-12, 2015]

III 기능성 시험 방법

1. 바이오마커의 선정

(1) 연구유형별 바이오마커

스트레스로 인한 긴장완화 관련 기능성을 확인하기 위한 측정 가능한 연구유형별 바이오마커(biomarker)는 다음 표 1과 같다.

표 1. 긴장완화 관련 기능성 확인을 위한 바이오마커

구 분	바이오마커	측정 가능한 연구유형		
		in vitro	in vivo	Human
생리적 지표	뇌 신경세포 생존율	○		
	젖산탈수소효소(LDH)	○		
	모노아민산화효소(MAO-A, MAO-B)	○	○	
	조직무게		○	
	세로토닌과 그의 대사체(5-HIAA)		○	○
	도파민과 그의 대사체(DOPAC, HVA)		○	○
	노르에피네프린		○	○
	코르티코스테론/코르티솔		○	○
	DHEA(dehydroepiandrosterone)		○	○
	사이토카인(IL-6, TNF- α 등)		○	○
	부신피질자극 호르몬(ACTH)		○	○
	부신피질자극 호르몬 유리 호르몬(CRH)		○	○
	신경세포 증식인자(NGF)		○	
	Synaptophysin		○	
	BDNF(brain-derived neurotrophic factor)		○	○
	타액 아밀라아제			○
	타액 IgA			○
	혈압			○
	심박수			○
	뇌파			○
	심박변이도(heart rate variability, HRV)			○

구 분	바이오마커	측정 가능한 연구유형		
		in vitro	in vivo	Human
행동적 지표	스트레스 관련 행동		○	
	고가 십자미로 검사		○	
	방어적 매장 시험		○	
	자당선회도 검사		○	
	강제 수영검사		○	
	꼬리 현수법		○	
	NSF(novelty suppression of feeding)		○	
	Resident-intruder test		○	
	명암이행테스트(Light/dark transition test)		○	
심리적 지표	Beck 우울척도(BDI)			○
	Beck 불안 척도(BAI)			○
	상태-특성 불안 척도(STAI)			○
	시각적 상사 척도(VAS)			○
	기분상태 척도(POMS)			○
	스트레스 반응 척도(SRI)			○
	스트레스 자각 척도(PSS)			○
	해밀턴 불안 척도(HAM-A)			○
	해밀턴 우울 척도(HAM-D)			○

(2) 바이오마커 설명

스트레스로 인한 긴장완화와 관련된 바이오마커는 생리학적 작용을 설정하는 기전인 생리적 지표와 긴장완화를 평가할 수 있는 행동적 지표 및 심리적 지표로 구분되어 있다.

(가) 생리적 지표

① 뇌 신경세포 생존율

신경세포는 신경계를 구성하는 주된 세포이다. 뇌 신경세포의 사멸정도가 적을수록 인지능력이 향상됨을 의미한다.

② 젖산탈수소효소(lactate dehydrogenase, LDH)

젖산탈수소효소는 L-젖산(L-lactic acid)을 탈수소하여 L-피루빈산(L-pyruvic acid)으로 만드는 반응을 촉매하는 효소로서 대부분의 조직에 존재한다. 조직이 손상된 경우, 세포내 효소의 이탈이 일어나 젖산탈수소효소도 유리된다. 일반적으로 젖산탈수소효소의 농도가 높으면 세포가 손상되었음을 의미한다.

③ 모노아민산화효소(MAO, MAO-B)

모노아민산화효소는 산화적 탈아미노반응을 촉매하는 효소로 생체내의 아민의 농도조절에 관여한다. 모노아민 산화효소 억제제 또는 MAO 억제제(MAOI, Monoamine oxidase inhibitor)는 모노아민 산화효소 A(monoamine oxidase A, MAO-A)와 모노아민 산화효소 B(monoamine oxidase B, MAO-B) 중 하나 또는 둘 모두의 활성을 억제하는 약제이다. 이들은 공황 장애 및 사회적 공포증에 효과적인 치료제뿐만 아니라 강력한 항우울제로 잘 알려져 있다. 특히 치료 저항성 우울증과 비정형 우울증에 효과적인 것으로 알려져있다. 또한, 파킨슨병과 다른 여러 질환의 치료에도 사용된다.

④ 조직무게(부신, 비장)

부신은 좌우 콩팥 위에 각각 한 개씩 있는 삼각형의 작은 내분비선으로 부신피질에서는 스트레스에 대응하여 코르티솔이 분비되며, 부신수질에서는 나오는 카테콜라민은 스트레스에 급히 반응하는 호르몬 등을 분비한다. 따라서, 스트레스에 의해 부신 비대와 면역과 관련된 비장에서는 스트레스에 의해 비장 위축이 나타날 수 있다.

⑤ 세로토닌(Serotonin)과 그의 대사체(5-HIAA)

세로토닌은 5-히드록시트립타민(5-Hydroxytryptamine; 5HT) 구조의 생리활성 아민으로서, 기분, 행동, 식욕, 수면, 근 수축과 관련된 기능에 관여한다. 세로토닌이 지나치게 많으면 뇌 기능이 흥분, 자극되고, 부족하면 우울증처럼 신체적 기능을 저하시키는 물질이다. 세로토닌 대사체로는 5-HIAA(5-Hydroxy indolacetic acid)가 있다. 세로토닌이 증가할수록 평온함의 증가를 의미한다.

⑥ 도파민(Dopamine)과 그의 대사체(DOPAC, HVA)

도파민은 신경전달물질의 하나로 노르에피네프린과 에피네프린의 전구물질이다. 도파민은 신체 내에서 감정을 조절하고 기분 좋게 하며, 인지과 주의 집중력, 보상, 운동기능 조절 등에 관여한다. 도파민 대사체로는 DOPAC(3,4-Dihydroxy phenyl acetic acid), HVA (Homovanillic acid) 등이 있다. 도파민의 증가는 스트레스의 감소를 의미한다.

⑦ 노르에피네프린(Norepinephrine)

노르에피네프린은 신경전달물질의 하나로 노르아드레날린(Noradrenaline)이라고도 한다. 스트레스를 받았을 때 분비되는 노르에피네프린은 심장의 수축력과 심박수를

증가시키고, 전신의 혈관을 수축시켜서 혈압을 상승시키며 또한, 기분 상태에도 관여한다. 노르에피네프린 농도가 높을수록 스트레스가 높은 것을 의미한다.

⑧ 코르티코스테론(corticosterone)/코르티솔(cortisol)

부신피질에서 분비되는 스테로이드호르몬으로 쥐의 경우 코르티코스테론, 사람의 경우 코르티솔의 형태로 분비되며 시상하부-뇌하수체-부신 축의 최종 작용물질로서 스트레스원에 대한 개체의 반응과 항상성의 조절에 관여한다. 코르티코스테론 및 코르티솔은 정신적인 스트레스를 받았을 때 상대적으로 농도가 증가하며 혈압 및 맥박을 증가시킨다. 코르티코스테론 및 코르티솔 농도가 높을수록 스트레스가 높음을 의미한다.

⑨ DHEA(dehydroepiandrosterone)

DHEA(dehydroepiandrosterone)는 부신 수질의 안쪽에서 만들어지는 호르몬이다. 부신에서 만들어진 DHEA는 혈류를 따라 온몸을 돌아 조직에 도달하여 세포 속으로 들어가 남성 호르몬으로 알려진 안드로젠, 여성 호르몬으로 유명한 에스트로젠, 그리고 다른 스테로이드로 전환된다. 중년의 지원자들에게 3개월 동안 밤마다 50 mg의 DHEA를 복용하게 결과 육체적, 심리적 안정감이 증가되고 긴장이 이완되며 스트레스 상황에 대처하는 능력이 향상되는 것으로 나타났다. 스트레스가 증가할수록 DHEA 농도는 감소한다.

⑩ 사이토카인(Cytokine)

사이토카인은 세포 사이의 신호전달을 매개하는 단백질로 인터루킨(Interleukin; IL), 인터페론(Interferon; IFN), 종양괴사인자(Tumor necrosis factors; TNF) 등이 있다. 면역세포뿐만 아니라 신경세포도 사이토카인을 분비하여 뇌신경 기능조절에 관여한다. 염증성 사이토카인인 IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α 등은 스트레스 반응 때 중추신경계에서 분비된다. 염증성 사이토카인인 IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α 등의 생성(발현)량이 많을수록 스트레스 정도가 심함을 의미한다.

⑪ 부신피질자극 호르몬(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)

부신피질자극 호르몬은 뇌하수체에서 분비되는 물질로 부신피질을 자극하여 코르티솔과 같은 스테로이드 호르몬을 분비시킨다. 인체가 스트레스를 받으면 중추신경계를 통해 이 호르몬의 분비가 촉진된다.

⑫ 부신피질자극 호르몬 유리 호르몬(corticotropin releasing hormone, CRH)

부신피질자극 호르몬 유리 호르몬은 시상하부-뇌하수체 신경분비계에 의해 뇌하수체 문맥계에 분비되고, 부신피질자극 호르몬의 분비에 관여한다. 혈중의 부신피질호르몬 농도에 의해 분비가 조절된다.

⑬ 신경세포 증식인자(nerve growth factor, NGF)

신경세포 증식인자(NGF)는 Neuro-trophic 단백질로 감각신경과 교감신경의 신경세포 발달 및 유지에 있어서 핵심적인 역할을 한다. 또한, 조직과 신경섬유 말단으로부터 신경세포 내로 수송되어 감각신경, 말초 아드레날린성 신경 및 중추의 콜린성 신경섬유에 대한 발달과정에 기여한다.

⑭ Synaptophysin

Synaptophysin은 신경세포나 신경내분비세포의 소포막에 존재하는 당단백으로서, 발달과정동안 신경연접의 형성 정도와 비례하여 증가하고, 신경연접의 분포와도 일치하므로 신경 발달의 연구에 있어 많이 사용되고 있는 단백질이다.

