

건강기능식품 기능성 평가 가이드

‘인지기능개선/기억력개선에 도움을 줄 수 있음’ 편

2019.11.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

지침서·안내서 제·개정 점검표

명칭	건강기능식품 기능성 평가 가이드 (‘인지기능개선/기억력개선에 도움을 줄 수 있음’편)
----	--

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. 2019년 11 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 2019년 11월 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 영양기능연구팀으로 문의하시기 바랍니다.

전화번호: 043-719-4416, 4421, 4423, 4428, 4430

팩스번호: 043-719-4420

제·개정 이력

연번	제·개정번호	승인일자	주요내용
1		2014.12.	제정 (‘인지능력개선에 도움을 줄 수 있음’편)
2	B1-2015-1-007	2015.12.31.	제정 (‘기억력개선에 도움을 줄 수 있음’편)
3	안내서-0130-01	2017.6.1.	「식약처 지침서등의 관리에 관한 규정」에 따른 등록번호 일괄 정비 (규제개혁담당관실-3761호, 2017.5.16.) (‘기억력개선에 도움을 줄 수 있음’편)
4	안내서-0780-01	2017.7.28.	「식약처 지침서등의 관리에 관한 규정」에 따른 등록번호 일괄 정비 (규제개혁담당관실-3761호, 2017.5.16.) (‘인지능력개선에 도움을 줄 수 있음’편)
5	안내서-0780-02	2019.6.	개정 및 가이드 통합 (기능성 시험방법 등 업데이트, 인지능력개선/기억력개선 가이드 통합)
6	안내서-0780-03	2019.11.	개정(제명변경)

CONTENTS

※ 건강기능식품의 기능성 개요	1
※ 약어	3
 I 서 론	5
 II 일반적 사항	5
1. 개요	5
2. 보건학적 중요성	14
 III 기능성 시험 방법	16
1. 바이오마커의 선정	16
2. 주요 바이오마커의 측정 방법	31
3. 시험 설계 시 고려사항	44
 IV 참고문헌	47

건강기능식품의 기능성 개요

□ 기능성 정의

건강기능식품법 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

8-OH-dG	8-oxo-2'-deoxyguanosine(8-OH-dG)
ACh	acetylcholine
AChE	acetylcholinesterase
ADAS-Cog	alzheimer's disease assessment scale-cognition
AICD	amyloid precursor protein(APP) intracellular domain
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid
APP	amyloid precursor protein
ATP	adenosine triphosphate
A β	β -amyloid protein
BACE	β -secretase
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BOLD	blood oxygenation level dependent
BuChE	butyryl-cholinesterase
CaMK	calcium/calmodulin-dependent protein kinase
CFT	C-terminal fragment
COX-2	cyclooxygenase-2
Cr	creatine
CREB	cyclic adenosine monophosphate(cAMP) response element-binding protein
CT	computed tomography
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
fMIR	functional magnetic resonance imaging
GDNF	glial-derived neurotrophic factor
GPx	glutathione peroxidase
GSH	glutathione
H&E	hematoxylin-Eosin
IL-1 β	interleukin-1 β
LDH	lactate dehydrogenase
LTP	long-term potentiation
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MDA	malondialdehyde
mGluR	metabotropic glutamate receptor
MMSE	mini-mental state examination

MRI	magnetic resonance imaging
MRS	magnetic Resonance Spectroscopy
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NAA	N-acetyl aspartate
nAChR	nicotinic acetylcholine receptors
NFT	neurofibrillary tangle
NGF	nerve growth factor
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NMDAR	N-methyl-D-aspartate receptor
NO	nitric oxide
NT	neurotrophin
PARP	poly ADP ribose polymerase
PCr	phosphocreatine
PGE2	prostaglandin E2
RCT	randomized, controlled trial
ROS	reactive oxygen species
sAPP	soluble amyloid peptide precursor
SOD	superoxide dismutase
TNF- α	tumor necrosis factor - α
VAS	visual analogue scale
WAIS	wechsler adult intelligence scale

I

서론

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

II

일반적 사항

1. 개요

가. 뇌의 구조와 신경세포

(1) 뇌의 구조

뇌는 인지, 정서, 행동과 판단 등에 영향을 미치는 인간의 가장 중요한 신체부위 중의 하나이다. 뇌는 구조상 좌우의 반구와 간뇌로 이루어져 있으며, 이는 대뇌, 소뇌, 간뇌, 뇌간(중뇌, 뇌교, 연수)으로 구분된다(그림 1). 대뇌(cerebrum)는 기억과 판단을 관장하는 정신활동 및 감각과 수의운동의 중추로서, 대부분의 행동을 통합하고 조절하는 기능을 한다. 대뇌 표면은 수많은 주름으로 이루어져 다양한 뇌 구성 세포들이 여러 층으로 구성되어 있고, 약 1,000 억 개의 뇌세포가 있다. 해마(hippocampus)는 내측두엽 안에 위치하면서 다양한 기능별 뇌 부위와 복잡한 네트워크를 구성하고 변연계와 구조적으로 밀접한 관계가 있으며, 학습과 기억 형성에 중추역할을 한다. 기억 형성에 문제가 있는 노인의 경우, 일반적으로 해마가 위축되어 있으며, 신경세포의 손상 정도가 높은 것으로 알려져 있다.

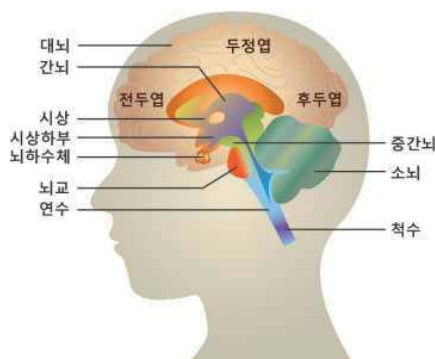


그림 1. 뇌의 구조

[출처: 이해하기 쉬운 건강기능식품, 2019]

(2) 신경세포

뇌는 뉴런(neuron)과 신경교세포(glial cell)라는 지지세포(supporting cell)로 이루어져 있다. 뉴런은 신경계를 구성하는 기본단위로 받은 자극을 다른 세포로 전달하는 기능을 감당한다. 신경교세포는 지지작용, 탐식작용 및 영양공급 작용을 통해 뉴런을 보호하고 뉴런의 기능을 보조하는 역할을 한다. 신경계를 구성하고 신경활동을 담당하는 기본 단위인 뉴런은 자극을 받으면 이를 전기 신호화하고, 뉴런의 말단에서 신경전달물질(neurotransmitter)을 분비함으로써 다른 세포들에게 자극 정보를 한쪽의 일정한 방향으로 전달한다. 따라서 이러한 특징이 신경세포의 신호 전달의 방향성과 신경물질에 따른 신호의 강도를 결정하게 된다. 뉴런의 구조는, 핵을 포함한 세포체(nerve cell body), 수상돌기(dendrite), 축삭돌기(axon), 신경종말(axon terminals)로 이루어져 있다. 신경종말의 작은 주머니 안에는 신경전달물질이 저장되어 있으며, 자극에 따라 이를 시냅스로 분비하여 다음 뉴런으로 정보를 전달한다. 신경세포가 손상되면 정상적인 뇌기능을 할 수 없게 되며, 일단 손상되면 다시 재생되지 않기 때문에 신경세포를 건강하게 유지하는 것이 중요하다.

나. 인지기능

뇌의 지능(intelligence)을 이용하여 문제를 인식하고 해결할 수 있는 방법 또는 과정을 생각해내는 능력을 인지능력(cognition)이라고 할 수 있으며 문제를 해결하는 방법을 생각해내기 위해서는 과거의 체험 등을 응용하게 되는데 이 때 과거의 체험을 기억해 낼 수 있는 기억력이 필요하게 된다.

인지(라틴어: cognocere로 아는 것, 개념화하는 것, 또는 인식하는 것)란 정보를 가공하는 과정, 지식을 적용하는 것 및 적용사례 바꾸는 능력으로 정의될 수 있으며 사용하는 분야에 따라 인지(력)의 의미가 달라질 수 있다. 그 예로 심리학과 인지과학에서는 인지는 개인의 정보 처리 능력을 의미하며 인지력의 발달된 다른 개념으로 개인의 심리상태 집단 및 조직 간의 사회적 연결기능을 포함한다.

다. 기억력

(1) 정의

기억(memory)이란, 정보의 저장과 유지, 그리고 회상의 일련의 과정을 의미한다. 기억의 첫 번째 단계인 저장(encoding)은 외부로부터 온 정보를 화학적, 물리적 자극의 형태로 우리의 감각기관을 통해 받아들이는 것이다(그림 2). 유지(storage)는 그 두 번째 단계로 정보를 시간이 지남에도 계속 유지할 수 있게 하는 과정이다. 마지막으로 회상(retrieval)은 저장되어 있는 정보를 찾아내서 의식수준으로 끌어내는 것을 의미한다. 이러한 회상은 정보의 종류에 따라서는 노력 없이도 의식수준으로 끌어올 수 있는 경우도 있다.

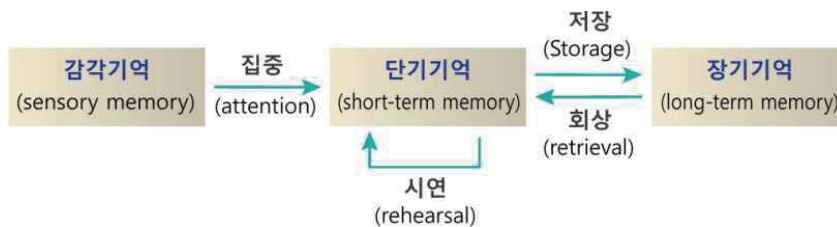


그림 2. 기억의 형성 과정

[출처: 건강기능식품 기능성 평가가이드, 2015]

(2) 기억의 분류

(가) 감각기억(sensory memory)

감각기억은 극히 짧은 시간에 기억되다가 순간적으로 사라지는 기억이다. 감각지역에서는 그 내용을 기억 속에 두고 유지시키려면 주의를 기울여서 정보가 몇 초 동안 더 지속되게 해야 한다. 시각적 자극은 0.5초 정도, 청각적 기억은 2초 정도로 굉장히 짧은 시간 내에 사라진다.

(나) 단기기억(short-term memory)

단기기억이란 새로운 정보를 받아 등록된 정보가 1차적으로 저장되는 것으로 수초에서 수분 내에 회상해 낼 수 있는 기억을 의미하며 작업기억(working memory)의 중요요소이다. ‘단기기억’이라는 용어는 인지과학 초기에 사용한 용어로, 장기기억과의 대비를 강조한 용어이다. 반면, ‘작업기억’은 기억의 역동적·과정적 측면을 강조하기 위한 용어이다. 작업기억의 용량은 7 ± 2 개 혹은 그 이하로 매우 제한적이다. 과거 전화번호가 7가지 숫자로 이루어져 있었던 것도 이러한 이유이다. 하지만, 묶는 전략을 쓰면 더 늘릴 수 있다. 예를 들면, 전화번호 123-456-7890과 같이 묶어서 암기하면, 10개를 개별로 외우는 것보다 쉽다. 이것이 많은 국가에서 전화번호를 묶어서 표시하는 이유이기도 하다. 단기기억은 새로운 정보를 장기기억으로 저장하기 위해 거치는 단계로, 단기기억에 머무는 시간은 평균 3초 내지 5초, 길어야 30초이다. 자극 정보는 시각적, 청각적(언어적) 형태로 변환된다. 단기기억은 용량에 제한이 있고, 자극에 주의를 주지 않으면 새로운 자극에 의하여 대체되어 망각된다. 쉽게 말해 컴퓨터의 RAM 같은 역할을 하는 것으로, 하드디스크에 저장하기 위한 일련의 과정과 각종 정보처리가 일어나는 곳이다. 단기기억에 관련되는 뇌 부위는 전두엽, 특히 전전두엽이 담당하는 것으로 다양한 뇌영상 연구들을 통해 제안되었다.

(다) 장기기억(long-term memory)

단기기억으로 임시 저장된 기억이 반복 또는 저장된 다른 정보와의 연합을 통해 강화되어 더 영구적인 형태로 유지되는 것이 장기기억이다. 이 저장 과정은 항상 연습과 시연(rehearsal)을 통한 노력이 요구되는 능동적인 과정을 거치기도 하고, 일부 정보는 우리의 삶을 통해서 수동적으로 저장된다.

장기기억은 세 가지 특성을 가진다. 첫째는 선택성으로, 아무 자극이나 장기기억으로 남지 않고, 자기에게 중요한 정보만을 선별하여 장기기억으로 저장하게 된다. 둘째는 영속성이다. 동물의 기억이 10분 내외인 반면, 인간이 과거에 일어난 경험들도 언제든지 기억에서 불러올 수 있는 것처럼 항상 역동적으로 변화하는 시냅스 연결망들이 수십 년간 장기기억을 유지하는 것이다. 셋째는 유전자의 발현이 조절되어 새로운 단백질이 합성되고, 시냅스에서 새로운 돌기가 형성되어 단기기억이 장기기억으로 바뀌게 된다.

단기기억은 용량이나 지속시간이 제한되는 반면, 장기기억은 용량이 훨씬 더 크고, 평생 지속되기도 한다. 예를 들면, 불규칙한 7 단위 숫자는 보통은 겨우 수 초간 유지할 수 있어 단기기억으로 분류되지만, 전화번호는 반복적으로 정보를 활용함으로써 수년 동안 기억할 수 있게 되어, 장기기억으로 저장되었다고 말할 수 있다. 단기기억의 저장(encoding)이 소리를 통한 전략을 구사한다면, 장기기억은 의미(semantics) 전략을 통해 저장(encoding)된다(표 1).

