

발 간 등 록 번 호

안내서-0779-02

건강기능식품 기능성 평가 가이드

(민원인 안내서)

면역기능 관련

2020. 9.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

지침서·안내서 제·개정 점검표

명칭

건강기능식품 기능성 평가 가이드
(면역기능 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(☞안내서) ☐ 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. 2020년 9 월 일 담당자 확 인(부서장) 이 혜 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 2020년 9월 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(식품의약품안전처 지침서등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 본 안내서에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 영양기능연구과로 문의하시기 바랍니다.

전화번호: 043-719-4402, 4416, 4421, 4422, 4423, 4425, 4426, 4430

팩스번호: 043-719-4420

제·개정 이력

연번	제·개정번호	승인일자	주요내용
1	안내서-0779-01	2014.12.	제정
2	안내서-0779-02	2020.9.	개정 (기능성 시험방법 등 업데이트)

CONTENTS

※ 건강기능식품의 기능성 개요	1
※ 약어	3
 I 서 론	5
 II 일반적 사항	5
1. 개요	5
2. 보건학적 중요성	16
 III 기능성 시험 방법	17
1. 바이오마커의 선정	17
2. 주요 바이오마커의 측정 방법	23
3. 시험 설계 시 고려사항	31
 IV 참고문헌	35

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 생리학적인 효과 또는 기전이 명확하게 입증되어야 하고 일관성 있는 바이오마커의 개선효과가 다수의 인체적용시험 (RCT)에서 확보되어야 함 ※ 질병 관련 바이오마커의 확인
생리활성 기능 ²⁾	○○에 도움을 줄 수 있음	기반연구 자료를 통해 기능성 있는 생리학적인 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 확인되어야 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

BSA	bovine serum albumin
CD	cluster of differentiation
Con A	concanavalin A
COX ₂	cyclooxygenase-2
CTL	cytotoxic T lymphocyte
DEPC	diethyl pyrocarbonate
DTH	delayed-type hypersensitivity
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FACS	fluorescence-activated cell sorting
Fc	fragment crystallizable
FOXP3	forkhead box protein P3
IFN	interferon
Ig	immunoglobulin
I κ B	inhibitor of kappa B
IL	interleukin
iNOS	inducible nitric oxide synthase
JNKs	c-Jun terminal kinases
LO	lipoxygenase
LBP	lipopolysaccharide-binding protein
LPS	lipopolysaccharide
MAC	membrane attack complex
MAPKs	Mitogen activated protein kinases
MHC	major histocompatibility complex
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK cell	natural killer cell
NO	nitric oxide

PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PFC	plaque forming cell
PGE2	prostaglandin E2
PHA	phytohemagglutinin
PKC	protein kinase C
PRRs	pattern-recognition receptors
PWM	pokeweed mitogen
ROR γ t	RAR-related orphan receptor gamma
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis
SRBC	sheep red blood cell
Tc cell	cytotoxic T cell
Th cell	T helper cell
Treg cell	regulatory T cell
TLR	toll-like receptor
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
TNF	tumor necrosis factor

I

서론

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

II

일반적 사항

1. 개요

가. 면역기능의 의의

면역은 체내에 존재하는 자기방어체계로서 인체가 외부로부터 침입해오는 각종 물질이나 생명체를 자기 자신에 대한 이물질로 인식하여 제거하고 대사시키는 과정이다. 외부 자극에 의한 손상이나 병원 미생물의 침입으로부터 자신을 방어하기도 하지만, 염증반응 등과 같이 자기 자신의 조직에 손상을 줄 수도 있다. 면역기능의 변화를 조절하여 정상으로 회복시키거나 변화의 폭을 줄여 주는 작용으로 면역기능은 면역증가와 면역억제로 구분된다. 면역증가는 외부의 이물질이나 병원체로부터 자신을 보호하는 기능을 말하며, 면역억제는 외부 물질에 의해 초래되는 알레르기 반응, 자기항원 또는 변형된 자기항원에 대한 반응 등 바람직하지 않게 증가된 면역반응을 억제시키는 것을 의미한다(그림 1).

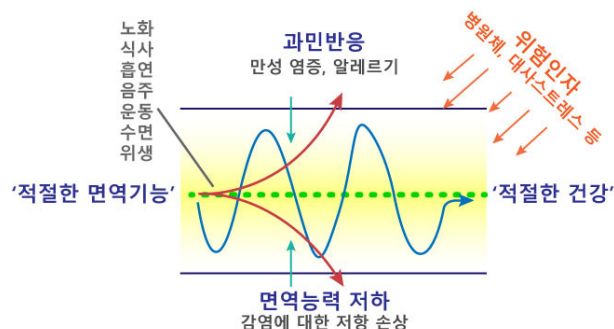


그림 1. 면역기능의 유지

[출처: Br J Nutr 110:Suppl 2:S1-S30, 2013]

나. 면역계(immune system)

인체의 면역기능을 조절하는 면역계는 흉선(thymus), 비장(spleen), 골수(bone marrow), 림프절(lymph node) 등의 조직으로 구성되어 있다(그림 2). 골수에서 면역세포가 만들어지고, 흉선과 비장은 면역세포를 성숙시키는 기관이다. 파이에르씨판 (Peyer's patches)이라고 하는 림프절은 소화기계에 부속되어 있고, 면역글로불린 A(immunoglobulin A, IgA)를 분비하고 다양한 면역세포를 가지고 있다. 이 외에 피부는 외부의 이물질이 체내로 침입하는 것에 대한 장벽을 제공하며, 소화기계, 비뇨생식기계, 호흡기계의 점막도 외래 이물질이 침입하는 것을 막아주는 보호 역할을 한다.

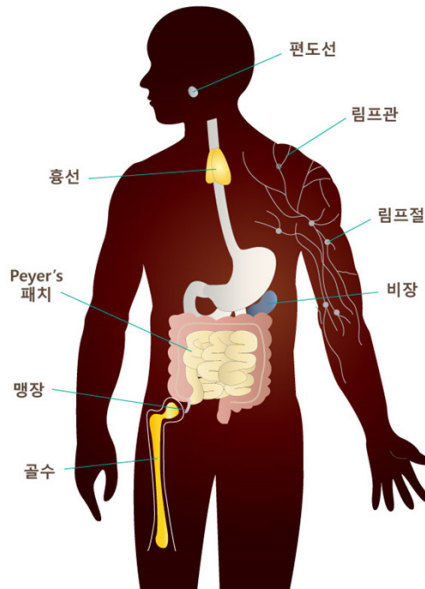


그림 2. 인체의 면역계

[출처: ILSI Europe Concise Monograph Series 2nd ed., 1-30, 2011]

다. 면역에 관여하는 세포

면역반응에 관여하는 세포는 골수계 세포와 림프계 세포로 나누어지고 여러 종류의 세포로 분화하여 작용한다(그림 3).

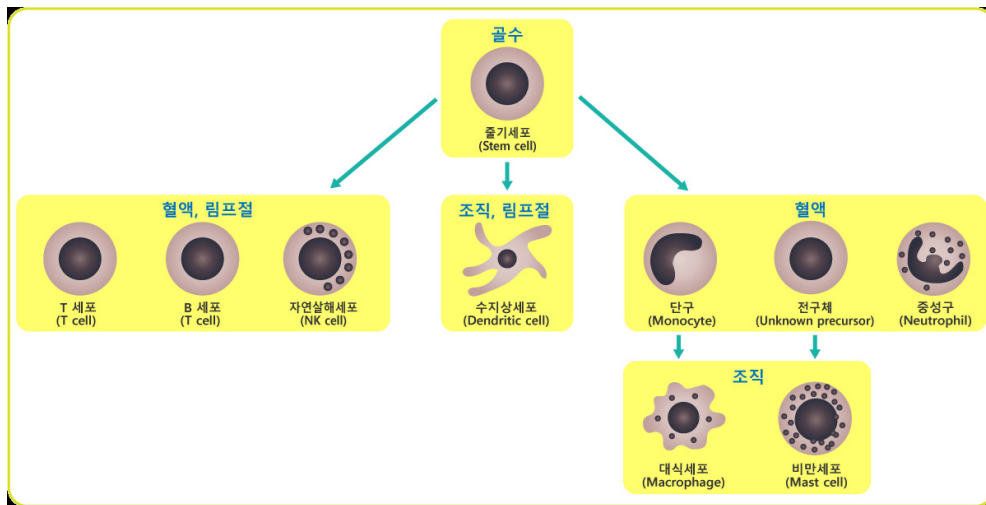


그림 3. 면역세포 분류

[출처: ILSI Europe Concise Monograph Series 2nd ed., 1-30, 2011]

(1) 골수계 세포(myeloid system)

골수계 세포는 면역계에서 과립구(granulocyte), 대식세포(macrophage), 수지상세포(dendritic cell), 비만세포(mast cell)로 분화한다.

(가) 과립구

과립구는 세포질 내 과립의 염색성에 따라 호중구, 호산구, 호염구로 분류된다. 과립구는 혈액 내 일정한 수를 유지하기 위해서 끊임없이 골수로부터 공급받으며 특정 항원에 대한 특이성은 없으나, 주 기능은 탐식 작용이며 미생물이 침입하거나 급성 염증 시 급격히 증가한다. 호중구(neutrophil)는 과립구의 90%를 차지하며, 가장 많은 골수계 세포로써 활발한 탐식 작용을 한다. 호산구(eosinophil)는 비알레르기성 사람의 경우 과립구의 2~5%를 차지하며, 기생충과 같은 큰 표적에 대해 탈과립 방법으로 독성단백을 분비하여 표적 공격한다. 호염구(basophil)는 0.2% 존재하며, 염증을 유발하는 히스타민과 혈액 응고를 억제하는 헤파린 등을 분비한다.

(나) 대식세포

대식세포는 탐식 작용을 하는 세포로 신체의 각 조직에 광범위하게 분포되어 있다. 혈액 내를 순환하는 단구(monocyte)가 조직 내로 이동하게 되면 대식세포로 분화한다. 대식세포는 항원의 침입에 의해 초기에 반응하여 항원의 탐식, 림프구에 항원 제시 및 병원체의 증식 억제 등을 담당하는 중요한 세포이다.