⑮ BDNF(Brain-derived Neurotrophic factor)

BDNF는 신경기능 조절인자로서 신경회로의 구축과 기능발달에 중요한 역할을 하며, 이에 뇌신경/정신계의 병리생리학적으로도 관련 있는 것으로 밝혀졌다. 우울증 유도 동물의 뇌 해마와 우울증 환자의 혈중에서 BDNF의 농도 감소, BDNF 뇌실투여로 이상행동의 개선, 그리고 항우울제 투여로 혈중 BDNF 농도 상승과 우울 증상이 개선되었다.

⑯ 타액 아밀라아제(salivary amylase)

타액 아밀라아제는 녹말의 α -1,4-글라이코사이드 결합(glycosidic bond)을 가수분해하는 효소로서, 귀밑샘과 턱밑샘의 샘파리 세포에서 생성된다. 타액 아밀라아제는 교감신경의 자극에 의해 분비되며, 스트레스 상황에서 타액 아밀라아제 분비가 증가한다.

⑰ 타액 IgA

면역글로불린A(IgA)는 혈청, 타액, 초유, 눈물, 담즙, 뇨, 분변 등의 점막 분비물 중에 많이 함유되어 있으며, 각종 병원체에 대한 방어역할을 한다. 스트레스 상황에서 증가된 코르티솔은 타액 IgA의 분비를 억제한다.

⑱ 혈압

혈압은 혈액이 혈관 벽에 미치는 압력으로서 심실이 수축할 때의 혈압인 수축기 혈압, 이완할 때의 혈압인 이완기 혈압이 있다. 정상 혈압은 수축기 혈압 120~130mmHg, 이완기 혈압 80~85mmHg 내외이다. 이보다 일정 수준 이상 높아지면 고혈압, 낮아지면 저혈압이라고 한다. 스트레스는 교감신경을 자극하여 혈압상승을 유발한다.

⑲ 심박수

박수는 심장이 1분 동안 뛰는 횟수를 말하는 것으로 정상인은 안정 시 약 70회/분이지만 개인마다 차이가 커서 50~100회 정도를 정상 범위로 보고 있다. 심박수 변화요인에는 체온, 운동, 수면, 섭식상태, 감정 등이 있다. 스트레스는 교감신경을 자극하여 심박수가 증가될 수 있다.

⑳ 뇌파

뇌파는 뇌의 활동에 따라 일어나는 전류를 기록한 것으로 뇌파는 α , β , γ , δ , θ 가 있다. 뇌파 α 파의 파워가 증가할수록, β 파의 파워가 감소할수록 스트레스가 완화됨을 의미한다.

㉑ 심박변이도(heart rate variability, HRV)

심박 변이도의 파워 스펙트럼 분석은 자율신경계의 활동을 정량화하여 분석할 수 있는 도구로서, 사용 방법이 간단하고 비침습적이기 때문에 쉽게 임상 환경에서 사용될 수 있다. 심장 박동의 변이는 교감신경과 부교감신경에 의해 조절되기 때문에 전반적인 자율신경계의 활동을 반영한다. 시간에 따른 이런 심장 박동의 주기적 변화를 측정하여 분석하면 자율신경계의 활동을 정량화할 수 있어 여러 상황에서의 생리적 반응에 대한 정보를 얻을 수 있다. 스트레스는 심박 변이도의 감소, LH/HF 비의 증가를 일으키고, 수면을 방해한다.

(나) 행동적 지표

행동적 지표는 스트레스 관련 행동 및 고가 십자미로 시험 등의 동물실험을 통해 긴장완화의 기능성을 평가하는 바이오마커이다.

① 스트레스 관련 행동

실험동물에서 스트레스 자극에 대한 반응을 측정하는 시험으로 스트레스 상황에서 굴 파기, 꼬리 흔들기, 털 손질 횟수 등의 행동은 증가하고, 양육, 냄새 맡기, 먹이주기 등의 행동은 감소한다.

② 고가 십자미로 시험(Elevated plus-maze test)

설치류의 불안 정도를 측정하는 시험으로 실험기구는 서로 마주보며 개방된 두 개의 통로와 폐쇄된 두 개의 통로로 구성되어있다. 설치류 습성상 새로운 환경을 탐색하려는 욕구와 밝은 빛과 개방된 공간을 회피하려는 욕구 사이에서 갈등한다. 스트레스 상황에서 설치류는 개방된 공간을 회피하므로 개방된 공간에 머문 시간과 출입 횟수가 감소한다.

③ 방어적 매장 시험(Defensive burying test)

실험동물은 혐오적 상황이나 위협적인 상황에 의한 스트레스에서 앞발을 앞으로 밀어서 깔집을 밀어내고 머리로 삽질하는 파묻기 행동을 한다. 파묻기 시간이 짧을수록 스트레스 감소를 의미한다.

④ 자당선호도 검사

실험동물의 자당용액 섭취량 변화를 통하여 우울 관련 행동 변화 중 자극에 대한 무쾌감 즉, 즐거움에 대한 감수성 감소 반응을 알 수 있다. 실험동물이 스트레스를 받으면 자당 선호도가 감소한다.

⑤ 강제 수영 검사(forced-swim test)

강제 수영 검사는 실험동물의 꼬리가 바닥에 닿지 않을 정도의 물 높이에 강제로 빠뜨린 다음 부동시간, 수영시간, 오르기 시간을 측정한다. 실험동물이 스트레스를 받으면 움직임이 없는 부동 시간이 길어진다.

⑥ 꼬리 현수법(tail suspension test)

실험동물의 꼬리를 매달고, 매달려있는 상태에서 아무런 움직임 없이 완전히 멈춰 있는 상태인 부동시간을 측정한다. 실험동물이 스트레스를 받으면 움직임이 없는 부동 시간이 길어진다.

⑦ NSF(novelty suppression of feeding) 시험

실험동물이 새로운 환경에서 음식을 먹고 접근하는 데 걸리는 시간을 측정하여 우울상태를 측정한다. 실험동물이 스트레스를 받으면 음식에 접근하는 시간이 길어진다.

⑧ Resident-intruder 시험

실험동물(intruder)을 다른 실험동물(resident)의 케이지에 위치시켜 싸움이 일어나는지 확인한다. Resident 실험동물이 intruder 실험동물을 공격하는 데 걸리는 시간이 감소하면 resident 실험동물의 스트레스 지수가 높음을 의미한다.

⑨ 명암이행시험(Light/dark transition test)시험

설치류는 선천적으로 밝은 빛을 싫어하며, 새로운 환경에 자발적인 탐색 활동을 한다. 실험동물이 암실에서 명실로 옮겨가는 횟수와 시간을 측정하여 시험물질의 항불안 및 항스트레스 효과 유무를 판단한다.

(다) 심리적 지표

스트레스로 인한 긴장완화에 대한 기능성 평가는 인체적용시험을 통해 기능성 물질의 대조군 대비 BDI, BAI, STAI, VAS, POMS, SRI, PSS, HAM-A, HAM-D 등의 심리적 지표의 개선 여부로 평가할 수 있다.

① Beck 우울척도 (Beck depression inventory, BDI)

Beck 등이 고안한 것으로 13세 이상 개인의 우울 정도를 측정하기 위해 사용되는 척도이다. 총 21개의 문항으로 구성되어 있으며, 문항 당 0~3점 척도를 사용한다. 총점은 63점으로, 점수가 높을수록 우울의 정도가 높음을 의미한다.

② Beck 불안 척도(Beck anxiety inventory, BAI)

Beck 등이 고안한 것으로 17~80세 성인의 불안을 측정하기 위해 사용되는 척도이다. 총 21문항으로 구성되어 있으며, 문항 당 0~3점 척도를 사용한다. 총점은 63점으로, 점수가 높을수록 불안의 정도가 높음을 의미한다.

③ 상태-특성 불안 척도(State trait anxiety inventory; STAI)

Spielberger 등이 고안한 것으로 상태 불안과 특성 불안을 평가를 위해 사용되는 척도이다. 걱정, 두려움, 또는 긴장으로 조성되는 즉각적인 감정 상태인 상태 불안(State version of STAI, S-STAI)을 측정하는 20개 문항과 환경적 상황을 위협적인 것으로 인지하는 성격인 특성 불안(Trait version of STAI, T-STAI)을 측정하는 20개 문항으로 구성되어 있다. 각 항목의 점수가 높을수록 상태 불안 및 특성 불안의 정도가 높음을 의미한다.

④ 시각적 상사 척도(Visual analogue scale, VAS)

주관적으로 느끼고 있는 스트레스 정도를 측정하기 위해 사용되는 척도이다. 결과값이 클수록 스트레스가 많은 것으로 판단한다.

⑤ 기분상태 척도(Profile of mood states; POMS)

McNair 등이 고안한 것으로 13세 이상 개인의 기분상태 평가를 위해 사용되는 척도이다. 총 65문항으로 구성되어 있으며, 문항 당 0~4점 척도를 사용한다. 점수가 높을수록 심리상태가 좋지 않은 것을 의미한다.

⑥ 스트레스 반응 척도(Stress response inventory, SRI)

4가지 스트레스 반응(감정적, 사회적, 인지적, 행동적 반응)이 포함된 스트레스 반응 척도를 위하여 개발되었다. SRI는 임상 진료용 및 연구용으로 적합하다.

⑦ 스트레스 자각 척도(Perceived stress scale, PSS)

Cohen 등에 의해 개발된 척도로서 특정 스트레스 사건 자체가 아니라 보고자가 지난 한 달간 스트레스를 전반적으로 어떻게 지각하고 해석하는가에 초점을 맞춘 척도이다. 같은 스트레스 상황 하에서도 사람마다 스트레스를 느끼는 정도의 차이를 보일 수 있기 때문에 PSS는 객관적인 스트레스 상황만을 측정하는 타 척도에 비해 개인이 실제로 느끼는 스트레스 정도를 평가하는 데 적합하다고 할 수 있다.

⑧ 해밀턴 불안 척도(Hamilton anxiety scale, HAM-A)

Hamilton Anxiety Rating Scale(이하 HAMA)은 불안 증상의 심각도를 측정하기 위해 14개 문항으로 이루어진 반구조화된 면담형식의 도구로 Hamilton에 의해 개발되었다.

