

발 간 등 록 번 호

안내서-0128-03



# 건강기능식품 기능성 평가 가이드 (민원인 안내서)

장 건강 관련

2024. 12.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원



지침서·안내서 제·개정 점검표

|    |                                |
|----|--------------------------------|
| 명칭 | 건강기능식품 기능성 평가 가이드<br>(장 건강 관련) |
|----|--------------------------------|

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

|                                                                                       |                                                                                                                                     |                                                                             |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| 등록대상<br>여부                                                                            | <input type="checkbox"/> 이미 등록된 지침서·안내서 중 동일·유사한<br>내용의 지침서·안내서가 있습니까?                                                              | <input type="checkbox"/> 예<br><input checked="" type="checkbox"/> 아니오       |
|                                                                                       | 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 기존의 지침서·안내서의 개정을<br>우선적으로 고려하시기 바랍니다. 그럼에도 불구하고 동 지침서·<br>안내서의 제정이 필요한 경우 그 사유를 아래에 기재해 주시기<br>바랍니다.<br>(사유 : ) |                                                                             |
|                                                                                       | <input type="checkbox"/> 법령(법·시행령·시행규칙) 또는<br>행정규칙(고시·훈령·예규)의 내용을 단순 편집<br>또는 나열한 것입니까?                                             | <input type="checkbox"/> 예<br><input checked="" type="checkbox"/> 아니오       |
|                                                                                       | <input type="checkbox"/> 단순한 사실을 대외적으로 알리는 공고의 내용입니까?                                                                               | <input type="checkbox"/> 예<br><input checked="" type="checkbox"/> 아니오       |
|                                                                                       | <input type="checkbox"/> 1년 이내 한시적 적용 또는 일회성 지시·명령에<br>해당하는 내용입니까?                                                                  | <input type="checkbox"/> 예<br><input checked="" type="checkbox"/> 아니오       |
|                                                                                       | <input type="checkbox"/> 외국 규정을 번역하거나 설명하는 내용입니까?                                                                                   | <input type="checkbox"/> 예<br><input checked="" type="checkbox"/> 아니오       |
|                                                                                       | <input type="checkbox"/> 신규 직원 교육을 위해 법령 또는 행정규칙을<br>알기 쉽게 정리한 자료입니까?                                                               | <input type="checkbox"/> 예<br><input checked="" type="checkbox"/> 아니오       |
| 상기 사항 중 어느 하나라도 '예'에 해당되는 경우에 지침서·안내서 등록 대상이<br>아닙니다. 지침서·안내서 제·개정 절차를 적용하실 필요는 없습니다. |                                                                                                                                     |                                                                             |
| 지침서·안내서<br>구분                                                                         | <input type="checkbox"/> 내부적으로 행정사무의 통일을 기하기 위하여 반복적<br>으로 행정사무의 세부기준이나 절차를 제시하는 것<br>입니까? (공무원용)                                   | <input type="checkbox"/> 예( 지침서)<br><input checked="" type="checkbox"/> 아니오 |
|                                                                                       | <input type="checkbox"/> 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게<br>풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전<br>처의 입장을 기술하는 것입니까? (민원인용)                | <input checked="" type="checkbox"/> 예( 안내서)<br><input type="checkbox"/> 아니오 |
| 기타 확인<br>사항                                                                           | <input type="checkbox"/> 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설·강화<br>하거나 민원인을 구속하는 내용이 있습니까?                                                       | <input type="checkbox"/> 예<br><input checked="" type="checkbox"/> 아니오       |
|                                                                                       | 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고<br>지침서·안내서 제·개정 절차를 진행하시기 바랍니다.                                                               |                                                                             |
| 상기 사항에 대하여 확인하였음.                                                                     |                                                                                                                                     |                                                                             |
| 2024년 12월 일                                                                           |                                                                                                                                     |                                                                             |
| 담당자<br>확 인(부서장) 이 순 호                                                                 |                                                                                                                                     |                                                                             |



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 2024년 12월 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: 043-719-4416, 4421, 4423, 4428, 4430

팩스번호: 043-719-4420



## 제·개정 이력

| 연번 | 제·개정번호        | 승인일자      | 주요내용                                                                 |
|----|---------------|-----------|----------------------------------------------------------------------|
| 1  | B1-2015-1-005 | 2015.12.  | 제정                                                                   |
| 2  | 안내서-0128-01   | 2017.6.1. | 「식약처 지침서등의 관리에 관한 규정」에 따른 등록번호 일괄 정비<br>(규제개혁담당관실-3761호, 2017.5.16.) |
| 3  | 안내서-0128-02   | 2020.9.   | 개정<br>(기능성 시험방법 등 업데이트)                                              |
| 4  | 안내서-0128-03   | 2024.12.  | 개정<br>(신규 기능성 내용 등 업데이트)                                             |





# CONTENTS

|                          |    |
|--------------------------|----|
| ※ 건강기능식품의 기능성 개요 .....   | 1  |
| ※ 약어 .....               | 3  |
| <br>Ⅰ 서 론 .....          | 5  |
| <br>Ⅱ 일반적 사항 .....       | 5  |
| 1. 개요 .....              | 5  |
| 2. 보건학적 중요성 .....        | 20 |
| <br>Ⅲ 기능성 시험 방법 .....    | 21 |
| 1. 바이오마커의 선정 .....       | 21 |
| 2. 주요 바이오마커의 측정 방법 ..... | 36 |
| 3. 시험 설계 시 고려사항 .....    | 51 |
| 4. 안전성 평가 .....          | 58 |
| <br>Ⅳ 참고문헌 .....         | 59 |



## 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<br>위험 감소<br>기능 <sup>1)</sup> | ○○발생위험 감소에<br>도움을 줌 | 기반연구 자료를 통해 생리화학적 효과 또는<br>기전이 명확하게 입증되어야 하고 일관성 있는<br>바이오마커의 개선효과가 다수의 인체적용시험<br>(RCT)에서 확보되어야 함<br>※ 질병 관련 바이오마커의 확인                                                                         |
| 생리활성<br>기능 <sup>2)</sup>          | ○○에 도움을 줄 수<br>있음   | 기반연구 자료를 통해 기능성 있는 생리화학적<br>효과 또는 기전을 추측할 수 있어야 하고 일관성<br>있는 바이오마커의 개선효과가 최소 1건 이상의<br>인체적용시험(RCT)에서 확보되어야 함(추측<br>제안기전과 관련한 바이오마커가 기반연구시험과<br>인체적용시험에서 일관성 있게 확인되어야 함)<br>※ 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

|                 |                                                  |
|-----------------|--------------------------------------------------|
| A1AT            | $\alpha$ 1-antitrypsin                           |
| BHI             | brain heart infusion                             |
| BSFS            | bristol stool form scale                         |
| CI              | calcium ionophore                                |
| CRP             | c-reactive [rotein                               |
| DSS             | dextran sodium sulfate                           |
| ELISA           | enzyme-linked immunosorbent assay                |
| ESR             | erythrocyte sedimentation rate                   |
| FITC-dextran    | fluorescein isothiocyanate-conjugated dextran    |
| FOXO            | forkhead transcription factors of the O class    |
| FWC             | a fetal water content                            |
| GALT            | gut-associated lymphoid tissue                   |
| H&E             | hematoxylin-eosin                                |
| HAPCs           | high-amplitude propagated contractions           |
| IBS             | irritable bowel syndrome                         |
| IBS-SSS         | irritable bowel syndrome severity scoring system |
| IFN- $\gamma$   | interferon- $\gamma$                             |
| IgA/IgM/IgE     | immunoglobulin A/M/E                             |
| IL-6/IL-8/IL-10 | interleukin-6/8/10                               |
| I-FABP          | intestinal fatty acid binding protein            |
| ILF             | isolated lymphoid follicle,                      |
| iNOS            | inducible nitric oxide synthase                  |
| KRB buffer      | krebs-ringer bicarbonate buffer                  |
| LAP             | latency-associated peptide                       |
| LPS             | lipopolysaccharide                               |
| LTB4            | leukotriene B4                                   |
| MHC             | major histocompatibility complex                 |
| MLC-2           | myosin light chain II                            |
| MLCK            | myosin light chain kinase                        |
| MPO             | myeloperoxidase                                  |
| NRS             | numeric rating scale                             |
| PAMPs           | pathogen-associated molecular patterns           |
| PBMC            | peripheral blood mononuclear cells               |

|                          |                                                                     |
|--------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| PCR                      | polymerase chain reaction                                           |
| PGE2                     | prostaglandin E2                                                    |
| PMA                      | phorbol 12-myristate 13-acetate                                     |
| pMLC                     | phosphorylated myosin light chain                                   |
| PMNL                     | polymorphonuclear leukocyte                                         |
| RBL-2H3                  | rat basophilic leukemia                                             |
| RCT                      | randomized, controlled trial                                        |
| Reg                      | regenerating islet-derived protein                                  |
| ROCK                     | rho-associated coiled-coil containing protein kinase                |
| RT-PCR                   | real time-polymerase chain reaction                                 |
| SCFA                     | short chain fatty acid                                              |
| SDS-PAGE                 | sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis           |
| SIBO                     | small intestinal bacterial overgrowth                               |
| slgA/slzM                | secretory immunoglobulin A/M                                        |
| SSA                      | significant scientific assessment                                   |
| TCR                      | time to complete relief                                             |
| TFF                      | trefoil factor                                                      |
| TFR                      | time to first relief                                                |
| TGF- $\beta$             | transforming growth factor                                          |
| Th1/Th2                  | T-helper cell 1/2                                                   |
| TJ                       | tight junction,                                                     |
| TNBS                     | trinitrobenzen sulfonic acid                                        |
| TNF- $\alpha$            | tumor necrosis factor- $\alpha$                                     |
| TPH1                     | tryptophan hydroxylase 1                                            |
| Tr1                      | type 1 regulatory                                                   |
| VAS                      | visual analogue scale                                               |
| VAS-IBS<br>questionnaire | visual analogue scale for irritable bowel syndrome<br>questionnaire |

## I

## 서론

이 가이드는 건강기능식품 기능성 원료를 개발하는 연구자 및 영업자에게 식품의약품 안전처의 기능성(장 건강 관련)에 대한 바이오마커 등의 정보를 제공함으로써 산업체의 기능성 원료 연구개발에 적정을 기하고 효율성을 높이고자 작성되었다.

## II

## 일반적 사항

## 1. 개요

## 가. 장의 구조

장(intestine)은 소화기계를 이루는 주요 장기 중 하나로 소장(small intestine)과 대장(large intestine)으로 구분된다.

## (1) 소장

소장은 십이지장(duodenum), 공장(jejunum), 회장(ileum)으로 구성되는데, 길이가 6-7 m로 소화관에서 가장 길며 다양한 소화효소 분비 및 활발한 장운동을 통해 다량 영양소인 탄수화물, 단백질, 지방과 미네랄, 비타민 등의 미량 영양소 및 수분 대부분의 소화, 흡수되는 곳이다.

## (2) 대장

대장은 회맹판(ileocecal valve, 회장에서 맹장으로 넘어가는 부위로 조임근의 역할 수행)을 경계로 소장과 구분되는데, 맹장(cecum), 충수(appendix), 결장(colon), 직장(rectum)으로 이루어져 있다. 대장은 소장에서 소화, 흡수되지 않은 음식물의 분해 및 배설을 주로 담당하며, 일부 전해질과 수용성 비타민이 흡수되는 곳이다.