(다) 수지상세포

수지상세포는 항원을 획득해 림프구가 쉽게 인지할 수 있도록 제시하는 기능을 한다. 미성숙 수지상세포는 혈액에서 조직 내로 이용하여 탐식 작용을 한다. 병원균을 만나게 되면 이들은 빠르게 성숙하여 림프절로 이동한다.

(라) 비만세포

비만세포는 조직 내에서 분화가 완성되고 기능하는 세포이다. 이들은 전신의 혈관 근처에 섬유모세포가 있는 곳에 있으며 활성화되면 혈관 투과성에 영향을 미치는 여러 물질을 분비한다. 비만세포는 일반적으로 알레르기 반응의 원인 세포로 알려져 있다.

(2) 림프계 세포(lymphoid cells)

림프계 세포에는 T 림프구, B 림프구, 자연살해세포(natural killer cell, NK cell)가 있다. 조혈모세포(hematopoietic stem cell)에서 생성된 림프구는 흉선, 비장 및 림프절에 들어가 분화·성숙되어 림프구 클론 집단을 형성하고 방출된다. 흉선에 들어간 림프구는 T 림프구가 된 후 다른 기관에 들어가 분화 성숙된다. T 림프구가 아닌 대부분의 림프구를 B 림프구라고 한다.

(가) T 림프구

T 림프구는 아형으로 분류되는데, 하나는 세포독성 또는 세포살해 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte, CTL)로, CD8 표면 분자에 의해 확인될 수 있고 외부 이물질에 감염된 체세포를 파괴시킨다. 다른 하나는 보조 T 림프구(helper T cell, Th cell)로 B 림프구나 대식세포 등 다른 세포의 활성을 돕는다. 보조 T 림프구는 생성하는 세포활성물질 종류의 차이에 따라 Th1 림프구와 Th2 림프구 2가지의 아형으로 나뉜다. Th1 림프구는 주로 대식세포의 활성을 증가(탐식 작용 자극)시키고, interferon- γ (IFN- γ)와 IL-2 등을 분비하며, Th2 림프구는 B 림프구의 활성을 자극해 항체 생산을 증가시키고, IL-4, IL-5, IL-6 등을 분비한다. 면역 반응에서 T 림프구의 분화를 조절하는 전사인자(transcription factor)의 역할이 알려지고 있다. T-bet는 Tbx21 유전자에 암호화되어 있으며 Th1 림프구 반응에서 주요 조절자이며, GATA3는 Th2 림프구, forkhead box protein P3(FOXP3)는 regulatory T 림프구(Treg 림프구), Retinoic-acid-related orphan receptor(ROR) gamma t(ROR γ t)는 Th17 림프구의 발달과 기능에 필요하다.

(나) B 림프구

B 림프구는 항원과 결합하는 면역글로불린(immunoglobulin, Ig)을 생성하여 분비한다. 5종류의 면역글로불린(IgA, IgD, IgE, IgG, IgM)이 존재하며 이들의 기본 구조와 기능은 유사하나 크기, 특성, 기능은 서로 다르다. IgG는 혈청 속의 대부분 항체로서 식세포(phagocyte)와 결합하여 병원체를 탐식·파괴하는 역할을 한다. IgA는 타액과 유즙 같은 분비물에 존재하며, 점막의 국소 방어에 기여한다. IgE는 알레르기 반응(allergic reaction)에 관여한다. IgM은 초기 항원 접촉 시 첫 번째로 분비되며, 항원의 중화 및 응집 반응을 촉진하고 보체의 활성화에 관여한다.

(다) 자연살해세포(natural killer cell)

자연살해세포는 항원특이 수용체가 없으며 독성 과립을 가진 큰 림프구의 형태로 혈액 내를 순환한다. 이들은 일부 이상세포들, 예를 들면 일부 종양세포나 바이러스 감염세포들을 인지하고 살해하는 능력이 있다.

라. 면역반응

인체의 외부 이물질에 대한 면역반응은 크게 선천 면역반응(innate immune response)과 적응 면역반응(adaptive immune response)으로 나눌 수 있다.

(1) 선천 면역반응

선천 면역반응은 특정 항원에 노출된 경험이 없는데도 직접적으로 반응하여 외부 이물질을 파괴하는 면역반응을 말하며, 내재적 면역 또는 비특이적 면역(non-specific immunity)이라고 한다. 선천 면역반응에 관여하는 백혈구는 호중구, 대식세포 등 탐식 능력을 가진 세포(phagocytic cell)들이다. 이 세포들은 일반적으로 공격대상 세포의 종류에 상관없이 다양한 기능을 발휘하는 것이 특징이다. 선천 면역에 관여하는 체내 기관과 방어기전은 표 1과 그림 4와 같다.

인체가 외부 이물질(병원체)에 노출될 경우, 생체방어의 첫 번째 반응으로 신체의 상피 표면은 병원체의 부착을 막고, 항균효소(라이소자임)와 펩타이드를 분비하여 이물질(병원체)이 체내로 들어오는 것을 막는 물리적인 장벽 역할을 한다. 또한, 소화기계가 이물질(병원체)에 노출될 경우 위에서는 위산에 의해, 결장에서는 유익균에 의해 제거될 수 있다. 호흡기에서는 점액이 분비되어 체내로 이물질(병원체)이 들어오는 것을 막을 수 있으며 폐포 내 대식세포에 의해서도 이물질(병원체)이 제거될 수 있다.

그러나 이러한 외부적인 장벽을 뚫고 체내로 들어온 세균, 바이러스, 그리고 기생충들은 즉각적으로 여러 종류의 탐식 작용을 할 수 있는 단구, 호중구, 대식세포 등과 작용하며, 그 중 호중구의 탐식 작용이 가장 왕성하다. 이러한 탐식 작용은 항체의 opsonin 활성화에 의해서 현저히 촉진된다. 병원균 등의 이물질과 IgG 및 IgM 항체가 결합하고, 이러한 항원 항체 복합물에 다시 보체 단백질이 결합한다. 병원균에 결합한 항체와 보체 (C_{3b}와 C_{3d})가 탐식세포 표면의 Fc 수용체 및 보체 수용체와 결합하고, 그 결과 병원균이 탐식세포에 접착하게 된다. 이후 접착한 병원균은 탐식세포의 위쪽에 포위되고 위쪽의 선단부분이 융합해서 식세포 (phagosome)를 만든다. 또한, 대식세포는 다양한 인터페론을 분비하여 항바이러스 작용을 한다. 이와 같이 선천 면역반응은 병원체에 대한 감염에 직접적으로 관여해 즉각적 효과 기전을 통해 제일선의 숙주 방어를 수행한다.

자연살해세포는 T 림프구나 B 림프구보다 크고, 특징적인 세포질 과립들을 가진다. 자연살해세포는 이전의 면역 접촉이나 활성화가 없이도 생체 외에서 일부의 종양세포들을 사멸시킬 수 있는 능력이 있는 선천 면역반응을 담당한다.

표 1. 선천 면역의 체내 기관과 방어기전

기관		방어 기전
외부	피부	- 병원체 침투에 대한 물리적 장벽 역할 - 라이소자임 분비
	소화기계	위의 강산성, 결장의 세균에 의한 보호
	호흡기계	점액 분비와 이동, 폐포 대식세포
	비뇨생식기계	소변의 산성, 질의 젖산
내부	탐식세포(phagocyte)	세균, 세포잔해, 변성 단백질과 독소 등의 파괴
	인터페론(interferon)	항미생물 물질. 바이러스 복제 억제
	보체 단백질(complement protein)	세균의 파괴 촉진, 염증반응 증강

(가) 패턴인지 수용체 (pattern recognition receptor)

병원체 표면은 분자구조의 반복 패턴을 특징적으로 갖고 있고, 선천 면역계는 이러한 전형적인 패턴과 결합하는 수용체들에 의해 병원체들을 인지한다.

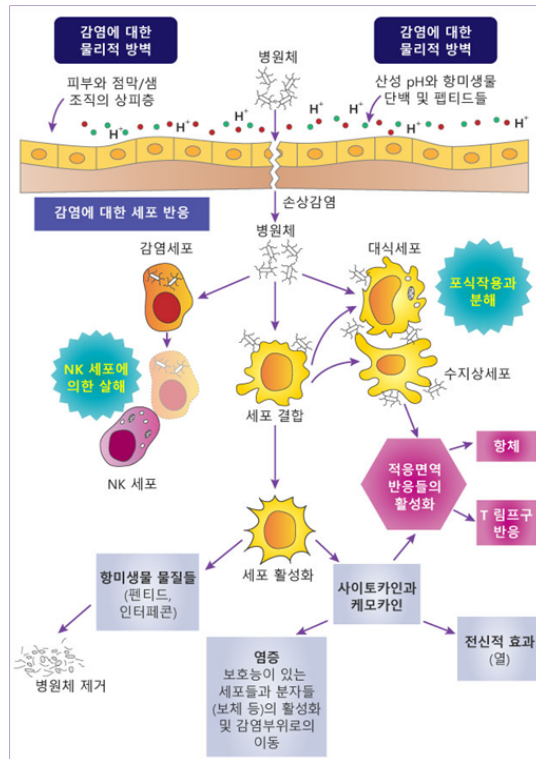


그림 4. 선천 면역의 개요

[출처: Owen 등, Kuby 면역학(7판). 범문에듀케이션, 2014]

① 가용성 수용체(soluble receptors)

가용성 수용체에는 보체계, collectins, pentraxins, lipopolysaccharide-binding protein (LBP)과 CD14 등이 있다.

보체계는 병원체를 인지하여 초기 감염에 의한 효과적 숙주 방어의 중요한 기전 중의 하나이다. 보체는 혈장 단백질로 구성된 체계로 직접적으로 병원체에 의해 활성화될 수 있고 또는 병원체 결합 항체에 의해 간접적으로 활성화되어 병원체의 표면에서 연쇄반응을 일으켜 여러 가지 효과기능(effector function)들을 가진 활성화된 성분들을 생성한다. 보체 활성화에는 고전 경로(classic pathway), lectin pathway, 대체 경로(alternative pathway) 등 세 가지 경로가 있다.

② 세포 관련 수용체(cell-associated receptors)

세포 관련 수용체에는 막 연결 수용체(membrane-bound receptor)와 세포 내 수용체(intra-cellular receptor)가 있다.