⑨ 해밀턴 우울 척도(Hamilton depression scale, HAM-D)

Hamilton에 의해 개발된 관찰자 평가척도로 우울증에 가장 널리 사용되고 있는 척도 중 하나이다. 우울 증상과 관련된 정신병리 및 심리측정 도구로서 우울증의 신체화 증상을 강조하며 총 21개의 문항 중 처음 17개 문항은 우울증의 심도를 측정하고 4개의 부가적 문항은 특별한 치료를 필요로 하는 부수적인 증상에 대한 정보를 제공해 주며 점수가 높을수록 더 심한 우울증을 나타낸다.

2. 주요 바이오마커의 측정 방법

(1) 생리적 지표

① 뇌 신경세포 생존율

뇌 신경세포 생존율은 MTT법 등을 이용하여 측정한다. MTT법은 세포의 미토콘드리아 내 효소인 succinate-dehydrogenase에 의해 MTT가 formazan으로 변하여 세포의 성장이 멈추거나 세포가 죽으면 formazan의 생성이 줄어들게 되는 것을 이용한 것이다. 세포 생존율을 측정하기 위해 96-well plate에 각 well당 일정량의 세포를 분주하여 24시간 배양 후 배양액을 제거하고 fetal bovine serum이 포함되지 않은 배양액을 분주한 뒤, 시험물질을 여러 농도로 처리한다. 일정시간 후, MTT reagent를 분주하여 배양한 다음 상층액을 제거하여 DMSO를 첨가하고, 배양시켜 생성된 formazan을 완전히 녹여준 다음 흡광도를 측정한다.

② 젖산탈수소효소(lactate dehydrogenase, LDH)

젖산탈수소효소는 assay kit 등을 이용하여 측정한다. 시험물질을 세포에 처리하여 배양시킨 후, H_2O_2 로 세포막 손상을 유도한 후, 이를 원심분리하여 상등액을 취하여 LDH assay kit를 사용하여 젖산탈수소효소 양을 측정한다.

③ 모노아민산화효소(MAO, MAO-B)

혈청 MAO의 저해활성은 benzylamine을 기질로 사용하여 37℃에서 3시간 반응시키는 동안 생성한 benzaldehyde를 비색하는 방법으로 측정한다.

④ 조직무게(부신, 비장)

실험동물로부터 적출한 부신, 비장을 생리식염수로 씻어내고 여과지로 수분을 제거한 후 무게를 측정한다.

⑤ 세로토닌(Serotonin)과 그의 대사체(5-HIAA)

세로토닌과 5-HIAA는 미세투석법(microdialysis), HPLC, 면역조직화학법(IHC) 등을 이용하여 측정한다.

미세투석법은 실험동물을 마취시킨 후 수술대에 고정시키고, microdialysis probe를 삽입할 부위의 두피를 절개한다. 현미경을 이용하여 guide cannula를 설치한다. 수술을 마친

실험동물은 회복기를 지낸 후, guide cannula를 통하여 미세투석법을 위한 microdialysis probe를 삽입하고, microdialysis system에 연결한다. microdialysis injection pump를 이용하여 인공뇌척수액을 probe에 관류한다. 케이지 속의 실험동물이 자유로이 움직이는 상태에서 뇌의 분석물질을 probe 끝의 반투과성 막의 확산원리에 의하여 세포외액을 취한다. 이를 HPLC를 이용하여 분석한다.

HPLC법은 실험동물의 뇌 조직을 균질화 한 다음, 초음파 처리하여 원심분리한다. 여기에서 얻은 상층액을 취하여 HPLC를 이용하여 분석한다.

면역조직화학법(IHC)은 실험동물을 희생시킨 동물에서 혈액을 채취하고 뇌 조직을 적출하여 고정액에 담가 고정한다. Free-floating 방법으로 고정된 뇌 조직은 30% sucrose용액에 넣고 24시간 이상 침적시킨 후 꺼내어 동결절편기를 이용하여 일정한 두께의 연속 가로 동결절편을 제작한다. 조직절편에 과산화수소(H_2O_2)를 처리하여 내인성 과산화효소를 제거하고 normal goat serum으로 처리한다. 희석한 1차 항체를 4℃에서 수 시간 동안 반응시킨 후 세척한다. 2차 항체를 반응시킨 후, avidin biotin complex(ABC)를 처리시키고, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB)로 발색시킨다.

⑥ 도파민(Dopamine)과 그의 대사체(DOPAC, HVA)

도파민과 그의 대사체는 미세투석법(Microdialysis), HPLC, 면역조직화학법(IHC) 등을 이용하여 측정한다. 각 실험에 대한 방법은 위에 언급된 시험법과 동일하다.

⑦ 노르에피네프린(Norepinephrine)

노르에피네프린은 HPLC, Kohno법 등을 이용하여 측정한다.

HPLC 법은 위에 언급된 시험법과 동일하다.

Kohno법은 뇌 조직 중 dorsal cortex 쪽을 분리하여 0.1% 메타비스황산나트륨을 포함한 0.2 N 황산 4 mL로 저온에서 마쇄한 다음, 8,000×g로 5분간 원심분리 한다. 상층액 2 mL를 취한 다음, 0.1% $Na_2S_2O_5$ 와 0.05% EDTA를 포함한 0.4 N PCA 3 mL를 첨가한다. 다시 8,000×g에서 10분간 원심분리한 후 상층액은 캡튜브에 옮긴 후 실험하기 전까지 -45℃의 냉동고에 저장한다. 노르에피네프린의 분비량 측정을 위한 파이렉스 칼럼(pyrex column: 직경 6 mm, 높이 25 cm)은 유리솜(glass wool)으로 막고 정확히 6cm의 높이에서 pH 7.5-8.0로 활성화된 알루미나(alumina)로 채운다. 노르에피네프린은 0.05 N PCA 2 mL로 칼럼을 통해 추출한다. 추출한 후 요오드(iodine) 시약 2 mL를 첨가하여 형광화합물로

전환시킨다. 노르에피네프린의 형광물질은 형광광도계를 사용하여 excitation 380 nm, emission 495 nm에서 측정하였다. 노르에피네프린 표준물질은 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 준비하여 표준검량선에 따라 노르에피네프린의 분비량(ng/g brain)을 정량한다.

⑧ 코르티코스테론(Corticosterone)/ 코르티솔(Cortisol)

코르티코스테론은 RIA, HPLC 등을 이용하여 측정한다.

Radioimmune assay(RIA)법은 corticosterone 항체가 코팅된 시험관에 혈청과 I^{125} 가 결합된 reagent를 분주하고, 분주된 시험관을 혼합한 다음, 반응시킨 후 시험관 안에 있는 모든 reagent를 제거한 후 이를 gamma counter로 측정한다.

HPLC법은 위에 언급된 시험법과 같다.

⑨ DHEA(dehydroepiandrosterone)

효소를 표지자로 이용한 효소면역측정법(EIA), luminol이나 그 유도체 또는 aminobutylethylisoluminol(ABEI)로 감도를 증가시킨 화학섬광면역측정법(chemiluminescence immunoassay; CIA), 또는 형광물질표지자(fluorescent label)를 이용한 형광면역측정법(fluorescence immunoassay; FIA) 등이 사용될 수 있으나, 특히, 방사선면역측정법(Radioimmunoassay; RIA)을 사용하는 것이 좋다. RIA법은 위에 언급된 시험법과 같다.

⑩ 사이토카인(Cytokine)

사이토카인은 ELISA, PCR 등을 이용하여 측정한다.

ELISA법은 항체를 coating 용액에 희석하여 micro well에 코팅한 후 4°C 에서 overnight 한다. 각 well을 washing 용액으로 세척한 후 시험물질을 섭취한 실험동물의 균질화된 조직 상층액이나 혈액을 분주한다. 실온에서 방치한 다음 washing 용액으로 세척하고, antibody avidin-HRP conjugated를 처리한다. 실온에서 방치 및 세척한 다음 TMB 기질을 분주하여 어두운 곳에서 방치한 후 stop 용액을 넣고 흡광도를 측정한다.

PCR법은 시험물질을 식이섭취 시킨 실험동물의 조직을 석출하여 trizol을 넣어 균질기로 분쇄하여 chloroform을 첨가한 후 혼합하여 방치 후, 원심분리한다. 원심분리 상층액을 회수하여 2-propanol을 혼합하여 방치한다. 이를 다시 원심 분리한 후 80% 에탄올로 세척하여 건조시킨다. 추출한 RNA는 DEPC(diethyl pyrocarbonate) 물에 녹여 first strand cDNA로 합성한다. 합성된 cDNA에 사이토카인의 primer를 반응시켜 타겟 유전자를 증폭한 후 유전자 발현량을 분석한다.

⑪ 부신피질자극 호르몬(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)

부신피질자극 호르몬은 ELISA, 면역조직화학법(IHC), RIA 등을 이용하여 측정한다. 각 시험법은 위에 언급된 시험법과 동일하다.

⑫ 부신피질자극 호르몬 유리 호르몬(corticotropin releasing hormone, CRH)

부신피질자극 호르몬 유리 호르몬은 PCR, 단백질 전기영동법, ELISA 등을 이용하여 측정한다.

단백질 전기영동법(Western blotting analysis)은 시험물질을 섭취한 실험동물의 대뇌피질과 해마를 lysis buffer를 넣고 균질화하여 원심분리한다. 원심분리하여 얻은 상층액은 단백질을 정량하여 일정량의 단백질을 sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 크기별로 분리한 후, membranes에 이동시킨다. Membrane은 skim milk나 BSA(bovine serum albumin)로 blocking 과정을 거친 후, CRH 1차 항체를 첨가하여 반응시킨다. 그 후 2차 항체를 첨가하여 반응시킨 다음 ECL 용액으로 반응시켜 X-ray film에 노출시킨 다음 각각의 band를 정량화한다.

PCR법과 ELISA법은 위에 언급된 시험법과 같다.

⑬ 신경세포 증식인자(nerve growth factor, NGF)

신경세포 증식인자는 단백질 전기영동법, ELISA 등을 이용하여 측정한다. 각 시험법은 위에 언급된 시험법과 동일하다.