표 1. 기억의 분류 및 특성 비교

특징	감각기억	단기(작업)기억	장기기억
정보의 유입	주의 필요 없음	주의 필요	시연(되뇌임)
정보의 지속	불가능	주의지속	반복
정보의 유형	유입 정보	음운적, 시각적, 의미적	의미적(주로), 시각적, 청각적(일부)
수용 능력	작음	작음	무제한
기억의 상실	쇠퇴	대치, 쇠퇴	간섭, 인출 실패
흔적 지속시간	0.5-2초	3-15(20)초	수분, 수년
인출	읽어냄	자동적 처리 의식된 것 시청각적 단서	검색과 재구성

자료: 인지과학-학문 간 융합의 원리와 응용. 성균관대학교출판부. 2012

라. 기억력 및 인지능력에 영향을 미치는 요인

(1) 신경전달물질 및 시냅스 가소성(plasticity) 조절

(가) 신경전달물질 생성 및 분비

신경전달물질(neurotransmitter)은 하나의 신경에서 또 다른 신경 세포로 시냅스(synapse)를 통해 신호를 전달하는 내인성 화학물질(endogenous chemicals)이다. 신경전달물질의 전달 과정은 다음 그림 3과 같다. 신경전달물질은 시냅스전 뉴런(presynaptic neuron)의 축색말단부(axon terminal)에서 시냅스 소포로 포장된다. 신경전달물질은 시냅스 간극(synaptic cleft)으로 방출되고 확산되어 시냅스후 뉴런(postsynaptic neuron)의 막에 있는 특정 수용체에 결합하여 고유한 작용을 나타낸다. 그리고 시냅스 간극에 있는 신경전달물질들은 신경전달물질 운반단백질(neurotransmitter transporter)에 의해 시냅스 전 뉴런으로 되돌아가 재합성 되기도 하고, 시냅스 간극에 있는 분해효소들에 의해 분해되기도 한다. 인지능력 및 기억력과 관련된 가장 대표적인 신경전달물질로는 아세틸콜린(acetylcholine, ACh)을 들 수 있다. 아세틸콜린은 콜린 전달효소에 의해 뇌신경세포내에서 생산되고 시냅스 간극으로 방출된 후 시냅스 후 뉴런의 아세틸콜린 수용체에 붙어 콜린성 신경전달(cholinergic neurotransmission)을 일으키는데 시냅스 간극에 있는 아세틸콜린에스테라아제(acetylcholinesterase)에 의해 분해되어 작용을 마치게 된다. 인지능력 및 기억력 저하는 아세틸콜린에스테라아제의 증가로 더욱

심화된다. 콜린에스테라아제는 아세틸콜린에스테라아제(AChE)외에, 부틸콜린에스테라아제(BuChE)가 있는데, BuChE는 AChE에 비해 아세틸콜린에 대한 친화성이 비교적 낮지만, 높은 농도의 아세틸콜린 조건에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

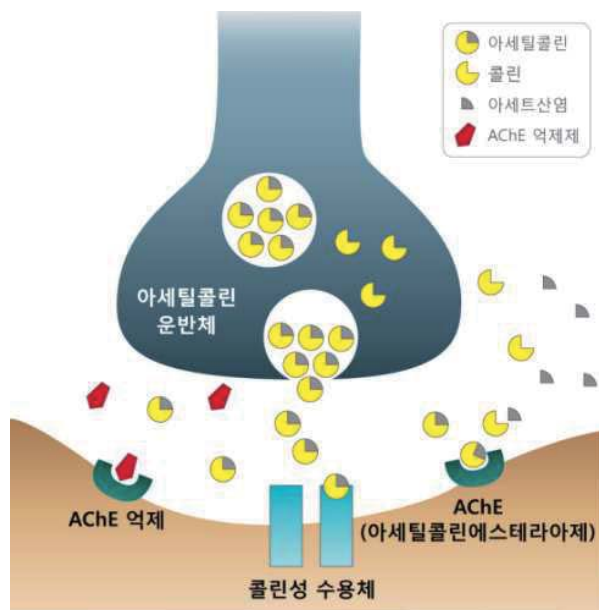


그림 3. 아세틸콜린에스테라아제의 작용

[출처: Campanari ML et al., 2016]

(나) 신경전달물질 생성 및 분비

① 시냅스(synapse)와 시냅스 가소성(synaptic plasticity)

해마에 전기적 자극이 전달되어 활성화되면 신경전달물질인 글루타메이트(glutamate)가 시냅스 전(presynaptic site)의 축삭말단(axon terminal)에서 분비되어 시냅스 후(postsynaptic site)에 흥분성 반응을 일으킨다. 분비된 글루타메이트는 α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid(AMPA)나 N-methyl-D-aspartate(NMDA) 수용체에 작용한다. AMPA 수용체를 통하여 Na^+ 이온이 세포 내로 유입되고 K^+ 이온이 세포 외로 이동하여 탈분극(depolarization)이 일어남으로써 전기적 신호가 형성, 전달된다. NMDA 수용체는 휴지기에는 Mg^{2+} 이온에 의하여 막혀있으나, 지속적인 자극에 의해 전위변화가 생기면 Mg^{2+} 이온이 제거되어 세포 내로 Na^+ 와 Ca^{2+} 이온을 유입시킨다. Ca^{2+} 의 투과는 신경세포 안에서 단백질 발현에 관련하여 여러 중요한 역할을 한다. 시냅스 가소성은 시냅스에서

AMPA와 NMDA 수용체 수의 변화로 시냅스의 기능이 강화되거나 약화되는 것을 의미하며, 기억력의 강화와 관련하여 중요한 메커니즘으로 여겨진다.

니코틴성 아세틸콜린 수용체(nAChR)는 아세틸콜린 수용체 중의 하나로, 인지능력과 관련되어 있고 알츠하이머 질환에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 치매치료제 중, Galantamine는 AChE억제의 역할을 하며 nicotinic receptor와의 구조적 유사성으로 인한 잠재력이 예상되고 있다. 따라서, nAChR의 양을 높인다면, 시냅스의 기능강화를 통해 인지기능 향상효과를 얻을 수 있다.

② 장기강화(long-term potentiation, LTP)

장기강화(long-term potentiation, LTP)는 두 신경세포의 신호전달이 지속적으로 향상되는 현상을 말한다. 신경세포는 시냅스 결합을 통하여 신호전달을 하며, 기억은 이 시냅스에 단백질의 형태로 축적되어 있다고 여겨진다. 장기강화는 학습과 기억의 형성 및 강화의 주요 세포학적 메커니즘의 하나로 여겨지고 있다. 장기강화는 시냅스 후 NMDA 및 AMPA 수용체 수의 증가로 시냅스 전 뉴런과 시냅스 후 뉴런이 시냅스를 통해 신호를 전달하는 능력을 증가시킨다. 현재 장기강화의 기초생물학적 이해 및 장기강화와 행동학적 학습의 인과관계 관하여 활발한 연구가 진행되고 있으며, 장기강화를 유도할 수 있는 약리학적 방법 등의 개발도 진행되고 있다. 아래의 그림 4는 장기강화의 단계를 도식화한 것으로, 장기강화는 1) 시냅스에 지속적으로 자극이 전달되어 2) 시냅스 후 수용체 수가 증가하고, 그와 관련된 3) 신경전달물질의 분비가 증가하여 4)시냅스 간 연결이 강화되는 과정을 거친다.

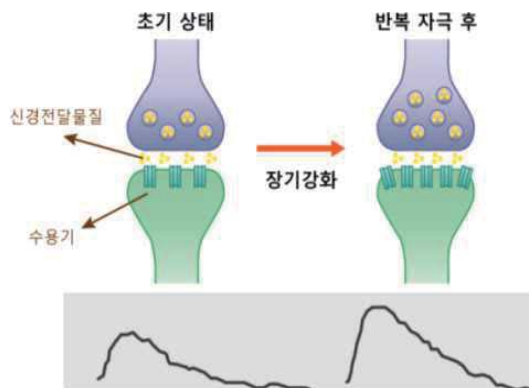


그림 4. 시냅스에서의 장기강화 모식도

[출처: Bliss TV, 1993]

(2) β -amyloid protein 축적 억제

β -amyloid protein($A\beta$)은 아밀로이드전구단백질(amyloid precursor protein, APP)이 절단효소(secretase)에 의해 끊어짐으로 인해 생성된다. 아밀로이드전구단백질을 절단하는 효소는 3종이 있으며, 각각 α -, β - 및 γ -secretase로 지칭한다. 정상 상태에서는 α 와 γ -secretase가 아밀로이드전구단백질을 절단하여 용해되어 배출이 쉬운 β -amyloid protein이 생성되지만, 알츠하이머병에서는 β -와 γ -secretase에 의하여 응집성이 강한 β -amyloid protein이 생성되어 세포 내에 축적하게 된다(그림 5). 축적된 β -amyloid protein은 섬유상(fibril)으로 응집하여 노인반을 생성하고, 신경독성을 나타내서 세포를 공격하여 파괴한다.

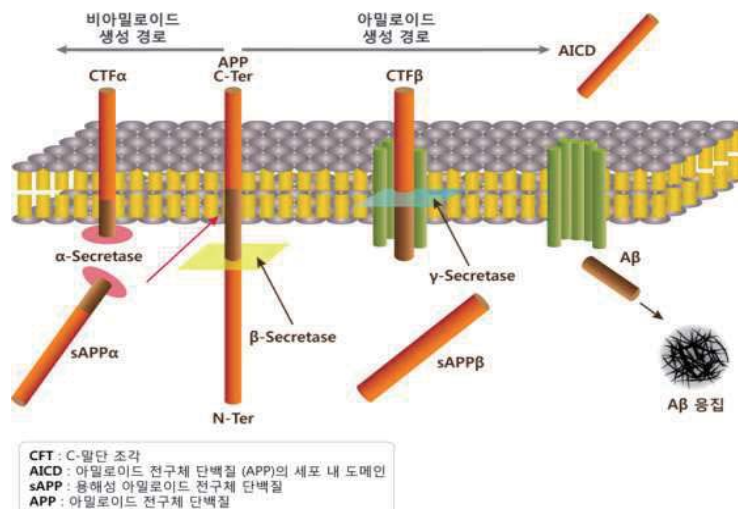


그림 5. β -amyloid protein의 생성

[출처: Picone P et al., 2014]

(3) Tau protein의 과인산화 억제

타우단백질(tau protein)은 중추신경계 특히 신경세포의 축삭돌기에 주로 존재하는 것으로 미세소관(microtubule)을 안정화시키는 역할을 한다. 타우 단백질 응집의 원인은 정확히 밝혀지지 않았지만 타우단백질의 과인산화(hyperphosphorylation) 현상이 미세소관의 결합을 약화시키고 응집현상을 증가시킨다고 보고되고 있다. 타우단백질의 과인산화로 타우 단백질이 미세소관으로부터 떨어져 미세소관의 안정성을 약화시키게 되고 이는 신경세포의 축삭이동 이상을 가져와 퇴행을 야기 시킨다. 또한 과인산화된 타우단백질의 독성은 응집을 유발하고 결국 섬유화 형태의 엉킴으로 neurofibrillary tangle(NFT)를 형성한다(그림 6).

또한, 자체적으로 응축된 타우단백질은 세포 밖에서 다발을 이루면서 활성화산소를 통한 신경세포사멸을 유도한다고 보고되었다.

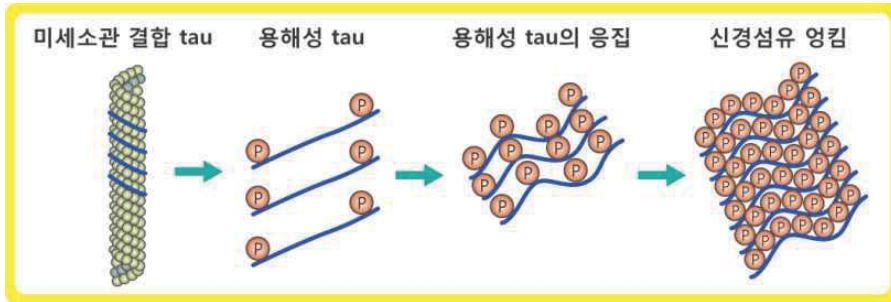


그림 6. 타우 단백질의 생성

[출처: Citon M, 2010]

(4) 신경염증 억제

신경염증(neuroinflammation)은 신경 조직에 염증이 생긴 것으로, 외상성 뇌손상(traumatic brain injury), 감염(infection), 자가면역(autoimmunity) 등 여러 가지 원인에 의해 발생한다. 중추신경계에서의 신경염증은 신경퇴행성질환(neurodegenerative disease)의 중요한 병인인 미세아교세포(microglia) 및 별아교세포(astrocytes)의 활성화를 동반한다. 신경염증에 의하여 활성화된 별아교세포는 보체 활성화제(complement activators), 케모카인(chemokines), 사이토카인(cytokines), 유리라디칼(free radical) 등의 염증성 인자를 분비하여 신경세포의 괴사를 촉진하게 된다.

(5) 신경세포사멸 억제를 통한 신경세포보호

세포사멸(apoptosis)은 세포의 항상성 유지를 위한 중요한 기전으로 능동적인 세포사멸 과정이다. 형태적으로 세포의 비중감소, 세포막의 파괴, 핵 응축 등과 더불어 세포 내부의 물질들이 사멸체(apoptotic body)라는 포낭을 형성하면서 식세포작용을 거친다. 반면, 세포사멸의 비정상적인 조절은 신경퇴화 등에 관여하여 결과적으로 기억력에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 세포사멸을 유발하는 경로는 내인성과 외인성 경로로 구분된다. 내인성 경로는 DNA 손상, 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 등의 자극에 의해 유발되며, 이런 자극은 미토콘드리아 전위조절 능력을 파괴시켜, cytochrome c등을 세포질로 유출시킨다. Cytochrome c는 apoptotic protease activating factor 1 (APAF1) 및 caspase-9과 결합하여 'apoptosome'을 형성한 후 caspase-3를 활성화시켜 세포사멸을 유도한다. 외인성

경로는 세포벽의 CD95(Fas) 수용체에 CD95L(fas ligand, FasL)이 결합하여, fas-associated protein with death domain(FADD)이 동원되어 세포사멸을 유발시킨다. FADD는 procaspase 8을 동원하고, caspase 8로 분해되어 caspase-3을 형성한다. Caspase-3은 핵내 DNA를 분해하여 세포사멸을 일으킨다.

(6) 산화스트레스 억제

산소는 생체 내에서 영양소를 산화시켜 에너지를 만들어내기도 하지만, 이 과정에서 생성되는 ROS는 반응성이 강하여 세포막, DNA, 단백질 등을 공격한다. 체내에는 과잉의 활성 산소를 제거하기 위해 자체적으로 항산화 방어체계를 갖추고 있으나, 이러한 항산화 방어 체계가 잘 작동되지 않으면 노화가 가속화되고 각종 질병이 발생하는 위험도는 증가하게 된다. 뇌는 글루타티온(glutathione, GSH) 함량이 낮은 반면 불포화지방산과 Fe, Al, Cu 등과 같은 metal의 함량이 높고, 대사과정에 산소가 필수적인 이유 등으로 산화 스트레스에 손상 당하기 쉬운 장기이다. 이로 인해 DNA의 붕괴, 세포막 손상, 단백질 산화, 신경세포 사멸과 관련되는 신경퇴행성 변화를 일으킬 수 있다. 특히, 알츠하이머병의 원인물질로 제시되고 있는 β -amyloid는 아밀로이드전구단백질이 β , γ -secretase라 불리는 단백질 분해효소에 의해 생성되는 단백질로서 reactive oxygen intermediates(ROI), superoxide anion(O_2^-), hydrogen peroxide(H_2O_2), 4-hydroxynonenal(HNE)등 스스로 ROS 생성에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 뿐만 아니라 기억력 저하를 특징적으로 보이는 노인을 대상으로 혈청 내 비타민 E 수준을 조사한 역학연구에서, 혈액 내 tocopherol 수준과 기억력 손상과 상관관계가 있는 것으로 나타났다.