막 연결 수용체인 Toll 유사 수용체(toll-like receptor, TLR)는 다세포 생물에서 작동하는 신호전달경로를 통한 숙주 방어를 활성화하며, 적응면역을 시작할 수 있게 해주는 중요한 역할을 한다.

(2) 적응 면역반응

적응 면역반응은 특정 항원에 대하여 특정 림프구가 작용하여 특이적 면역 (specific immunity)이라고 한다. 적응 면역은 이전에 노출된 특정 항원을 기억하고 있다가 동일 항원이 다음에 들어오면 더 증폭된 면역반응을 진행한다. 적응 면역반응은 B 림프구가 관여하는 체액성(humoral)면역반응과 T 림프구가 관여하는 세포성(cell-mediated) 면역반응으로 구분된다.

(가) 체액성(humoral) 면역반응

체액성 면역 능력을 담당하는 B 림프구는 항원의 자극과 class II major histocompatibility complex(MHC)를 인식하고 있는 보조 T 림프구, 보조 T 림프구가 분비하는 물질들에 의해 활성화된다. 활성화된 B 림프구는 항체로서 면역글로불린을 생성하여 혈액과 림프로 분비한다. 혈액과 림프가 체액이기 때문에 B 림프구가 관련하는 면역반응을 체액성 면역반응이라 한다. 항체는 미생물 항원을 특이적으로 인식하여 감염성을 중화시키고 표적 미생물을 제거한다 (그림 5).

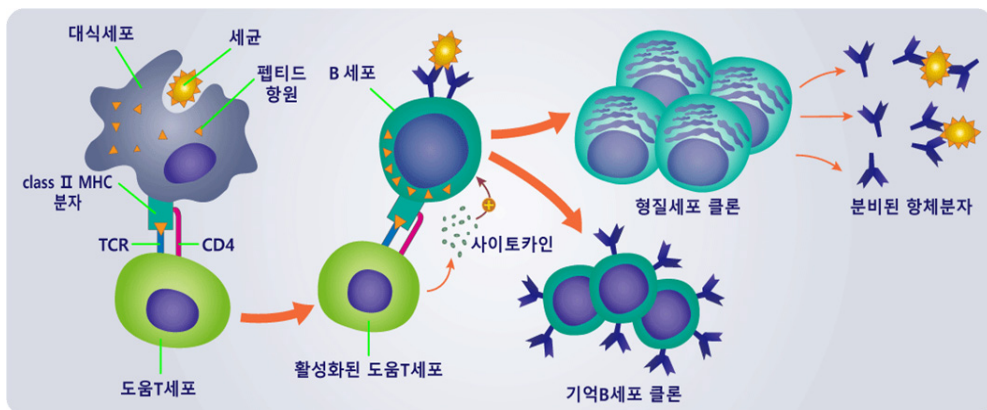


그림 5. 체액성 면역반응

[출처: Stuart Ira Fox, 생리학(12판). 라이프사이언스, 2014]

(나) 세포성(cell-mediated) 면역반응

세포성 면역반응은 세포매개 면역반응이라고도 하며 T 림프구가 관여한다. T 림프구 중 세포독성 T 세포(cytotoxic T lymphocyte, CTL)는 항체를 분비하지 않고 세포에 가까이 접근하거나 물리적 접촉을 하여 세포를 제거한다. 세포 내 병원체는 대식세포 및 다른 숙주 세포 내에서 증식할 수 있는데 이러한 감염에 대한 방어를 담당하여 대식세포 내 있는 미생물을 파괴하거나 혹은 감염된 세포를 사멸시킨다(그림 6).

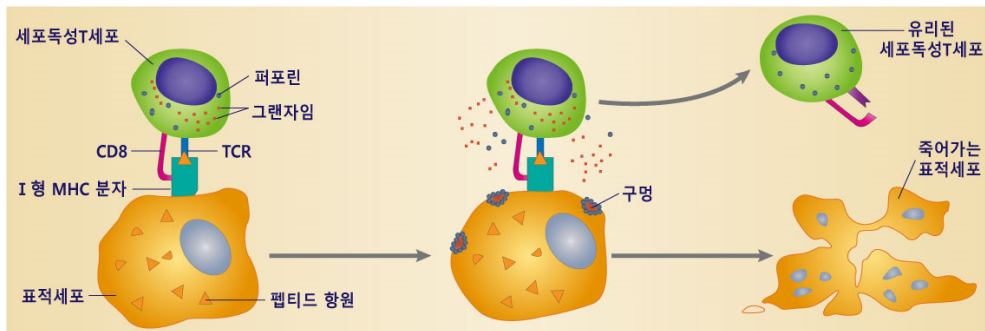


그림 6. 세포성(세포매개) 면역반응

[출처: Stuart Ira Fox, 생리학(12판), 라이프사이언스, 2014]

라. 사이토카인

사이토카인은 선천 면역과 적응 면역에 관여하는 세포에서 분비되는 단백질로서, 면역세포의 여러 기능을 조절한다. 사이토카인은 적응면역반응의 활성화 단계에서 림프구의 성장과 분화를 자극하고, 선천 면역과 적응 면역의 작동 단계에서 여러 종류의 작동 세포들을 활성화시켜 미생물과 항원들을 제거한다(그림 7).

(1) 선천 면역 주요 사이토카인

(가) 종양괴사인자- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)

TNF- α 는 미성숙 면역세포를 성숙된 형태의 세포로 전환시켜 항원에 노출된 세포의 살해 능력을 증진시켜 초기 면역반응에 중요한 역할을 한다. TNF- α 는 항원에 자극된 T 림프구, 자연살해세포, 비만세포, 활성화된 대식세포에서 생성된다.

(나) 인터페론- α , β (Interferon, IFN, IFN- α /IFN- β)

바이러스 감염에 대해 방어하고 세포 내 미생물에 대한 세포매개면역을 증진시킨다. IFN- α 는 대식세포에서 IFN- β 는 섬유모세포에서 분비된다.

(다) 케모카인(Chemokine)

케모카인은 숙주 방어 세포를 감염 부위로 이동시키는 역할을 하고, 림프구 및 다른 백혈구의 말초 림프조직을 통한 이동을 조절한다. 대식세포, 내피세포, T 림프구 등에서 생성된다.

(라) 인터루킨-1(Interleukin-1, IL-1)

IL-1은 TNF와 비슷하게 감염 및 다른 자극에 대한 숙주의 염증반응 매개자로서 작용하며, 대식세포, 호중구, 상피세포 등에서 생산된다.

(마) 인터루킨-6(Interleukin-6, IL-6)

선천 면역과 적응 면역에서 모두 기능을 하는 사이토카인이다. 선천 면역에서 골수 전구 세포로부터 호중구의 생산을 유도하며, 적응면역에서는 항체 생산자로 분화된 B 림프구의 성장을 자극한다. 또한, 항염증성 사이토카인의 생산을 자극하고 조절 T 림프구의 생성과 작용을 억제하여 세포매개 면역반응을 촉진하며, 대식세포와 내피세포, T 림프구에서 생성된다.

(바) 인터루킨-10(Interleukin-10, IL-10)

활성화된 대식세포를 억제하여 면역계를 휴지기 상태로 되돌리며, 대식세포, T 림프구에서 생성된다.

(사) 인터루킨-12(Interleukin-12, IL-12)

대식세포, 자연살해세포, T 림프구가 관련된 일련의 반응을 시작하는 데 중요한 역할을 하며, 대식세포, 수지상세포에서 생성된다.

(2) 적응면역 주요 사이토카인**(가) 인터루킨-2(interleukin-2, IL-2)**

T 림프구, B 림프구, 자연살해세포의 증식과 분화를 자극한다. T 림프구에서 생성된다.

(나) 인터루킨-4(interleukin-4, IL-4)

IgE 항체 생성과 미감작 $CD4^+$ 보조 T 세포로부터의 Th2 세포 발달을 위한 주된 자극 인자이다. Th2 세포와 비만세포에서 생성된다. B 림프구 증식분화 촉진, 대식세포 탐식 작용 항진, T 림프구 증식 항진 등의 작용을 한다.

(다) 인터페론- γ (interferon- γ , IFN- γ)

대식세포를 활성화시켜 병원균을 탐식한다. 또한, 미감작 $CD4^+$ 보조 T 세포의 Th1 세포로의 분화를 촉진시키며, Th2 세포로의 분화를 억제시킨다. T 림프구와 자연살해세포에서 생성된다.

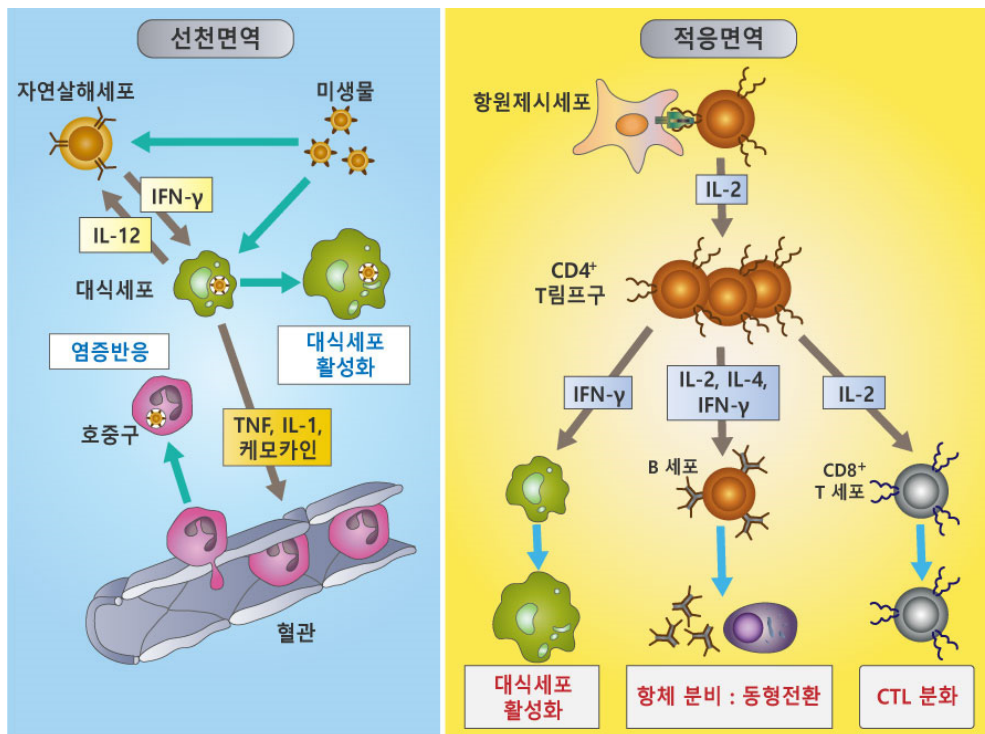


그림 7. 숙주 방어에 있어 사이토카인의 기능

[출처: Abbas 등, 세포분자면역학(7판), 범문에듀케이션, 2013]

2. 보건학적 중요성

신체 면역반응은 외부로부터 침입한 병원체에 대한 감염에 대해 보호하거나, 외부에서 유입은 되었으나 신체에 해가 되지 않은 물질에 대한 알레르기반응이 일어나지 않도록 하며, 대사적 염증에 대한 조절 작용을 포함하고 있다. 본 평가 가이드의 ‘면역기능 증진’ 기능성은 병원체의 감염으로부터 신체를 보호하는 체내 면역능력을 증진시키는 면역기능 개선에 도움을 주는 기능성을 의미한다.