⑭ Synaptophysin

Synaptophysin은 단백질 전기영동법, 면역조직화학법(IHC) 등을 이용하여 측정한다. 각 시험법은 위에 언급된 시험법과 동일하다.

⑮ BDNF(Brain-derived Neurotrophic factor)

BDNF 측정은 효소면역측정법(ELISA)을 활용한 kit를 사용하여 측정한다.

⑯ 타액 아밀라아제(salivary amylase)

대상자의 타액을 수거하여 상용화되어있는 colorimetric system kit를 이용하여 분석한다. 타액 아밀라아제에 의해 substrate 2-chloro-4-nitrophenyl-4-O- β -D galactopyranosylmaltoside는 가수분해되는데, 이때 노란색에서 흰색으로 색이 변한다. 이 변화 값이 클수록 타액 아밀라아제의 수치가 많은 것을 의미한다.

⑰ 타액 IgA

대상자의 타액을 수거하여 EIA(enzyme immuno assay)로 측정장비 microplate reader와 상용화된 시약 kit를 이용하여 분석한다.

⑱ 혈압

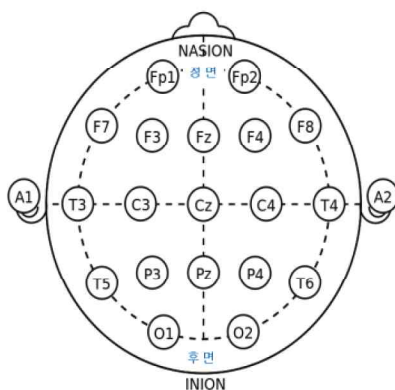
안정된 상태를 유지한 대상자의 상완동맥 위에 심장과 같은 높이로 하여 자동 혈압기를 감고 3회의 혈압을 mmHg 단위로 표시하여 평균값을 구한다.

⑲ 심박수

소음이 없는 조용하고 서늘한 실내에서 피검자를 눕힌 후 약 10분 이상 안정을 취하게 한 후 심박수가 일정 수준을 유지한 시점부터 12유도 심전도를 이용하여 안정시 심박수를 측정한다.

⑳ 뇌파

소음, 빛 등과 같은 외부 요인을 배제할 수 있는 환경에서 뇌파측정을 수행한다. 대상자는 일정 시간 동안 안정을 취한 뒤, 대상자가 환경에 적응한 다음 눈을 감은 상태에서 안정 뇌파를 기록한다. 뇌파 측정부위는 국제표준 전극 부착법(그림 5) 기준에 따라 부착하고, 기준전극을 귀부위에 부착하여 측정한다. 뇌파측정은 조용한 환경에서 피시험자의 움직임 통제한 상태에서 시행하고 눈 움직임에 의한 잡음 혼입을 막기 위해 눈을 감고 시행한다. 수집된 뇌파 데이터는 TeleScan™ 등과 같은 프로그램을 이용하여 분석한다.



Fp1.2	Frontal pole(전두극)
F3.4	Frontal(전두부)
C3.4	Central(중심부)
P3.4	Parietal(두정부)
O1.2	Occipital(후두부)
F7.8	Anterior temporal(측두정부)
T3.4	Middle temporal(측두중앙부)
T5.6	Posterior temporal(측두후부)
Fz	Midline - Frontal(정중전두부)
Cz	Midline - Central(정중중심부)
Pz	Midline - Parietal(정중두정부)
A1.2	Auricular(귓볼)

그림 5. 국제표준 전극 부착법

[출처: J Clin Neurophysiol 2011;28:611-617.]

㉑ 심박변이도(heart rate variability, HRV)

심박변이도는 자율신경검사기를 이용하여 좌우 손목과 발목에 전극을 부착하고 5분간 측정한다. 기기 내 시간영역 분석(time domain analysis) 프로그램을 통해 분석된 데이터를 해석한다.

(2) 행동적 지표

① 스트레스 관련 행동

동물 행동을 관찰하여 스트레스 관련 행동의 횟수 등을 측정한다.

② 고가 십자미로 시험(Elevated plus-maze test)

바닥에서 일정한 높이에 설치된 십자형(+) 미로로서, 4개의 통로 가운데 크기가 동일한 2개의 통로는 벽으로 구성되어 있고, 다른 2개의 통로는 개방되어있다. 미로의 중앙부 천장에 비디오카메라를 설치하여 동물의 행동을 기록한다. 실험시작 시, 실험동물은 미로의 열린 공간에 머리를 밖으로 향하게 놓은 다음 미로를 자유롭게 탐색하도록 한다. 실험동물이 열린 공간과 폐쇄 공간에 머문 시간, 출입 횟수 등을 측정한다.

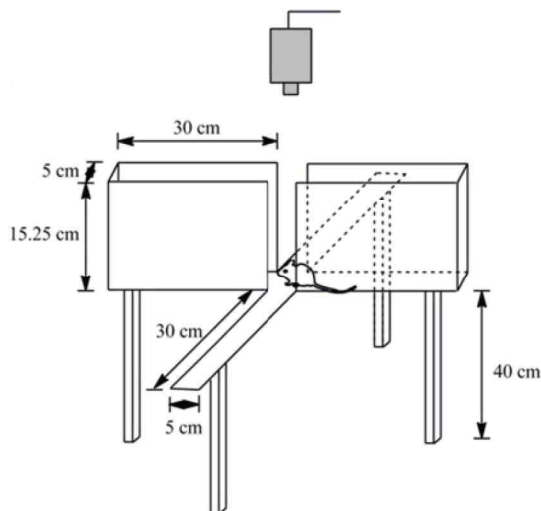


그림 6. 고가 십자미로 시험의 예

[출처:Mol Brain 2012, 5:20]

③ 방어적 매장 시험(Defensive burying test)

케이지에 우드 칩 깔집을 5 cm 높이로 고르게 펴서 준비한다. 실험동물을 시험 전 3 일 동안 1시간 동안 전기 탐침의 부재 하에 챔버에 순응시킨다. 3일 후, 전기 탐침을 2.5cm 높이 깔집 위의 작은 구멍을 통해 삽입하고, 접촉 시 전기 충격이 가해지도록 설정한다. 전기 탐침 접촉 시, 매장(Burying) 동작을 시작하는 시간을 대기 시간(Latency)으로 하고, 대기 시간(Latency) 이후부터 15분 동안 전기 탐침에 접촉했을 때까지의 시간을 계산한다.

④ 자당선호도 검사

본 실험에 앞서 자당 용액 적응 훈련을 수행한다. 각 케이지에 2명의 자당 용액을 공급하고, 24시간 이후 1명을 수거하고 물로 대체하여 24시간 동안 공급한다. 적응 훈련 이후, 24시간 동안 물과 사료 공급을 제한한다. 각 케이지에 자당 용액과 물을 공급하고 1시간 후, 자당 용액 및 물의 소모량을 기록한다. 자당 및 물의 선호율은 다음과 같은 공식으로 산출한다.

$$\% \text{ 자당 선호율} = \text{자당 소모량} / (\text{물 소모량} + \text{자당 소모량}) \times 100\%$$

⑤ 강제 수영 검사(forced-swim test)

유리 원통 수조에 25℃의 물을 채우고, 실험동물을 강제로 빠트린 다음 15분 동안 있게 한다. 24시간 후, 실험동물은 다시 원통 수조에 5분 동안 있게 한다. 실험동물이 어떠한 움직임을 보이지 않을 때 부동 상태로 간주하며, 심한 저항을 보이는 것은 활동적인 움직임을 보이는 것을 의미한다. 부동 상태는 머리를 물 위로 드러내기 위한 최소한의 움직임만 하면서 똑바로 서서 움직이지 않고 떠 있는 상태로 간주한다.

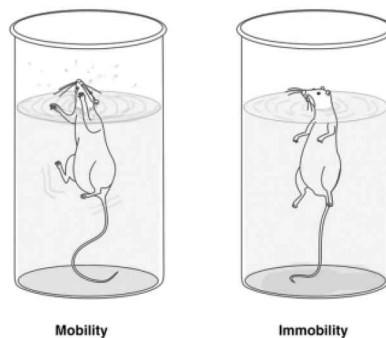


그림 7. 강제 수영 검사

[출처: Rev Bras Psiquiatr. 2013;35 Suppl 2:S112-20]

⑥ 꼬리 현수법(tail suspension test)

실험동물을 각각 분리된 구역에서 꼬리 끝부분으로부터 약 1 cm 떨어진 부위에 부착된 테이프에 의하여 거꾸로 매달고, 실험기간 총 6분 중에서 마지막 4분 동안 발생한 부동시간을 측정한다. 부동 상태는 매달려있는 상태에서 아무런 움직임 없이 완전히 멈춰있는 상태로 간주한다.

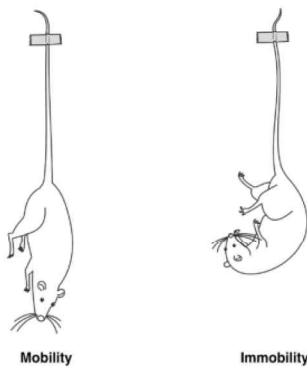


그림 8. 꼬리 현수법

[출처: Rev Bras Psiquiatr. 2013;35 Suppl 2:S112-20]

⑦ NSF(Novelty suppression of feeding) 시험

실험박스는 빨간 불이 직접적으로 들어오게 하고, 깔집을 깬다. 시험 24시간 전부터 식이공급을 제한한다. 시험기간 동안, 식이는 박스 중간에 위치한 흰색 플랫폼에 위치시키고 실험동물을 박스의 모서리에 위치시킨다. 일정 시간동안 실험동물이 식이에 접근하는 데 걸리는 시간을 기록한다. 이 시험방법은 식이를 섭취하고자 하는 욕구와 박스의 중앙으로 이동하는 두려움 사이에서 실험동물의 갈등을 유발하는 방법이다.