2. 보건학적 중요성

가. 인지기능/기억력 개선의 중요성

2018년 통계청이 보도한 자료에 의하면 2018년 65세 이상 인구는 738만1천명으로 전체 인구 중 14.3%를 차지하고 생산가능인구(15~64세 인구) 100명당 65세 이상 인구를 뜻하는 노년부양비는 19.6명에서 저출산·고령화의 영향으로 2060년에는 82.6명으로 증가할 전망이다. 또한 유소년인구(0~14세 인구) 100명당 65세 이상 인구(노령화지수)는 2016년 100.1명으로 0~14세 인구를 넘어서, 2018년 110.5명, 2020년에는 434명을 돌파할 것으로 예상하고 있다(그림 7). 또한, 2017년 치매 환자수는 70만명으로 2050년에는 303만명으로

4.3배 증가할 것으로 예상된다(그림 8). 이에 따라 치매 관리 비용 역시 2015년 약 13조 2,000억원에서 2050년 106조 5,000억원으로 8.1배 늘어날 것으로 추정된다.



그림 7. 노년부양비 및 노령화지수

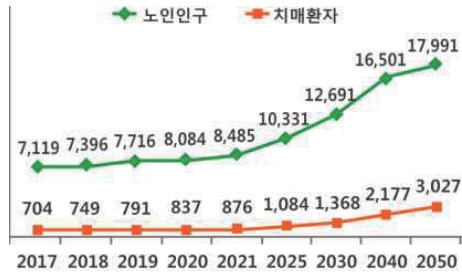


그림 8. 노인인구 및 치매인구 (천명)

[출처 : 통계청, 2018]

30세 이후부터 뇌세포는 감퇴되기 시작하며, 지속적인 스트레스, 과도한 알코올 섭취, 약물, 수면부족, 우울 등은 뇌세포의 피로를 증진시켜 기억력을 떨어뜨릴 수 있다. 또한 고령화로 인해 자연적으로 또는 치매 등의 퇴행성 질환에 의해 인지기능이 감퇴된 경우 본인의 사회 활동뿐 아니라 주변인들의 생활에 많은 장애를 초래한다. 따라서 기억력 및 인지능력을 개선 시키는 것은 다양한 뇌세포 손상물질로부터 뇌세포를 보호하고 기능을 활성화시키는 것을 의미한다. 신경세포와 정상적인 두뇌활동에 필요한 산소와 영양소를 원활하게 공급해 주고, 신경세포의 손상을 일으키는 요인을 줄이면 기억력 및 인지능력 개선에 도움을 줄 수 있다.

Ⅲ

기능성 시험 방법

1. 바이오마커의 선정

가. 연구유형별 바이오마커

인지능력 및 기억력 개선 기능성을 확인하기 위한 시험관시험, 동물시험 및 인체적용시험의 바이오마커는 아래의 표 2와 3과 같다.

표 2. 인지기능 개선의 기능성 평가를 위한 유형별 바이오마커

구분		바이오마커	측정 가능한 연구유형		
			in vitro	in vivo	Human
신경 세포 보호	신경세포사멸 억제	세포생존율	○		
		미토콘드리아 막전위차	○		
		세포사멸 관련 단백질 및 유전자 발현 (bax, Bcl-2 family, PARP, caspase 등)	○	○	
β-amyloid 형성 및 축적 억제		β-amyloid protein		○	○
		Secretase(-α, -β, -γ)	○	○	○
		Presenilin 1/2	○	○	
Tau protein 과인산화 억제		Tau protein/phospho-tau protein	○	○	○
신경염증 억제		Cytokine(TNF-α, IL-1β, PGE2 등)	○	○	○
		Cyclooxygenase-2	○	○	
		NF-kB 발현	○	○	
		MAPKs(ERK, JNK, p38MAPK)	○	○	
		NO, iNOS	○	○	
신경전달 물질 및 시냅스 가소성 조절	신경전달 물질 생성, 분비 및 대사 조절	Acetylcholine, acetylcholinesterase	○	○	
		Choline acetyltransferase	○	○	
		Butylcholinesterase	○	○	
	시냅스 가소성	N-methyl-D-aspartate receptor(NMDAR)		○	○
		Nicotinic acetylcholine receptors(nAChR)			
		Metabotropic glutamate receptor(mGluR)	○	○	
		Calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK)	○	○	
		MAPKs(ERK, JNK, p38MAPK)		○	
		Postsynaptic density-95(PSD-95)	○	○	
		CREB	○	○	
		BDNF	○	○	○

구분	바이오마커	측정 가능한 연구유형		
		in vitro	in vivo	Human
산화스트레스 억제	Reactive oxygen species	○	○	○
	항산화효소 활성(SOD, GPx, catalase)	○	○	○
	글루타티온(glutathione)	○	○	○
	8-oxo-2'-deoxyguanosine(8-OH-dG)	○	○	○
	지질과산화(MDA 등)	○	○	○
동물행동시험	모리스수중미로시험(morris water maze test)		○	
	수동회피시험(passive avoidance test)		○	
	팔방미로시험(radial arm maze test)		○	
	반스미로시험(barnes maze test)		○	
	신물질탐색시험(novel object recognition test)		○	
임상적 평가	뇌 영상 촬영(fMRI, sMRI, DTI, MRS, PET)		○	○
	한국판 웨슬러 성인용 지능검사 4판			○
	Kims 전두엽-관리기능 신경심리검사			○
	한국판 몬트리올 인지평가(MoCA-K)			○
	CANTAB			○
	Stroop test			○
	MMSE			○
	ADAS-Cog			○

표 3. 기억력 개선의 기능성 평가를 위한 유형별 바이오마커

구분		바이오마커	측정 가능한 연구유형		
			in vitro	in vivo	Human
신경세포 보호	신경세포사멸 억제	세포생존율	○		
		미토콘드리아 막전위차	○		
		세포사멸 관련 단백질 및 유전자 발현 (bax, Bcl-2 family, PARP, caspase 등)	○	○	
β-amyloid 형성 및 축적 억제		β-amyloid protein		○	○
		Secretase(-α, -β, -γ)	○	○	○
		Presenilin 1/2	○	○	
Tau protein 과인산화 억제		Tau protein/phospho-tau protein	○	○	○
신경염증 억제		Cytokine(TNF-α, IL-1β, PGE2 등)	○	○	○
		Cyclooxygenase-2	○	○	
		NF-kB 발현	○	○	
		MAPKs(ERK, JNK, p38MAPK)	○	○	
		NO, iNOS	○	○	
신경전달물질 및 시냅스 가소성	신경전달물질 생성, 분비 및 대사 조절	Acetylcholine, acetylcholinesterase	○	○	
		Choline acetyltransferase	○	○	
		Butylcholinesterase	○	○	

구분		바이오마커	측정 가능한 연구유형		
			in vitro	in vivo	Human
조절	시냅스 가소성	N-methyl-D-aspartate receptor(NMDAR)		○	○
		Nicotinic acetylcholine receptors(nAChR)			
		Metabotropic glutamate receptor(mGluR)	○	○	
		Calcium/calmodulin-dependent protein kinase(CaMK)	○	○	
		MAPKs(ERK, JNK, p38MAPK)		○	
		Postsynaptic density-95(PSD-95)	○	○	
		CREB	○	○	
		BDNF	○	○	○
산화스트레스 억제		Reactive oxygen species	○	○	○
		항산화효소 활성(SOD, GPx, catalase)	○	○	○
		글루타티온(glutathione)	○	○	○
		8-oxo-2'-deoxyguanosine(8-OH-dG)	○	○	○
		지질과산화(MDA 등)	○	○	○
동물행동시험		모리스수중미로시험(morris water maze test)		○	
		수동회피시험(passive avoidance test)		○	
		팔방미로시험(radial arm maze test)		○	
		반스미로시험(barnes maze test)		○	
		신물질탐색시험(novel object recognition test)		○	
임상적 평가		뇌 영상 촬영(fMRI, sMRI, DTI, MRS, PET)		○	○
		한국판 웨슬러 성인용 지능검사 4판			○
		Kims 전두엽-관리기능 신경심리검사			○
		한국판 기억평가검사			○
		숫자외우기 검사			○
		한국판 몬트리올 인지평가(MoCA-K)			○
		CANTAB			○
		Stroop test			○

나. 바이오마커 설명

(1) 신경세포 보호

(가) 세포생존율

신경세포 손상(신경세포사멸)을 유도하는 원인물질인 β -amyloid, glutamate, 3-HK (3-hydroxykynurenine), Fe_2SO_4 등의 물질 및 시험물질을 처리한 후, 세포생존율을 관찰한다. 세포생존율은 성장, 증식, 대사활성, 세포막 손상 등을 지표로 평가할 수 있는데, 일반적으로 염색제를 이용하여 세포 생존율을 측정한다. 세포막 변형을 평가하는 방법으로는 propidium iodide, trypan blue, 7-aminoactinomycin D 등을 이용한 방법이 있으며, 미토콘드리아 활성을 이용한 측정방법으로는 formazan 등을 측정하는 MTT 등의 방법이 있다.

(나) 미토콘드리아 막 전위차

미토콘드리아(mitochondria, 사립체)는 진핵생물의 세포 안에 있는 세포소기관으로, 여러 유기물질에 저장된 에너지를 산화적 인산화 과정을 통하여 생명활동에 필요한 ATP의 형태로 변환시키는 역할을 하므로 ‘세포의 발전소’라고도 불린다. 또한, 에너지 생성 외에도 신호 전달, 세포 분화, 세포 사이클, 세포 성장 등과 관련된 주요 역할을 한다.

(다) 신경세포사멸(apoptosis) 관련 단백질 및 유전자 발현

① Bax와 Bcl-2 family

Bax(bcl-2-associated X protein)는 구조적인 변화를 거쳐 세포사멸을 유도하는데, 이로 인해 미토콘드리아에서 cytochrome c와 세포사멸인자가 나오게 된다. Bcl-2 family는 세포사멸의 주요 경로를 제어하는 중요한 역할을 한다. 미토콘드리아의 외막 등에 제한적으로 분포되어 있으며, 미토콘드리아의 기능 조절을 통해 세포사멸을 제어한다.

② Poly ADP ribose polymerase(PARP)

PARP는 DNA 복구에 관여하는 단백질로, DNA 손상이 심할 경우 기질인 NAD를 소모하면서 세포사멸을 유도한다.

③ Caspase

Caspase는 단백질 분해효소의 일종으로 세포사멸에 필수적인 역할을 한다. Caspase는 initiator caspase(-2, -8, -9, -10)와 effector caspase(-3, -6, -7)로 나뉘며, initiator caspase는 대체적으로 death signal에 의해 처음으로 활성화되어 effector caspase로 신호전달계를 거치게 된다. Caspase 활성화는 세포사멸 진행의 중심이 되는 기전이며, 다른 caspase를 직접적으로 활성화시켜 세포사멸을 일으키게 한다. 특히, caspase-3는 다양한 기질을 파괴하는 주된 effector caspase로 알려져 있다.

(2) β -amyloid protein 형성 및 축적 억제

(가) β -amyloid protein 및 아밀로이드전구단백질(amyloid precursor protein)

β -amyloid protein은 아밀로이드전구단백질 절단효소(secretase)에 의해 끊어짐으로 인해 생성된다. 축적된 β -amyloid protein은 섬유상(fibril)으로 응집하여 노인반(senile plaque)을 생성하고, 이는 신경독성을 나타내어 세포를 손상시킨다.

(나) Secretase

아밀로이드전구단백질을 절단하는 효소는 3종이 있으며, 각각 α -, β - 및 γ -secretase로 지칭한다. 정상 상태에서는 α 와 γ -secretase가 아밀로이드전구단백질을 절단하여 용해되어 배출이 쉬운 β -amyloid protein이 생성되지만, 알츠하이머병에서는 β -와 γ -secretase에 의하여 응집성이 강한 β -amyloid protein이 생성되어 세포 내에 축적하게 된다. 아밀로이드 자체에 의하여 secretase의 활성이 증가한 보고는 많지 않으나 최근의 연구에 의하면 exogenous 하게 투입된 β -amyloid가 산화적 스트레스에 의하여 신호전달 체계의 하나인 MAPK (mitogen activated protein kinase)를 자극하고, 이는 positive mechanism에 의하여 β -secretase(BACE) 단백질을 발현을 증가시켜 β -amyloid를 더 많이 만들어낸다는 보고가 있다.

(다) Presenilin 1/2

Presenilin은 gamma-secretase complex의 transmembrane protein으로 presenilin gene에는 presenilin 1을 coding하는 PSEN 1(human chromosome 14), presenilin 2를 coding하는 PSEN 2(human chromosome 1) gene이 있다. 이들은 가족형 알츠하이머병(familial alzheimer's disease)의 가장 많은 원인이 되는 유전자로 알려져 있다.

(3) Tau protein 형성 및 과인산화 억제

타우단백질은 신경세포의 구조 및 미세소관을 안정되게 지지해주는 단백질이다. 타우단백질이 과인산화되면 서로 응집하여 tangle을 형성하게 되며, 이는 독성을 나타내서 신경세포를 사멸시키는 것으로 알려져 있다. 이러한 과인산화는 GSK3 β , CDK5, p38MAPK 등에 의해 일어난다.

(4) 신경염증억제

(가) 사이토카인

Pro-inflammatory cytokine은 염증 반응에서 염증을 촉진하는 사이토카인을 의미하며, IL-1, TNF- α , PGE2 등이 여기에 해당한다. IL-1은 IL-1 α , IL-1 β 등 11개의 사이토카인으로 분류되며, 주로 조직 대식세포, 단핵구, 섬유아세포, 수지상 세포 등에서 생성된다. 뇌 손상 물질을 처리하면 염증 반응이 일어나고 이 때 IL-1과 TNF- α 등의 염증성 사이토카인의 수치가 뇌 조직과 혈액 내에서 상승한다. 항염증성 사이토카인(anti-inflammatory cytokine)은 면역조절 분자로서 염증성 사이토카인의 반응을 조절한다. 주요 항염증성 사이토카인으로서는 IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-13 등이 있다. IL-4는 T 세포, 비만세포(mast cell), B 세포, 기질세포 등에서 생성되며, LPS로 유도된 염증성 사이토카인의 합성을 억제한다. IL-6는 T 세포, B 세포, 단핵구 등에서 생성되며, 대식세포에서 생성되는 TNF 및 IL-1의 생성을 억제한다. IL-10은 단핵구 및 대식세포, T 세포, B 세포에서 생성되며, 단핵구 및 대식세포, 호중구에서의 염증성 사이토카인 생성을 억제한다. PGE2는 cyclooxygenase-2에 의해 생성되는 사이토카인으로 신경염증 상태에서 함량이 증가하는 것으로 알려져 있다.