체내 면역능력은 유전, 성별, 나이 등 선천적인 요인에 의해서 영향을 받고 또한 영양상태, 식사, 음주, 흡연, 운동, 스트레스 등 환경적인 요인에 의해서도 영향을 받는다. 또한, 비만, 병원균 노출, 예방접종 등도 면역기능을 정상적으로 유지하는 데 영향을 주는 요인이다(그림 8).

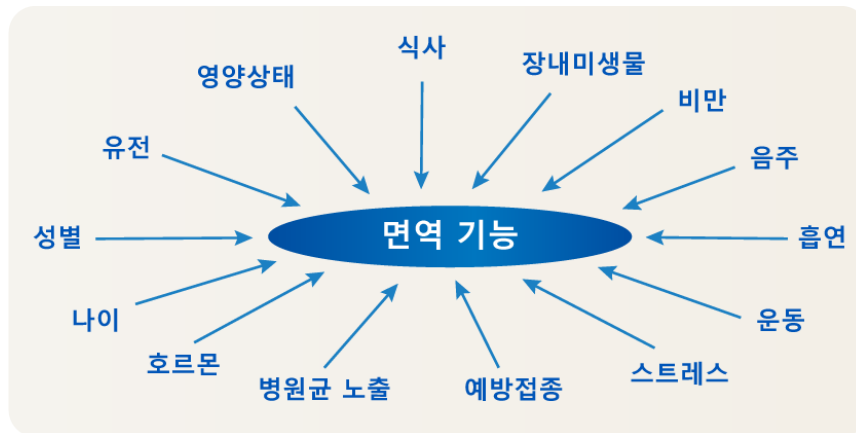


그림 8. 면역기능에 영향을 주는 인자

[출처: ILSI Europe Concise Monograph Series 2nd ed., 1-30, 2011]

체내 면역능력은 생리적 항상성을 유지하는 것으로 건강 증진에 결정적인 역할을 한다. 면역기능의 저하는 전신의 다양한 질환을 일으킬 수 있다. 즉, 정상적인 면역능력이 저하하면 외부의 병원균에 대한 침입이 용이하게 되어 바이러스 및 세균에 대한 감염 및 질병의 발생 위험을 증가시키게 된다. 그러므로 면역능력이 증진된다는 것은 선천적, 환경적 요인에 의해 체내 저하된 면역 방어체계를 향상시키는 것을 의미하고, 이는 다양한 질병발생의 위험을 감소시킬 수 있다.

Ⅲ

기능성 시험 방법

1. 바이오마커의 선정

가. 연구유형별 바이오마커

면역기능 관련 기능성을 확인하기 위한 측정 가능한 연구유형별 바이오마커(biomarker)는 다음 표 2와 같다.

표 2. 면역기능 관련 기능성 확인을 위한 바이오마커

구 분	바이오마커	측정 가능한 연구유형			
		in vitro	in vivo	Human	
면역조직	조직무게		○		
	조직학적 분석		○		
면역세포	백혈구 수 및 비율(총 백혈구, 중성구, 단구/대식세포, 자연살해세포)		○	○	
	림프구 수 및 아형비율		○	○	
	T 림프구 전사인자 발현	○	○	○	
항원인지	Major histocompatibility(MHC)	○	○	○	
	Toll-like receptor(TLR)	○	○	○	
면역세포활성	비장세포 증식능력		○	○	
	용혈판형성 세포수(plaque forming cell)		○	○	○
	지연성 과민반응(delayed-type hypersensitivity, DTH)			○	○
	대식세포 활성	탐식능력	○	○	○
		산화질소(nitric oxide, NO)	○	○	○
		Inducible nitric oxide synthase(iNOS)	○	○	○
		Cyclooxygenasse-2(COX ₂)	○	○	○
		Prostagladin E ₂ (PGE ₂)	○	○	○
		NF- κ B	○	○	○
		MAPKs	○	○	○
자연살해세포활성			○	○	
면역글로불린	IgA, IgG, IgM, IgD, IgE		○	○	
사이토카인	사이토카인 양, 단백질 발현, 유전자 발현	○	○	○	
보체	보체양		○	○	
	보체계 활성		○	○	

나. 바이오마커 설명

(1) 면역조직

(가) 조직 무게

면역기능과 관련된 조직으로는 비장, 흉선 등이 있다. 비장은 림프구 생성과 성숙, 흉선은 림프구 중 특히 T림프구의 분화 및 성숙에 관여한다. 동물실험의 경우 시험물질 섭취 후 흉선과 비장의 무게 증가는 면역세포의 적절한 생성 및 성숙이 일어날 수 있는 생리적 상태를 반영하여 면역기능에 우호적인 작용을 한다고 판단할 수 있다.

(나) 조직학적 분석

체내 면역기능과 관련된 조직을 적출하여 염색을 한 후 조직학적 관찰을 할 수 있다. 시험물질을 섭취한 후 실험동물의 비장이나 림프절 등을 염색하여 두께, 백색 수질의 수, 백색 수질의 직경 등을 관찰하여 정상적인 조직을 유지하고 있는지를 관찰할 수 있다.

(2) 면역세포

(가) 백혈구 수 및 비율

백혈구는 혈액 내 주요 면역세포로 과립구(호중구, 호산구, 호염구), 자연살해세포, 단구, 대식세포, 림프구를 포함한다. 시험물질 처리에 의한 총 백혈구 수, 과립구 수, 단구 수, 대식세포 수와 비율 증감은 면역기능 면역조절의 지표가 될 수 있다.

(나) 림프구 수 및 아형 비율

림프구는 T 림프구, B 림프구, 자연살해세포로 나누어진다. T 림프구와 B 림프구 및 그들 아집단의 구별은 각각의 세포들에 특징적인 세포표면 표지자(cluster of differentiation, CD)의 항체를 이용함으로써 가능하다(표 2). 각각의 림프구 수 뿐만 아니라 림프구의 아형 비율을 계산할 수 있다($CD4^+/CD8^+$). 정상적인 면역상태에서 $CD4^+/CD8^+$ 비율은 2 정도이다.

표 2. 대표적인 림프구 표면 표지자

구분	표면 표지자(CD)
자연살해세포	CD56, CD16, CD94, CD161 등
B 림프구	CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD40 등
T 림프구	CD3
보조 T 림프구	CD4
세포독성 T림프구	CD8

(다) T 림프구 전사인자 발현

T 림프구 전사인자(transcription factor)는 T 림프구의 아형에 따라 T-bet(Th1 림프구), GATA3(Th2 림프구), FOXP3(Treg 림프구), ROR γ t(Th17 림프구) 등이 있다. 이러한 전사인자들은 각 림프구의 분화와 성숙 과정에 관여하고 각 림프구에서의 사이토카인의 분비를 조절하므로 세포매개성 면역반응과 체액성 면역반응을 조절한다. T 림프구에서의 전사인자 발현을 측정하므로 면역반응을 측정할 수 있다.

(3) 항원인지

(가) Major histocompatibility(MHC) class

대식세포와 같은 탐식세포는 T 림프구에 항원을 제시할 수 있는 세포표면분자인자로 구조적 적합성 복합체(MHC class I/II)를 표면에 발현하여 항원과 결합한다. 탐식세포가 활성화되어 있지 않은 상태에서는 세포표면에 적은 양이 발현되지만, 활성화되면 발현량이 증가하여 T 림프구에 많은 양의 항원이 전달되도록 한다. 그러므로 MHC class I/II 발현량이 증가한다는 것은 T 림프구 항원 수용체를 자극하여 증식반응이 증가한다고 볼 수 있다.

(나) Toll-like receptor(TLR)

면역세포에 의한 병원균의 초기인식은 매우 중요하다. 면역세포의 pattern-recognition receptor(PRR)는 병원균의 pathogen-associated molecular pattern(PAMP)이라고 불리는 구조와 결합한다. 가장 많이 연구된 PRR은 TLR 계열이다. 현재까지 13개의 TLRs가 포유류에서 발견되었고, 다양한 면역세포(수지상세포, 자연살해세포, T 림프구, B 림프구)는 TLRs를 발현한다. 자연살해세포는 TLR-1, 3, 6을, 수지상세포는 TLR-2, 4, 7, 9를, T 림프구는 TLR-1-5, 7, 9를, B 림프구는 TLR-3, 4를 발현한다. TLRs는 병원균을 인식한 후 MAPKs와 NF- κ B와 같은 세포 내 신호전달경로 활성화를 통해 다양한 전사인자들의 활성화와 사이토카인의 생성을 촉진하면서 효과적인 면역반응을 유도한다.

(4) 면역세포활성

(가) 비장세포 증식능력

비장은 림프구를 만들고 노쇠한 적혈구를 파괴하는 조직이다. 시험물질을 섭취한 실험동물에서 분리한 비장세포의 증식능력이 증가할수록 면역기능이 개선됨을 의미한다. 비장세포에 T 림프구를 활성화하는 concanavalin A(ConA), PHA(phytohemagglutinin), B 림프구를 활성화하는 PWM(pokeweed mitogen)을 처리하여 림프구의 활성 정도를 구별하여 측정할 수 있다.