그림 9. Novelty suppression of feeding

[출처: Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice Neuromethods Volume 63, 2011, pp 107-121]

⑧ Resident-intruder 시험

실험동물(Intruder)을 다른 실험동물(Resident)의 케이지에 위치시킴으로써 공격성을 측정하는 시험방법이다. Resident 실험동물은 소극적이고 공격성이 적은 종으로 사용한다. Intruder 실험동물을 Resident 실험동물의 케이지에 5분 동안 위치시킨다. 첫 번째 공격을 하는 데 걸리는 시간과 Intruder 실험동물을 공격하는 횟수를 측정한다.

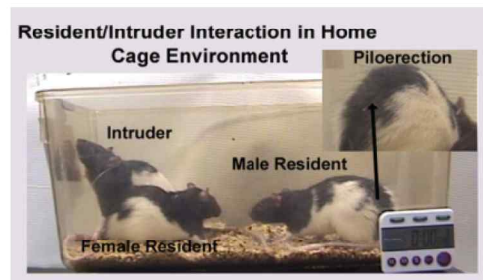


그림 10. Resident-intruder 시험

[출처: BMC Neurosci. 2008 Nov 13;9:111]

⑨ 명암이행시험(Light/dark transition test)시험

어둠 / 빛으로 전환 시험에 사용되는 장치는 문(7.5×7.5 cm)이 있는 파티션에서 동일한 크기의 밝은 부분(21×42×25 cm, 390 룩스 백색 다이오드)과 어두운 부분(21×42×25 cm, 2 룩스)으로 구성되어 있다. 밝은 부분에 마우스를 두고 5분 동안 관찰하면서 밝은 부분에 머문 시간(time in bright area) 및 밝은 부분으로 왕복한 횟수(number of transitions)를 측정한다. 매 행동실험 종료 후에는 70% 에탄올로 남아있는 냄새를 제거한다. 밝은 부분에 머문 시간 및 밝은 부분으로 왕복한 횟수가 증가하는 경우 항우울증 또는 항스트레스 효과가 있는 것으로 판단한다.

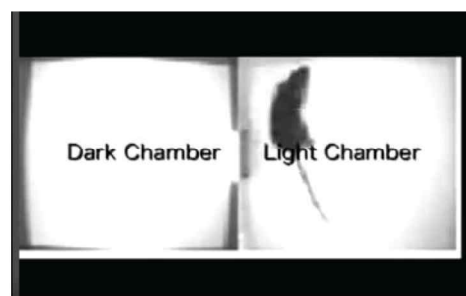


그림 11. Light/dark transition 시험

[출처: J Vis Exp 13:104, 2006]

(3) 심리적 지표

① Beck 우울척도 (Beck depression inventory, BDI)

Beck 등이 고안한 것으로 13세 이상 개인의 우울 정도를 측정하기 위해 사용되는 척도이다. 총 21개의 문항으로 구성되어 있으며, 문항 당 0~3점 척도를 사용한다. 총점은 63점으로, 점수가 높을수록 우울의 정도가 높음을 의미한다. 0~9점은 최소한의 우울 수준(minimal depression), 10~18점은 경도 우울(mild depression), 19~29점은 중등도 우울(moderate depression), 30~63점은 중증 우울(severe depression)로 본다.

② Beck 불안 척도(Beck anxiety inventory, BAI)

Beck 등이 고안한 것으로 17~80세 성인의 불안을 측정하기 위해 사용되는 척도이다. 총 21 문항으로 구성되어 있으며, 문항 당 0~3점 척도를 사용한다. 총점은 63점으로, 점수가 높을수록 불안의 정도가 높음을 의미한다. 0~7점은 최소한의 불안 수준(minimal level of anxiety), 8~15점은 경도 불안(mild anxiety), 16~25점은 중등도 불안(moderate anxiety), 26~63점은 중증 불안(severe anxiety)으로 본다.

③ 상태-특성 불안 척도(state trait anxiety inventory; STAI)

Spielberger 등이 고안한 것으로 상태 불안과 특성 불안 평가를 위해 사용되는 척도이다. 걱정, 두려움, 또는 긴장으로 조성되는 즉각적인 감정 상태인 상태 불안을 측정하는 20개 문항과 환경적 상황을 위협적인 것으로 인지하는 성격인 특성 불안을 측정하는 20개 문항으로 구성되어 있다. 문항 당 0~4점 척도를 사용하며, 상태 불안 및 특성 불안의 점수는 각각 20점에서 80점까지로 나타난다. 각 항목의 점수가 높을수록 상태불안 및 특성불안의 정도가 높음을 의미한다.

④ 시각적 유사 척도(visual analogue scale, VAS)

주관적으로 느끼고 있는 스트레스 정도를 측정하기 위해 사용되는 척도이다. 10cm 수평선의 왼쪽 끝은 0(스트레스가 없는 상태), 오른쪽 끝은 100(스트레스가 아주 심한 상태)로 표시하고 그 결과를 자로 cm 단위를 측정하여 결과값이 클수록 스트레스가 많은 것으로 판단한다.

⑤ 기분상태 척도(profile of mood states; POMS)

McNair 등이 고안한 것으로 13세 이상 개인의 기분상태 평가를 위해 사용되는 척도이다.

총 65문항으로 구성되어 있으며, 문항 당 0~4점 척도를 사용한다. POMS는 긴장-불안(Tension-anxiety), 우울-낙담(Depression-dejection), 분노-적개심(Anger-hostility), 생기-활력(Vigor-activity), 피곤-무력(Fatigue-inertia), 혼란-당황(Confusion-bewilderment)의 6개의 하위척도로 구성되어 있다. 전체 심리상태 점수는 긴장-불안, 우울-낙담, 분노-적개심, 피곤-무력, 혼란-당황의 5개 하위척도의 점수를 합한 후 생기-활동요인점수를 뺀 총합의 점수를 의미하며, 점수가 높을수록 심리상태가 좋지 않은 것을 의미한다.

⑥ 스트레스 반응 척도(stress response inventory, SRI)

SRI는 총 39문항 7개의 하위척도로 구성되어 있으며, 감정적, 신체적, 인지적, 행동적 스트레스 반응을 포함하고 있다. 하위척도는 긴장 6문항, 공격성 4문항, 신체화 3문항, 분노 6문항, 우울 8문항, 피로 5문항, 좌절 7문항으로 구성되었다. 각 문항은 0-4점까지의 5점 척도로 구성되어 있으며, 최저 0점에서 최고 156점으로 점수가 높을수록 더 높은 정서적, 신체적, 인지적, 행동적 스트레스 반응을 의미한다.

⑦ 스트레스 자각 척도(perceived stress scale, PSS)

10문항으로 이뤄진 체크리스트로, 5분 이내에 본인이 직접 평가할 수 있도록 만들어져 있다. 총점이 높을수록 스트레스가 높다고 할 수 있으며, 일반적으로 13~16점은 경도 스트레스, 16~18점은 우울증·불안증 검사가 필요한 중등도 스트레스, 18점 이상은 심한 스트레스로서 우울증·불안증 검사 및 정신건강 전문가와의 면담이 필요한 상태라고 할 수 있다.

⑧ 해밀턴 불안 척도(Hamilton anxiety scale, HAM-A)

해밀턴 불안 척도는 불안 정도를 측정하는 검사로 1959년 Hamilton에 의해 개발되었으며 타당도와 신뢰도가 입증되었다. HAM-A는 총 14문항으로 구성되어 있으며 각 문항은 Likert척도(0=없음, 1=경함, 2=중등도, 3=심함, 4=심하게 기능을 잃게 함)로 평가한다. 총 점수는 0~56점으로 정신적 불안 증상과 신체적 불안 증상의 두 가지 요인으로 구성된다. 점수가 높을수록 높은 불안 증상이 있음을 의미한다.

⑨ 해밀턴 우울 척도(Hamilton depression scale, HAM-D)

우울 증상 평가를 위해 Hamilton이 개발한 17문항으로 되어 있다. 표준 9개의 항목은 5점 척도(0~4점)로, 8개 항목은 3점 척도(0~2점)로 채점되며, 총점의 범위는 0~52점으로 점수가 높을수록 우울증이 심각하다는 것을 의미한다.

3. 시험 설계 시 고려사항

(1) 시험관 시험

(가) 시험계

뇌 신경세포(PC12, SK-N-BE(2)C 등)에 Corticosterone을 처리하여 스트레스 유도 후 시험물질의 스트레스 완화 효과를 측정할 수 있다.

(나) 바이오마커

시험물질의 작용기전을 설명하기 위하여 예상되는 대사 경로에 위치하는 유전자, 효소, 전사인자, 신호전달물질, 대사산물 등의 바이오마커에 대한 활성 및 그 발현 정도 등을 측정한다.

(다) 통계처리

시험결과는 시험물질 처리에 따른 변화 또는 대조군과 시험군을 통계적으로 비교하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 판정한다.

(2) 동물시험

(가) 실험동물

스트레스를 유도한 동물모델을 이용하여, 시험물질을 투여한 후 긴장완화와 관련된 바이오마커를 측정한다. 관찰하고자 하는 목적에 따라 다양한 모델을 사용하여 긴장완화에 대한 효과를 종합적으로 판단한다. 스트레스 유도에 사용되는 동물모델의 예는 아래와 같다.

※ 스트레스 유도 프로토콜

(이해를 돕기 위해 작성된 내용으로 추가/변경 가능함)

예시1. 다음과 같은 스트레스원을 무작위로 몇 주간 반복하여 제시
스트레스원(stressor)

- (1) 24시간 절식
- (2) 24시간 물 공급 중단
- (3) 1시간 동안 빈 물통 제공
- (4) 7시간 동안 케이지 45° 기울임
- (5) 밤샘 조명
- (6) 24시간 동안 100 g 톱밥 깔집에 200 mL 물 뿌림
- (7) 6분 동안 8℃ 물에서 강제 수영
- (8) 2시간 동안 신체적 통제
- (9) 24시간 동안 이물질(예: 플라스틱 조각) 노출

예시2. 다음과 같은 스트레스 프로토콜을 몇 주간 반복

1일차	2일차	3일차	4일차	5일차	6일차	7일차
절식	빈 물통	강제수영	통제	절식	절수	빈 물통
절수	이물질 노출	밤샘조명	기울임	젖은 깔집	밤샘조명	기울임

예시3. 부동상태, 전기자극, 강제수영, 추위(4℃) 등 하나의 스트레스원을 반복하여 제시

(나) 바이오마커

실험동물을 대상으로 원료의 경구 투여 또는 섭취에 의한 행동적 지표와 생리적 지표 변화를 측정한다.