(나) Cyclooxygenase-2(COX-2)

COX-2는 산화적 스트레스에 의해 과발현되는 단백질이며, 이는 prostaglandin E2 (PGE2)라는 사이토카인을 생성하여 염증반응을 일으킨다.

(다) NF- κ B

NF- κ B는 염증을 조절하는 중요한 전사인자로, p50과 p65 단백질을 구성하는 heterodimer이다. 세포질 내에서 I κ B와 결합되어 불활성화된 상태로 존재하다가, 자극을 받으면 I κ B kinase(IKK)가 활성화되어 I κ B를 분해시킨다. 활성화된 NF- κ B는 핵 내로 들어가 유전자의 promoter에 결합하여 염증 및 다양한 반응을 일으키는 것으로 알려져 있다. NF- κ B 활성화에 관여하는 인자들은 mitogens, bacterial lipopolysaccharides (LPS), 산화 스트레스, 자외선 및 TNF- α , IL-1 β 와 같은 염증성 cytokine 등이 있다. 따라서 뇌조직 내 NF- κ B 활성을 지연시키는 것은 염증 반응을 억제함으로써 기억력을 개선하는 데 효과가 있다고 판단한다.

(라) Mitogen-activated protein kinases(ERK, JNK, p38MAPK)

Mitogen-activated protein kinases(MAPK)는 protein kinase로 세포외 자극을 세포막에서 핵까지 전달하는 대표적인 신호전달경로로 알려져 있다. MAPK는 사이토카인, mitogen 등의 자극에 의해서 활성화되며 세포 염증반응, 세포사멸과 관련이 있다.

(마) Nitric oxide(NO)와 inducible nitric oxide synthase(iNOS)

Nitric oxide(NO, 산화질소)는 iNOS에 의해 생성된다. iNOS는 세포질 안에 존재하는 효소로서, 세포 내 일련의 산화반응에 의해 NO를 생성하는 반응을 촉매하는 산화 환원 효소이다. NO는 그 자체로 자유유리기로 작용하여 신경세포를 손상시킬 수 있으며, NF- κ B를 활성화 시켜 염증반응을 유도할 수 있다.

(5) 신경전달물질 생성 및 분비 조절

(가) 아세틸콜린 및 아세틸콜린에스테라아제(acetylcholinesterase, AChE)

아세틸콜린은 말초신경계와 중추신경계 모두에서 작용하는 신경전달물질인데, 특히 중추신경계에서는 신경조절인자로서 가소성, 각성 및 보상 체계에 관여한다. 고도의 정신기능, 운동 및 감각기능, 학습 및 기억기능 등을 담당한다. 아세틸콜린에스테라아제(AChE)는 아세틸콜린을 분해하는 효소로 대뇌피질 및 해마에서 효소활성을 억제함으로써 기억력 개선에 도움을 줄 수 있는 것으로 알려져 있다.

(나) 콜린 아세틸트랜스퍼라아제(choline acetyltransferase, ChAT)

콜린 아세틸트랜스퍼라아제는 콜린(choline)과 아세틸 보효소A(acetyl-CoA)가 아세틸 콜린과 보효소A(CoA)로 변환하는 반응을 촉매하는 효소이다. 알츠하이머병 환자에게는 측두엽의 신피질, 편도 등의 부위에서 약 50~90% 정도 감소한다고 알려져 있다.

(다) 부틸콜린에스테라아제(butylcholinesterase)

부틸콜린에스테라아제(BuChE)는 아세틸콜린에스테라아제(AChE)와 같이 콜린에스테라아제로서, AChE에 비해 아세틸콜린에 대한 친화성이 비교적 낮지만, 높은 농도의 아세틸콜린 조건에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 치매치료제 중, Rivastigmine은 AChE와 butyryl-cholinesterase(BuChE)을 동시에 저해하며 AChE에 의해 바로 대사되어 다른 약물과의 상호작용이 적다고 알려져 있다. 따라서 BuChE의 활성을 억제한다면 아세틸콜린의 함량을 농도를 증가시켜 인지기능의 향상효과를 얻을 수 있다.

(6) 시냅스 가소성 조절

(가) N-methyl-D-aspartate receptor(NMDA 수용체)

해마의 CA1 영역의 장기 증강(long-term potentiation, LTP)이나 장기 억제(long-term depression, LTD)의 유도에 글루타민산 수용체의 하나인 NMDA가 중요한 역할을 한다. NMDA 수용체의 활성화에 의해 Ca^{2+} 이 세포 내에 유입되면, 신호전달계가 활성화된다. 정지막 전위 부근에서는 세포 외에서의 Mg^{2+} 에 의해 블록 상태로 있다가 시냅스 전 세포에서 글루타민산이 방출되고, 시냅스 후 세포가 충분한 탈분극을 일으킴으로써 Mg^{2+} 블록이 떨어져 나간다는 2가지 조건이 동시에 일어났을 때에만 충분한 활성이 얻어지고 Ca^{2+} 을 유입시키면서 활성화된다.

(나) 니코틴성 아세틸콜린 수용체(nAChR)

니코틴성 아세틸콜린 수용체는 신경-근 접합부와 신경-신경 접합부의 시냅스 간 생리적 신호전달 및 흥분조절을 매개하는 중요한 역할을 담당하고 있다. 니코틴성 아세틸콜린 수용체는 5개의 서브유닛(subunit)으로 이루어진 오합체(pentamer) 구조의 이온통로이다. 아세틸콜린이 니코틴성 수용체에 결합하게 되면 수용체 안쪽의 이온통로를 개방시켜 주로 Na^+ 와 Ca^{2+} 의 유입과 K^+ 의 유출이 일어나는 것으로 보고되어 있다.

(다) Metabotropic glutamate receptor(mGluR)

대사형 수용체는 결합하는 G-단백질의 종류나 아미노산 배열의 상동에 따라 그룹 I (mGluR1, mGluR5), 그룹 II(mGluR2, mGluR3), 그룹 III(mGluR4, mGluR6, mGluR7, mGluR8) 등으로 분류된다. 그룹 I은 시냅스 전 부위에서 발현하며, 그룹 II와 III은 시냅스 후 부위에서 발현한다. mGluR은 칼륨채널이나 NMDA 수용체의 수식, Ca^{2+} 밸런스 조절, 흥분성의 제어에서 LTP의 역치 조절, PLC, PKC, MAPK 등 여러 가지 신호전달 기전의 조절까지 다양한 역할을 한다.

(라) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase(CaMK)

CaMKII는 α 또는 β 서브유닛으로 12량체를 형성하며, 뇌 내에서는 각각의 서브유닛이 높은 레벨로 발현되고 있고, 각 서브유닛은 촉매도메인, 조절도메인(칼모둘린 결합부위), 회합도메인으로 구성된다. LTP 유도에 필수적인 Ca^{2+} -칼모둘린(CaM)에 의존하여 활성화가 제어된다. 평상시에는 마스크된 형태로 키나아제(kinase) 활성을 지니지 않다가 CaM 결합에 의해 마스크가 떨어져나가 키나아제가 활성화되면서 인산화 되어 Ca^{2+} 비의존형으로 바뀐다. 이러한 CaMK 활성화의 상승이 LPT의 분자적 기전이라고 할 수 있다. 실제로 CaMKII knockout mice에서 LPT가 감소되고, 공간학습 행동의 장애가 확인되었다.

(마) Mitogen-activated protein kinase(MAPK)

MAPK family는 ERK1/2(p44/42 MAPK), JNK, p38, ERK5 등 몇 가지 서브패밀리로 구성되는데, 이 중 ERK가 해마 LPT나 학습행동과 관련된 것으로 보고되었다. 활동 의존적인 신경세포의 흥분성 제어에 의존하는 LPT는 MAPK 감수성이 높은 것으로 알려져 있다.

(바) Postsynaptic density-95(PSD-95)

시냅스 후 치밀질(PSD)에는 NMDA 수용체나 CaMKII를 비롯한 LTP 유도에 필수적인 기능 분자군이 다수 포함되어 있다. PSD-95는 PSD-93, SAP97, SAP102과 함께 membrane-associated guanylate kinase(MAGUK) family 중의 하나로, 3개의 PDZ 도메인, SH3 도메인, GK 도메인으로 구성되어 있다. Neuroligin, NMDA 수용체, AMPA 수용체, 칼륨 채널 등에 직간접적으로 결합하며, 시냅스 가소성 및 LTP 동안의 시냅스 변화의 안전성에 중요한 역할을 한다.

(사) cAMP response element-binding protein(CREB)

CREB는 기억이나 시냅스 가소성과 관련된 다양한 유전자의 프로모터 부위에 결합하는 전사인자로, CREB의 활성화는 기억 형성 및 강화와 관련된 유전자(BDNF 등)의 전사를 유도하는 것으로 알려져 있다.

(아) Brain-derived neurotrophic factor(BDNF)

BDNF는 주로 뇌에 존재하는 신경영양인자의 일종으로 학습, 기억, 고차원적인 사고의 중요한 역할을 담당하는 해마, 파질, 전뇌 기저부에서 활성화된다. 기억과 밀접한 관련이 있는 CREB가 BDNF 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다. BDNF 증가는 시냅스 가소성 및 신경세포 활성 증가를 의미한다. 단백질(western blotting)과 mRNA 발현 등을 통해 측정할 수 있다.

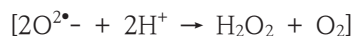
(7) 산화스트레스 억제

(가) 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)

ROS는 정상적인 세포 내 활성작용 과정에서 생성될 수 있으며, 세포 분화, 유전자의 발현, 사이토카인에 대한 반응 정도를 포함한 다양한 생물학적 과정에 연관되어 있으므로 이러한 ROS의 항상성을 유지하는 것이 세포 성장 및 생존에 매우 중요하다. 그런데, 산화적 스트레스로 인해 ROS의 항상성이 깨져 세포 내 ROS가 증가하면 세포 내 DNA나 단백질, 지질을 손상시키고, 세포사멸의 중간 신호 매개체로서의 역할을 하게 된다. 따라서 이러한 ROS의 생성 억제 효과(항산화 효과)를 통해 세포 손상 및 다양한 스트레스로부터 뇌세포를 효과적으로 보호할 수 있다. 대표적인 ROS 측정 방법으로는 세포 내 hydroxyl과 peroxy 그리고 기타 활성산소종의 활성을 측정할 수 있는 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA) 형광 염색제를 이용한 방법이 있다. DCF-DA가 세포의 에스테라제를 통해 디아세틸화되면, 그것이 ROS에 의해 산화되어 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)가 되고, 이것이 형광을 띄게 된다. 따라서 ROS가 많이 생성될수록 형광이 강해진다.

(나) 항산화 효소

SOD는 superoxide radical($O_2^{\bullet-}$)로부터 H_2O_2 와 O_2 형성을 촉매 하는 효소로 활성산소에 의한 세포 손상에 대응하는 첫 번째 방어 라인을 구성한다.



Catalase는 H_2O_2 를 사용하여 다른 물질을 산화함으로써 세포 내에서의 H_2O_2 축적을 방지하도록 도와준다.



Glutathione peroxidase(GPx)는 과산화수소를 환원시켜 물을 만드는 반응을 촉매함으로써 세포 내에서의 H_2O_2 의 축적을 방지하도록 도와준다. 또한, 지질과산화물 등의 유기과산화물(organic peroxide)을 알코올(ROH)로 전환시킨다.



(다) 글루타티온

글루타티온(GSH)은 간에서 만들어지는 3개의 아미노산(glutamate, cysteine, glycine)이 결합된 펩타이드로 산화적 손상으로부터의 보호에 중추적인 역할을 하는 매우 강력한 항산화 물질이다. GSH은 GPx가 관여하는 항산화 대사 작용을 위해 필요한 전자를 내어주며, hydroxyl radical과 singlet oxygen을 제거하는 역할을 하며, 지질 과산화(lipid peroxidation)의 환원에도 관여한다.

(라) 8-oxo-2'-deoxyguanosine(8-OH-dG)

DNA를 구성하는 염기 중 guanine 분자의 8번째 위치에 있는 수산화기의 산화가 일어나 8-OH-dG가 생성된다. 따라서 8-OH-dG의 정량적 측정은 활성 산화물에 의한 체내 DNA의 손상 정도를 평가하는 지표로서 이용될 수 있다.

(마) 지질과산화물(malondialdehyde, MDA)

MDA는 노화주 또는 기억력 손상이 유발된 실험동물의 뇌조직에서 증가하는 것으로 알려져 있다.

(8) 동물행동시험

(가) 모리스 수중미로 시험(morris water maze test)

모리스 수중미로 시험은 실험동물의 공간학습능력과 그에 대한 기억능력을 검사하기 위해서 실시하는 행동실험으로, 인지능력 및 기억력 평가를 위해서 가장 많이 이용되는 방법이다. 이 방법은 목적 있는 훈련을 통한 인지기능 강화 및 측정 방법으로도 널리 이용되고 있다.

(나) 수동회피 시험(passive avoidance test)

수동회피 시험은 실험동물의 기억능력을 검사하기 위해서 실시하는 행동실험이다. 실험동물을 주변 환경을 인식할 수 있는 방에 위치시키고 해로운 자극 (예: 전기자극)을 가한 뒤 실험동물이 그곳에 가지 않음으로써 그 상황을 기억했음을 확인하는 시험방법이다.

(다) 팔방미로 시험(radial arm maze test)

실험동물의 장소기억과 작업기억을 측정할 수 있는 행동시험이다. 실험동물은 중앙에 있는 출발상자에서 8개의 통로를 자유롭게 선택하여 들어간다. 통로 끝에는 보상물이 있다. 동물은 공간 단서를 이용하여 선택하지 않았던 새로운 통로로 들어갈 때에만 보상을 받는다. 공간작업기억을 측정할 수 있다.

(라) 반스미로 시험(Barnes maze test)

실험동물의 기억력 평가를 위한 행동시험이다. 처음 goal box를 찾을 때까지의 시간을 초단위로 측정하여 얼마나 빨리 goal box 위치를 기억하고 찾아가는지를 관찰하는 실험 방법이다.

(마) 신물질 탐색시험(novel object recognition test)

신물질 탐색시험(novel object recognition test)는 실험동물의 기억능력을 검사하기 위해서 실시하는 행동실험이다. 실험동물을 두 개의 동일한 물체가 담긴 불투명 박스에 배치하고 물체 탐색 소요 시간을 측정한다. 그런 다음 물체 중 하나는 새로운 물체로 대체하고 다시 각 물체를 탐색하는데 소요되는 시간을 측정한다.