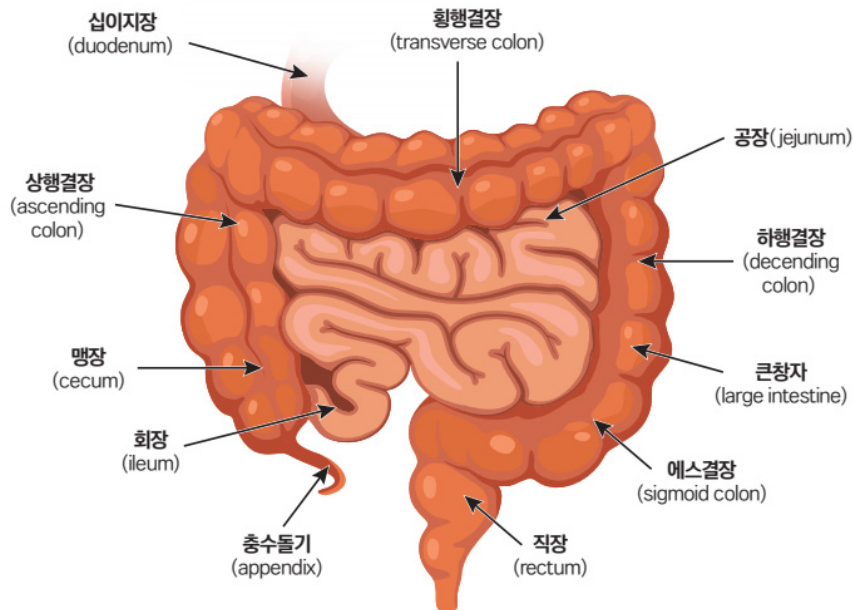


그림 1. 장의 구조

## 나. 장의 기능

### (1) 기계적 소화

소장은 공복 시 소화운동(motility)을 조절하다가, 식사를 하게 되면 위에서 소화된 미즙(chyme)이 소장으로 내려가면서 운동성(motor activity)이 강해지게 된다. 이 과정에서 소장 내 음식물은 소장 평활근의 수축과 이완이 반복되는 분절운동(segmentation)에 의해 작은 덩어리로 나뉘면서 소화액과 혼합되고, 소장벽과 접촉되면서 영양소의 흡수가 원활히 이루어지게 된다.

대장은 소장에서 흡수되지 않은 음식 잔여물의 소화가 완료되는 곳이다. 대장의 소화 운동은 매우 느리지만 분절운동이 약 30분마다 일어나 대장 내용물을 혼합해주는 역할을 한다. 결장에서는 소장의 연동운동과 유사한 수축운동이 일어남으로써 대장 마디 사이에 수축하지 않는 부분이 불룩하게 나와 염주 같은 모양을 띠게 된다.

### (2) 화학적 소화 및 흡수

소장은 열량 영양소가 최종 흡수단위로 분해되는 주요 장소로서 췌장에서 분비되는 췌장액, 간에서 합성되어 분비되는 담즙, 장내에서 분비되는 소화효소의 화학 작용이



활발히 이루어지는 곳이다. 췌장액에는 위산을 중화시키는 중탄산염(bicarbonate)과 탄수화물, 지방, 단백질을 소화시키는 소화효소가 함유되어 있다. 담즙은 담즙산(bile acid), 빌리루빈(bilirubin), 콜레스테롤, 지방산, 인지질 등의 복합체로 이루어진 수용성 용액으로 음식물이 소장으로 유입되면 담낭에서 십이지장으로 분비된다. 담즙산은 음식으로 섭취한 중성지방을 유화시켜 마이셀(micelles)을 형성하는데, 이는 지질 성분이 효율적으로 소화, 흡수될 수 있도록 해준다. 대부분의 담즙산은 결국 회장 말단부에서 재흡수 되어 다시 간문맥을 통해 간으로 이동된다. 소장 점막은 영양소 흡수에 적합하도록 넓은 표면적을 가지고 있고, 장세포(enterocyte)의 장내 표면은 올리고당, 펩타이드를 각각 단당류와 아미노산으로 분해할 수 있는 다양한 효소들을 함유하고 있어, 음식물의 소화를 돕는다. 최종적으로 소화된 영양소들은 특정 운반체 의한 능동수송 또는 수동 확산에 의해 세포막을 통과하거나 점막 세포 사이의 공간이나 연결결합(tight junction) 부위를 통해 흡수될 수 있다.

대장점막에서는 알칼리성 점액이 분비되나 소화효소는 함유되어 있지 않아서 화학적 소화는 일어나지 않으며, 소장에서 소화, 흡수되지 않은 일부 비타민 및 미네랄, 수분이 흡수된다.

### (3) 박테리아에 의한 발효

대장은 소화운동이 느리며, 소장에서 흡수되지 않고 대장으로 내려온 음식 잔여물이 남아 장내 미생물이 성장, 번식할 수 있는 배지 역할을 하므로 미생물의 성장과 번식에 매우 좋은 환경이라 할 수 있다. 따라서 대장에서 일어나는 주요한 생리반응에서 장내 미생물의 역할이 매우 중요하다. 장내 미생물이 음식 잔여물, 특히 소화되지 않은 다당류를 발효하는 과정에서 단쇄지방산(short-chain fatty acids)이 생성되는데 이는 장내 미생물 및 대장 상피세포(intestinal epithelial cell)의 주요 에너지원으로 사용된다. 그 외에도 소장에서 재흡수 되지 않은 담즙산은 대장 박테리아에 의해 대사되어 이차성 담즙산으로 전환되는데 이는 대장에서 다시 재흡수 되거나 변을 통해 배설된다. 장내 박테리아는 또한 암모니아와 요소(urea)로부터 아미노산을 합성하기도 하며, 비타민 K, 비오틴, 엽산, 판토텐산 등의 비타민을 합성하기도 한다.

### (4) 노폐물 배설

전해질과 수분이 흡수된 후 남은 노폐물들이 직장으로 이동되면 직장내압(rectal pressure)이 증가되어, 항문 괄약근이 이완되고 배변이 일어난다. 직장내압이 특정 수준(30-40 mmHg)으로 상승되면 배변반사(defecation reflex)가 나타난다. 건강한 배변

활동을 위하여 장운동(motility)과 장 내 수분의 적절한 유지가 중요하며, 이들은 배변량, 변 내 수분함량, 음식물의 대장통과시간(intestinal transit time), 배변횟수 등의 배변 습관을 결정하는 중요 요소라 할 수 있다.

## 다. 장의 특성

### (1) 장 내 생체 방어(gut defense)

장은 체내에서 표면적이 가장 넓은 기관으로(약  $400\text{ m}^2$ ) 외부로부터 유입된 물질들이 접촉되는 주요 장소이다. 장의 표면을 이루고 있는 점막에서는 음식물, 병원균 등 외부로부터 유입된 물질과 장내 미생물의 상호작용이 이루어지며, 다양한 외부 자극으로부터 우리 몸을 보호해주는 중요한 역할을 담당한다. 장 내 방어는 1차적으로 장관의 구조적 특성과 고유한 운동성에 의해 가능한데, 이때 관여하는 것이 장내 미생물(gut flora), 점막 장벽(mucosal barrier; intestinal epithelial cell barrier), 장운동(intestinal motility)이다. 2차적으로는 세포성, 체액성 면역에 의한 방어기전이 작용하게 된다.

#### (가) 장 점막 장벽(mucosal barrier; intestinal epithelial cell barrier)

장관 벽은 단일층으로 이루어진 장 상피세포(intestinal epithelial cells), 점막층(mucus layer)과 각종 기질들로 구성되어 있다. 장 점막 상피는 융모(villus)의 선와(crypts)에 존재하는 다분화능 장 상피 줄기세포(pluripotent intestinal epithelial stem cells)에 의해 세포의 증식, 분화, 교체 등이 이루어지면서 지속적으로 교체된다. 즉, 새로 분화된 장 상피 세포가 융모 기저부로부터 융모 상단 부위로 이동되면서, 융모 상단 부위에 있던 기존 상피세포가 장벽에서 분리된다. 이때 장 점막에 붙어 있던 병원성 물질도 함께 떨어져 나가게 됨으로써 병원성 물질이 상피세포에 침투하기 어렵게 된다. 장 상피세포의 교체는 2-5일 주기로 빠르게 일어나는데, 병원균에 의한 감염이 있을 경우 교체 속도가 빨라진다.

장 점막층은 뮤신(mucins), TFF(trefoil factor)와 같이 다양한 점막 분비물로 구성된 겔(gel)로 이루어져 있다. 이 층은 장의 내강 환경(luminal environment)과 장 상피를 물리적으로 분리시킴으로써 외부로부터 유입된 물질을 1차적으로 방어하는 역할을 한다. 즉 점막층은 강한 소수성(hydrophobicity)을 가지고 있기 때문에 수용성 독소가 장 상피로 유입되는 것을 막아준다. 사람을 포함한 여러 포유류의 경우 위장과 대장 상단 부위 점막층은 소수성이 매우 큰 반면, 영양소의 흡수가 활발한 소장

점막층은 소수성이 매우 작다. 또한 위장의 경우 점막층의 두께가 450  $\mu\text{m}$ 로 두껍지만, 소장에서 다시 얇아지고, 회맹판(ileocecal valve)을 지나면서 점막층 두께와 소수성이 점차 증가된다.

#### (나) 장 점막 면역(mucosal immunity)

장 상피세포(intestinal epithelial cells)는 선천성 면역반응(innate immune response)과 적응 면역반응(adaptive immune response)에 관여한다. 점막에서 이루어지는 면역 시스템은 항체 분비를 통해서 미생물이 표면에 서식(colonisation)하는 것을 방해하고, 면역원을 제거하여 잠재적으로 위험한 물질의 침투를 막는 역할을 한다.

체내에서 활성화된 B 세포의 80% 이상이 점막에 존재할 정도로 점막은 면역작용에 중요한 역할을 한다. 면역적 배제는 선천성 면역방어 기전(innate immunity)과 함께 분비성 IgA(secretory immunoglobulin A:sIgA)와 분비성 IgM(secretory immunoglobulin M:sIgM)에 의해 중재된다. 즉, 병원성 미생물 또는 항원이 M 세포로 유입되면 소화관점막림프조직(gut-associated lymphoid tissue; GALT)이 자극되어 면역반응이 유도된다.

GALT는 장 전체에 걸쳐 있으며(대략 260-300 $\text{m}^2$ ), 소장의 peyer's 패치, 장 전체에 존재하는 고립된 림프 낭종(isolated lymphoid follicle, ILF), 충수를 포함한다. GALT는 체중 대비 약 70%를 차지하는 면역 시스템의 일부로, GALT가 손상되면 전체 면역 시스템의 강도에 중대한 영향을 미칠 수 있다.