(다) 통계처리

시험결과는 대조군과 시험군을 통계적으로 비교하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 판정한다.

(3) 인체적용시험

(가) 시험대상

① 시험대상자(예시)

- 18세 이상 75세 이하의 성인
- 아래의 스트레스 척도 중 1가지 이상 해당되는 자
 - 스트레스 반응 척도(stress response inventory, SRI)가 50점 이상, 115점 이하인 자
 - 스트레스 자각 척도(perceived stress scale, PSS)가 13점 이상, 16점 이하인 자
 - 정신과 전문의의 정신과적 면담 및 설문지(VAS, Visual Analog Scale)를 통해 현재 긴장 및 스트레스 증상이 있다고 판단되는 경우(VAS 50% 이상 응답)
 - 기타 척도: 경증~중등도
- 아래의 우울/불안척도 중 1가지 이상 해당되는 자
 - 백 우울 척도 (Korean-Beck Depression Inventory-II, K-BAI-II)가 14점 이상, 45점 이하인 자
 - 백 불안 척도 (Korean-Beck Anxiety Inventory, K-BAI)가 8점 이상, 45점 이하인 자
 - 상태-특성 불안 척도(state trait anxiety inventory, STAI)가 40점 이상, 60점 이하인 자
 - 기타 척도: 경증~중등도

② 대상자 제외기준(예시)

- 질병상태
 - 알콜 사용·유발 장애, 심장질환, 중추 신경 장애 등으로 입원 및 약물치료, 재활치료 중인 자
 - 조현병, 양극성 장애 등의 정신질환을 앓고 있거나 병력이 있는 자
 - 모든 중증의 소화기계, 직장·항문질환, 간, 신장, 신경계, 호흡기계, 내분비계, 혈액·종양, 정신질환, 심혈관계 질환 등이 있거나 과거력이 있는 자
 - 시험물질의 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계 질환(예 : 크론병)이나 위장관계 수술(단, 단순맹장수술이나 탈장 수술은 제외)의 과거력이 있는 자
 - 시험 시작 3개월 이내에 치매로 치료중인 자
 - DSM-V 기준으로 주요우울증, 범불안장애, 외상 후 스트레스 장애, 강박장애 등으로 진단 받은 자
 - 음주, 흡연 등의 금단 현상을 보이는 자
 - 조절되지 않는 고혈압환자(160/100 mmHg 이상, 시험대상자 10분 안정 후 측정기준)

- 혈당이 조절되지 않는 당뇨병환자(공복혈당 180 mg/dL 이상 또는 3개월 이내에 당뇨병으로 인해 약제를 새로 시작하는 경우)
- 갑상선자극호르몬(TSH) 0.5 μ U/mL 이하이거나 7.0 μ U/mL 이상인 자
- 갑상선 질환으로 치료중이거나 약물을 복용 중인 자
- Creatinine이 시험기관 정상 상한치의 2배 이상인 자
- AST(GOT) 또는ALT(GPT)가 시험기관 정상상한치의 3배 이상인 자
- Serum Creatinine이 2.0mg/dl 이상인 자
- Creatine Kinase(CK)가 정상상한치의 2배 이상인 자

○ 약물복용

- 약물중독자
- 약물 및 임상적으로 유의한 과민반응의 병력이 있는 자
- 시험시작 4주 이내에 항우울제, 항불안제, 수면제 등 스트레스로 인한 긴장완화에 영향을 미치는 약물을 복용한 자
- 시험시작 4주 이내에 경구용 스테로이드제, 부신피질호르몬제를 복용한 자
- 스크리닝 검사 전 2개월 이내에 항정신병 약물치료를 받은 경험이 있는 자

○ 생리적 상태

- 임신부, 임신을 준비하는 자
- 수유부
- 올바른 피임방법을 사용하지 않는 여성
- 출산 후 6개월 이내 여성

○ 생활 습관

- 과도한 알코올 섭취(> 2 g/일)
- 흡연자
- 야간근무, 교대근무, 심한 중복 업무 중인 자(과도한 육체적 만성피로를 보이는 자)

○ 기타

- 시험시작 2주 이내에 스트레스 개선과 관련된 건강기능식품을 복용한 자
- 최근 3개월 내 다른 인체적용시험에 참가한 자
- 시험물질에 대한 알레르기/부작용이 있는 자
- 연구자에 의해 실험에 부적합하다고 판단되는 자

(나) 시험설계

이중눈가림, 무작위배정, 위약대조연구(Randomized, controlled trial; RCT)를 기본으로 한다. 시험설계 시 대상자 선정·제외 기준을 명확히 하여 기관생명윤리위원회(IRB)에서 약물 치료가 필요한 대상자가 시험에 포함되지 않도록 한다. 이때, 기관명과 승인일이 기술되도록 한다.

대상자 수의 산출방법과 근거, 검정력 등은 기술되어야 하며, 이중눈가림이 이루어진 경우, 배정된 군에 대해 비밀이 유지된 대상(예: 연구대상자, 연구담당자, 결과분석자 등), 비밀유지방법, 눈가림의 해제 등에 대해 기술하고 비뚤림 방법을 최소화하기 위한 방법(무작위배정)이 기술되어야 한다.

또한, 평가지표에 영향을 미칠 수 있는 기저시점에서의 각 군 대상자들의 인구학적 특성, 기초특성(성별, 연령, 신체 활동량, 흡연력, 약물 복용력, 식이 섭취량, 체중, 운동, 음주 등)을 군간 차이로 기술한다.

(다) 바이오마커

기능성 내용을 확인할 수 있는 긴장완화 관련 바이오마커의 변화를 측정한다. 바이오마커는 기전별로 다양한 지표들이 포함되어 있기 때문에 연구 목적에 부합하는 추측 기전을 선정하고, 관련된 바이오마커의 결과에 일관성이 나타나야 한다(Ⅲ. 기능성 시험방법 1. (1). 연구유형별 바이오마커 참고).

(라) 통계처리

인구학적 자료 및 기초특성의 측정지표에 대한 통계분석방법을 기술하고 분석군(ITT, FAS, PP)에 대해 명확하게 정의하여 주분석군 설정에 대한 설명이 계획서와 결과보고서에 기술되도록 한다. 또한, 기능성 평가지표에 대한 통계분석방법 및 중도탈락자 및 결측 처리에 대한 통계분석방법을 명확히 한다. 연구 개시 후 측정 시기 및 방법의 변화가 있는 경우, 그 변경 사유를 기술하여야 하며, 층화 분석, 보정분석 등이 제출된 경우, 사전 계획 여부가 기술되도록 한다. 이때, 각 군별 기능성 평가지표에 대한 분석결과에 사용된 통계분석방법, 군간 통계적 유의성, 시험대상자 수, 평균, 표준편차 등이 확인될 수 있도록 하여야 하며 통계분석방법의 변경이 있는 경우, 변경사항에 대해 기술하도록 한다.

1. 종속변수가 범주형일 경우

○ 범주형 변수는 크게 명목 척도와 순위 척도로 구분할 수 있음

- 명목 척도 : 성별, 국가, 흡연 여부 등 연속되지 않으며 범주 간 서열이 존재하지 않는 범주형 척도
- 순위 척도 : 질병의 병기(1기, 2기, 3기) 등 연속되지 않으나 범주 간 서열이 존재하는 범주형 척도

○ 연속형 변수는 수치화된 변수로 연속성이 있으며, 평균, 표준편차 등을 계산할 수 있는 변수임

1.1. Chi-square test

- 두 군간의 차이를 비교할 때 사용됨
- * 빈도가 5 미만인 항목이 있는 경우 Fisher's exact test를 사용

1.2. McNemar's test

- 군 내의 전후 차이를 비교할 때 사용됨

2. 종속변수가 연속형이고 비교군이 2개일 경우

※ 연구 내 비교군이 2개(대조군, 시험군)일 경우 사용되는 분석 모델임

2.1. Paired T-test : 군 내의 전후 차이를 비교할 때 사용됨

2.1.1. Wilcoxon's signed-ranks T-test

- 군 내의 전후 차이 비교 시, 변수의 분포가 정규분포를 따르지 않는 경우 사용됨

2.2. Independent T-test : 두 군간의 차이를 비교할 때 사용됨

2.2.1. Wilcoxon's signed-ranks T-test

- 두 군간의 차이 비교 시, 변수의 분포가 정규분포*를 따르지 않는 경우 사용됨

2.3. Linear mixed effect model

- 유효성 평가 지표 측정 시점이 3회 이상일 경우 사용할 수 있음*

* 방문 시점 간의 공분산 구조(covariance structure)를 결정하여 분석에 적용할 수 있는 모델이며, 효과의 크기(slope), linear function의 절편(intercept) 등의 방문시점, 대상자 등에 따른 고정효과(fixed effect) 또는 무작위효과(random effect)의 여부를 결정하여 model안에 혼합(mixed effect)하여 적용할 수 있음

3. 종속변수가 연속형일 경우 AND 비교군이 3개 이상일 경우

※ 연구 내 비교군이 3개(대조군, 시험군1, 시험군2 등)일 경우 사용되는 분석 모델임

3.1. ANOVA(Analysis of variance) : 군 간의 차이를 비교할 때 사용

3.2. Kruskal Wallis test : 군 간의 차이 비교 시, 변수의 분포가 정규분포를 따르지 않는 경우 사용

※ 변수 분포의 정규성 검정

- 정규성 검정 방법은 Kolmogorov-Smirnov test, Shapiro-Wilk test 등의 방법으로 검정할 수 있음. 일반적으로 p value가 0.05 미만일 경우, 정규분포를 따르지 않는 것으로 판단함. 그러나 현실에서 해당 기준에서 정규분포를 따르는 경우가 많지 않으므로, p value가 0.05 이상이라도 marginal한 p value를 확인하거나 Q-Q plot을 육안으로 확인하는 등 연구자가 자의적으로 정규분포를 따르는 것으로 판단할 수 있음
- 군 당 sample size가 30 이상인 경우, 중심극한정리를 이용하여 정규성을 가정하는 경우가 있음. 그러나 중심극한정리는 표본집단이 대표하는 모집단이 무한모집단이라는 가정 하에 사용됨. 즉, 모집단에 대한 가정이 불확실한 경우 또는 유한모집단인 경우가 있으므로 군 당 sample size가 30 이상이라고 해도 정규성 검정이 필요할 수 있음. 또한 30명이라는 기준은 연구자가 임의적으로 설정한 것임을 고려하여 절대적인 기준이 되지 않을 수 있음