(9) 임상적 평가

인지능력 및 기억력은 연령대별 차이가 있어서 모든 인체적용시험에서 각 대상군은 반드시 해당 연령대 대상군별 독립된 충분한 숫자의 피험자수로 평가가 이루어져야 한다. 또한, 해당 대상군에 따른 기전과 안전성 및 기능성 검증이 필요하다. 예를 들어, 어린이, 중고생, 청년, 중장년, 노인 등의 각각의 독립적인 인체시험 평가가 반드시 필요하다.

(가) 뇌 영상 촬영

MRI(magnetic resonance imaging, 자기공명영상법)와 CT(computed tomography, 컴퓨터 단층촬영)로 뇌에 해부학적인 이상이 없는지를 확인하고, 알츠하이머병으로 인한 심각한 뇌 실질의 손상 등 유무를 확인하여 반건강인/건강인과 질환자를 구별하여 질환자는 대상군에서 배제할 수 있다. 그리고 fMRI(functional magnetic resonance imaging,

기능성자기공명영상법)를 통해 특정 작업을 통해 뇌를 사용하는 동안과 쉬는 동안의 두뇌 활성 정도 및 두뇌의 기능적 연결성 정도를 평가하고, SPECT(single photon emission computed tomography, 단일광자단층촬영)를 이용하여 두뇌 혈류 개선 정도를 평가한다. PET 등을 이용하면 β -amyloid의 양을 측정할 수도 있다. 최근에는 확산텐서영상(diffusion tensor imaging, DTI)나 구조적 MRI(structural MRI), 또는 MRS(magnetic resonance spectroscopy)를 이용해서 뇌의 구조적 연결성 변화, 뇌가소성으로 인한 뇌부분용적 변화, 뇌대사물질, 에너지 대사물질 변화 등을 지표로 삼기도 한다.

(나) 한국판 웨슬러 성인용 지능검사 4판(Korean wechsler adult intelligence scale-IV, K-WAIS-IV)

K-WAIS-IV는 WAIS-IV를 국내 실정에 맞게 표준화한 검사방법이다. K-WAIS-IV는 10개의 핵심 소검사, 5개의 보충 소검사로 구성되며, 4개의 지수점수의 조합으로 전체 지능지수(full scale intelligence quotient, FSIQ)를 추정하여 평가할 수 있다. WAIS-IV는 전체 지능지수(FSIQ) 뿐만 아니라, 언어 이해 지수(verbal comprehension index), 지각 추론 지수(perceptual reasoning index), 작업 기억 지수(working memory index), 처리 속도 지수(processing speed index)를 산출한다.

(다) Kims 전두엽-관리기능 신경심리검사(Kims frontal-executive intelligence test)

전두엽의 관리기능(executive function, 실행기능)을 평가하는 검사이다. 인지과정적 측면에서 관리기능은 주의, 언어, 시공간, 기억기능과 같은 하위인지기능을 통제하는 것으로, 상위 인지기능에 해당한다. Kim 전두엽-관리기능 신경심리검사 EXIT(executive intelligence test), E-CFT(executive-complex figure test), EBS(executive behavior scale)의 세 모듈로 구성되어 있다. 관리기능은 상위기능이라는 속성상 손상 시, 환자의 적응행동에 매우 광범위하고 결정적인 영향을 미친다.

(라) 한국판 몬트리올 인지평가(Korean version of Montreal Cognitive Assessment, MoCA-K)

MoCA는 경도인지장애(mild cognitive impairment, MCI)를 정확하게 변별한 목적으로 개발된 검사로서, 집행기능, 시공간구성능력, 기억력, 주의집중능력 및 지남력으로 구성되어 있다. 총점은 30점으로 MMSE와 동일하지만 MCI를 민감하게 탐지할 수 있도록 훨씬 더 다양하고 다소 어려운 검사들로 구성되어 있으며, 집행기능과 주의집중능력을 평가하는 다수의 문항들을 포함하고 있어 MCI 뿐만 아니라 전두엽기능을 특징적으로 평가하는 데에도 사용되고 있다.

(마) 케임브리지 전산화 신경심리검사(cambridge neuropsychological test automated Battery; CANTAB)

CANTAB은 임상 및 연구 분야에서 전 세계적으로 널리 사용되고 있는 전산화 신경심리검사 중 하나이다. 가장 최신 버전은 윈도우에 기반한 프로그램으로, 터치스크린 기술을 활용하고 있다. 스크리닝, 주의력, 시각적 기억기능, 언어적 기억기능, 집행기능·작업기억·계획기능, 의사결정·반응통제기능 및 사회인지기능의 모두 7개 영역을 측정하는 총 24개의 하위 검사로 구성되어 있고, 추가적인 설문을 전산화하여 추가할 수 있는 기능이 포함되어 있다. 이러한 하위 검사 중 선택적으로 필요한 검사로 구성된 특정 검사 총집(battery)를 구성할 수 있다. 초기에 노인군을 대상으로 치매 진단에 활용하기 위해 개발된 이 검사는, 현재 4-90세의 정상군 기반 규준을 제공하고 있다.

(바) 스트룹 검사(stroop test)

전두엽-관리기능 중 특히 주의력을 평가하기 위해 스트룹 검사를 시행한다. 스트룹 검사는 색과 글자로 이루어진 복합자극 중 글자를 무시하고 색깔 이름을 가능한 빨리 말하는 검사로 전두엽-관리기능의 인지적 측면 중에 주의력을 시험하는 검사이다. 색깔 이름을 말하는 단순 검사, 글자의 색을 말하는 중간검사, 다른 색으로 써진 색깔 이름을 보고 글자는 무시한 채 글자의 색을 말하는 간접검사로 이루어진다. 오류가 생길 경우, 틀린 곳에서부터 다시 하도록 지시하며, 오류 횟수와 총 걸린 시간을 기록한다.

(사) MMSE(mini-mental state examination)

임상에서 가장 널리 사용되고 있는 기본적인 인지기능을 평가하는 검사이다. 시간 및 장소 지남력, 기억등록, 주의집중 및 계산, 기억 회상, 언어능력, 그리기 구성 항목으로 이루어져 있으며 총점은 30점이다. MMSE는 인지기능 장애의 정도를 정량적으로 평가할 수 있고, 반복적인 측정으로 인지기능의 변화를 관찰할 수 있는 장점이 있다. 중등도와 중증치매환자의 선별에 주로 사용되고 있다.

(아) ADAS-Cog(alzheimer's disease assessment scale-cognition)

알츠하이머 치매를 가진 환자의 인지기능과 행동변화의 진행을 평가하는데 있어 가장 많이 사용되는 척도의 하나이다. 11가지의 항목으로 인지기능을 평가할 수 있도록 구성되어 있다. 평가항목은 기억력(단어-회상, 단어 재인, 검사 지침 기억하기), 실행(구성 능력과 연속행위), 언어(명령, 사물과 손가락 이름대기, 언어 표현능력, 이해력, 낱말 찾기 어려움) 그리고 지남력으로 크게 구성된다. 총점은 70점으로 점수가 낮을수록 인지기능이 잘 보존되어있음을 의미한다.

(자) 한국판 기억평가검사(Korean version of memory assessment scales, K-MAS)

MAS(memory assessment scales: Williams, 1991)를 한국어로 번안하여 표준화한 한국판 기억평가검사이다. K-MAS는 언어적 과제와 비언어적인 시각적 과제로 나누어서 평가할 수 있어 본 연구의 시험제가 기억에 미치는 영향을 효과적으로 평가할 수 있다.

(차) 숫자외우기 검사(digit span)

숫자 외우기 검사는 즉각적인 숫자 회상 능력(immediate digit recall)의 폭을 측정하는 검사로서, 작업기억(working memory)을 평가하기 위한 목적으로 널리 사용되고 있다. 숫자외우기 검사는 숫자 바로 따라 외우기와 숫자 거꾸로 따라 외우기로 구성되어 있으며 각각의 점수와 함께 숫자 바로 따라 외우기와 숫자 거꾸로 따라 외우기의 점수 차이를 측정치로 사용한다.

2. 주요 바이오마커의 측정 방법

가. 신경세포 보호

(1) 세포생존율

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 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 첨가하여 DMSO를 첨가하고 배양시켜 생성된 formazan을 완전히 녹여준 다음 흡광도를 측정한다.

(2) 미토콘드리아 막 전위차

세포 손상이 유도되면, 미토콘드리아의 막 전위차가 감소되며, 미토콘드리아 활성이 저하된다. 이의 측정을 위해 사용되는 염색법으로는 일반적인 cationic fluorescent probe인 JC-1과 rhodamine-123 등이 있다.

(3) 신경세포사멸(apoptosis) 관련 마커

(가) Bax와 Bcl-2 family

Bax/Bcl-2 비율이 높아지면 세포사멸이 증가하게 되는데, Bax/Bcl-2 비율을 측정함으로써 기능성소재를 통한 신경세포사멸 억제효과를 관찰할 수 있다.

(나) Poly ADP ribose polymerase(PARP)

PARP, cleaved PARP(활성형) 단백질 발현 정도를 측정하여, 신경세포사멸 정도를 관찰할 수 있다.

(다) Caspase

신경세포 사멸을 확인하기 위하여 caspase 효소 활성이나 caspase의 활성 형태인 cleaved caspase의 단백질 발현(western blotting) 정도를 측정한다.

나. β -amyloid protein 형성 및 축적 억제

(1) β -amyloid protein

β -amyloid protein은 ELISA 방법 등을 통해 혈액, 세포배양액, 조직균질액에서도 측정할 수 있다. 또한, 아밀로이드전구단백질 및 생성 관련 효소(secretase)의 단백질 발현 정도를 통해 β -amyloid protein 형성 관련 기전을 간접적으로 확인할 수 있다.

(2) Secretase

Secretase는 뇌, 혈액, 세포배양액에서 효소 활성 등을 측정할 수 있으며, 특히 in vitro 에서 기능성 식품 소재의 활성을 검색하기 위한 스크리닝 방법으로도 활용된다.

(3) Presenilin 1/2(PSEN 1, PSEN 2)

PSEN 1 유전자와 PSEN 2 유전자의 mutation은 β -amyloid protein을 과다 생성시키는 원인으로 알려져 있으며, mRNA 발현정도를 측정하여 평가할 수 있다.

다. Tau protein 형성 및 과인산화 억제

과인산화 타우단백질을 western blotting 등을 통해 측정할 수 있다.

라. 신경염증억제

(1) 사이토카인

Pro-inflammatory cytokine은 염증 반응에서 염증을 촉진하는 사이토카인을 의미한다. 사람의 경우, 침습적인 방법을 이용하는 데에 어려움이 있기 때문에 혈액 및 peripheral blood mononuclear cells(PBMC)에서 효소면역측정법(eELISA)으로 정량하는 것이 일반적이다. 동물의 경우는 뇌조직에서 사이토카인 생성을 효소면역측정법으로 정량하거나 RNA를 추출하여 mRNA 발현을 RT-PCR로 정량하여 측정가능하다.

(2) Cyclooxygenase-2(COX-2)

COX-2는 세포 및 뇌조직에서 단백질 및 유전자 발현을 측정할 수 있다.

(3) NF- κ B

세포 및 뇌조직에서 단백질 및 mRNA 발현을 측정하거나 사람의 경우 PBMC에서 측정할 수 있다.

(4) Mitogen-activated protein kinases(ERK, JNK, p38MAPK)

Mitogen-activated protein kinases(MAPK)는 protein kinase로 세포의 자극을 세포막에서 핵까지 전달하는 대표적인 신호전달경로로 알려져 있다. ERK, JNK, p38MAPK로 분류되며 세포 및 뇌조직에서 단백질 및 유전자 발현을 측정할 수 있다.

(5) Nitric oxide(NO)와 inducible nitric oxide synthase(iNOS)

Nitric oxide(NO, 산화질소)는 세포배양액 및 뇌조직 균질액에서 측정할 수 있다. iNOS의 경우, 세포 및 뇌조직에서 단백질 및 mRNA 발현을 측정하거나 사람의 경우 PBMC에서 측정할 수 있다.

마. 신경전달물질 생성 및 분비 조절

(1) 아세틸콜린 및 아세틸콜린에스테라아제

아세틸콜린의 양은 시험물질을 섭취한 실험동물의 조직을 이용하여 상용화된 assay kit 및 UV-spectrophotometer를 사용하여 측정한다. 아세틸콜린에스테라아제(AChE)의 활성 저해효과 측정 실험은 아세틸콜린을 기질로 사용하며 AChE에 의해 생성되는 thiocholine을 DTNB와 반응시켜 그 결과 생성된 5-thio-2-nitrobenzoate를 spectrophotometer를 이용하여 405nm에서 흡광도 변화를 측정한다.

(2) 콜린 아세틸트랜스퍼라아제(choline acetyltransferase, ChAT)

콜린 아세틸트랜스퍼라아제는 단백질 전기영동법 등을 이용하여 측정한다. 단백질 전기영동법 측정법은 시험물질을 섭취한 실험동물의 대뇌피질과 해마를 lysis buffer를 넣고 균질화하여 원심분리한다. 원심분리하여 얻은 상층액은 단백질을 정량하여 일정량의 단백질을

sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 크기별로 분리한 후, membrane에 이동시킨다. membrane은 skim milk나 BSA(bovine serum albumin)로 blocking 과정을 거친 후, 콜린 아세틸트랜스퍼라아제 1차 항체를 첨가하여 반응시킨다. 그 후 2차 항체를 첨가하여 반응시킨 다음 ECL용액으로 반응시켜 X-ray에 노출시킨 다음 각각의 band를 정량화한다.

(3) 부틸콜린에스테라아제(butylcholinesterase)

부틸콜린에스테라아제(BuChE)는 아세틸콜린에스테라아제(AChE)와 같이 콜린에스테라아제로서, 부틸콜린에스테라아제(BChE)의 활성 저해효과 측정 실험은 부틸싸이오아세틸콜린(butrylthiocholine)을 기질로 사용하여 BChE에 의해 생성되는 thiocholine을 DTNB와 반응시켜 그 결과 생성되는 5-thio-2-nitrobenzoate를 spectrophotometer를 이용하여 405 nm에서 흡광도 변화를 측정한다.

바. 시냅스 가소성 조절

(1) N-methyl-D-aspartate receptor(NMDA 수용체)

NMDA 수용체는 해마의 CA1 영역의 장기 증강(long-term potentiation, LTP)이나 장기 억제(long-term depression, LTD)의 유도에 글루타민산 수용체의 하나인 NMDA가 중요한 역할을 한다. 뇌조직에서 단백질을 추출하여 단백질 및 mRNA 발현을 측정할 수 있다.