장 상피세포가 미생물에 존재하는 PAMPs(Pathogen-associated molecular patterns)을 인식하면, PAMPs와 결합할 수 있는 수용체(toll-like receptors, NOD-family receptors)를 발현시킴으로써 선천성 면역이 시작된다. 또한 미생물 침입에 대해 반응으로서 전사인자인 NF- $\kappa$ B를 활성화시킴으로써 친염증성 단백질(proinflammatory proteins)의 발현을 증가시킨다. 따라서, 상피세포는 화학주성인자(chemoattractants)를 통해 호중구(neutrophils)와 친염증성 사이토카인(proinflammatory cytokines)을 감염부위로 집중시키고 산화질소(nitric oxide), 프로스타글란딘(prostaglandins), 류코트리엔(leukotrienes) 합성에 관여하는 효소의 발현을 증가시킨다. 이 외에도 장 상피세포는 MHC (major histocompatibility complex) class II와 non-classical MHC class I 분자를 발현할 수 있으므로 항체 제시세포(antigen-presenting cells)로서도 기능할 수 있다. 이처럼 장 상피세포는 장 점막에서 이루어지는 선천성 면역반응 개시에 중요한 신호들을 제공하고, 면역반응에 관련된 면역세포들과 매개 인자들을 모아주는 역할을 한다.

## (2) 장내 미생물 균총(gut flora)

장 점막에 서식하는 장내 미생물은 체내 방어 기전에서 매우 중요한 역할을 한다. 실제로 무균(germ free) 동물들의 경우 감염에 더 취약한 것으로 보고되고 있으며, 사람의 경우도 항생제 사용 등으로 장내 미생물 균형이 파괴될 경우 설사가 유발될 수 있다. 상재균(commensal bacteria)의 경우 병원균(pathogen)의 성장을 저해하는 항균물질을 분비할 수 있고, 외부에서 침입된 유기체(invading organisms)와 장 점막 결합부위(binding site)에 대해 경쟁함으로써 유해 물질이 장점막을 통과하지 못하도록 하는 장벽(barrier) 역할을 한다(그림 2).

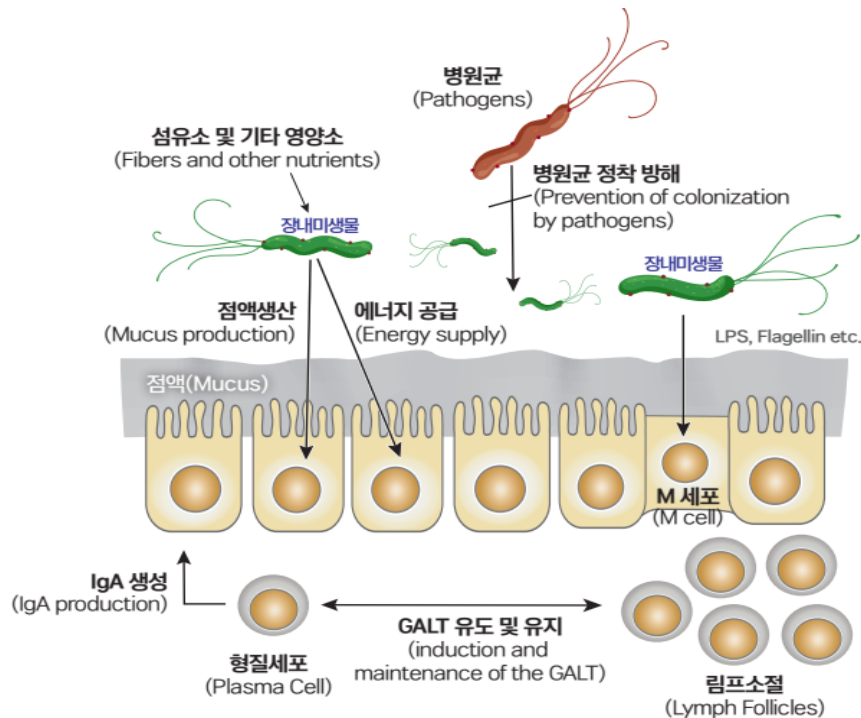


그림 2. 장내 미생물이 장관 장벽에서 하는 역할

IgA, Immunoglobulin A; GALT, Gut-associated lymphoid tissue; LPS, Lipopolysaccharide

### (가) 장내 미생물 분포

소화기관에는 매우 많은 수의 미생물들이 정상 소화기능에 상당 부분 기여하며 공생관계로 살아간다. 인간의 소화기관은 태아기에 무균 상태로 존재하다가 분만 동안 미생물의 번식이 이루어진다. 미생물 점종원은 자연분만 또는 제왕절개환경에서 주로 모친의 질이나 분변미생물군에서 유래된다. 초기에 우선적으로 *Escherichia coli* 또는 *Streptococci*가 옮겨온다. 영양요구가 많지 않은 이 미생물들이 나중에 장에서 절대

혐기성 미생물종들이 우세하게 성장할 수 있도록 장 내 환경을 바꾼다.

미생물의 성장은 주로 식이에서 기인한다. 모유수유를 받는 유아의 장내에서는 *Bifidobacteria*가 우위를 보이는데 이는 모유 속 당단백질들에 의존한 것으로 추측된다. 그에 반해 분유를 먹인 유아는 *Bacteroides*, *Clostridia*, *Bifidobacteria*, *Lactobacilli*, Gram positive cocci, Coliforms 등과 같은 다양한 미생물들이 고르게 분포되어있어 성인과 비슷한 장내 미생물 조성을 가진다. 이러한 미생물들은 이유식을 하는 동안 발달하게 되어 2세경에 상당히 안정한 생태계를 이루게 된다.

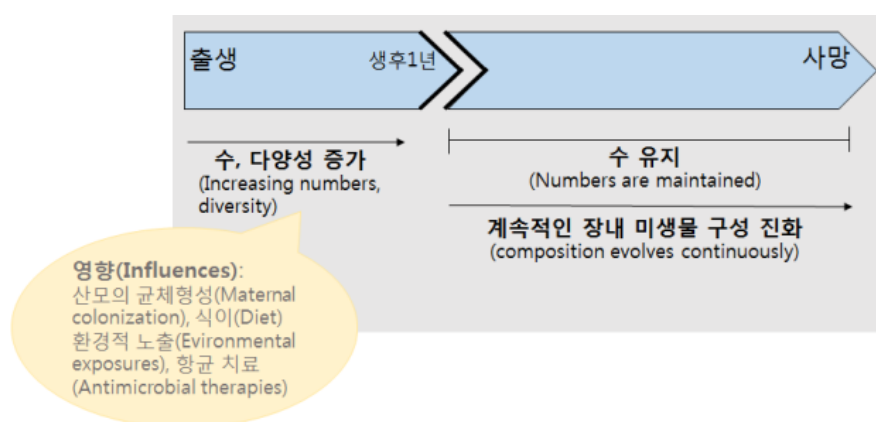


그림 3. 장내 미생물의 발달

사람의 장 표면에는 다양한 미생물들이 군집을 이루고 있다. 십이지장(duodenum)은 장관 통과시간이 짧고 담즙 및 췌장액이 분비되는 등 미생물 서식이 어려운 환경을 가지고 있어 서식하는 미생물 수가 적다. 미생물의 수와 종류는 공장(jejunum)과 회장(ileum)에 이르러 점진적으로 증가하여 수는 공장에  $10^6 \sim 10^7$  CFU/g에 이르며 회장은 pH가 점점 높아짐에 따라 그람음성균과 절대혐기성균에 속하는 세균들이 서식한다.

대장(colon)은 체내에서 가장 큰 미생물 군집을 갖는데 대변을 현미경으로 관찰하면 습중량(wet weight) 1 g당 약  $10^{12}$ 마리의 미생물들이 관찰되며 400여종 이상의 세균들이 분리된다. 대장의 환경은 장관 통과시간이 길고 영양공급과 미생물에 유리한 pH를 가지고 있어 미생물의 생장에 유리하다. 대장에서 수적으로 우세한 미생물은 무포자 혐기성 세균으로 *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp., *Eubacterium* spp., *Clostridium* spp., *Lactobacillus* spp., *Fusobacterium* spp. 및 다양한 그람 양성 구균 등이다. 상대적으로 숫자가 적은 균에는 *Enterococcus* spp., *Enterobacteriaceae*, *Methanogens*와 황환원세균 등이 있다.

표 1. 장관에서의 장내 미생물 분포

| 기관명                   | 미생물 수                 | 미생물 종류                                                                                                           |
|-----------------------|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 십이지장(Duodenum)        | $10^2$                | <i>Streptococcus</i> , <i>Lactobacillus</i>                                                                      |
| 공장(Jejunum)           | $10^2$                | <i>Streptococcus</i> , <i>Lactobacillus</i>                                                                      |
| 근위부회장(Proximal ileum) | $10^3$                | <i>Streptococcus</i> , <i>Lactobacillus</i>                                                                      |
| 원위부회장(Distal ileum)   | $10^7$ - $10^8$       | <i>Clostridium</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Bacteroides</i> ,<br><i>Actinomycinae</i> , <i>Corynebacteria</i> |
| 결장(Colon)             | $10^{11}$ - $10^{12}$ | <i>Bacteroides</i> , <i>Clostridium</i> groups IV and XIV,<br><i>Bifidobacterium</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> |

### (나) 유익균과 유해균

장내 미생물 무리는 장 연동운동 등의 물리적 작용으로 지속적으로 이동하고, 제거되며, 항상성 유지를 위해 분열 등을 통해서 지속적으로 대체된다. 정상적인 상태에서 장내 미생물은 자가조절(self-regulation)을 통해 미생물들 간에 또는 미생물과 숙주 사이에서 경쟁과 상리공생에 의해 일정한 상태를 유지하지만, 섭취하는 식이, 약물, 생균제품, 기후, 스트레스 등의 외부 요인과 세균 상호간의 관계에 의해 발생하는 내부요인에 의해 그 구성이 변화하여 장내 미생물 불균형이 초래될 수 있다.

*Bifidobacteria*, *Lactobacilli*와 같은 균들은 상피세포나 점막세포에 대해서 병원균들과 접착 경쟁을 함으로써 병원균의 침입을 막기도 하지만 병원균의 활성을 저해할 수 있는 물질을 생산함으로써 병원균을 감소시키는 역할을 한다. *Bifidobacteria*, *Lactobacilli*는 난소화성 당류를 분해해서 아세트산(acetic acid)과 젖산(lactic acid) 등 대사산물을 생성하고, 이를 통해 장 내 pH를 저하시킴으로써 산에 민감한 *E. coli*, *Clostridium perfringens*와 같은 유해세균의 성장을 저해시킨다. 한편 *E. coli*, *Clostridium perfringens*와 같은 유해균들은 내독소(endotoxin)를 생산하거나 유해 효소들을 생산함으로써 건강에 나쁜 영향을 주게 된다. 장내 미생물을 통해서 건강을 유지하기 위해서는 *Bifidobacteria*, *Lactobacilli* 등의 유익균을 증가시키고, 유해균을 감소시키는 것이 도움이 될 수 있다.

## 라. 장과 건강문제

### (1) 장 운동 이상

대변은 음식을 섭취하고 보통 24-72시간 후에 배설되는데, 위와 소장 통과 시간(intestinal transit time)은 4-8시간에 불과하며, 18-64시간을 대장, 특히

결장에 머무르게 된다. 전체적으로 대장 통과시간이 짧을 경우에는 설사증상이 나타나며, 결장 안에 대변이 오랜 시간 머물러 있게 되면 변비(constipation) 증상이 나타난다. 개인차는 있으나 일반적으로 1주일 동안 세 번 미만으로 배변할 때, 3일 이상 배변하지 않을 때, 한 번의 배변량이 25 g 이하일 때 배변이 원활하지 않은 것으로 판단하며, 반대로 배변 횟수가 하루에 3회를 초과할 경우에도 비정상적인 것으로 판단한다.