(나) 용혈판 형성 세포 수(plaque forming cell, PFC)

PFC는 항원인 면양적혈구(sheep red blood cell, SRBC)에 대한 항체 생산 정도를 측정하는 것으로 체액성 면역반응 능력을 알 수 있다. 비장세포의 항체 생성은 T 림프구와 B 림프구의 상호작용 및 대식세포가 관여하고 이들의 활성화 정도를 알 수 있다.

(다) 지연성 과민반응(delayed type hypersensitivity, DTH)

지연성 과민반응은 T 림프구에 항원이 전달되고, 항원을 인지하고 T 림프구가 증식되는 활성 능력을 관찰하는 것이다. 항원을 주입한 후 24시간에서 48시간 후에 피부의 발적이나 경화현상을 관찰하는 것으로 전반적인 면역기능을 검사할 수 있는 유용한 검사 방법이다. 항원 주입에 대한 무반응을 보이는 것은 면역결핍과 관련성이 있다.

(라) 대식세포 활성

① 탐식 능력

탐식 능력은 식균작용(phagocytosis)이라고도 하며, 병원균이나 이물질을 제거하기 위한 대식세포의 면역반응이다. 대식세포는 다양한 분자물질에 대한 수용체를 가지고 있으며, 이 수용체는 병원균이나 이물질 등과 만났을 때 상호반응을 일으켜 탐식 능력을 증가시킨다. 그러므로 시험물질에 의해 대식세포의 탐식 능력이 증가한다는 것은 면역능력이 증가한 것으로 볼 수 있다.

② 산화질소(nitric oxide, NO)

NO는 대식세포나 호중구로부터 생성된다. 생성된 NO는 포식된 병원체의 구성분자 변형과 Fe-S를 함유하는 효소의 작용을 억제시켜 탐식작용 및 병원균의 증식 억제 활성을 가진다. 과량의 NO는 정상세포를 공격하고 염증을 유도하여 염증 질환의 매개인자로 알려져 있으나 활성화된 면역세포에서 분비되는 적절한 양의 NO는 면역신호전달자로서 면역세포를 활성화시켜, 외부 병원체로부터의 보호작용을 한다.

③ iNOS(inducible nitric oxide synthase)

iNOS는 L-아르지닌(L-arginine)을 산화시켜 시트룰린(L-citrulline)과 NO를 생산시킨다. 정상적인 농도에서 NO는 면역세포를 활성화시키므로 NO 생성을 위해 iNOS가 요구된다.

④ Cyclooxygenase-2(COX₂)

COX₂는 지방산인 아라키돈산(arachidonic acid)을 prostaglandin E₂(PGE₂)로 전환시키는 효소이다. COX₂는 대식세포 등에서 자극에 의해 유도되어 PGE₂를 합성한다.

⑤ Prostaglandin E₂(PGE₂)

PGE₂는 사이토카인의 생성을 조절하여 면역능력을 조절한다. 정상적인 농도에서 시험물질의 자극에 의해 PGE₂ 농도의 증가는 면역능력을 활성화하는 것으로 볼 수 있다.

⑥ NF-κB

NF-κB는 세포질에서 IκB와 결합되어 불활성화 상태로 있다가 자극에 의해 IκB가 인산화되어 분해되면 NF-κB는 핵내로 들어가 다양한 사이토카인의 합성을 촉진한다. NF-κB의 발현이나 IκB, phospho-IκB(phospho inhibitor of kappa, p-IκB)의 발현이 증가하면 면역능력이 활성화되었다는 것을 의미한다.

⑦ Mitogen activated protein kinases(MAPKs)

MAPKs(p38, ERK, JNK 등) 신호전달경로는 면역세포에서 NO 생성을 촉진하고, TNF-α, IL-6와 같은 사이토카인을 생성하여 면역세포 활성화에 중요한 신호전달경로이다. 시험물질에 의해 p38, ERK1/2, JNK의 인산화 과정을 통한 MAPKs의 활성화는 면역세포의 활성화를 의미한다.

(마) 자연살해세포(natural killer cell, NK cell) 활성화

NK 세포는 선천면역을 담당하는 혈액 속 백혈구로 바이러스에 감염된 세포 또는 스트레스 받은 세포를 인식하여 직접 죽이거나 염증성 사이토카인을 분비하여 죽이는 세포이다. NK 세포 활성 변화를 통해 면역기능 증진 여부를 판단할 수 있다.

(5) 면역글로불린

항체의 기능을 갖는 체액성 면역의 주된 역할을 하는 혈청단백질로 IgA, IgD, IgE, IgG, IgM로 구분된다. 면역기능 증진 기능으로 주로 측정되는 면역글로불린은 IgA, IgG, IgM이다. IgA는 혈청 중 면역글로불린의 약 20%를 차지하고, 타액, 상기도 분비액 등 점액에 존재하여 점막의 감염 방어에 관여한다. IgG는 4개의 아집단 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4로 나뉘지며,

독소나 바이러스의 중화, 침강, 응집반응 등에 관여한다. IgM은 보체결합성이 있으며, 응집 반응성이 높다. 면역글로불린(IgA, IgG, IgM)의 증가는 면역기능 증진을 의미한다.

(6) 사이토카인

사이토카인은 세포 사이의 신호전달을 매개하는 단백질로서, 인터루킨(interleukin, IL), 인터페론(interferon, IFN), 종양괴사인자(tumor necrosis factors, TNF), 케모카인(chemokine) 등이 있다. 사이토카인은 활성화된 대식세포나 림프구에 의해 생성되어 분비된다. 대식세포에서는 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 등이 분비된다. Th1 보조 T 림프구에서는 TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 등 분비되며 Th2 보조 T 림프구에서는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 등이 분비된다(표 3). 시험물질에 의한 림프구와 대식세포에서의 IL-2, TNF- α 의 생산량 증가는 면역기능 증진을 의미한다.

표 3. 면역세포에서 분비되는 주요 사이토카인

구분	사이토카인
대식세포	TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 등
Th1 보조 T 림프구	TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 등
Th2 보조 T 림프구	IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 등

(7) 보체계

(가) 보체 양

보체는 혈액, 림프액 속에 함유된 단백질이다. 보체는 면역학적 특이성이 없고, 항원과 항체의 복합체에 결합하여 용혈, 용균작용을 하여 물리적 장벽을 통과한 세균과 항원들을 제거한다. 보체는 20개 이상의 단백질로 구성되어 있으며, 주로 C₃, C₄, C₅를 측정하여 보체의 양이 증가한다는 것은 면역능력의 증진을 의미한다.

(나) 보체계 활성화

보체계가 활성화되면 연속적인 반응에 의해 보체단백질이 활성화 분자로 분해되고 분해된 물질들이 외부물질이나 병원균 등의 표면에 부착되어 최종적으로 membrane attack complex(MAC)를 형성하여 이물질이나 병원균을 제거한다. 보체활성화과정에서 생성되는 분해산물들은 대식세포와 림프구를 활성화하여 면역능력을 증가시킨다고 알려져 있으므로 시험물질에 의한 보체계 활성화가 증가하는 것은 면역능력이 증가되었다고 볼 수 있다.

2. 주요 바이오마커의 측정 방법

가. 면역조직

(1) 조직 무게

시험물질을 섭취시킨 실험동물에서 적출한 흉선과 비장은 생리 식염수로 씻고 여과지로 수분을 제거한 후 무게를 측정한다. 측정된 무게를 절대무게라고 하고, 조직무게를 체중으로 나눈 값을 상대무게라고 한다.

$$\text{상대무게(relative weight)} = \frac{\text{조직 무게 (g)}}{\text{체중 (g)}}$$

(2) 조직학적 분석

시험물질을 섭취시킨 실험동물에서 비장이나 림프절 등을 적출하여 조직학적 관찰을 한다. 적출된 조직은 10% 중성 포르말린에 고정시킨 후 파라핀 포매를 실시하여 절편을 제작한 후 Hematoxylin-eosin(H&E) 염색을 실시하여 광학현미경으로 조직학적 변화를 확인한다. 비장의 경우 비장 전체의 두께, 백색 수질의 수, 백색 수질의 직경 등을 관찰한다.

나. 면역세포

(1) 백혈구 수 및 비율

시험물질을 섭취한 실험동물의 혈액, 인체 peripheral blood mononuclear cells(PBMC)은 혈액자동분석기를 이용하여 총 백혈구, 호산구, 호중구, 호염구, 단핵구 및 림프구 수와 비율을 측정한다. 자연살해세포는 fluorescence-activated cell sorting(FACS)을 이용하여 측정한다. 분리한 세포를 시험관에 넣고, staining buffer로 washing 후에, 첫 번째 항체를 붙이고, 다시 washing 후 형광물질이 붙어있는 두 번째 항체(CD3, CD16 등)를 부착한다. FACS staining 후, 유세포 분석기(flow cytometry)를 이용하여 형광도를 측정한다.

(2) 림프구 수 및 아형 비율

시험물질을 섭취한 실험동물의 혈액, 비장세포, 복강대식세포와 인체 PBMC의 림프구 아집단은 fluorescence-activated cell sorting(FACS)을 이용하여 측정한다. FACS법은

분리한 림프구를 시험관에 넣고, staining buffer로 washing 후에, 첫 번째 항체를 붙이고, 다시 washing 후 형광물질이 붙어있는 두 번째 항체(측정하고자 하는 CD)를 부착한다. FACS staining 후, 유세포 분석기(flow cytometry)를 이용하여 형광도를 측정한다.

(3) T 림프구 전사인자 발현

T 림프구 전사인자(transcription factor)는 시험물질을 처리한 세포나 시험물질을 섭취시킨 실험동물의 혈액 또는 조직에서, 인체의 혈액 내 면역세포에서 RT-PCR 방법으로 mRNA 발현수준을 측정할 수 있다. 세포 또는 조직에 Trizol을 넣어 균질기로 분쇄하여 chloroform을 첨가한 후 혼합하여 방치 후, 원심분리한다. 원심분리 상층액을 회수하여 2-propanol을 혼합하여 방치한다. 이를 다시 원심분리한 후 80% 에탄올로 세척하여 건조시킨다. 추출한 RNA는 DEPC water에 녹여 first strand cDNA로 합성한다. 합성된 cDNA에 각 전사인자의 primer를 반응시켜 타겟 유전자를 증폭시킨 후, 유전자 발현량을 분석한다.