(2) 니코틴성 아세틸콜린 수용체 (nAChR)

니코틴성 아세틸콜린 수용체의 활성은 효소처리로 분리된 단일 골반 신경절 세포에서 dialyzed 혹은 gramicidin-perforated patch clamp 방법으로 이온전류 및 막전압을 측정하거나, 형광측정장치를 이용하여 세포 내 칼슘이온농도를 측정함으로써 확인할 수 있다. 또한, 역전사 연쇄증합반응(RT-PCR)을 시행하여 수용체 서브유닛들의 발현 정도를 확인할 수 있다.

(3) Metabotropic glutamate receptor(mGluR)

mGluR은 세포나 뇌조직에서 단백질 발현정도를 측정하거나 RNA를 추출하여 mRNA 발현을 RT-PCR로 측정이 가능하다.

(4) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase(CaMK)

CaMK는 세포나 뇌조직에서 단백질 발현정도를 측정하거나 RNA를 추출하여 mRNA 발현을 RT-PCR로 측정가능하다.

(5) Mitogen-activated protein kinase(MAPK)

MAPK family는 세포 및 동물조직에서 단백질 발현 정도를 측정할 수 있으며, 특히 인산화된 형태를 관찰해야 한다.

(6) Postsynaptic density-95(PSD-95)

PSD-95는 PSD-93, SAP97, SAP102과 함께 membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) family 중의 하나로, 뇌조직에서 단백질 발현정도를 측정할 수 있다.

(7) cAMP response element-binding protein(CREB)

CREB는 세포나 뇌조직에서 단백질 발현정도를 측정하거나 RNA를 추출하여 mRNA 발현을 RT-PCR로 측정가능하다.

(8) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

BDNF는 ELISA등을 이용하여 분석한다. ELISA방법은 항체를 coating용액에 희석하여 micro well에 코팅한 후 4℃에서 overnight 한다. 각 well을 washing용액으로 세척한 후 대상자의 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.

사. 산화스트레스 억제

(1) 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)

대표적인 ROS 측정 방법으로는 세포 내 hydroxyl과 peroxy 그리고 기타 활성산소종의 활성을 측정할 수 있는 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA) 형광 염색제를 이용한 방법이 있다. DCF-DA가 세포의 에스테라제를 통해 디아세틸화되면, 그것이 ROS에 의해 산화되어 2',7'-dichlorofluorescein(DCF)가 되고, 이것이 형광을 띄게 된다. 따라서 ROS가 많이 생성될수록 형광이 강해진다.

(2) 항산화 효소

항산화 효소의 활성은 뇌조직, 적혈구 및 혈액에서 상용화된 kit 및 spectrophotometer를 이용하여 측정할 수 있다.

(3) 글루타티온

글루타티온(GSH)은 세포, 뇌조직 및 사람의 혈액에서 commercial kit를 이용하여 측정할 수 있다.

(4) 8-oxo-2'-deoxyguanosine(8-OH-dG)

8-OH-dG의 정량적 측정은 활성 산화물에 의한 체내 DNA의 손상 정도를 평가하는 지표로서 이용될 수 있다. 소변, 혈액 및 조직에서 HPLC, ELISA 방법을 통해 측정이 가능하다.

(5) 지질과산화물(malondialdehyde, MDA)

각종 생체막의 과산화 반응으로 생성되는 MDA를 immunoblot 및 ELISA 방법으로 측정할 수 있다. MDA를 TBA와 반응시켜 생성되는 thiobarbituric acid reactive substance (TBARS)를 측정하는 것이 가장 보편적인 방법이다.

아. 동물행동시험

(1) 모리스 수중미로 시험(morris water maze test)

실험동물의 공간학습능력을 측정하기 위한 방법으로, 인지능력 및 기억력 평가를 위해 가장 널리 이용되고 있는 방법이다(그림 9). 수중 미로로 이용되는 수조는 직경이 180cm, 높이가 50cm인 원형통으로 온도가 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 되는 물을 30cm 높이로 채운다. 수중 미로의 주변에는 비디오카메라, 실험대, 그리고 수조 주위 벽면에 걸려있는 각종 도형 모양의 공간 단서(cue)들을 일정하게 설치한다. 도피대는 직경이 12cm인 원형 투명 아크릴에 받침대를 부착하고, 수면보다 1.5cm 낮게 위치시킨다. 수중 미로는 사분면으로 나누어져서 북동(NE), 북서(NW), 남동(SE), 남서(SW)로 구분되며, 이중 북동 사분원의 중심부에 도피대가 놓여지고, 나머지 중 하나를 출발위치로 사용한다. 실험동물은 하루에 180초간 4번 6일간 훈련을 받고(acquisition test), 7일째 마지막 시행이 끝나면 자유수영검사(retention test)를 시행한다. 이때 동물들은 도피대가 제거된 채로 60초간 수영을 하게하고, 실험동물들의 행동은 비디오 카메라로 녹화한다. 훈련 시행에서는 출발에서부터 도피대에 올라가는 데 걸린 시간을 S-MART 프로그램(Pab Lab, Spain)을 이용하여 측정한다.

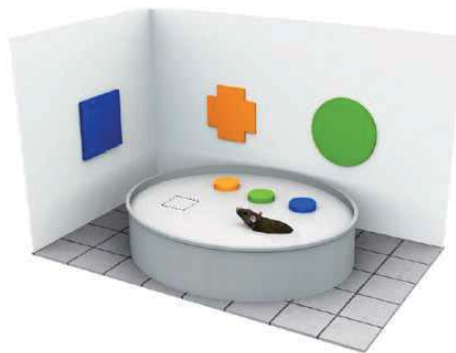


그림 9. 모리스 수중 미로 시험

(2) 수동회피 시험(passive avoidance test)

실험동물의 기억력을 측정하기 위해서 passive avoidance를 주로 사용한다. 실험동물을 주변 환경을 인식할 수 있는 방에 위치시키고 해로운 자극(예: 전기자극)을 가한 뒤 실험동물이 그곳에 가지 않음으로써 상황을 기억했음을 확인하는 시험방법이다. 상세한 시험방법은 다음 그림 10과 같다. 수동회피 시험에 사용되는 장치는 전기충격발생기와 회피장치로 구성되어

있다. 회피장치는 검은 아크릴로 만들어진 어두운 상자(30×30×30cm)이고, 바닥에는 알루미늄 막대가 일정한 간격으로 깔려있어 동물의 발바닥에 전기충격을 가할 수 있다. 상자의 전면 바깥벽에는 한 마리의 동물을 가깝스로 올려놓을 수 있는 크기(5×15cm)의 난간이 설치되어 있다. 난간 위쪽 45cm 지점에는 할로겐 전구(AC12V-50 W)가 설치되어 있다. 난간과 회피상자 사이에는 작은 문 (5×5cm)이 장치되어 있다. 먼저 상자 바깥에 설치되어 있는 난간에 동물을 머리가 바깥을 향하게 올려놓는 동시에 상자로 통하는 문을 연다. 문이 열리자마자 난간 위 45cm 지점에 설치된 조명장치를 통해 50 W의 불빛을 동물에게 비춘다. 장치는 바닥에서 60cm 되는 곳에 설치되어 있어서 난간 위의 동물은 혐오 상황에 노출된다. 이런 조건에서 동물은 밝은 곳을 피해 어두운 상자로 들어가면 회피반응을 보인다. 동물이 상자로 들어가면 10초간의 시행 간 간격을 두었다가 두 번째 시행을 실시한다. 이런 시행이 3회 반복되고, 3번째 시행에서는 동물이 어두운 상자로 들어가는 순간 상자의 바닥에 깔려있는 알루미늄 격자를 통해 전기충격(0.4 mA, 5초)을 가한다. 다음날 동일한 절차를 사용하여 기억력 검사(retention test)를 실시한다. 기억력 검사에서는 동물이 상자로 들어가면 전기충격이 제시되지 않고 바로 시행이 종료된다. 이때, 실험동물이 혐오 상황인 난간에서 어두운 상자로 들어가는 데 소요된 반응잠재기(response latency)를 측정한다. 동물이 싫어하는 밝은 곳에서 어두운 곳으로 들어갔을 때 전기충격을 경험한 기억을 잘 형성하면 기억검사시행에서는 어두운 곳으로 들어가지 않고 밝은 곳에서 오래 머물게 된다.



그림 10. 수동회피시험 기계

[출처: GEMINITM Avoidance System]

(3) 팔방미로(radial arm maze test)

실험동물의 기억력 평가를 위한 행동시험이다. 투명한 아크릴로 제작된 8개의 통로가 중앙의 출발영역(central platform)을 중심으로 매 45도 각도(방사형)로 뻗어 나온 형태의 장치가 이용된다(그림 11). 중앙 출발영역은 직경 38 cm인 원에 내접하는 정팔각형 상자로 높이는 30 cm이다. 주로는 출발 상자의 각 면에 뚫린 9×9 cm 크기의 통로와 연결되어 있으며, 길이는 70 cm이고 뚜껑이 있어서 동물이 바깥으로 나가지 못한다. 주로의 끝에는 보상으로 제공하는 먹이나 물을 담을 수 있는 5×5×2 cm 크기의 용기(음식 접시)가 설치되어 있다. 각 주로의 출발 지점으로부터 15 cm되는 지점과 주로의 끝에서 8 cm 되는 지점에 각각 광전탐지기(photoelectric sensor)를 부착하여 동물이 주로 출입행동을 탐지하도록 한다. 비디오를 이용하여 동물의 움직임이 감지되면 이 신호가 컴퓨터 인터페이스를 거쳐 디지털 값으로 변환되어 컴퓨터의 I/O port로 입력된다. 컴퓨터에서는 이 신호를 기호로 하여 쥐들이 각 주로를 방문한 횟수와 오류 여부가 계산되고 그 값이 저장된다.

실험에 들어가기 전 36시간 동안 사육 상자에서 물과 먹이를 박탈하고 갈증을 유발시킨 쥐를 행동 관찰실로 옮겨와 30분간 환경에 적응시킨다. 각 주로의 끝에 있는 보상 용기에 0.1 cc의 물 또는 먹이를 넣고 주로로 통하는 통로를 닫는다. 쥐를 미로의 출발 상자에 넣고 1분간 두어 상황에 적응시켰다. 1분이 지나면 각 주로로 통하는 통로를 개방하여 쥐가 자유롭게 미로 속을 돌아다니게 된다. 쥐가 주로를 방문하여 끝까지 다다르면 보상 용기에서 한 방울의 물 또는 먹이를 먹을 수 있다. 그러나 동일한 주로를 반복해서 방문하면 두 번째 방문 부터는 물 또는 먹이가 제공되지 않고, 반응은 오류로 기록된다. 쥐가 5분 동안에 8개의 주로를 모두 방문하지 못하면 시행을 중지시키고, 그 시행은 실패로 간주한다. 쥐가 학습 준거에 도달하는 경우 24시간 후에 기억검사를 실시한다.

그림 11. 팔방미로 시험

(4) 반스미로(barnes maze test)

실험동물의 기억력 평가를 위한 행동시험이다. 처음 goal box를 찾을 때까지의 시간을 초 단위로 측정하여 얼마나 빨리 goal box 위치를 기억하고 찾아가는지를 관찰하는 실험 방법이다(그림 12). 실험 방법은 하루 4번씩 20분 간격으로 각 mouse에게 goal box를 찾을 수 있도록 반스미로에 노출시키는 것으로, 정상동물은 첫 노출 후 점점 goal box를 찾는 시간이 감소한다.

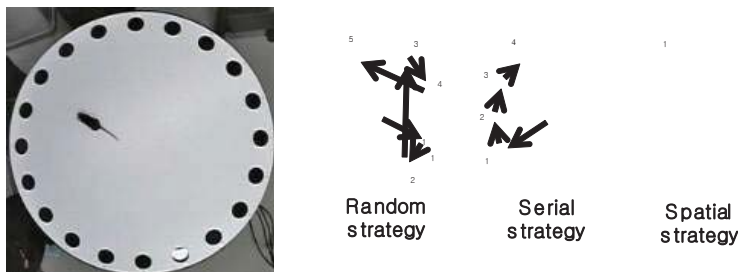


그림 12. Barnes maze test

(5) 신물질 탐색(novel object recognition test)

실험동물을 두 개의 동일한 물체가 담긴 불투명 박스에 배치하고 물체탐색 소요 시간을 측정한다(그림 13). 그런 다음 물체 중 하나는 새로운 물체로 대체하고 다시 각 물체를 탐색하는데 소요되는 시간을 측정한다. 기억력 장애가 있는 실험동물은 두 번째 단계에서 새로운 물체를 탐색하는데 더 많은 시간을 보낸다. 데이터는 각 물체를 찾는데 소요되는 시간과 분별 지수(discrimination index=새로운 물체를 찾는데 소요되는 시간/두개의 물체를 찾는 시간)로 나타낸다. 낮은 분별 지수는 새로운 물체를 인식하는 능력이 손상되었음을 의미한다.

지연
(예:1 시간,
24시간 후)

그림 13. Novel object recognition test

자. 임상적 평가

(1) 뇌 영상 촬영

(가) fMRI(functional magnetic resonance imaging)

연구대상자는 안정 후, fMRI 장치 내의 표준 두부 코일 안에 머리를 두고 양와위로 누워 환경에 적응하도록 한 후, 머리를 sponge로 고정시키고 움직이지 않도록 주의를 시킨 다음 진행한다. head coil에 부착된 거울을 통해 제시되는 자극을 보며 과제를 수행하는 동안 측정장치를 이용하여 영상을 획득한다.

(나) 뇌자기공명분광영상(magnetic resonance spectroscopy, MRS)

뇌자기공명영상장치에 연구대상자를 눕힌 후 자기장 내에서 스핀을 지닌 원자핵을 배열한 후 고주파를 가했을 때 발생하는 자기공명신호의 획득한다. 이후 뇌자기공명분광영상의 분석을 통하여 관심 뇌 영역을 지정하고 생화학적 정보를 획득한다. NAA, Cr, PCr 농도는 ^1H -MRS로 측정하며 ATP 농도는 ^{31}P -MRS로 측정한다. 이렇게 획득한 뇌 내 생화학물질의 절대적인 농도 또는 생화학물질 간 농도비율을 분석, 비교한다.

(2) 한국판 웨슬러 성인용 지능검사 4판

(Korean wechsler adult intelligence scale-IV, K-WAIS-IV)

K-WAIS-IV는 10개의 핵심 소검사, 5개의 보충 소검사로 구성되며, 4개의 지수점수의 조합으로 전체 지능지수(full scale intelligence quotient, FSIQ)를 추정하여 평가할 수 있다. WAIS-IV는 전체 지능지수(FSIQ) 뿐만 아니라, 언어 이해 지수(verbal comprehension index), 지각 추론 지수(perceptual reasoning index), 작업 기억 지수(working memory index), 처리 속도 지수(processing speed index)를 산출한다.