### (가) 기능성 변비

변비는 소화관의 운동 기능이 저하되거나 수분 조절에 문제가 생겼을 때 발생한다. 기능성 변비는 로마 IV 진단 기준으로 판단한다.

표 2. 기능성 변비- 로마 IV 진단 기준

|                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                    |
|----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 주관적<br>기준                                                                        | 1) 배변 시 과도하게 힘을 주는 경우가 배변 4회 중 1회 이상<br>2) 딱딱하고 덩어리진 변을 보는 경우가 배변 4회 중 1회 이상<br>3) 대변의 불완전 배출이 있다고 느끼는 경우가 배변 4회 중 1회 이상<br>4) 항문이나 직장의 폐쇄감을 느끼는 경우가 배변 4회 중 1회 이상<br>5) 배변을 용이하게 하기 위해 수조작이 필요한 경우가 배변 4회 중 1회 이상 |
| 객관적<br>기준                                                                        | 6) 배변 횟수가 1주일에 3번 미만인 경우                                                                                                                                                                                           |
| 항목 중에서 2가지 이상을 만족하면서 묶은 변은 거의 없고, 과민성 장증후군의 진단 기준은 충족되지 않는 경우를 기능성 변비의 필요조건으로 정의 |                                                                                                                                                                                                                    |

소화관 운동 기능이 떨어지는 것은 장 내용물들의 이동시간(transit time)을 길어지게 만드는 작용을 한다. 결장에서는 두 가지 특징적인 운동이 일어나는데, 반복적인 비진행성(nonpropulsive) 수축과 고진폭 추진성 수축(high-amplitude propagated contractions; HAPCs)이 그것이다. 반복적인 비진행성 수축은 내용물을 섞고 흡수시키는 방식으로 변을 이동시키고, HAPCs는 상행결장에서부터 변을 가지고 와서 좌측 결장으로 내려 보내는 일을 하는데, 변비일 때, 이 HAPCs의 횟수가 줄어든다.

결장의 기능은 수분을 흡수하고 남은 찌꺼기를 직장으로 이동시키는 것인데, 변 찌꺼기로부터 수분을 제거하는 것은 시간 의존적이고 능동적으로 조절된다. 체내 수분이 극도로 부족한 탈수 상태(dehydrated states)에서는 신세뇨관(renal tubule)에서 알도스테론(aldosterone)이 분비되어 나트륨과 수분의 재흡수를

자극함에 따라 나트륨은 몇 가지 능동 수송 채널을 통해서 결장 안에 있는 내용물로부터 체내로 재흡수되며, 이와 함께 수분도 수동적으로 삼투 기울기(osmotic gradients)에 의해 수동적으로 이동한다. 결장 속에 변이 오래 머물러 있게 되면 수분의 체내로의 재흡수가 증가되어 변은 점점 건조되고, 자갈 모양 변(pebble-like stools)을 만든다. 이 변이 더 커지고 딱딱해지면 항문관을 통과하기가 어려워진다. 보통 정상적인 상태에서는 변 내 수분함량이 70-80% 정도인 것으로 알려져 있으며, 배변이 원활하지 않은 사람의 경우 변 수분 함량은 70% 미만으로 알려져 있다.

### (나) 기능성 설사

설사는 빈번한 변 혹은 묽은 변, 빈번하면서 묽은 변을 보는 것으로 정의한다. 급성 설사는 몇 주 안에 증상이 사라지며, 3~4주 이상 지속되면 만성 설사가 된다. 특정 기저질환이 발견되지 않으면 기능성 설사로 진단한다. 현재까지 명확한 원인이 밝혀지지 않았지만, 위장 운동성과 연관이 있는 것으로 보고된다.

표 3. 기능성 설사- 로마 IV 진단 기준

|                          |                                                                                                              |
|--------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 주관적<br>기준                | 1) 복통이나 불편한 복부팽만감 없이, 묽은 변이 대변의 25% 이상에서 발생하는 경우<br>2) 진단을 받기 최소 6개월 전부터 증상이 시작되었으며, 최근 3개월 동안 진단 기준을 충족한 경우 |
| 과민성 장증후군-설사형의 진단의 경우는 제외 |                                                                                                              |

### (2) 장 불편감

장 불편감은 복부팽만(bloating), 복통(abdominal pain), 복부경련(abdominal cramp), 복명(borborygmi), 잔변감(sensation of incomplete evacuation) 등의 증상이 나타나는 경우이며, 과민성 장증후군(irritable bowel syndrome, IBS)은 기질적 병변 없이 반복적인 복통, 복부팽창, 배변습관 변화를 가져오는 소화기 기능성 질환으로 정의하고 있어, 장 불편감을 유발하는 주된 원인이다.

IBS의 원인은 불분명하나 현재까지 제안되는 원인 인자로는 식습관(음주, 자극적 음식 등), 내장과민성, 유전적 요인, 장내 세균총의 변화, 뇌-장관 상호 연관성, 스트레스에 대한 반응이상 등 다양한 요인들이 있으며, 이러한 인자들이 서로 연관성을 가지면서 증상을 초래하는 것으로 이해되고 있다. IBS의 진단은 로마기준 IV에 따라 판단한다(표 4).



표 4. 과민성 장증후군- 로마 IV 진단 기준

|        |                                                                                                                                                                                                                                                           |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 주관적 기준 | <p>1) 지난 3개월 동안 평균적으로 주당 최소 1일은 재발성 복통이 있으며, 다음의 두 가지 이상의 기준과 관련이 있는 경우</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 배변과 관련된 증상</li> <li>▪ 대변의 빈도 변화</li> <li>▪ 대변의 형태(외관)의 변화</li> </ul> <p>2) 진단을 받기 최소 6개월 전부터 증상이 시작되었으며, 최근 3개월 동안 진단 기준을 충족한 경우</p> |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

IBS는 증상에 따라서 변비형(IBM with predominant constipation), 설사형(IBM with predominant diarrhea), 혼합형(IBM with mixed bowel habits)의 3가지로 분류하며, 분류가 불가능한 경우를 비특이형(IBM unclassified)으로 분류한다. 아형의 분류는 주로 대변의 굳기 정도에 따라서 평가하며 Bristol Stool Form Scale (BSFS)을 이용한다(그림 4).

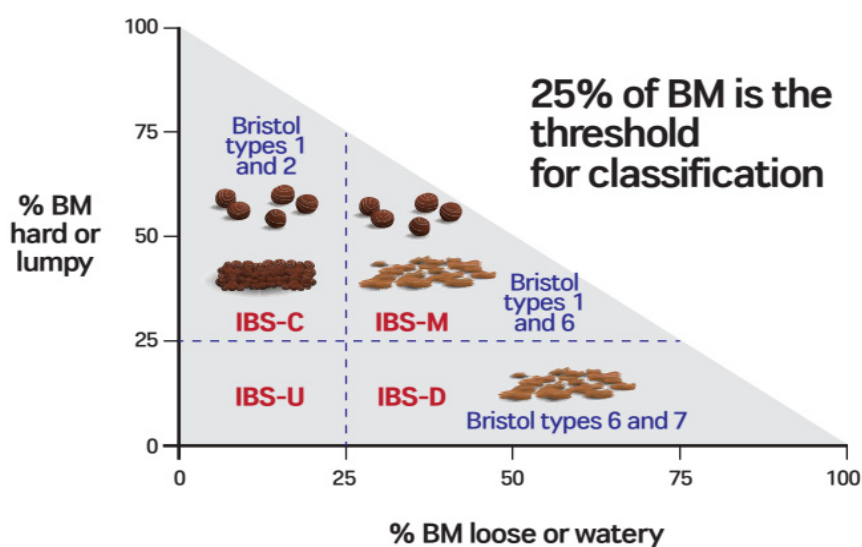


그림 4. 과민성 장증후군의 아형 분류  
(Korean J Med 2017;92:366-371)

다양한 증상으로 인해 증상별로 식습관교정, 생활습관교정, 스트레스 완화, 약물요법 등이 시도되고 있다. 증상 개선 방법에는 차이가 있을 수 있지만, 전체적으로 장 불편감을 나타내는 횟수와 정도를 개선시킨다는 것은 동일하며, 장 불편감 감소 여부는 장 건강 개선 정도를 반영할 수 있다.

관련되는 기전으로는 장관운동의 변화, 장막면역활성, 장막투과성변화, 장내세균불균형 등의 다양한 원인이 복합적으로 작용하여 증상을 야기한다.

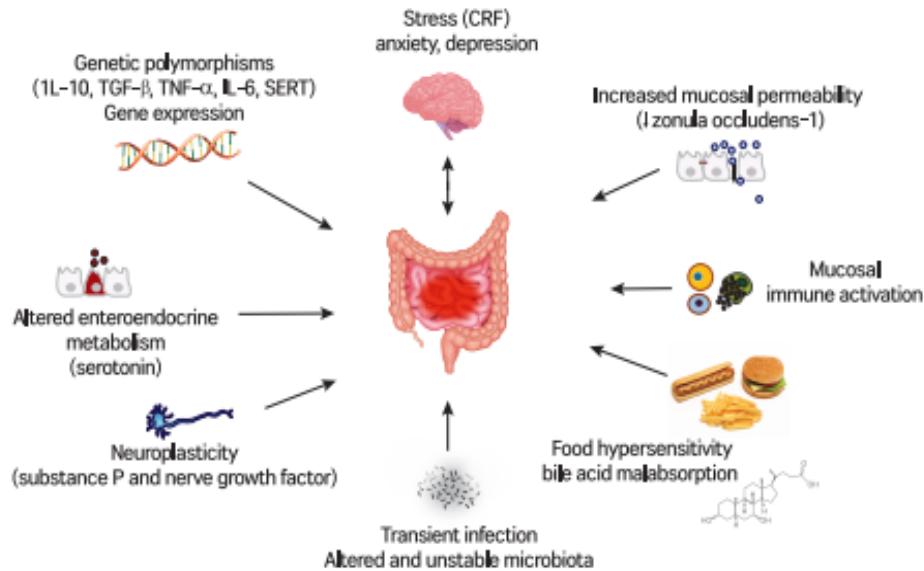


그림 5. 과민성 장증후군의 원인

(J NeurogastroenterolMotil. 2011;17(4):349-59)

### (3) 장관 면역 조절

장 내 점막 장벽은 장 내강(intestinal lumen)에 있는 세균이 점막층을 투과하여 상피세포로 이동되는 ‘장내 세균 전위(bacterial translocation)’를 차단한다. 생균이든 사균이든 점막을 투과하여 상피세포로 이동될 경우 면역 시스템이 빠르게 활성화된다. 장 점막 장벽이 손상되거나 기능적 이상이 있을 경우 상당수준의 생균(보통 그람 음성 호기성 균)이 장점막을 투과하여 림프(lymph)를 통해 체내로 유입되지만, 장간막에 존재하는 림프절(lymph node), 간, 비장, 폐는 모두 세균이 체내로 급속히 퍼지는 것을 차단해준다.