다. 항원인지

(1) Major histocompatibility(MHC) class

MHC class I/II은 FACS를 이용하여 측정한다. FACS법은 분리한 림프구를 용기에 넣고, staining buffer로 washing 후에, 첫 번째 항체를 붙이고, 다시 washing 후 형광물질이 붙어있는 두 번째 항체를 부착한다. FACS staining 후, 유세포 분석기(flow cytometry)를 이용하여 형광도를 측정한다.

(2) Toll-like receptor(TLR)

TLR은 시험물질을 섭취시킨 실험동물의 세포와 조직에서 RT-PCR 방법으로 mRNA 발현수준을 측정할 수 있다. 시료에 Trizol을 넣어 균질기로 분쇄하여 chloroform을 첨가한 후 혼합하여 방치 후, 원심분리한다. 원심분리 상층액을 회수하여 2-propanol을 혼합하여 방치한다. 이를 다시 원심분리한 후 80% 에탄올로 세척하여 건조시킨다. 추출한 RNA는 DEPC(diethyl pyrocarbonate) water에 녹여 first strand cDNA로 합성한다. 합성된 cDNA에 TLR의 primer를 반응시켜 타겟 유전자를 증폭시킨 후, 유전자 발현량을 분석한다.

라. 면역세포활성

(1) 비장세포 증식능력

시험물질을 섭취시킨 실험동물에서 적출한 비장을 핀셋이나 메쉬를 이용하여 단일세포 부유액을 만들고, RPMI 1640 배양액으로 세척한 다음, 일정 농도로 희석한 후 96 well plate에 분주한다. 림프구를 자극하는 물질(Con A, PHA, PWM 등)을 첨가하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 일정시간 배양한 다음, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)를 이용하여 세포증식을 측정한다.

(2) 용혈반 형성 세포수(plaque forming cell, PFC)

시험물질을 투여한 실험동물의 비장에서 측정할 수 있다. 비장을 적출한 후 단일세포 부유액을 만든 후 적혈구를 용해시켜 제거한다. 면양적혈구에 기니아피그 보체를 혼합하여 30분간 정치한 후, 적혈구를 제거한 비장세포 부유액을 혼합하고 cunningham chamber에 적당량을 주입하여 CO₂ incubator에서 1시간 배양한다. 다른 방법으로는 시험물질을 투여한 실험동물의 복강에 면양적혈구를 주사하고 4일 후에 비장을 적출하여 실험한다. 비장세포와 면양적혈구를 혼합하며 cunningham chamber에 적당량을 주입하고 CO₂ incubator에서 1시간 배양한다. 배양하면서 항체 생산 세포 주위에 적혈구가 용해된 투명한 용혈반(plaque)이 생성되는데 이 용혈반수를 세어 항체 생산 세포수를 산정한다.

(3) 지연성 과민반응(delayed-type hypersensitivity, DTH)

지연성 과민반응은 항원을 팔이나 등의 진피와 표피 사이에 피내 주사를 한다. 주사 후 24시간에서 48시간 후에 항원에 대한 피부반응이 직경 5mm 이상인 경우를 양성으로 판단한다. 주사한 항원에 대해 양성을 나타낸 수와 합산점수로 평가한다.

(4) 대식세포활성

(가) 탐식능력

대식세포 탐식능력은 시험물질을 처리한 세포나 시험물질을 섭취시킨 실험동물과 인체에서 얻은 대식세포에서 측정할 수 있다. 대식세포를 배양한 plate를 RPMI 1640 배지로 세척하여 부착되지 않은 세포를 제거한다. 각 well에 10% FBS가 포함된 RPMI 1640, 대식세포, yeast 형태의 *C. albicans*를 넣은 후 배양한다. RPMI 1640배지로 세척하여 탐식되지 않은 *C. albicans*를 제거한 후 2.5% glutaldehyde로 고정한다. 그 후 현미경을 이용하여 정해진

부위에서 사진을 찍고 대식세포 안에 1개 이상의 *C. albicans*가 보이면 탐식을 일으킨 것으로 간주하여 탐식 능력(phagocytic activity)을 %로 다음과 같은 방식으로 계산한다.

$$\text{탐식 능력(phagocytic activity)} = \frac{\text{탐식을 일으킨 세포} \times 100}{\text{관찰된 대식세포}}$$

(나) 산화질소(nitric oxide, NO)

NO 농도는 시험물질을 처리한 세포나 시험물질을 섭취시킨 실험동물의 혈액 또는 조직, 인체의 혈액 등에서 Griess reaction 법, ELISA 법에 의한 상용화된 kit, chemiluminescent technique, spectrometry-based method 등으로 측정할 수 있다. Griess reaction 법은 시료 중에 존재하는 NO^{2-} 의 형태를 griess reagent를 이용하여 측정한다. 세포를 96 well plate에 넣고 griess reagent(1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid, 1% α -naphthylamide in H_2O)와 혼합하여 실온에서 방치한 후 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정한다.

(다) iNOS(inducible nitric oxide synthase)

iNOS는 시험물질을 처리한 세포나 시험물질을 섭취시킨 실험동물의 혈액 또는 조직에서 단백질 발현과 유전자 발현을 측정할 수 있다. 전기영동법을 통한 단백질 발현을 측정하기 위해 시료를 균질화한 후 상층액을 얻어 단백질을 정량한다. 일정량의 단백질을 sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 분리한 후, membranes에 이동시킨다. Membranes은 skim milk나 BSA(bovine serum albumin)로 blocking 과정을 거친 후, iNOS 1차 항체를 첨가하여 반응시킨다. 그 후 2차 항체를 첨가하여 반응시킨 다음 ECL 용액으로 반응시켜 X-ray film에 노출시킨 후 각각의 band를 정량화한다.

RT-PCR 방법으로 시험물질을 처리한 세포나 시험물질을 섭취시킨 실험동물의 조직에서 mRNA 발현 수준을 측정할 수 있다. 세포 또는 조직에 Trizol을 넣어 균질기로 분쇄하여 chloroform을 첨가한 후 혼합하여 방치 후, 원심분리한다. 원심분리 상층액을 회수하여 2-propanol을 혼합하여 방치한다. 이를 다시 원심분리한 후 80% 에탄올로 세척하여 건조시킨다. 추출한 RNA는 DEPC water에 녹여 first strand cDNA로 합성한다. 합성된 cDNA에 iNOS의 primer를 반응시켜 타겟 유전자를 증폭시킨 후, 유전자 발현량을 분석한다.

(라) Cyclooxygenase-2(COX₂)

COX₂는 시험물질을 처리한 세포나 시험물질을 섭취시킨 실험동물의 혈액이나 조직, 인체의 혈액에서 단백질 발현과 유전자 발현을 측정할 수 있다. COX₂는 ELISA로 측정할 수 있으며, 단백질 발현은 전기영동법, 유전자 발현은 RT-PCR 방법으로 mRNA 발현 수준을 측정할

수 있다. COX₂는 상용화된 ELISA kit를 사용하여 측정할 수 있으며, 항체를 직접 well에 코팅하여 측정할 수 있다. COX₂ 항체를 coating 용액에 희석하여 micro well에 코팅한 후 4℃에서 overnight 한다. 각 well을 washing 용액으로 세척한 후 시료를 분주한다. 실온에서 방치한 다음 washing 용액으로 세척하고, antibody Avidin-HRP conjugated를 처리한다. 실온에서 방치 및 세척한 다음 TMB(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) 기질을 분주하여 어두운 곳에서 방치한 후 stop 용액을 넣고 흡광도를 측정한다.

전기영동법을 통한 단백질 발현을 측정하기 위해 시료를 균질화한 후 상층액을 얻어 단백질을 정량한다. 일정량의 단백질을 SDS-PAGE로 분리한 후, membranes에 이동시킨다. Membranes은 skim milk나 BSA로 blocking 과정을 거친 후, COX₂ 1차 항체를 첨가하여 반응시킨다. 그 후 2차 항체를 첨가하여 반응시킨 다음 ECL 용액으로 반응시켜 X-ray film에 노출시킨 다음 각각의 band를 정량화한다.

RT-PCR 방법으로 mRNA 발현을 측정하기 위해 시료에 Trizol을 넣어 균질기로 분쇄하여 chloroform을 첨가하여 혼합한 후 방치하여 원심분리한다. 원심분리 상층액을 회수하여 2-propanol을 혼합하여 방치한다. 이를 다시 원심분리한 후 80% 에탄올로 세척하여 건조시킨다. 추출한 RNA는 DEPC water에 녹여 first strand cDNA로 합성한다. 합성된 cDNA에 COX₂의 primer를 반응시켜 타겟 유전자를 증폭시킨 후, 유전자 발현량을 분석한다.

(마) Prostaglandin E₂(PGE₂)

PGE₂는 시험물질을 처리한 세포나 시험물질을 섭취시킨 실험동물의 혈액 또는 조직, 인체의 혈액에서 단백질 발현과 유전자 발현을 측정할 수 있다. PGE₂양은 ELISA를 사용할 수 있고, 단백질 발현은 전기영동법, 유전자 발현은 RT-PCR 방법으로 mRNA 발현수준을 측정할 수 있다. PGE₂양은 상용화된 ELISA kit를 사용하여 측정할 수 있으며, 항체를 직접 well에 coating 하여 측정할 수 있다. PGE₂ 항체를 coating 용액에 희석하여 micro well에 코팅한 후 4℃에서 overnight 한다. 각 well을 washing 용액으로 세척한 후 시료를 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.

전기영동법을 통한 단백질 발현을 측정하기 위해 시료를 균질화한 후 상층액을 얻어 단백질을 정량한다. 일정량의 단백질을 SDS-PAGE로 분리한 후, membranes에 이동시킨다. Membranes은 skim milk나 BSA로 blocking 과정을 거친 후, PGE₂ 1차 항체를 첨가하여 반응시킨다. 그 후 2차 항체를 첨가하여 반응시킨 다음 ECL 용액으로 반응시켜 X-ray film에 노출시킨 다음 각각의 band를 정량화한다.