(3) Kims 전두엽-관리기능 신경심리검사

(Kims frontal-executive intelligence test)

Kims 전두엽-관리기능 신경심리검사는 Kim 전두엽-관리기능 신경심리검사 EXIT(executive intelligence test), E-CFT(executive-complex figure test), EBS(executive behavior scale)의 세 모듈로 구성되어 있다. 관리기능은 상위기능이라는 속성상 손상 시, 환자의 적응 행동에 매우 광범위하고 결정적인 영향을 미친다.

(4) 한국판 몬트리올 인지평가

(Korean version of Montreal cognitive assessment, MoCA-K)

MoCA는 경도인지장애(mild cognitive impairment, MCI)를 정확하게 변별한 목적으로 개발된 검사로서, 집행기능, 시공간구성능력, 기억력, 주의집중능력 및 지남력으로 구성되어 있다. 총점은 30점으로 MMSE와 동일하지만 MCI를 민감하게 탐지할 수 있도록 훨씬 더 다양하고 다소 어려운 검사들로 구성되어 있으며, 집행기능과 주의집중능력을 평가하는 다수의 문항들을 포함하고 있어 MCI 뿐만 아니라 전두엽기능을 특징적으로 평가하는 데에도 사용되고 있다.

(5) 케임브리지 전산화 신경심리검사

(Cambridge neuropsychological test automated battery; CANTAB)

CANTAB은 스크리닝, 주의력, 시각적 기억기능, 언어적 기억기능, 집행기능·작업기억·계획기능, 의사결정·반응통제기능 및 사회인지기능의 모두 7개 영역을 측정하는 총 24개의 하위 검사로 구성되어 있고, 추가적인 설문을 전산화하여 추가할 수 있는 기능이 포함되어 있다. 이러한 하위 검사 중 선택적으로 필요한 검사로 구성된 특정 검사 총집(battery)를 구성할 수 있다.

(6) 스트룹 검사(stroop test)

스트룹 검사는 색과 글자로 이루어진 복합자극 중 글자를 무시하고 색깔 이름을 가능한 빨리 말하는 검사로 전두엽-관리기능의 인지적 측면 중에 주의력을 시험하는 검사이다. 색깔 이름을 말하는 단순검사, 글자의 색을 말하는 중간검사, 다른 색으로 써진 색깔 이름을 보고 글자는 무시한 채 글자의 색을 말하는 간접검사로 이루어진다. 오류가 생길 경우, 틀린 곳에서부터 다시 하도록 지시하며, 오류 횟수와 총 걸린 시간을 기록한다.

(7) MMSE(mini-mental state examination)

MMSE는 시간 및 장소지남력, 기억등록, 주의집중 및 계산, 기억 회상, 언어능력, 그리기 구성 항목으로 이루어져 있으며 총점은 30점이다. MMSE는 인지기능 장애의 정도를 정량적으로 평가할 수 있고, 반복적인 측정으로 인지기능의 변화를 관찰할 수 있는 장점이 있다. 중등도와 중증치매환자의 선별에 주로 사용되고 있다.

(8) ADAS-Cog(alzheimer's disease assessment scale-cognition)

ADAS-Cog는 11가지의 항목으로 인지기능을 평가할 수 있도록 구성되어 있다. 평가항목은 기억력(단어-회상, 단어 재인, 검사 지침 기억하기), 실행(구성 능력과 연속행위), 언어(명령, 사물과 손가락 이름대기, 언어 표현능력, 이해력, 낱말 찾기 어려움) 그리고 지남력으로 크게 구성된다. 총점은 70점으로 점수가 낮을수록 인지기능이 잘 보존되어 있음을 의미한다.

(9) 한국판 기억평가검사

(Korean version of memory assessment scales, K-MAS)

K-MAS는 언어적 과제와 비언어적인 시각적 과제로 나누어서 평가할 수 있어 본 연구의 시험제가 기억에 미치는 영향을 효과적으로 평가할 수 있다.

(10) 숫자외우기 검사(digit span)

숫자외우기 검사는 숫자 바로 따라 외우기와 숫자 거꾸로 따라 외우기로 구성되어 있으며 각각의 점수와 함께 숫자 바로 따라 외우기와 숫자 거꾸로 따라 외우기의 점수 차이를 측정치로 사용한다.

3. 시험 설계 시 고려사항

가. 시험관시험

(1) 시험계

시험관시험이 반드시 수행될 필요는 없으나 뇌 신경세포(SH-SY5Y 등)나 신경세포의 특성을 나타내는 세포(PC12 등)등에 아밀로이드 베타 단백질(A β)나 H₂O₂를 처리하여 세포 사멸을 유발하여 시험물질의 뇌 신경세포 보호 효과를 볼 수 있다.

(2) 바이오마커

시험물질의 작용 기전을 설명하기 위하여 예상되는 대사경로에 위치하고 있는 유전자 효소 전사인자 신호전달물질 대사산물 등의 바이오마커에 대한 활성 및 그 발현정도 등을 측정한다.

(3) 통계처리

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

나. 동물시험

(1) 실험동물

일반 실험동물을 사용하거나 특이 모델을 만들어서 사용 가능하다(예: A β ₂₅₋₃₅를 투여하여 알츠하이머를 유발, scopolamine를 투여한 기억력 손상 모델 등).

(2) 바이오마커

기능성 내용을 확인할 수 있는 행동학적 지표 탈출 시간 부동시간 등 의 유의적 개선 확인 및 기능성을 뒷받침할 수 있는 생리학적 지표 신경전달물질 및 관련효소 등 의 개선이 확인 되어야 한다.

(3) 통계처리

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

다. 인체적용시험

(1) 시험대상

(가) 시험대상자(예시)

① 인지기능 개선

- ① 동의일 기준으로 연령이 만 55세 이상 만 85세 미만
- ② 다음 조건을 만족하는 대상자
 - 인지 저하를 호소하는 자
 - 정신질환 진단 및 통계편람(diagnostic and statistical manual of mental disorders)의 치매의 정의에 부합되지 않는 자
 - 본 인체적용시험에 자의로 참여를 결정하고 서면 동의한 자

② 기억력 개선

- ① 동의일 기준으로 연령이 만 20세 이상 만 85세 미만
- ② 다음 조건을 만족하는 대상자
 - ADHD 임상적 진단기준에 부합되지 않는 자
 - 정신질환 진단 및 통계편람(diagnostic and statistical manual of mental disorders)의 치매의 정의에 부합되지 않는 자
 - 본 인체적용시험에 자의로 참여를 결정하고 서면 동의한 자

(나) 대상자 배제기준

- ① 동의일 기준 4주 이내 아래와 같은 약제를 복용한 경우
 - 치매치료제, 뇌대사개선제, 갑상선호르몬제, 중추신경흥분제, 항정신병제, 항콜린제
- ② 혈액검사 상 이상소견을 보이는 자
 - AST, ALT 가 정상상한치의 3배 이상
 - $Hb \leq 8 \text{ g/dL}$ 또는 $\text{platelet} < 100,000 / \text{mm}^3$
 - Serum Creatinine이 정상상한치의 3배 이상이거나 투석이 필요한 급만성 신부전증 환자
- ③ 뇌 질환이나 정신질환으로 인지장애가 있는 환자

- ④ 약물로 조절되지 않는 고혈압, 당뇨, 갑상선 기능 저하증을 갖고 있는자.
- ⑤ 중증 우울증, 정신분열증, 알코올 중독, 약물의존 등 심각한 정신적 질환이 있는 경우
- ⑥ 동의일 기준 6개월 이내 불안전성 협심증, 심근경색증, 일과성 허혈발작, 관상동맥 우회술을 포함한 관상동맥 중재술 병력을 가진자
- ⑦ 동의일 기준 6개월 이내 의식 소실을 동반한 심한 두부 외상 병력이 있는 경우
- ⑧ 동의일 기준 3개월 이내 급성 뇌졸중 병력이 있는 경우
- ⑨ 3개월이내 다른 인체적용시험용의약품을 복용한 경우
- ⑩ 시험 제재에 과민반응이 있는 자
- ⑪ 유효성 평가가 불가능한 중증의 청력 및 시력 장애 환자
- ⑫ 기타 시험자가 판단할 때, 인체적용시험 결과 평가에 영향을 줄 수 있는 조건이 있는 등 인체적용시험에 참여하기에 부적합하다고 판단되는 자

(2) 시험설계

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

(3) 바이오마커

(가) 인지기능 개선

인체시험에서 기능성 내용을 확인할 수 있는 직접적인 지표로서 WAIS, MMSE, ADAS-cog, CANTAB 등의 인지능력평가 점수에서의 개선을 확인한다.

(나) 기억력 개선

인체시험에서 기능성 내용을 확인할 수 있는 직접적인 지표로서 한국판 기억평가검사, 숫자 외우기 등의 기억력평가 점수에서의 개선을 확인한다.

(4) 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 제 2016-141호, 2016
2. 건강기능식품 시험법 가이드-‘기억력 개선에 도움을 줄 수 있음’ 편, 식품의약품안전처, 2015
3. 건강기능식품 시험법 가이드-‘인지능력 개선에 도움을 줄 수 있음’ 편, 식품의약품안전처, 2014
4. 고령자통계. 통계청. 2018
5. 권용철, 박종한. 노인용 한국판 Mini-Mental State Examination(MMSE-K)의 표준화 연구 - 제1편: MMSE-K의 개발. 신경정신의학 28:125-135, 1989
6. 그림으로 읽는 뇌과학의 모든 것, 박문호, (주)휴머니스트 출판그룹, 2013
7. 박종한, 권용철. 노인용 한국판 Mini-Mental State Examination(MMSE-K)의 표준화 연구 - 제2편: 구분점 및 진단적 타당도. 신경정신의학 28:508-513, 1989
8. 박태진. 인간 기억의 암묵적 인출과 외현적 인출의 인지신경심리학. 한국심리학회지 14:267-290, 2002
9. 박희경. 외현기억과 암묵기억: 구조인가 처리인가?. 한국심리학회지 18:65-85, 1999
10. 배현수, 신인섭. 집중력 및 기억력 개선 관련 기능성 평가체계 구축 최종보고서. 식품의약품안전처, 2003
11. 서석교, 김홍근. 정신분열병 환자의 전두엽-관리기능. 한국심리학회지 25:23-43, 2004
12. 신경정신의학 2nd ed., 대한신경정신의학회, 중앙문화사, 2005
13. 아담스 신경과학, 아담스 신경과학 편찬위원회 역, Adams RD, Victor M, Ropper AH, 한글 제 1판, 도서출판 정담, 1998
14. 이해하기 쉬운 인체생리학, 이연숙, 구재욱, 임현숙, 강영희, 권종숙, 파워북, 2011
15. 인지과학-학문 간 융합의 원리와 응용, 이정모, 성균대학교 출판부, 2012
16. K-WAIS 실시요강, 염태호, 박영숙, 오경자, 김정규, 이영호, 한국 가이던스, 1992
17. 한국판 보스톤 이름대기검사, 김향희, 나덕렬, 학지사, 1997
18. Aghili R, Khamseh ME, Malek M, Hadian A, Baradaran HR, Najafi L, Emami Z, Changes of subtests of Wechsler Memory Scale and cognitive function in subjects with subclinical hypothyroidism following treatment with levothyroxine. Arch Med Sci 8(6):1096-1101, 2012
19. Altermann CD, Martins AS, Carpes FP, Mello-Carpes PB, Influence of mental practice and movement observation on motor memory, cognitive function and

- motor performance in the elderly. *Braz J Phys Ther* 18(2):201-209, 2014
20. Amariglio RE, Townsend MK, Grodstein F, Sperling RA, Rentz DM, Specific subjective memory complaints in older persons may indicate poor cognitive function. *J Am Geriatr Soc* 59(9):1612-1617, 2011
21. Andrewes DG, Tomlinson L, Elwes RD, Reynolds EH, The influence of carbamazepine and phenytoin on memory and other aspects of cognitive function in new referrals with epilepsy. *Acta Neurol Scand Suppl* 99:23-30, 1984
22. Ano Y, Nakayama H, Preventive Effects of Dairy Products on Dementia and the Underlying Mechanisms. *Int J Mol Sci* 19(7):E1927, 2018
23. Aubrun F, Gaillat C, Rosenthal D, Dupuis M, Mottet P, Marchetti F, Coriat P, Riou B, Effect of a low-dose ketamine regimen on pain, mood, cognitive function and memory after major gynaecological surgery: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Eur J Anaesthesiol* 25(2):97-105, 2008
24. Ball MJ, Neuronal loss, neurofibrillary tangles and granulovacuolar degeneration in the hippocampus with ageing and dementia. A quantitative study. *Acta Neuropathol* 37(2):111-118, 1977
25. Bartres-Faz D, Junque C, Clemente IC, Serra-Grabulosa JM, Guardia J, Lopez-Alomar A, Sanchez-Aldeguer J, Mercader JM, Bargallo N, Olondo M, Moral P, MRI and genetic correlates of cognitive function in elders with memory impairment. *Neurobiol Aging* 22(3):449-459, 2001
26. Bartres-Faz D, Sole-Padulles C, Junque C, Rami L, Bosch B, Bargallo N, Falcon C, Sanchez-Valle R, Molinuevo JL, Interactions of cognitive reserve with regional brain anatomy and brain function during a working memory task in healthy elders. *Biol Psychol* 80(2):256-259, 2009
27. Benito-Leon J, Mitchell AJ, Vega S, Bermejo-Pareja F, A population-based study of cognitive function in older people with subjective memory complaints, *J Alzheimers Dis* 22(1):159-170, 2010
28. Berrios GE, Hodges JR, Memory disorders in psychiatric practice. Cambridge, UK ; New York, NY, Cambridge University Press, 2000
29. Bettermann K, Arnold AM, Williamson J, Rapp S, Sink K, Toole JF, Carlson MC, Yasar S, Dekosky S, Burke GL, Statins, risk of dementia, and cognitive function: secondary analysis of the ginkgo evaluation of memory study. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 21(6):436-444, 2012