‘장내 세균 전위(bacterial translocation)’는 장 상피세포의 투과성(permeability)에 의존적이며, 장 상피세포의 투과성에 영향을 주는 것이 바로 세포 사이에 존재하는 밀착연접(tight junction, TJ)이다. 소장에서 물질이 흡수되는 경로는 ‘paracellular pathway’와 ‘transcellular pathway’가 있으며, ‘paracellular pathway’는 장 세포 간 틈새로 물질이 통과하는 것으로 분자량이 작은 물질은 이 방법으로 장벽을 통과한다(그림 6). 밀착연접은 장 세포 간 틈새를 조절함으로써 물질의 장관 투과에

영향을 줄 수 있다. 장내 자극이나 손상으로 인해 밀착연접이 느슨해지면 유해한 분자(병원균, 독소, 항원 등)들이 장 상피에 과량 투과되어 내독소혈증(endotoxemia)이 유발되고, 점막 면역 시스템 혼란과 염증반응이 유도되어, 궁극적으로 장 관련 또는 전신질환이 유발될 수도 있다. 외부로부터 유입한 다양한 종류의 세균이 장 내에 서식하게 되는데, 경우에 따라 병원성 세균이 상피세포와 상호작용을 하면서 밀착연접을 손상시킴으로써 비정상적인 전해질 및 수분 이동, 조직 염증 등을 일으킬 수도 있다.

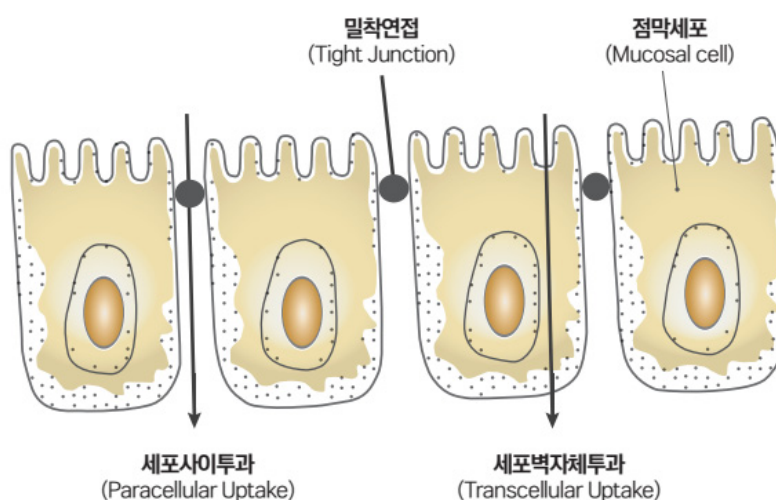


그림 6. Paracellular and transcellular pathway

장 상피세포의 투과성이 증가하여 다량의 독소들과 항원들이 장 상피를 통과하여 혈중으로 유입되면 면역체계가 과다하게 감작되어, IL(interleukin)-4, IL-6, IL-10, IL-13, TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ (interferon- $\gamma$ )와 같은 염증성 사이토카인의 분비가 증가된다. 또한 소화기계에 존재하는 세로토닌의 생성이 촉진되어 장내 운동성을 변화시키게 된다. 일반적으로 과민성 장 증후군 환자에 있어 정상인에 비해 식후 혈중 세로토닌 농도가 상승하는 것으로 보고되고 있다(그림 7).

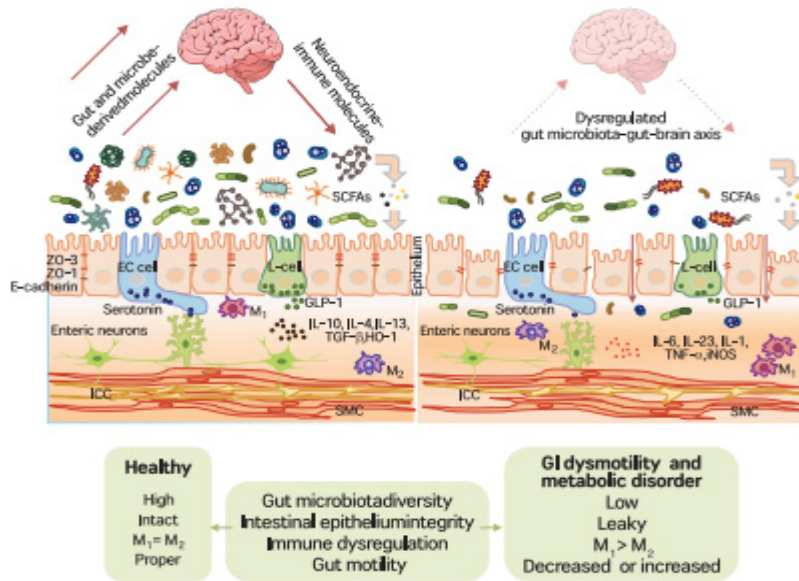


그림 7. 장 상피세포의 투과성 및 염증성 사이토카인  
(Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 17(6):338-351, 2020)

여러 연구에서 식품 성분들이 밀착연접 조절에 영향을 주는 것으로 보고되고 있으며, 글루타민, 폴리페놀, 프로바이오틱스 등은 장벽 온전성(barrier integrity)을 보호하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 반면 알코올 또는 그 대사물인 아세트알데하이드는 장벽에 손상을 주어 장 상피세포의 투과성을 촉진하는 것으로 보고되고 있다.

과도한 염증반응은 주로 장내 미생물 불균형과 동반되어 나타나는데, 여러 연구들에 따르면 건강한 사람은 자신의 장내 미생물에 대한 내성을 가지고 있지만, 염증성 장증후군이 있는 사람들은 내성이 저하되어 있는 것으로 보고되고 있다. 장내 미생물은 장내 삼투압을 안정화시키고, 항원을 분해하는 것으로 알려져 있으며, IgA의 반응을 증진시키고, 친염증성 사이토카인과 항염증성 사이토카인 분비 간에 균형 조절을 중재함으로써 면역기능을 조절할 수 있는 것으로 제안되고 있다(그림 8).

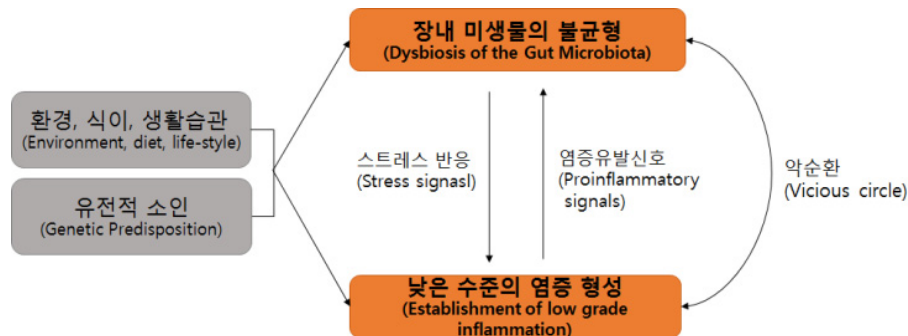


그림 8. 장내 미생물 불균형과 만성적 염증반응

#### (4) 장내 미생물 불균형

장내 미생물 분포는 식이에 의해 크게 좌우되는데, 고단백식이의 경우 잠재적으로 유해한 세균 산물의 생산을 증가시킬 수 있다. 소화되지 않은 단백질은 장내 미생물에 의해 발효되어 잠재적으로 유해한 대사 산물인 암모니아, 아민, 페놀, 황화물, 인돌 등을 만들어낸다. 전체적인 단백질이 많은 식이보다, 특히 동물성 단백질 함량이 높은 식이는 장내 미생물에 특히 더 영향을 주는데,  $\beta$ -glucuronidase, azoreductase, nitroreductase, 7- $\alpha$ -hydroxysteroid dehydroxylase 등의 특정 세균 효소를 증가시킨다. 이러한 효소들의 증가는 장에서 잠재적 독성이 있는 대사산물을 분비시키는 작용을 하는 것으로 보고되고 있다. 항생제 사용도 장내 미생물 불균형을 유발시키는 요인 중 하나로 장내 미생물 성장을 억제함으로써 단쇄지방산 생산에 영향을 주어 전해질 불균형과 설사를 유발한다. 또한 장 내에 이미 서식하고 있던 곰팡이나 *Clostridium difficile*과 같은 유해한 미생물 성장을 촉진하고, 설사 및 독소 분비로 인한 장 손상을 유발시킬 수 있다. 그 외에도 여러 연구들에서 스트레스가 장내 미생물 균형에 중요한 변화를 유도하는 것으로 보고되고 있는데, 스트레스에 의해서 *Lactobacilli*, *Bifidobacteria*와 같은 유익균은 유의적으로 감소되고 *E.coli*와 같은 유해균은 증가된 것으로 나타났다. 이러한 변화는 노에피네프린(norepinephrine) 분비에 의해 그람 음성균의 성장이 증가되고, 스트레스로 인한 장관 운동성, 분비능 변화 때문인 것으로 추측되고 있다.

소장내 세균 과증식(small intestinal bacterial overgrowth, SIBO)은 소장 내 세균의 수가 증가하거나 비정상적인 종류의 세균 양이 증가한 경우를 의미하며, 이에 의해 복합적이고 다양한 증상이 발생할 수 있다. 일반적으로는 전진성의 연동으로 인해 섭취한 미생물의 부착을 막고, 위산으로 위내 유입된 미생물을 파괴한다. 또한 회맹판은 세균이 대장에서 소장으로 역행하여 전위되는 것을 방지하는 역할을 한다.

장 기능 이상으로 인해 소장내 세균이 증식하게 되면, 소장 세균에 의해 소장 내 단쇄지방산의 생성이 증가하게 되고, 근위부의 장 운동 기능을 저하시켜 SIBO를 약시하고, 담즙산을 탈결합시켜 설사를 직접적으로 유발하게 된다. 더불어 세균에 의해 생성된 메탄은 변비와 연관성이 있다고 보고된다. 현재 IBS로 진단되는 경우 대략 30-85%에서 SIBO가 동반된 것으로 알려져 있다.

## 2. 보건학적 중요성

만성변비(chronic constipation) 유병률은 성인의 경우 2-27%이며, 여성 대 남성의 비율은 2.2:1이라고 알려져 있다. 국내 인구의 16.5%가 스스로 변비라고 인식하고 있으며, 연령이 증가할수록 유병률이 증가하며, 특히 65세 이상의 노인의 경우 더 높다. 노인의 경우 대장통과시간의 증가, 각종 질환(당뇨병, 파킨슨병과 같은 신경학적 문제 등) 발병 증가, 약물 복용 등이 주요 원인으로 제시되고 있다. 또한, 임신 말기에는 프로게스테론(progesterone)의 증가로 인해 음식물의 대장통과시간이 길어지기 때문에 배변 장애가 흔하게 나타난다. 배변 장애 환자의 70%는 일상업무에 방해를 받고 사회적 및 인간 관계에 있어서 어려움을 느낀다고 생각할 정도로 삶의 질에 영향을 주는 중요한 증상이다.