4. 교란변수 보정이 필요한 경우

- Randomized Clinical Trial(중재연구)은 randomization을 통해 대상자가 군에 배정되므로, 교란변수를 통제할 수 있는 설계의 연구임. 그러나 우연에 의해 baseline의 특성이 군 간 차이를 보이는 경우가 발생할 수 있음. 이럴 경우, 연구자는 해당 변수를 공변량(covariate)으로 model에 포함시켜 분석할 수 있음. 그러나 가능할 경우, randomization block으로 생성하여 randomization 단계에서 층화무작위배정 등으로 미리 불균형을 방지하는 것이 바람직할 수 있음

4.1. ANCOVA

- 보정하고자 하는 변수를 모델 내 공변량(covariate)으로 추가할 수 있음

4.2. Linear mixed effect model

- 보정하고자 하는 변수를 모델 내 공변량(covariate)으로 추가할 수 있음

IV 참고문헌

1. 「건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정」, 식품의약품안전처 고시
2. 건강기능식품(개정판), 김미경, 권오란, 전향숙, 원혜숙, 김지연, 강병철, 제정환, 한재갑, 홍성화, 복혜숙, 김우선, 피재호, 박현용, 김현정, 교문사, 2010
3. 건강기능식품 기능성평가 해설서, 식품의약품안전처, 2008
4. 건강기능식품 시험법 가이드(I), 식품의약품안전처, 2005
5. 고민석, 이승진, 강상모. 마우스에서 흰목이버섯 (*Tremella fuciformis* Berk)의 장·단기적 항스트레스 효과. *KSBB Journal* 24(2):131-139, 2009
6. 국민건강영양조사, 질병관리본부, 2017
7. 김병수, 민정아. 심박변이도 HRV의 활용과 해석. *법문에듀케이션*, 2015
8. 김이은, 조은지, 변의홍. 꾸지뽕 열매 조다당류 분획물의 산화방지 활성 및 신경세포 보호 효과. *한국식품과학회지* 50(5):543-548, 2018
9. 김용구, 신철민. Ketamine의 속효성 항우울효과와 임상 적용. *신경정신의학* 57(2):108-118, 2018
10. 김종민, 박선경, 강진용, 박상현, 박수빈, 유슬기, 한혜주, 이수광, 이 욱, 허호진. 품종별 꽃감(*Diospyros kaki*)의 영양성분 분석, 산화방지 효과 및 뇌 신경세포 보호효과. *한국식품과학회지* 50(2):225-237, 2018
11. 나주련, 김선오, 조아라, 배동혁, 오교녀, 김용재, 이유현, 전우진. 석류 열수 추출물의 수면박탈을 유도한 Rat 모델에서의 항스트레스 효과. *한국식품영양과학회지* 45(11):1533-1543, 2016
12. 대한스트레스학회 저. 스트레스 과학. *한국의학*. 2013
13. 박상기, 김태일, 이원경, 박형국, 홍진태. 녹차추출물과 테아닌 복합물의 신경전달물질 조절을 통한 항스트레스 효과. *약학회지* 53(5):241-249, 2009
14. 양선아, 전상경, 이은정, 임남경, 심창현, 이인선. 라벤더, 실버퍼, 그레이프후룻 정유 흡입이 마우스의 구속 스트레스에 미치는 효과. *생명과학회지* 20(8):1230-1234, 2010

15. 우남식, 서용배. 굴(*Crassostrea gigas*)·나시바(*Saccharina japonica*) 발효 분말의 스트레스 완화 및 수면 유도 효과. 한국수산과학회지 46(6):702-707, 2013
16. 유윤선, 박종민, 고인성, 강형원, 유영수. 구속스트레스로 불안과 우울증상을 일으킨 백서에서 죽여의 개선 효과. 동의신경정신과학회지 24(3):293-308, 2013
17. 이소영, 최재홍, 정향숙, 김영균, 조수인. 생쥐의 심리적 스트레스에 대한 호초(胡椒)의 효과. 論文集: 大田大學校 韓醫學研究所. 韓醫學編 21(2):95-104, 2013
18. 이하민, 정영은, 채정호. *Saccharomyces Cerevisiae* 효모 추출물 SCP-20의 스트레스 반응, 불안 및 우울에 대한 효과 : 이중 맹검 위약 통제 연구. 대한불안의학회지 5(1):8-13, 2009
19. 이중휘, 최승훈, 오민석, 김재식, 윤상원. 포도즙가산조인탕(葡萄汁加酸棗仁湯)의 스트레스 해소효과에 대한 임상적(臨床的) 연구(研究). 12(1):129-137, 2003
20. 장 석, 이도경, 양환진, 안향미, 백은혜, 김미진, 이강오, 정명준, 김진웅, 하남주. 유산균 (*Lactobacillus acidophilus*, *Pediococcus pentosaseus*, *Bifidobacterium longum* SPM1205)의 항스트레스 효과. 환경독성학회지 25(1):79-84, 2010
21. 청소년건강행태조사, 질병관리본부, 2018
22. 최현숙, 신건성, 최순옥, 김승환, 황방연, 이종길, 이명구. 돌외 에탄올 추출물 엑스의 만성 스트레스-유도 불안작용에 대한 개선작용. 생약학회지 42(1):32-37, 2011
23. Abelaira HM, Reus GZ, Quevedo J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. Rev Bras Psiquiatr. 35 Suppl 2:S112-20, 2013
24. Arab L, Guo R, Elashoff D. Lower Depression Scores among Walnut Consumers in NHANES. Nutrients 11(2):1-13, 2019
25. Ashton MM, Berk M, Ng CH, Hopwood M, Dodd S, Turner A, Brown E, Jacka FN, Cotton SM, Khoo JP, Chatterton ML, Kavanagh BE, Nadjidai SE, Lo Monaco SL, Harvey BH, Sarris J, Malhi GS, Dowling NL, Dean OM. Efficacy of adjunctive *Garcinia mangostana* Linn (mangosteen) pericarp for bipolar depression: study protocol for a proof-of-concept trial. Braz J Psychiatry 41(3):245-253, 2019
26. Beck AT et al. An inventory for measuring depression. Arch Gen Psychiatry 4:561-571, 1961

27. Beck AT et al. An inventory for measuring clinical anxiety: psychometric properties. *J Consult Clin Psychol* 56:893-897, 1988
28. Benjamin AS, Rene H. Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice. *Neuromethods* 63:107-121, 2011
29. Buttke D, Vagi S, Bayleyegn T, Sircar K, Strine T, Morrison M, Allen M, Wolkin A. Mental health needs assessment after the Gulf Coast oil spill-Alabama and Mississippi, 2010. *Prehosp Disaster Med* 27:401-408, 2012
30. Cattaneo A, Macchi F, Plazzotta G, Veronica B, Bocchio-Chiavetto L, Riva MA, Pariante CM. Inflammation and neuronal plasticity: a link between childhood trauma and depression pathogenesis. *Front Cell Neurosci* 9:1-12, 2015
31. Choi EK, Won YH, Kim SY, Noh SO, Park SH, Jung SJ, Lee CK, Hwang BY, Lee MK, Ha KC, Baek HI, Kim HM, Ko MH, Chae SW. Supplementation With Extract of *Gynostemma Pentaphyllum* Leaves Reduces Anxiety in Healthy Subjects With Chronic Psychological Stress: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Phytomedicine* 52:198-205, 2019
32. Choudhry QN, Kim JH, Cho HT, Heo W, Lee JJ, Lee JH, Kim YJ. Ameliorative effect of black ginseng extract against oxidative stress-induced cellular damages in mouse hepatocytes. *J Ginseng Res* 43:179-185, 2017
33. Dantzer R, Auber A, Bluthe R, Gheusi G, Cremona S, Laye S, Konsman J, Parnet P, Kelley K W. Mechanisms of the behavioral effects of cytokines. *Adv Exp Med Biol* 461:83-105, 1999
34. Devine JK, Bertisch SM, Yang H, Scott-Sutherland J, Wilkins A, Molina V, Henrikson K, Haack M. Glucocorticoid and inflammatory reactivity to a repeated physiological stressor in insomnia disorder. *Neurobiol Sleep Circadian Rhythms* 6:77-84, 2018
35. Dhamija I, Parle M, Kumar S. Antidepressant and anxiolytic effects of *Garcinia indica* fruit rind via monoaminergic pathway. *Biotech* 7:131, 2017

36. Elms L, Shannon S, Hughes S, Lewis N. Cannabidiol in the Treatment of Post-Traumatic Stress Disorder: A Case Series. *J Altern Complement Med* 25(4):392-397, 2019
37. Ferris CF et al. Imaging the neural circuitry and chemical control of aggressive motivation. *BMC Neurosci* 13:111, 2008
38. Fitzgerald PJ, Yen JY, Watson BO. Stress-sensitive antidepressant-like effects of ketamine in the mouse forced swim test. *PLoS One* 14(4):1-17, 2019
39. Freidin M, Bennett MV, Kessler JA. Cultured sympathetic neurons synthesize and release the cytokine interleukin 1 beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10440-10443, 1992
40. Guo LT, Wang SQ, Su J, Xu LX, Ji ZY, Zhang RY, Zhao QW, Ma ZQ, Deng XY, Ma SP. Baicalin ameliorates neuroinflammation-induced depressive-like behavior through inhibition of toll-like receptor 4 expression via the PI3K/AKT/FoxO1 pathway. *J Neuroinflammation* 16(1):95, 2019
41. Hamilton, M. Diagnosis and rating of anxiety. *British Journal of Psychiatry. Special Publication* 3:76-79, 1969
42. Hamilton, M. A RATING SCALE FOR DEPRESSION. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 23:1 56-62, 1960
43. Hussein UK, Hassan NEY, Elhalwagy MEA, Zaki AR, Abubakr HO, Nagulapalli Venkata KC, Jang KY, Bishayee A. Ginger and Propolis Exert Neuroprotective Effects against Monosodium Glutamate-Induced Neurotoxicity in Rats. *Molecules* 22(11):1-24, 2017
44. Ibrahim MA, Bakhaat GA, Tammam HG, Mohamed RM, El-Naggar SA. Cardioprotective effect of green tea extract and vitamin E on Cisplatin-induced cardiotoxicity in mice: Toxicological, histological and immunohistochemical studies. *Biomed Pharmacother* 113:1-9, 2019
45. Takao K, Miyakawa T. Light/dark Transition Test for Mice. *J Vis Exp* 13:104, 2006