RT-PCR 방법으로 mRNA 발현을 측정하기 위해 시료에 Trizol을 넣어 균질기로 분쇄하여 chloroform을 첨가한 후 혼합하여 방치한 후, 원심분리한다. 원심분리 상층액을 회수하여 2-propanol을 혼합하여 방치한다. 이를 다시 원심분리한 후 80% 에탄올로 세척하여 건조시킨다. 추출한 RNA는 DEPC water에 녹여 first strand cDNA로 합성한다. 합성된 cDNA에 PGE₂의 primer를 반응시켜 타겟 유전자를 증폭시킨 후, 유전자 발현량을 분석한다.

(바) NF- κ B(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

NF- κ B는 시험물질을 처리한 세포나 시험물질을 섭취시킨 실험동물의 혈액 또는 조직에서 단백질 발현과 유전자 발현을 측정할 수 있다. 단백질 발현은 전기영동법으로, 유전자 발현은 RT-PCR 방법으로 mRNA 발현 수준을 측정할 수 있다.

전기영동법을 통한 단백질 발현을 측정하기 위해 시료를 균질화한 후 상층액을 얻어 단백질을 정량한다. 일정량의 단백질을 SDS-PAGE로 분리한 후, membranes에 이동시킨다. Membranes은 skim milk나 BSA로 blocking 과정을 거친 후, NF- κ B 1차 항체를 첨가하여 반응시킨다. 그 후 2차 항체를 첨가하여 반응시킨 다음 ECL 용액으로 반응시켜 X-ray film에 노출시킨 다음 각각의 band를 정량화한다.

RT-PCR 방법으로 mRNA 발현을 측정하기 위해 시료에 Trizol을 넣어 균질기로 분쇄하여 chloroform을 첨가한 후 혼합하여 방치 후, 원심분리한다. 원심분리 상층액을 회수하여 2-propanol을 혼합하여 방치한다. 이를 다시 원심분리한 후 80% 에탄올로 세척하여 건조시킨다. 추출한 RNA는 DEPC water에 녹여 first strand cDNA로 합성한다. 합성된 cDNA에 NF- κ B의 primer를 반응시켜 타겟 유전자를 증폭시킨 후, 유전자 발현량을 분석한다.

(사) Mitogen activated protein kianses(MAPKs)

MAPKs는 시험물질을 처리한 세포나 시험물질을 섭취시킨 실험동물의 혈액 또는 조직에서 단백질 발현과 유전자 발현을 측정할 수 있다. 단백질 발현은 전기영동법으로, 유전자 발현은 RT-PCR 방법으로 mRNA 발현 수준을 측정할 수 있다.

전기영동법을 통한 단백질 발현을 측정하기 위해 시료를 균질화한 후 상층액을 얻어 단백질을 정량한다. 일정량의 단백질을 SDS-PAGE로 분리한 후, membranes에 이동시킨다. Membranes은 skim milk나 BSA로 blocking 과정을 거친 후, MAPKs(p-p38, p38, ERK1/2, p-ERK1/2, JNK, p-JNK 등) 1차 항체를 첨가하여 반응시킨다. 그 후 2차 항체를 첨가하여 반응시킨 다음 ECL 용액으로 반응시켜 X-ray film에 노출시킨 다음 각각의 band를 정량화한다.

RT-PCR 방법으로 mRNA 발현을 측정하기 위해 시료에 Trizol을 넣어 균질기로 분쇄하여 chloroform을 첨가한 후 혼합하여 방치 후, 원심분리한다. 원심분리 상층액을 회수하여 2-propanol을 혼합하여 방치한다. 이를 다시 원심분리한 후 80% 에탄올로 세척하여 건조

시킨다. 추출한 RNA는 DEPC water에 녹여 first strand cDNA로 합성한다. 합성된 cDNA에 MAPKs의 primer를 반응시켜 타겟 유전자를 증폭시킨 후, 유전자 발현량을 분석한다.

(5) 자연살해세포(natural killer cell, NK cell) 활성화

NK 세포활성은 시험물질을 처리한 세포, 시험물질을 섭취시킨 동물의 비장 조직 또는 인체의 혈액에서 확인할 수 있다. 상용화된 NK 세포 분리 kit를 이용하여 NK 세포(effector cell, E)를 분리하고, 분리된 NK 세포는 NK 세포에 대한 감수성이 높은 세포(target cell, T)와 함께 E:T의 비율을 다양한 농도(20:1, 10:1등)로 배양한 후 유세포 분석 또는 LDH cytotoxicity assay kit를 이용하여 NK 세포의 활성을 평가한다.

마. 면역글로불린

면역글로불린양은 시험물질을 처리한 세포의 상층액과 시험물질을 섭취시킨 실험동물의 혈액이나 인체의 혈액에서 ELISA assay로 측정할 수 있다. 상용화된 ELISA kit를 사용하여 측정할 수 있으며, 항체를 직접 well에 코팅하여 측정할 수 있다. 특정 항체를 coating 용액에 희석하여 micro well에 코팅한 후 4℃에서 overnight 한다. 각 well을 washing 용액으로 세척한 후 시료를 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.

바. 사이토카인

시험물질을 처리한 세포나 시험물질을 섭취시킨 실험동물의 혈액 또는 조직, 인체의 혈액에서 사이토카인의 양, 단백질 발현과 유전자 발현을 측정할 수 있다. 사이토카인의 양은 ELISA assay에 의해, 단백질 발현은 전기영동법, 유전자발현은 RT-PCR 방법으로 mRNA 발현 수준을 측정할 수 있다. 사이토카인은 상용화된 ELISA kit를 사용하여 측정할 수 있으며, 항체를 직접 well에 코팅하여 측정할 수 있다. 사이토카인의 개별 항체를 coating 용액에 희석하여 micro well에 코팅한 후 4℃에서 하룻밤 방치한다. 각 well을 washing 용액으로 세척한 후 시료를 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.

전기영동법을 통한 단백질 발현을 측정하기 위해 시료를 균질화한 후 상층액을 얻어 단백질을 정량한다. 일정량의 단백질을 SDS-PAGE로 분리한 후, membranes에 이동시킨다. Membranes은 skim milk나 BSA로 blocking 과정을 거친 후, 개별 사이토카인 1차 항체를 첨가하여 반응시킨다. 그 후 2차 항체를 첨가하여 반응시킨 다음 ECL 용액으로 반응시켜 X-ray film에 노출시킨 다음 각각의 band를 정량화한다.

RT-PCR 방법으로 mRNA 발현을 측정하기 위해 시료에 Trizol을 넣어 균질기로 분쇄하여 chloroform을 첨가한 후 혼합하여 방치 후, 원심분리한다. 원심분리 상층액을 회수하여 2-propanol을 혼합하여 방치한다. 이를 다시 원심분리한 후 80% 에탄올로 세척하여 건조시킨다. 추출한 RNA는 DEPC water에 녹여 first strand cDNA로 합성한다. 합성된 cDNA에 개별 사이토카인의 primer를 반응시켜 타겟 유전자를 증폭시킨 후, 유전자 발현량을 분석한다.

사. 보체계

(1) 보체 양

시험물질을 처리한 세포나 시험물질을 섭취시킨 실험동물의 혈액, 인체의 혈액에서 측정할 수 있다. 보체 측정은 Latex 응집반응을 응용하여 면역 화학 분석 장치를 이용한 광학적 측정법으로 시행한다. 항 보체의 항체를 polyethylen latex 입자에 감작시켜 제조된 latex 시약과 검체를 cell 내에서 혼합 반응시키면 latex 입자에 감작시킨 항 보체 항체와 검체중의 보체가 반응하여 latex 응집반응이 일어난다. 이상의 응집반응을 nephelometry 분석장치를 이용하여 파장 660nm에서 탁도(산란광강도) 변화량을 측정한다.

(2) 보체계 활성

보체계 활성(항보체활성)은 시험물질에 의해 보체를 활성화 후 잔존하는 보체에 의한 적혈구 용혈 활성에 의한 complement fixation test로 측정한다. 정상인의 혈청과 gelatin veronal buffered saline과 시험물질을 혼합하여 1차 반응을 시킨 후 감작 적혈구를 넣어 2차 반응을 시킨다. 반응을 정지시킨 후 원심분리하여 상층액을 얻은 후 흡광도를 측정한다. 항보체 활성은 감작된 면양적혈구를 50% 용혈시키는 데 필요한 양을 구한다(CH₅₀).

3. 시험 설계 시 고려사항

가. 시험관시험

(1) 시험계

Jurkat cell(인체 T 림프구), Raw 264.7(마우스 대식세포), DC2.4(마우스 dendritic cell), THP-1(인체 단핵구), Molt-4T(인체 T 림프구)등과 같은 세포주를 사용하여 시험물질의 효능을 평가한다.

(2) 바이오마커

시험물질의 작용 기전을 설명하기 위하여 바이오마커의 양, 활성, 단백질 발현, mRNA 발현 등을 측정한다.

(3) 통계처리

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

나. 동물시험

(1) 실험동물

건강한 동물이나 약품(예: cyclophosphamide, methotrexate 등)을 투여하여 면역능력을 억제한 실험동물 모델을 사용한다. 또한 바이러스(예: LP-BM5 murine leukemia virus)를 투여하여 감염을 유도한 실험동물에 시험물질을 투여한 후 면역능력을 측정한다. 시험물질을 섭취하지 않은 군과 시험물질을 섭취한 군 간의 면역능력을 비교하여 시험물질의 효능을 평가한다.

실험동물의 혈액, 비장, 복강으로부터 얻은 면역세포를 배양하면서 시험물질의 효능을 평가할 수 있다(ex vivo).

(2) 바이오마커

시험물질의 작용 기전을 설명하기 위해 바이오마커의 양, 활성, 단백질 발현, mRNA 발현 등을 측정한다. 한 가지 지표의 변화가 아닌 일련의 바이오마커의 변화를 종합적으로 평가한다.

(3) 통계처리

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

다. 인체적용시험

(1) 시험대상

인체적용시험 대상자의 선정/제외기준은 원료의 특징과 작용 기전에 따라 인체적용시험 IRB 승인 시 구체적으로 결정할 수 있다. 본 평가 가이드는 인체적용시험의 선정/제외기준 설정 시 고려되어야 할 사항을 예시로 수록하였다.