과민대장증후군은 기능성 장 질환의 하나로 기질적 병변없이 복통, 복부 불편감, 배변습관 변화 등을 가져오는 질환이며, 전세계적으로 유병률은 9.5~25%이며, 남성(5~19%)보다 여성(14~24%)에서 발생빈도가 높다. 국내에는 소화기 증상으로 방문하는 환자의 28.7%가 과민성대장증후군으로 진단될 만큼 흔한 질환이며, 증상의 호전과 악화가 반복되는 만성적인 질환으로 삶의 질을 떨어뜨리고 의료비용을 증가시켜 사회경제적 손실을 초래하게 된다.

장내 환경은 외부로부터 유입된 물질들이 접촉되는 주요 장소로서 다양한 외부 자극으로부터 우리 몸을 보호해주는 중요한 역할을 담당한다. 장의 표면을 이루고 있는 점막에서는 음식물, 병원균 등 외부로부터 유입된 물질과 장내 미생물의 상호작용이 이루어지며, 장 내 방어는 장관의 구조적 특성, 운동성, 세포성 및 체액성 면역에 의해 이루어진다. 이와 같이 장 고유의 기능인 음식물의 소화, 흡수, 분해, 배설의 기능 뿐만 아니라, 장 내 유익균과 유해균 균형, 면역 기능을 포함하는 장 방어 기능이 적절하게 유지될 때 건강한 장이라고 할 수 있다. 따라서 장내 미생물 환경을 조성하고, 장관면역을 조절하는 것은 전체적인 장내 환경을 바람직하게 유지하는 방법이 되며, 이는 장 건강에 도움을 줄 수 있다.

## Ⅲ

## 기능성 시험 방법

## 1. 바이오마커의 선정

## 가. 연구유형별 바이오마커

장 건강 기능성을 확인하기 위한 측정 가능한 시험 연구유형별 바이오마커\*(biomarker)는 다음 표 3과 같다.

\* 작용 기전 또는 인체적용시험 설계에 따라 적절한 바이오마커를 선택할 수 있음

표 5. 연구유형별 바이오마커

| 기전       | 바이오마커       |                                                           | 측정 가능한 연구유형                                                        |         |       |
|----------|-------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|---------|-------|
|          |             |                                                           | in vitro                                                           | in vivo | human |
| 배변 활동 원활 | 변의 굳기 및 형태  | 변의 수분함량                                                   |                                                                    | ○       | ○     |
|          |             | 변의 형태(Bristol stool Form scale)                           |                                                                    |         | ○     |
|          | 소화관 운동능     | 대장통과시간(intestinal transit time)                           |                                                                    | ○       | ○     |
|          |             | 장관 운동능                                                    |                                                                    | ○       |       |
|          | 변 중량        |                                                           |                                                                    | ○       | ○     |
|          | 임상적 증상      | 배변 횟수, 변 굳기, 통변감 등 (Visual analogue scale, Likert scale)  |                                                                    |         | ○     |
| 장관 면역 조절 | 점막 장벽 기능    | 장 투과성 검사(intestinal permeability test)                    |                                                                    | ○       |       |
|          |             | 장내 세균 전위 평가 (bacterial translocation)                     |                                                                    | ○       |       |
|          |             | 점막 장벽 온전성 (mucosal barrier integrity)                     |                                                                    | ○       |       |
|          |             | 뮤신 분비 및 유전자 발현                                            | ○                                                                  | ○       |       |
|          |             | 장세포상하층부 전기저항치(transepithelial electrical resistance, TER) | ○                                                                  | ○       |       |
|          |             | intestinal fatty acid binding protein(I-FABP)             |                                                                    | ○       | ○     |
|          | 염증반응 및 면역조절 | 사이토 카인                                                    | ○                                                                  | ○       | ○     |
|          |             | 면역 작용                                                     | TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 등 |         |       |
|          |             |                                                           | 식균작용(phagocytic activity)                                          | ○       | ○     |
|          |             |                                                           | Oxidative(respiratory) burst                                       | ○       | ○     |
|          |             |                                                           | IgG, IgA                                                           | ○       | ○     |
|          |             |                                                           | 림프구아형 (lymphocyte subsets)                                         |         | ○     |
|          |             |                                                           | T-세포 조절인자                                                          | ○       | ○     |
|          | 염증          | Leukotriene B4                                            | ○                                                                  | ○       | ○     |

|                 |                                     |                                                                                           |                       |   |   |   |
|-----------------|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|---|---|---|
|                 | 반응<br>관련<br>인자                      | Prostaglandin E2                                                                          |                       | ○ | ○ | ○ |
|                 |                                     | C-Reactive Protein                                                                        |                       | ○ | ○ | ○ |
|                 |                                     | Inducible nitric oxide synthase                                                           |                       | ○ | ○ | ○ |
|                 |                                     | NF-κB 발현                                                                                  |                       | ○ | ○ | ○ |
|                 |                                     | Myeloperoxidase 활성                                                                        |                       | ○ | ○ | ○ |
|                 |                                     | Calprotectin                                                                              |                       | ○ | ○ | ○ |
|                 | 적혈구 침강 속도                           |                                                                                           |                       | ○ | ○ |   |
|                 | 조직<br>변화                            | 조직학적 손상 정도 및 병변                                                                           |                       |   | ○ |   |
|                 | 지사<br>효과                            | 설사 빈도, 완화 소요 시간 등                                                                         |                       |   | ○ | ○ |
|                 | 임상적<br>증상                           | 설사 수준<br>(Visual analogue scale, Likert scale)                                            |                       |   |   | ○ |
| 장내<br>미생물<br>개선 | 세균<br>동정 및<br>세균수                   | 유익균                                                                                       | 비피더스균, 락토바실러스균 등      | ○ | ○ | ○ |
|                 |                                     | 유해균                                                                                       | 병원성 대장균,<br>황색포도상구균 등 | ○ | ○ | ○ |
|                 | 메타지노믹스(metagenomics)                |                                                                                           |                       |   |   | ○ |
|                 | 장내 세균에 의한 부패산물                      |                                                                                           | ○                     | ○ | ○ |   |
|                 | 장내 유해효소 활성( $\beta$ -glucuronidase) |                                                                                           | ○                     | ○ | ○ |   |
|                 | 장내 pH                               |                                                                                           | ○                     | ○ | ○ |   |
|                 | 단쇄지방산(short chain fatty acids)      |                                                                                           | ○                     | ○ | ○ |   |
|                 | 탄소원이용능                              |                                                                                           | ○                     |   |   |   |
|                 | 항균기능 ( $\beta$ -defensin-2)         |                                                                                           | ○                     |   |   |   |
|                 | 장 상피세포주에 대한 병원균 점착저해 활성             |                                                                                           | ○                     |   |   |   |
| 장<br>불편감<br>완화  | 장내미생물<br>불균형                        | 소장내 세균 과증식                                                                                |                       |   | ○ | ○ |
|                 |                                     | 단쇄지방산(short chain fatty acids)                                                            |                       |   | ○ | ○ |
|                 |                                     | 트리토판수산화효소                                                                                 |                       | ○ | ○ | ○ |
|                 |                                     | 세로토닌                                                                                      |                       | ○ | ○ | ○ |
|                 | 장기능이상                               | 대장통과시간                                                                                    |                       |   | ○ |   |
|                 |                                     | 직장항문압 측정 검사                                                                               |                       |   |   | ○ |
|                 | 장막<br>염증<br>작용 및<br>투과성<br>조절       | 림프구 아형                                                                                    |                       |   | ○ | ○ |
|                 |                                     | 사이토카인, 프로스타글란딘 E2                                                                         |                       | ○ | ○ | ○ |
|                 |                                     | 세포 주위 투과성<br>(paracellular permeability)                                                  |                       | ○ |   |   |
|                 |                                     | 장점막단백질 인산화(MLCK(myosin<br>light chain kinase), pMLC(myosin<br>light chain), TJs proteins) |                       | ○ | ○ |   |
|                 |                                     | 장세포상하층부 전기저항치<br>(transepithelial electrical resistance, TER)                             |                       | ○ | ○ |   |
|                 | 배변<br>장애                            | 배변횟수                                                                                      |                       |   | ○ | ○ |
|                 |                                     | Anti-diarrhea activity                                                                    |                       |   | ○ |   |
|                 |                                     | FWC(fecal water content)                                                                  |                       |   | ○ |   |
|                 |                                     | Behavioral pain responses                                                                 |                       |   | ○ |   |
|                 | 임상적<br>증상                           | 대변 특성 점수                                                                                  |                       |   |   | ○ |
|                 |                                     | 불편감(복통, 배변의 변화, 복부 팽만감 등)에<br>대한 주관적 평가(VAS)                                              |                       |   |   | ○ |
|                 |                                     | 과민성 장증후군 시각유사척도<br>설문지(VAS-IBS questionnaire)                                             |                       |   |   | ○ |



## 나. 바이오마커 설명

### (1) 배변활동원활

#### (가) 변 중량

변의 양(bulk)이 많아지면 장의 연동운동이 촉진되고, 배출시간이 감소하므로 배변 활동이 개선되었음을 반영한다.

#### (나) 변의 굳기 및 형태

##### ① 변의 수분함량

변이 적당한 수분을 함유하면 부드러워져 배변활동이 원활해진다. 정상적인 수분함량은 70-80%로 변비 증상을 가진 사람들은 수분함량이 70% 미만인 딱딱한 변의 특성을 보인다.

##### ② 변의 형태(Bristol stool form scale, BSFS)

변의 형태는 배변활동의 일관성에 대한 간접 척도로 간주될 수 있으며, 시각적으로 평가할 수 있는 대변의 모양과 외관을 의미한다. 변의 형태 척도는 대변 형태를 제한된 수의 범주로 분류하고 표준화하여 저렴한 방법으로 의사, 의료 전문가, 연구자, 환자 및 일반 대중이 훈련 없이도 사용할 수 있다. 가장 단단한 1단계부터 가장 부드러운 7단계의 형태로 구분되며 3, 4, 5단계 형태의 변이 가장 정상적인 형태로 간주된다.

### (다) 소화관 운동능

#### ① 대장통과시간(intestinal transit time)

대장통과시간(intestinal transit time)은 어떠한 물질을 섭취하여 그 물질이 장을 통과해서 변으로 나오는 데 걸리는 시간을 의미한다. 대장통과시간이 지나치게 긴 것은 변비와 관련 있기 때문에 장 운동성 평가지표로 사용될 수 있다.

#### ② 장관 운동능

장내 배변활동과 연관이 있다.

### (라) 임상적 증상

배변 습관과 관련된 증상에 대하여 문진 조사를 실시하여 증상 개선을 평가한다.

## (2) 장관 면역 조절

### (가) 점막 장벽 기능(mucosal barrier function)

점막 장벽 기능(mucosal barrier function)은 물리적 방벽과 화학적 방벽 기능으로 분류되며 항균성 펩티드, 장 상피세포, 면역세포, 흡수성 세포, 점액관련인자, 밀착연접 단백질 등을 통칭한다.

점막 장벽기능의 측정은 대개 침습적 방법(invasive method)으로 인체연구에 적용하기에는 어려움이 따르기 때문에 다음과 같이 점막 장벽 기능을 간접적으로 측정할 수 있는 비침습적 방법을 사용할 수 있다.

#### ① 장 투과성 검사(intestinal permeability test)

장 투과성의 증가는 장 내강에서 내독소의 순환 축진을 초래하기 때문에 장관 면역의 지표로 사용된다. 장 투과성은 유당/만니톨 소변검사와 배변의 조눌린 농도를 측정하는 방법이 있다.