46. Kim HG, Cheon EJ, Bai DS, Lee YH, Koo BH. Stress and Heart Rate Variability: A Meta-Analysis and Review of the Literature. *Psychiatry Investig* 15:235-245, 2018
47. Kim YH, Im AR, Park BK, Paek SH, Choi G, Kim YR, Whang WK, Lee KH, Oh SE, Lee MY. Antidepressant-Like and Neuroprotective Effects of Ethanol Extract from the Root Bark of *Hibiscus syriacus* L. *Biomed Res Int* 19: 7383869, 2018
48. Leonard BE. Changes in the immune system in depression and dementia: Causal or co-incidental effects? *Int J Dev Neurosci* 19:305-312, 2001
49. Liu D et al. Resveratrol reverses the effects of chronic unpredictable mild stress on behavior, serum corticosterone levels and BDNF expression in rats. *Behav Brain Res.* 1:9-16, 2014
50. Li X, Smid SD, Lin J, Gong Z, Chen S, You F, Zhang Y, Hao Z, Lin H, Yu X, Jin X. Neuroprotective and Anti-Amyloid β Effect and Main Chemical Profiles of White Tea: Comparison Against Green, Oolong and Black Tea. *Molecules* 24(10):1-15, 2019
51. Li Z, Lam KYC, Liu X, Qi A, Yao P, Dong TTX, Yi T, Tsim KWK, Chen J. A Chinese Herbal Preparation, Xiao-Er-An-Shen Decoction, Exerts Neuron Protection by Modulation of Differentiation and Antioxidant Activity in Cultured PC12 Cells. *Evid Based Complement Alternat Med* 3:8670421, 2018
52. Liu Y, Zhi D, Wang X, Fei D, Zhang Z, Wu Z, Li Y, Chen P, Li H. Kushui Rose (*R. Setate* x *R. Rugosa*) decoction exerts antitumor effects in *C. elegans* by downregulating Ras/MAPK pathway and resisting oxidative stress. *Int J Mol Med* 42(3):1411-1417, 2018
53. Miranda M, Morici JF, Zanoni MB, Bekinschtein P. Brain-Derived Neurotrophic Factor: A Key Molecule for Memory in the Healthy and the Pathological Brain. *Front Cell Neurosci* 7:363, 2019
54. McNAIR et al. Manual for the Profile of Mood States. San Diego, CA: Educational and Industrial Testing Service 1971

55. Meyers CA. Mood and cognitive disorders in cancer patients receiving cytokine therapy. *Adv Exp Med Biol* 461:75-81, 1999
56. Mitsumoto Y, Sato R, Tagawa N, Kato I. Rubiscolin-6, a δ -Opioid Peptide from Spinach RuBisCO, Exerts Antidepressant-Like Effect in Restraint-Stressed Mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 65(2):202-204, 2019
57. Mizushige T, Nogimura D, Nagai A, Mitsuhashi II, Taga Y, Kusubata M, Iattori S, Kabuyama Y. Ginger-Degraded Collagen Hydrolysate Exhibits Antidepressant Activity in Mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 65(3):251-257, 2019
58. Nestler EJ, et al. Neurobiology of depression. *Neuron* 34:13-25, 2002
59. Olonode ET, Aderibigbe AO, Adeoluwa OA, Ajayi AM. Protective Effects of Morin Hydrate on Acute Stress-Induced Behavioral and Biochemical Alterations in Mice. *Basic Clin Neurosci* 9(3):195-208, 2018
60. Rai A, Gill M, Kinra M, Shetty R, Krishnadas N, Rao CM, Sumalatha S, Kumar N. Catechin ameliorates depressive symptoms in Sprague Dawley rats subjected to chronic unpredictable mild stress by decreasing oxidative stress. *Biomed Rep* 11(2):79-84, 2019
61. Scholey A, Benson S, Gibbs A, Perry N, Sarris J, Murray G. Exploring the Effect of Lactium™ and Zizyphus Complex on Sleep Quality: A Double-Blind, Randomized Placebo-Controlled Trial. *Nutrients* 9: E154, 2017
62. Shellhaas RA, Chang T, Tsuchida T, Scher MS, Riviello JJ, Abend NS. The American Clinical Neurophysiology Society's guideline on continuous electroencephalography monitoring in neonates. *J Clin Neurophysiol* 28:611-617, 2011
63. Onishi S, Meguro S, Pervin M, Kitazawa H, Yoto A, Ishino M, Shimba Y, Mochizuki Y, Miura S, Tokimitsu I, Unno K. Green Tea Extracts Attenuate Brain Dysfunction in High-Fat-Diet-Fed SAMP8 Mice. *Nutrients* 11:nu11040821, 2019
64. Short NA, Schmidt NB. A Multimethod Examination of the Effect of Insomnia Symptoms on Anxious Responding to a Social Stressor. *Behav Ther* 49(3): 323-330, 2018

65. Son H, Jung S, Shin JH, Kang MJ, Kim HJ. Anti-Stress and Anti-Depressive Effects of Spinach Extracts on a Chronic Stress-Induced Depression Mouse Model through Lowering Blood Corticosterone and Increasing Brain Glutamate and Glutamine Levels. *J Clin Med* 7: 1-10, 2018
66. Spielberger CD et al. Manual for the State-Trait Anxiety Inventory. Consulting Psychologists Press 1983
67. Stuart Ira Fox 외. 생리학(12판). 라이프사이언스. 2014
68. Unno K, Furushima D, Hamamoto S, Iguchi K, Yamada H, Morita A, Pervin M, Nakamura Y. Stress-reducing effect of cookies containing matcha green tea: essential ratio among theanine, arginine, caffeine and epigallocatechin gallate. *Heliyon* 5(5):1-6, 2019
69. Unno K, Noda S, Kawasaki Y⁴, Yamada H, Morita A, Iguchi K, Nakamura Y. Reduced Stress and Improved Sleep Quality Caused by Green Tea Are Associated with a Reduced Caffeine Content. *Nutrients* 9(7):1-13, 2017
70. Valdes-Sustaita B, Lopez-Rubalcava C, Gonzalez-Trujano ME, Garcia-Viguera C, Estrada-Camarena E. Aqueous Extract of Pomegranate Alone or in Combination with Citalopram Produces Antidepressant-Like Effects in an Animal Model of Menopause: Participation of Estrogen Receptors. *Int J Mol Sci* 18(12):1-13, 2017
71. Vigil JM, Stith SS, Diviant JP, Brockelman F, Keeling K, Hall B. Effectiveness of Raw, Natural Medical Cannabis Flower for Treating Insomnia under Naturalistic Conditions. *Medicines (Basel)* 5:1-10, 2018
72. Wang J, Cheng C, Xin C, Wang Z. The Antidepressant-like Effect of Flavonoids from *Trigonella Foenum-Graecum* Seeds in Chronic Restraint Stress Mice via Modulation of Monoamine Regulatory Pathways. *Molecules* 24(6):1-16, 2019
73. Wang Y, Huang M, Lu X, Wei R, Xu J. *Ziziphi spinosae* lily powder suspension in the treatment of depression-like behaviors in rats. *BMC Complement Altern Med* 17(1):238, 2017

74. Zhang F, Liu B, Lei Z, Wang J. mGluR1,5 activation improves network asynchrony and GABAergic synapse attenuation in the amygdala: implication for anxiety-like behavior in DBA/2 mice. *Mol Brain* 5:20, 2012
75. Zhang H, Caudle Y, Wheeler C, Zhou Y, Stuart C, Yao B, Yin D. TGF- β 1/Smad2/3/Foxp3 signaling is required for chronic stress-induced immune suppression. *J Neuroimmunol* 314:30-41, 2018
76. Zhang H, Liu P, Wu X, Zhang Y, Cong D. Effectiveness of Chinese herbal medicine for patients with primary insomnia: A PRISMA-compliant meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 98(24):1-9, 2019
77. Zhang H, Liu P, Wu X, Zhang Y, Cong D. Effectiveness of Chinese herbal medicine for patients with primary insomnia: A PRISMA-compliant meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 98(24):1-9, 2019

건강기능식품 기능성 평가 가이드(민원인 안내서)

- 긴장완화 관련 -

발 행 인 : 서경원

편 집 위 원 장 : 윤혜정

편 집 위 원 : 이해영, 윤태형, 권광일, 서은채, 이유경, 고경욱, 정유경,
홍은경, 김규현, 이미영, 안정선, 최정호, 이세윤, 이민아

발 행 처 : 식품의약품안전평가원

발 행 일 : 2022년 7월

문 의 처 : 식품위해평가부 영양기능연구과

(043-719-4402, 4409, 4416, 4417, 4419, 4422,
4428, 4429)



건강기능식품 기능성 평가 가이드 (민원인 안내서)

MINISTRY OF FOOD AND DRUG SAFETY
www.mfds.go.kr



【공직자 부조리 및 공익신고안내】 신고자 및 신고내용은 보호됩니다.

- ▶ 부조리 신고 : 식약처 홈페이지 “국민신문고 > 공직자 부조리 신고” 코너
- ▶ 공익 신고 : 식약처 홈페이지 “국민소통 > 신고센터 > 부패·공익신고 상담” 코너