30. Bizon JL, Foster TC, Alexander GE, Glisky EL, Characterizing cognitive aging of working memory and executive function in animal models. *Front Aging Neurosci* 4:19, 2012
31. Bliss TV, Collingridge GL, A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361(6407):31-39, 1993
32. Blume AW, Schmaling KB, Marlatt GA, Memory, executive cognitive function, and readiness to change drinking behavior. *Addict Behav* 30(2): 301-314, 2005
33. Bredt DS, Nicoll RA, AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. *Neuron* 40(2):361-379, 2003
34. Buckley RF, Saling MM, Irish M, Ames D, Rowe CC, Lautenschlager NT, Maruff P, Macaulay SL, Martins RN, Masters CL, Rainey-Smith SR, Rembach A, Savage G, Szoek C, Ellis KA, Personal memory function in mild cognitive impairment and subjective memory complaints: results from the Australian Imaging, Biomarkers, and Lifestyle (AIBL) Study of Ageing. *J Alzheimers Dis* 40(3):551-561, 2014
35. Cacace AT, McFarland DJ, Acoustic pattern recognition and short-term memory in normal adults and young children. *Audiology* 31(6):334-341, 1992
36. Carlin MF, Saniga RD, Normal listeners and the Goldman-Fristoe-Woodcock Test of Selective Attention. *Percept Mot Skills* 56(3):893-894, 1983
37. Chang YL, Jacobson MW, Fennema-Notestine C, Hagler DJ, Jr., Jennings RG, Dale AM, McEvoy LK, Alzheimer's Disease Neuroimaging I, Level of executive function influences verbal memory in amnesic mild cognitive impairment and predicts prefrontal and posterior cingulate thickness. *Cereb Cortex* 20(6):1305-1313, 2010
38. Cho SY, Shin AS, Na BJ, Jahng GH, Park SU, Jung WS, Moon SK, Park JM, Brain activity associated with memory and cognitive function during jaw-tapping movement in healthy subjects using functional magnetic resonance imaging. *Chin J Integr Med* 19(6):409-417, 2013
39. Chui H, Zhang Q, Evaluation of dementia: a systematic study of the usefulness of the American Academy of Neurology's practice parameters. *Neurology* 49(4):925-935, 1997
40. Chung JC, Man DW, Self-appraised, informant-reported, and objective memory and cognitive function in mild cognitive impairment. *Dement Geriatr Cogn*

- Disord 27(2):187-193, 2009
41. Clay OJ, Edwards JD, Ross LA, Okonkwo O, Wadley VG, Roth DL, Ball KK, Visual function and cognitive speed of processing mediate age-related decline in memory span and fluid intelligence. *J Aging Health* 21(4):547-566, 2009
 42. Coffey CE, Cummings JL, The American Psychiatric Press textbook of geriatric neuropsychiatry, 2nd ed., Washington, DC, American Psychiatric Press, 2000
 43. Cukierman-Yaffe T, Gerstein HC, Williamson JD, Lazar RM, Lovato L, Miller ME, Coker LH, Murray A, Sullivan MD, Marcovina SM, Launer LJ, Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes-Memory in Diabetes I, Relationship between baseline glycemic control and cognitive function in individuals with type 2 diabetes and other cardiovascular risk factors: the action to control cardiovascular risk in diabetes-memory in diabetes (ACCORD-MIND) trial. *Diabetes Care*, 32(2):221-226, 2009
 44. Davis KL, Mohs RC, Tinklenberg JR, Pfefferbaum A, Hollister LE, Kopell BS, Physostigmine: improvement of long-term memory processes in normal humans. *Science* 201(4352):272-274, 1978
 45. Drachman DA, Memory and cognitive function in man: does the cholinergic system have a specific role?. *Neurology* 27(8):783-790, 1977
 46. Drachman DA, Sahakian BJ, Memory and cognitive function in the elderly. A preliminary trial of physostigmine. *Arch Neurol* 37(1):674-675, 1980
 47. Duarte A, Hayasaka S, Du A, Schuff N, Jahng GH, Kramer J, Miller B, Weiner M, Volumetric correlates of memory and executive function in normal elderly, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 406(1-2):60-65, 2006
 48. Elixhauser A, Leidy NK, Meador K, Means E, Willian MK, The relationship between memory performance, perceived cognitive function, and mood in patients with epilepsy. *Epilepsy Res* 37(1):13-24, 1999
 49. Espeland MA, Rapp SR, Shumaker SA, Brunner R, Manson JE, Sherwin BB, Hsia J, Margolis KL, Hogan PE, Wallace R, Dailey M, Freeman R, Hays J, Women's Health Initiative Memory S, Conjugated equine estrogens and global cognitive function in postmenopausal women: Women's Health Initiative Memory Study. *JAMA* 291(24):2959-2968, 2004
 50. Flicker C, Ferris SH, Reisberg B, A longitudinal study of cognitive function in

- elderly persons with subjective memory complaints. *J Am Geriatr Soc*, 41(10):1029-1032, 1993
51. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR, "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 12(3):189-198, 1975
 52. Gazzaniga MS, Ivry RB, Mangun GR, *Cognitive neuroscience : the biology of the mind*, 2nd ed., New York, Norton, 2002
 53. Gliebus G, Lippa CF, The influence of beta-blockers on delayed memory function in people with cognitive impairment. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 22(1):57-61, 2007
 54. Gross AL, Rebok GW, Unverzagt FW, Willis SL, Brandt J, Word list memory predicts everyday function and problem-solving in the elderly: results from the ACTIVE cognitive intervention trial, *Neuropsychol Dev Cogn B Aging. Neuropsychol Cogn* 18(2):129-146, 2011
 55. Guo Y, Shi X, Uchiyama H, Hasegawa A, Nakagawa Y, Tanaka M, Fukumoto I, A study on the rehabilitation of cognitive function and short-term memory in patients with Alzheimer's disease using transcutaneous electrical nerve stimulation. *Front Med Biol Eng* 11(4):237-247, 2002
 56. Gupta S, Woods SP, Weber E, Dawson MS, Grant I, Group HIVNRC, Is prospective memory a dissociable cognitive function in HIV infection?. *J Clin Exp Neuropsychol* 32(8):898-908, 2010
 57. Hallahan DP, Gajar AH, Cohen SB, Tarver SG, Selective attention and locus of control in learning disabled and normal children. *J Learn Disabil* 11(4):47-52, 1978
 58. Hanon O, Haulon S, Lenoir H, Seux ML, Rigaud AS, Safar M, Girerd X, Forette F, Relationship between arterial stiffness and cognitive function in elderly subjects with complaints of memory loss. *Stroke* 36(10):2193-2197, 2005
 59. Hanon O, Pequignot R, Seux ML, Lenoir H, Bune A, Rigaud AS, Forette F, Girerd X, Relationship between antihypertensive drug therapy and cognitive function in elderly hypertensive patients with memory complaints. *J Hypertens* 24(10):2101-2107, 2006
 60. Hardy, J, The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297(5580):353-356, 2002

61. Haskell-Ramsay CF, Schmitt J, Actis-Goretta L, The Impact of Epicatechin on Human Cognition: The Role of Cerebral Blood Flow. *Nutrients* 10(8):E986, 2018
62. Heffernan TM, Jarvis H, Rodgers J, Scholey AB, Ling J, Prospective memory, everyday cognitive failure and central executive function in recreational users of Ecstasy. *Hum Psychopharmacol* 16(8):607-612, 2001
63. Hohman TJ, Beason-Held LL, Lamar M, Resnick SM, Subjective cognitive complaints and longitudinal changes in memory and brain function. *Neuropsychology* 25(1):125-130, 2011
64. Holowinsky IZ, Farrelly J, Intentional and incidental visual memory as a function of cognitive level and color of the stimulus. *Percept Mot Skills* 66(3):775-779, 1988
65. Hossain MS, Ifuku M, Take S, Kawamura J, Miake K, Katafuchi T, Plasmalogens rescue neuronal cell death through an activation of AKT and ERK survival signaling. *PLoS One* 8(12):e83508, 2013
66. Howes MJ, Houghton PJ, Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. *Pharmacol Biochem Behav* 75(3):513-527, 2003
67. Jones-Gotman M, Zatorre RJ, Odor recognition memory in humans: role of right temporal and orbitofrontal regions. *Brain Cogn* 22(2):182-198, 1993
68. J.R. Stroop. Studies of inference in serial verbal reactions. *J Exper Psychol* 18: 643-662, 1935
69. Kang YK, Lee BY, Bucci LR, Stohs SJ, Effect of a Fibroin Enzymatic Hydrolysate on Memory Improvement: A Placebo-Controlled, Double-Blind Study. *Nutrients* 10(2):233, 2018
70. Kearney-Schwartz A, Rossignol P, Bracard S, Felblinger J, Fay R, Boivin JM, Lecompte T, Lacolley P, Benetos A, Zannad F, Vascular structure and function is correlated to cognitive performance and white matter hyperintensities in older hypertensive patients with subjective memory complaints., *Stroke* 40(4):1229-1236, 2009
71. Kelleher RJ, 3rd, Govindarajan A, Jung HY, Kang H, Tonegawa S, Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell* 116(3):467-479, 2004
72. Kim JM, Stewart R, Shin IS, Choi SK, Yoon JS, Subjective memory impairment,

- cognitive function and depression--a community study in older Koreans. *Dement Geriatr Cogn Disord* 15(4):218-225, 2003
73. Klimesch W, Doppelmayr M, Russegger H, Pachinger T, Schwaiger J, Induced alpha band power changes in the human EEG and attention. *Neurosci Lett* 244(2):73-76, 1998
74. Kogan JH, Frankland PW, Blendy JA, Coblentz J, Marowitz Z, Schutz G, Silva AJ, Spaced training induces normal long-term memory in CREB mutant mice. *Curr Biol* 7(1):1-11, 1997
75. Krapivinsky G, Krapivinsky L, Manasian Y, Ivanov A, Tyzio R, Pellegrino C, Ben-Ari Y, Clapham DE, Medina I, The NMDA receptor is coupled to the ERK pathway by a direct interaction between NR2B and RasGRF1. *Neuron* 40(4):775-784, 2003
76. Krikorian R, Nash TA, Shidler MD, Shukitt-Hale B, Joseph JA, Concord grape juice supplementation improves memory function in older adults with mild cognitive impairment. *Br J Nutr* 103(5):730-734, 2010
77. Lamberty Y, Margineanu DG, Klitgaard H, Absence of negative impact of levetiracetam on cognitive function and memory in normal and amygdala-kindled rats. *Epilepsy Behav* 1(5):333-342, 2000
78. Lee BK, Glass TA, McAtee MJ, Wand GS, Bandeen-Roche K, Bolla KI, Schwartz BS, Associations of salivary cortisol with cognitive function in the Baltimore memory study. *Arch Gen Psychiatry* 64(7):810-818, 2007
79. Lezak MD, *Neuropsychological assessment*, 5th ed., Oxford ; New York, Oxford University Press, 2012
80. Lockhart SN, Mayda AB, Roach AE, Fletcher E, Carmichael O, Maillard P, Schwarz CG, Yonelinas AP, Ranganath C, Decarli C, Episodic memory function is associated with multiple measures of white matter integrity in cognitive aging. *Front Hum Neurosci* 6:56, 2012
81. Ly JD, Grubb DR, Lawen A, The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis: an update. *Apoptosis* 8(2):115-128, 2003
82. Lynch G, Palmer LC, Gall CM, The likelihood of cognitive enhancement. *Pharmacol Biochem Behav* 99(2):116-129, 2011
83. Maldjian JA, Detre JA, Killgore WD, Judy K, Alsop D, Grossman M, Glosser G, Neuropsychologic performance after resection of an activation cluster involved

- in cognitive memory function. *AJR Am J Roentgenol* 176(2):541-544, 2001
84. McAndrew FT, Memory disruption in mice following immersion in cold water. *J Gen Psychol* 99(1st Half):151-152, 1978
85. McClintock SM, Cullum M, Husain MM, Rush AJ, Knapp RG, Mueller M, Petrides G, Sampson S, Kellner CH, Evaluation of the Effects of Severe Depression on Global Cognitive Function and Memory. *CNS Spectr* 15(5):304-313, 2010
86. Meudell PR, Northen B, Snowden JS, Neary D, Long term memory for famous voices in amnesic and normal subjects. *Neuropsychologia* 18(2):133-139, 1980
87. Mohs RC, Rosen WG, Davis KL. The Alzheimer's disease assessment scale: an instrument for assessing treatment efficacy. *Psychopharmacol Bull* 19(3):448-450, 1983
88. Mungas D, Reed BR, Kramer JH, Psychometrically matched measures of global cognition, memory, and executive function for assessment of cognitive decline in older persons. *Neuropsychology* 17(3):380-392, 2003
89. Murphy DR, Craik FI, Li KZ, Schneider BA, Comparing the effects of aging and background noise on short-term memory performance. *Psychol Aging* 15(2):323-334, 2000
90. Nakata E, Kasai M, Kasuya M, Akanuma K, Meguro M, Ishii H, Yamaguchi S, Meguro K, Combined memory and executive function tests can screen mild cognitive impairment and converters to dementia in a community: the Osaka-Tajiri project. *Neuroepidemiology* 33(2):103-110, 2009
91. Ryu HW, Curtis-Long MJ, Jung S, Jeong IY, Kim DS, Kang KY, Park KH, Anticholinesterase potential of flavonols from paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*) and their kinetic studies. *Food Chem* 132(3):1244-1250, 2012
92. Solfrizzi V, Agosti P, Lozupone M, Custodero C, Schilardi A, Valiani V, Sardone R, Dibello V, Di Lena L, Lamanna A, Stallone R, Bellomo A, Greco A, Daniele A, Seripa D, Sabba C, Logroscino G, Panza F, Nutritional Intervention as a Preventive Approach for Cognitive-Related Outcomes in Cognitively Healthy Older Adults: A Systematic Review. *J Alzheimers Dis* 64(s1):S229-S254, 2018
93. Thaung Zaw JJ, Howe PRC, Wong RHX, Does phytoestrogen supplementation improve cognition in humans? A systematic review. *Ann N Y Acad Sci* 1403(1):150-163, 2017
94. Ul Islam B, Khan MS, Jabir NR, Kamal MA, Tabrez S, Elucidating Treatment of

- Alzheimer's Disease via Different Receptors. *Curr Top Med Chem* 17(12): 1400-1407, 2017
95. Wechsler, D. *The Measurement of Adult Intelligence*. Baltimore, MD: Williams & Wilkins. 1939
96. Zilbeyaz K, Stellenboom N, Guney M, Oztekin A, Senturk M, Effects of aryl methanesulfonate derivatives on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *J Biochem Mol Toxicol* 32(11):e22210, 2018

건강기능식품 기능성 평가 가이드(민원인 안내서)

- ‘인지기능개선/기억력개선에 도움을 줄 수 있음’ 편 -

발 행 인 : 이동희

편 집 위 원 장 : 황인균

편 집 위 원 : 이혜영, 권용관, 허수정, 서은채, 국주희, 김준영,
이미영, 오재명, 황경미, 방수진, 이요아, 정혜진,
김선후, 송진희

발 행 처 : 식품의약품안전평가원

발 행 일 : 2019년 11월

문 의 처 : 식품위해평가부 영양기능연구팀

(043-719-4416, 4421, 4423, 4428, 4430)