#### ② 장내 세균 전위 평가(bacterial translocation test)

장내 세균의 전위는 장내 미생물 및 거대 분자가 장 점막 장벽을 통과하여 혈류 또는 림프계로 방출되는 것이다. 장내 세균 전위는 점막면역은 약화를 나타내는 지표이며, 혈청 및 분변 등 비침습적인 방법으로 측정할 수 있다.

#### ③ 점막 장벽 온전성(mucosal barrier integrity)

점막 장벽 온전성 평가에는 항균성 펩티드가 포함되며 이는 소장 Paneth cell와 일반 장세포, 면역세포에서 분비된다. 여기에는 defensins, cathelicidin, regenerating islet-derived protein(Reg) III $\gamma$ , elafin, secretory leukocyte protease inhibitor, bactericidal/permeability-increasing protein, lysozyme, lactoferrin 등이 존재하며 미생물, 곰팡이, 바이러스 및 원생동물들의 국소적인 차단에 기여한다. 항균성 펩티드는 추가적인 생물학적 특성을 나타내며 예를 들어 defensin alpha 5는 IL-8 분비를 유도하는 반면, cathelicidin는 항세포자멸사 및 점막치유효과를 나타내며 elastin은 protease 억제제이다.

또한 점막 장벽 온전성 평가에는 밀착 연접 단백질(tight junction proteins)이 포함되는데 막 관통 장벽 단백질(claudins, junctional adhesion molecules, coxsackie adenovirus receptor, marvelD3, occludin 및 tricellulin 등)과 세포질 scaffolding 단백질(ZO family, cingulin 및 afadin 등)로 구성되어 있으며, 이는 세포 내 세포골격(actin 및 미세소관) 및 조절 단백질(aPKC, G proteins, Rab13 및 Rab3B)과 연결된다.

#### ④ 뮤신 분비 및 유전자 발현

장 점막에서 분비되는 점액물질로서 결장 장벽(barrier) 기능을 한다. 인체에서는 최소한 9개의 뮤신 유전자가 발견되었으며, 결장에는 MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC 유전자가 발현된다. 이 중에서 MUC2는 소장, 대장의 주요 겔 형성(gel-forming) 뮤신이다.

#### ⑤ 장세포상하층부 전기저항치(transepithelial electrical resistance, TER)

TER은 막에 의한 전기저항을 나타내는 값으로 세포의 tight junction에 의해 형성된 저항을 측정하는데 활용할 수 있는 방법이다.

#### ⑥ intestinal fatty acid binding protein(I-FABP)

I-FABP는 장막 상피세포에 생성되는 세포내 단백질이며, 특히 소장 및 대장에서 많이 존재한다. 장막 손상이 발생하는 경우 I-FABP는 혈액으로 방출되어 혈중 농도가 높아지게 된다. 이는 장막 장벽 기능의 주요한 지표가 된다.

### (나) 염증반응 및 면역 조절

#### ① 사이토카인

##### ■ Tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$

장 조직의 호중구를 끌어 모으는데 중요한 역할을 하며, 육아종 형성 등을 통해 염증성 장질환의 기전에 관여한다. TNF- $\alpha$  생성량의 변화에 따라서 장 손상 개선 효과를 평가할 수 있다. TNF- $\alpha$  생성이 증가하면 염증성 매개체로 작용하며 장 조직으로 염증세포의 침윤을 촉진하는 등, 장의 염증 반응을 촉진한 것이며, TNF- $\alpha$  생성이 감소했다면 항염증 효과에 의해 염증성 장질환의 염증 반응을 억제하여 장 손상을 개선하였다고 판단할 수 있다.

##### ■ Interferon(IFN)- $\gamma$

염증성 장 질환에서 증가한다고 알려진 사이토카인 중 하나다. 시험물질이 IFN- $\gamma$  생성에 미치는 영향을 관찰함으로써 염증성 장 질환에서 항염증 효과에 의한 장 손상 개선의 효과를 평가한다.

### ■ Interleukin(IL)-1 $\beta$

염증반응을 유도하는 대표적인 사이토카인으로 염증성 장 질환과 관련된 염증 매개체이다. IL-1 $\beta$ 는 eicosanoid 생성과 T 림프구의 활성화, 혈관 투과성의 항진 등을 유발하여 염증 과정에서 중요한 역할을 하며, NF- $\kappa$ B를 활성화 시켜 염증을 발생시키기에 염증과 관련하여 예민한 지표로 알려져 있다. IL-1 $\beta$  생성이 증가하면 염증성 매개체로 작용하며 면역 세포를 활성화하는 등 장의 염증 반응을 촉진시키며, IL-1 $\beta$  생성이 감소했다면 항염증 효과에 의해 염증성 장질환의 염증 반응을 억제하여 장손상을 개선하였다고 판단할 수 있다.

### ■ Interleukin(IL)-6

염증성 장 질환에서 증가한다고 알려진 사이토카인 중 하나로 IL-6생성에 미치는 영향을 관찰함으로써 염증성 장질환에서 항염증 효과에 의한 장 손상 개선의 효과를 평가한다. IL-6 생성이 증가하면 염증성 매개체로 작용하며 면역 세포를 활성화하는 등 장의 염증 반응을 촉진하며, 시험물질에 의해 IL-6 생성이 감소했다면 항염증 효과에 의해 염증성 장질환의 염증 반응을 억제하여 장 손상을 개선하는데 효과가 있다고 해석할 수 있다.

### ■ Interleukin(IL)-8

친염증성 사이토카인으로, 호중구나 과립성 백혈구에 주화성(chemotaxis)을 유도하여 이들 세포를 감염 부위로 이동하도록 만들고, 식균작용(phagocytosis)을 유도한다.

### ■ Interleukin(IL)-10

항염증성 사이토카인으로, 생성이 증가하면 염증 반응을 억제하고 장 상피세포층의 견고함을 유지시켜 주는 역할을 한다. IL-10 생성에 미치는 영향을 관찰함으로써 염증성 장 질환에서 항염증 효과에 의한 장 손상 개선의 효과를 평가한다. IL-10 생성이 증가하면 항염증 효과에 의해 염증성 장질환의 염증 반응을 억제하여 장 손상을 개선하는데 효과가 있다고 판단할 수 있다.

## ② 면역 작용

### ■ Phagocytic activity(식균작용)

호중구와 단핵백혈구에 의한 식균작용(phagocytosis)을 측정하여 면역기능을 평가할 수 있다.

### ■ Oxidative(respiratory) burst

호중구나 단핵백혈구로부터 활성산소종(reactive oxygen species)이 빠르게 분비되는 것을 말하는데, 식균세포가 침입한 박테리아 등을 분해(degradation)할 때 발생한다.

### ■ IgG, IgA

IgG와 IgA의 농도는 염증성 장질환의 활동도에 따라 차이를 나타내기 때문에 장 염증 여부를 판단하는 지표로 사용된다. Y자형 항체의 줄기에 해당하는 FC부위의 아미노산 서열에 따라 나뉘는 면역글로불린이며 세포 외액에 있는 바이러스나 박테리아에 대한 전반적인 특이적 면역반응을 제공한다.

### ■ 림프구 아형(lymphocyte subsets)

T 세포와 B 세포를 포함하는 면역세포는 세포 표면에 존재하는 단백질 분자에 의해서 구분되는데, 모든 T 세포는 CD3이, 모든 B세포에는 CD19와 CD20이 발현된다. T 세포 아형(subsets)에서는 세포독성 T세포(cytotoxic T cell)는 CD8이, 조력 T세포(T-helper cell;Th)는 CD4, 조절 T세포(regulatory T cell)는 CD4와 CD25가 발현된다. 각 림프구아형이 체내에서 하는 역할이 다르다. 조력 T세포(T-helper cell;Th)는 Th1 과 Th2로 나뉘며, Th1은 interferon(IFN)- $\gamma$ , tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$ 와 같은 사이토카인을 분비함으로써 대식세포(macrophage)를 활성화시키고, 세포독성 T세포의 역할을 포함하는 표적세포를 죽이는 반응(killing mechanism)을 유도한다. Th2는 IL-4, IL-5, IL-13 등의 사이토카인을 분비하는데, 이들 사이토카인은 IgE가 중재하는 알레르기 반응(IgE-mediated allergic reaction)에 관여한다. 즉 IL-4 와 IL-13은 B세포를 분화시켜 IgE를 생산하도록 하며, IL-5는 호산구를 자극한다. 조절 T세포는 면역반응을 억제하는 역할을 함으로써, 면역반응을 일으키는 세포독성 T세포, 조력 T세포와는 서로 반대되는 역할을 한다.

### ■ T-세포 조절인자(CD4+CD25high, CD4+LAP+)

조절 T세포(regulatory T cell)는 CD4+CD25+ T세포와 type 1 regulatory T (Tr1) 세포를 포함한다. 조절 T세포와 Tr1세포는 대장염 동물 모델에서 염증을 조절하는 역할을 한다. 조절 T세포 중에서 세포 표면에 transforming growth factor(TGF)- $\beta$ 의 불활성 형태를 표현하는 latency-associated peptide(LAP) T 세포의 경우, TGF- $\beta$ -의존 메커니즘을 통해서 실험상의 대장염을 억제하는 것으로 알려져 있다. 사람의 경우 조절 활동을 하는 CD4+CD25+ T세포는 세포 표면에 CD25가 강하게 발현(high expression)된다. 동물의 대장 조직이나 사람의

PBMC(peripheral blood mononuclear cells)에서 CD4+CD25 high T 세포나 CD4+LAP+ T세포의 발현 증가는 항염증 효과가 있다고 해석될 수 있다. 조절 T세포(regulatory CD4+CD25+ T cells)의 생성과 기능을 위한 주요 전사 인자인 FOXO(forkhead transcription factors of the O class)를 함께 측정할 수도 있다.

### ③ 염증 반응 관련 인자

#### ■ Leukotriene B4(LTB4)

루코트리엔(Leukotriene;LT) B4는 아라키돈산으로부터 유도되는 eicosanoids의 일종으로, 염증반응 제2기에 활동하는 백혈구 중 주로 PMNL에서 생합성 되어 백혈구 응집, 침윤, 주화성, 라이소좀 효소의 유리 등의 작용을 나타내는 물질로 면역세포에서 염증반응을 유발하며 염증성 세포의 활성화에 관여하므로 강력한 염증 매개체로 작용한다. LTb4 증가 시 염증성 장질환이 유발되기에 이를 억제하는 것이 염증 치료에 주요한 기전으로 판단된다.

#### ■ Prostaglandin E2(PGE2)

면역 세포가 활성화되어 IL-1, IL-6와 같은 사이토카인이 분비되어 뇌 혈관의 내피세포에 작용하여 내피세포에서 프로스타글란딘 합성 효소군에 의해 프로스타글란딘 E2라는 물질이 만들어진다. 궤양성 대장염을 포함한 장의 염증 반응에 있어서 장 점막 손상을 유발하는 물질로 판단한다.

#### ■ C-Reactive Protein(CRP)

급성 염증반응에서 가장 중요한 단백질로서 간세포에서 분비된다. 건강한 사람의 혈액에 있어서는 1 mg/L 미만의 낮은 농도로 유지되지만, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 등의 사이토카인에 의해 유도되는 급성 염증반응 시에 350-400 mg/L의 농도까지 급격히 상승한다. 10-40 mg/L의 농도는 만성 염증 또는 바이러스 감염을 나타낸다.