(가) 시험대상자(예시)

- 면역기능의 주요 지표인 혈중 백혈구 수가 낮거나 ($3 \sim 4 \times 10^3/\mu\text{l}$), 너무 높지 ($8 \sim 10 \times 10^3/\mu\text{L}$) 않은 자
- 시험 시작 전 1년 이내에 2회 이상 상기도감염(감기, 편도염, 인두염, 후두염, 부비강염, 중이염, 비염 등) 증상이 있었던 자

(나) 대상자 제외기준(예시)

- 질병상태
 - 백혈병환자
 - 자가면역질환자
 - 염증성 전신질환자
 - 대사증후군 환자
 - 감염성 질환자
 - 심혈관질환/부정맥/심부전/심근경색/심장조율기 사용 이력자
 - 약물치료 중이거나 조절되지 않는 당뇨병자
 - 위장질환(크론병)/위장절제수술/과민성 대장증후군환자
 - 간 질환자
 - 신장 질환자
 - 폐, 호흡기 질환자
 - 근골격 질환자

- 갑상선 질환자
- 고혈압 환자
- 신경·정신장애(우울증, 조현병), 심리치료를 받은 자
- 암 환자
- 갑상선 또는 호르몬 이상증세/이상 갑상선 수치를 가진 자
- 최근 6개월 내 수술을 한 자
- 알레르기 환자
- 생리적 상태
 - 임신부, 임신을 준비하는 자
 - 수유부
 - 올바른 피임방법을 사용하지 않는 여성
 - 출산 후 6개월 이내 여성
- 약물복용
 - 약물중독자
 - 지난 3개월 이내에 면역억제제, 항생제, 비스테로이드성 항염증제, 스테로이드성 약물, 항히스타민제를 복용한 자
 - 예방주사를 맞은 상태
- 생활 습관
 - 알코올섭취
 남자: <30 g/일(맥주 3잔, 소주 3잔 정도)
 여자: <20 g/일(맥주 2잔, 소주 2잔 정도)
 - 고강도 운동을 하는 자
- 알레르기
 - 시험물질에 대한 알레르기/부작용이 있는 자
- 기타
 - 최근 3개월 내 다른 임상시험에 참가한 자
 - 그 외 연구자에 의해 실험에 부적합하다고 판단되는 자

(2) 시험설계

무작위배정, 위약대조연구(Randomized, controlled trial, RCT)를 기본으로 한다.

(3) 바이오마커

시험물질의 작용 기전을 설명하기 위해 바이오마커의 양, 활성, 단백질 발현, mRNA 발현 등을 측정한다. 한 가지 지표의 변화가 아닌 일련의 바이오마커의 변화를 종합적으로 평가한다.

(4) 혼동요인 통제

피험자를 대상으로 인체적용시험 기간 중 심한 운동이나 자외선 노출이나 스트레스에 노출되지 않도록 교육을 실시하여 대조군과 시험군 간의 면역기능에 미치는 영향을 최소화하도록 한다.

(5) 통계처리

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

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, 북혜숙, 김우선, 피재호, 박현용, 김현정, 교문사, 2010
3. 건강기능식품 기능성평가 해설서, 식품의약품안전처, 2008
4. 생리학(12판). Stuart Ira Fox 외. 라이프사이언스. 2014
5. 생명과학의 기초 생화학. 양철학. 자유아카데미. 2009
6. 생명과학(8판). Campbell 등. 바이오 사이언스. 2011
7. 세포분자면역학. Abul K. Abbas 등. epublic. 2008
8. 식품의약품안전처. 면역기능 조절 관련 기능성 평가체계 구축. 2003
9. 식품의약품안전처. 면역력증진 관련 기능성 평가체계 구축(II). 2004
10. 안영근, 박영길, 김정훈. Quercetin이 마우스의 면역반응에 미치는 영향. 약학회지 35(5):401-415, 1991
11. Albers R, Bourdet-Sicard R, Braun D, Calder PC, Herz U, Lambert C, Lenoir-Wijnkoop I, Méheust A, Ouwehand A, Phothirath P, Sako T, Salminen S, Siemensma A, van Loveren H, Sack U. Monitoring immune modulation by nutrition in the general population: identifying and substantiating effects on human health. Br J Nutr 110:Suppl 2:S1-S30, 2013
12. Arreola R, Quintero-Fabián S, López-Roa RI, Flores-Gutiérrez EO, Reyes-Grajeda JP, Carrera-Quintanar L, Ortuño-Sahagún D. Immunomodulation and anti-inflammatory effects of garlic compounds. J Immunol Res 2015:401630, 2015
13. Byun EH. Immunomodulatory activities of crude polysaccharide fraction separated from *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo. Korean J Food Sci Technol 49(5):559-566, 2017
14. Chen L, Yu J. Modulation of Toll-like receptor signaling in innate immunity by natural products. Int Immunopharmacol 37:65-70, 2016
15. Choo SB, Yang H, Jeong DY, Jeong SY, Ryu MS, Ph KH, Yoo YC. Immunomodulating effect of extract of Cheonggukjang fermented with *Bacillus amyloliquefaciens*(SRCM100730) on RAW 264.7 macrophages. J Korean Soc Food Sci Nutr 46(11):1300-1307, 2017
16. Cummings JH1, Antoine JM, Azpiroz F, Bourdet-Sicard R, Brandtzaeg P, Calder

- PC, Gibson GR, Guarner F, Isolauri E, Pannemans D, Shortt C, Tuijelaars S, Watzl B. PASSCLAIM – Gut health and immunity. *Eur J Nutr* 43[Suppl 2]: II118-II173, 2004
17. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. Guidance on the scientific requirements for health claims related to gut and immune function. *EFSA J* 9(4):1984, 2011
18. Finamore A, Palmery M, Bensehaila S, Peluso I. Antioxidant, immunomodulating, and microbial-modulating activities of the sustainable and ecofriendly *Spirulina*. *Oxid Med Cell Longev* 2017:3247528, 2017
19. Jayasinghe CD, Gunasekera DS, De Silva N, Jayawardena KKM, Udagama PV. Mature leaf concentrate of Sri Lankan wild type *Carica papaya* Linn. modulates nonfunctional and functional immune responses of rats. *BMC Complement Altern Med* 26:17(1):230, 2017
20. Gredel S. Nutrition and immunity in man. ILSI Europe Concise Monograph Series 2nd ed., 1-30, 2011
21. Kim DS, Hurj BS, Shin KS. Chemical characteristics and immuno-stimulatory activity of polysaccharides from fermented vinegars manufactured with different raw materials. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44(2):191-199, 2015
22. Kim DS, Sung NY, Park SY, Kim G, Eom J, Yoo JG, Seo IR, Han IJ, Cho YB, Kim KA. Immunomodulating activity of *Sargassum horneri* extracts in RAW264.7 macrophages. *J Nutr Helath* 51(6): 507-514, 2018
23. Kim EH, Gwak JY, Chung MJ. Immunomodulatory ativity of *Platycodon grandiflorum*, *Codonopsis lanceolata*, and *Adenophora triphylla* extracts in mcrophage cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 47(11):1069-1075, 2018
24. Kim MS, Kim JS, Ryu MJ, Kim KH, Hwang KT. Immunomodulatory effects of β -1, 3/1,6-glucan and lactic acid bacteria in LP-BM5 murine leukemia viruses-induced murine acquired immune deficiency syndrome. *Korean J Food Preserv* 24(8): 1158-1167, 2017
25. Koo SW, Lim MK, Lee KW. Immunomodulatory effects of *Zingiber officinale* in cyclophosphamide-induced immunosuppress mice. *J Vet Clin* 32(1):56-61, 2015
26. Lee DH, Hong JH. Immune-enhancing effects of polysaccharides isolated from Ascidian (*Halocynthia roretzi*) Tunic. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44(5):673-680, 2015
27. Lee JH, Yang JE, Song JH, Maeng SH, Kim SY, Yoon NY. Immuno-potentiating

- activities of enzymatic hydrolysate of Japanese mud shrimp *Upogebia major*. Korean J Fis Aqat Sci 51(2):135-141, 2018
28. Liu M, Yasmeen R, Fukagawa NK, Yu L, Kim YS, Wang TTY. Dose-dependent responses of I3C and DIM on T-cell activation in the human T lymphocyte Jurkat cell line. Int J Mol Sci 18(7):1409, 2017
 29. Park HR, Suh HJ, Yu KW, Kim TY, Shin KS. Chemical properties and immuno-stimulating activities of crude polysaccharides from enzyme digests of tea leaves. J Korean Soc Food Sci Nutr 44(5):664-672, 2015
 30. Park SE, Seo SH, Moon YS, Lee YM, Na CS, Son HS. Antioxidant and immunological activities of *Sparassis crispa* fermented with *Meyerozyma guilliermondii* FM. J Korean Soc Food Sci Nutr 45(10):1398-1405, 2016
 31. Pritchard GH, Kedl RM, Hunter CA. The evolving role of T-bet in resistance to infection. Nat Rev Immunol 19(6):398-410, 2019
 32. Vanegas SM, Meydani M, Barnett JB, Goldin B, Kane A, Rasmussen H, Brown C, Vangay P, Knights D, Jonnalagadda S, Koecher K, Karl JP, Thomas M, Dolnikowski G, Li L, Saltzman E, Wu D, Meydani SN. Substituting whole grains for refined grains in a 6-wk randomized trial has a modest effect on gutmicrobiota and immune and inflammatory markers of healthy adults. Am J Clin Nutr 105(3):635-650, 2017

건강기능식품 기능성 평가 가이드(민원인 안내서) - 면역기능 관련 -

발 행 인 : 이동희

편 집 위 원 장 : 황인균

편 집 위 원 : 이혜영, 김종수, 윤태형, 권광일, 국주희, 김규현,
김준영, 주도영, 오재명, 방수진, 류은채, 안정선,
조정화, 김선후, 문상은, 김아름

발 행 처 : 식품의약품안전평가원

발 행 일 : 2020년 9월

문 의 처 : 식품위해평가부 영양기능연구과
(043-719-4402, 4416, 4421, 4422, 4423,
4425, 4426, 4430)

건강기능식품 기능성 평가 가이드 (민원인 안내서)

면역기능 관련



【부패. 공익신고】 신고자 및 신고내용은 보호됩니다.

- ▶ 식약처 홈페이지 “국민소통 > 국민신문고 > 부패.공익신고” 코너
- ▶ 식약처 홈페이지 “국민소통 > 신고센터 > 부패.공익신고 상담” 코너