#### ■ Inducible nitric oxide synthase(iNOS)

염증반응 동안에 대식세포의 세포기능을 조절하는 데 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ 와 같은 염증성 사이토카인의 자극에 의해서 증가되어 과도한 NO 생성을 통해 만성적인 염증반응에 있어서 해로운 역할을 한다.

#### ■ NF-kB

NF-kB는 염증반응과 발생과정에 중요한 신호전달 물질로 기전 연구의 주된 바이오마커이다. 세포에 염증을 발생시키는 자극을 주게 되면 NF-kB가 활성화 되어 핵

내의 target gene에 붙어 좋지 않은 물질들을 생성하게 된다. 따라서 장 조직 내 NF-kB 활성을 지연시키는 것은 염증 반응을 억제함으로써 장 손상을 개선하는 데 효과가 있다고 판단한다.

#### ■ MPO(Myeloperoxidase)활성

MPO는 호중구(neutrophil)에 풍부한 효소로서, 염증 발생 시 활성화되어 MPO 분비가 증가되므로 조직의 염증정도를 나타내는 기전 지표로 사용될 수 있다.

#### ■ Calprotectin

Calprotectin은 주로 호중구로부터 유리되는 칼슘과 아연결합 단백질로, 중성구 세포질 단백질의 50~60%를 차지하며 세포가 파괴되거나 활성화되면 세포 외로 분비되므로 염증 정도와 비례하는 민감한 표지자로 알려져 있다. 기전 및 임상 지표로 모두 활용 가능하다.

#### ④ 적혈구 침강 속도(Erythrocyte Sedimentation Rate;ESR)

적혈구 침강 속도는 혈장에서 적혈구가 이동하는 속도인데, 이는 혈장 내 적혈구의 크기와 농도에 따라 달라진다. 염증, 조직손상으로 인해 ESR이 증가하게 된다.

#### (다) 장의 조직학적 평가

장 염증모델을 이용한 동물실험에서 염증성 장 질환에서 볼 수 있는 점막 조직의 비후, 발적, 염증, 조직괴사로 인한 궤양 등의 대장병변의 정도를 육안으로 관찰하거나 조직 절편을 hematoxylin-Eosin(H&E) 이중염색 한 후 현미경을 통해 관찰한다.

#### (라) 지사 효과

시험동물에게 감염원(로타바이러스 등의 바이러스, 살모넬라, 비브리오, 대장균 등의 세균, 기생충 등)을 투여하여 감염을 유도한 후, 실험 식이를 공급하면서 설사의 빈도를 조사하고 분변에서 감염원의 농도를 측정함으로써 시험식이의 효과를 검증할 수 있다. 또한 동물실험에서 설사가 유도된 동물을 대상으로 시험물질 섭취 후 변 내 수분량을 측정하여 설사가 완화되는지 여부를 확인하기도 한다.

#### (마) 임상적 증상

설사의 심한 정도를 자가 판단하여 작성하도록 하고 이를 근거로 Likert scale 또는 VAS(visual analogue scale)를 이용하여 평가함으로써 장 건강에 문제가 있는 대상자들의 임상 증상 개선도를 평가할 수 있다.

### (3) 장내 미생물 개선

#### (가) 세균 동정 및 세균 수

장내 서식하는 세균의 수와 종류를 측정함으로써 장내 환경의 적합성을 판단하는데 이용된다. 변을 균질화하여 배지를 사용해 도말한 뒤 일정시간동안 혐기적·호기적 배양하여 배양된 집락의 수를 계수하여 주요한 유익균 또는 유해균의 분포를 확인하는 방법이 있고, 전체 세균의 분포를 확인하는 방법이 있다.

#### (나) 메타지노믹스(metagenomics)

장내 미생물의 종류와 수가 워낙 많고, 혐기적 조건이 필요하기 때문에 장내 미생물의 80% 정도는 변 내 미생물 세포배양을 통해서 분리동정하기 어렵다는 한계가 있다. 이러한 제한점을 해결하기 위해 PCR (polymerized chain reaction)과 'full bacterial sequencing' 기법을 활용한 메타지노믹스가 이용되고 있다. 또한 최근에는 형광 단백질 표지방법을 활용하여, 본래 장에 존재하던 미생물종과 섭취한 미생물종을 구분하여 분석하는 방법도 활용되고 있다. 사람의 경우 주로 변에서 측정되어진다.

#### (다) 장내 세균에 의한 부패산물 측정

장내세균 중 유해균(*E. coli*, *Clostridium*, *Bacterodaceae*, *Streptococcus faecalis*, *Proteus*)들은 부패산물을 생성한다. *E. coli*와 *Clostridium*은 암모니아, 아민을, *Bacterodaceae*와 *Streptococcus faecalis*는 니트로소아민, 아글리콜, 2차 담즙산을, *Proteus*는 암모니아, 아민, 인돌을 생산한다. 반면, 비피더스균이 증식되면 유기산의 생성을 증가시켜 암모니아, 인돌, 페놀 등 유해물질들의 생성을 억제하므로 장 기능 개선 평가에 사용된다.

#### (라) 장내 유해효소( $\beta$ -glucuronidase) 활성 측정

$\beta$ -glucuronidase는 장내 세균에 의해 생성되는 효소로 장관 내 각종 질환에 핵심적 역할을 한다고 알려져 있다.  $\beta$ -glucuronidase는 장간 순환 물질의 탈포합(deconjugation)에 주로 관여한다. 즉 간에서 benzopyrene 등의 지용성 유독 물질과 글루쿠론산(glucuronic acid) 등의 친수성 그룹은 포함되어 glucuronic acid conjugate 형태로 무독화되어 장으로 보내지는데, 장내에 존재하는  $\beta$ -glucuronidase는 글루쿠론산과의 결합을 끊어 주어 포함체를 가수분해하고, 결과적으로 독성 물질을 제공하게 된다. 장관 내 염증은 장내균총에 의해 생성되는



$\beta$ -glucuronidase의 활성화에 기인한다고 알려져 있으며, 몇몇 연구에서는 이 효소의 활성 증가가 결장 종양 형성 증가와 관련되어 있음을 검증하였다.  $\beta$ -glucuronidase의 활성화는 장내 미생물 무리의 구성에 의해 영향을 받으며 주로 *Clostridium perfringens*, *E. coli*, *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus* 등의 장내 유해균에 의해 생성되는 것으로 알려져 있다.

#### (마) 장내 pH

장내 미생물 중 유익균인 유산균(*Bifidobacteria* 등)을 증식시켜 장내에서 높은 상태로 유지시켜 준다면 유산균은 유산 및 초산 등 유기산을 생성하여 장내의 pH가 저하된다. 장내 세균이 생성하는 효소들은 장 질환과 밀접한 관계를 가지며 장내의 pH에 의해 영향을 받는데, 장내의 높은 pH에 의해 유해효소의 활성이 유도된다. 따라서 장내 pH를 낮추면 부패성 세균의 증식을 억제하고 유해 효소 활성을 저하시킴으로써 장내 환경이 개선된다.

#### (바) 단쇄지방산(short chain fatty acids, SCFA)

난소화성 다당류 섭취 시 장내균총에 의해 생성되는 단쇄지방산은 대장 내 세균의 세포증식을 촉진시키고, 대장 내 질소를 세균의 단백질합성에 이용하게 하여 결과적으로 대장 내 질소를 감소시킨다. 또한 생성된 단쇄지방산은 장 내 pH를 저하시켜 높은 pH 조건에서 성장하기 쉬운 유해균을 억제시키고, 유해효소의 활성을 저해함으로써 건강에 유익한 장내균총 환경을 형성하는 역할을 한다.

※ pH 나 단쇄지방산의 경우 이들 바이오마커 단독으로 효과를 검증하는 방법으로 사용되기 보다는 유익균이나 유해균 수의 증감, 유해균이 만들어내는 유해효소의 활성 변화 등을 설명하는 메커니즘을 설명하는 수단이 될 수 있다.

#### (사) 탄소원 이용능

식이 탄수화물은 장내 미생물 총의 주요 탄소 및 공급원이며 미생물은 유기 탄소원에서 에너지와 세포구성성분을 합성하여 성장한다. 탄소원의 다양성은 장 미생물 총의 구성을 다양하게 조절하고 미생물의 종류에 따라 선호하는 탄소원이 상이하다. 미생물의 구성과 수에 따라 탄소원을 소비하는데 차이가 있다.

#### (아) 항균기능 ( $\beta$ -defensin-2)

세포를 이용한 기전 연구 바이오마커로 활용되며, 그람양성 및 음성균, 곰팡이,

원생생물과 외피를 갖는 바이러스(enveloped virus)에 대해 항미생물효과를 나타낸다. 그 기전은 막투과(membrane permeabilization)의 증가, 세포벽 파괴효소의 활성화, 막부착 효소 및 세포내 기전의 방해 등을 통해 이루어진다.

소장 점막의 paneth 세포에서 생산되는 양친매성 항균 펩타이드로 그람 양성 및 그람 음성 세균을 사멸할 수 있다. Defensin의 양이온 아미노산과 세균 세포막의 음이온 인지질 부분이 반응하여 접합한 후 Defensin의 소수성 아미노산 부분이 세균의 세포막지질층으로 침투, 구멍을 내어 세균을 사멸시킨다.

#### (자) 장 상피 세포에 대한 병원균 접촉저해 활성화

장 상피 세포를 이용하여 유익균과 유해균의 접촉 활성을 측정하여 장내 미생물 개선도를 파악할 수 있다.

### (4) 장 불편감 완화

#### (가) 장 기능 이상

##### ① 대장통과시간(intestinal transit time)

대장통과시간(intestinal transit time)은 어떠한 물질을 섭취하여 그 물질이 장을 통과해서 변으로 나오는 데 걸리는 시간을 의미한다. 대장통과시간이 지나치게 긴 것은 변비와 관련 있기 때문에 장 운동성 평가지표로 사용될 수 있다.

##### ② 직장항문압 측정검사

직장항문기능검사는 하부 직장과 항문관의 압력 및 감각 기능을 측정하여 직장 및 항문의 기능성 질환을 진단할 수 있다. 변비, 변실금, 항문통 등 배변 장애 환자의 항문 및 직장의 신경, 근육 기능을 측정하기 위해 검사를 시행한다.

#### (나) 장막 염증 작용 및 투과성 조절

##### ① 림프구 아형

T 세포와 B 세포를 포함하는 면역세포는 세포 표면에 존재하는 단백질 분자에 의해서 구분되는데, 모든 T 세포는 CD3이, 모든 B세포에는 CD19와 CD20이 발현된다. T 세포 아형(subsets)에서는 세포독성 T세포(cytotoxic T cell)는 CD8이, 조력 T세포(T-helper cell;Th)는 CD4, 조절 T세포(regulatory T cell)는 CD4와

CD25가 발현된다. 각 림프구 아형의 비율을 측정함으로써 장내 염증 정도를 파악할 수 있다.

## ② 사이토카인, 프로스타글란딘

### ■ 사이토카인

다양한 염증성 사이토카인(IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$  등이 있을 수 있으며, 염증 정도를 판단할 수 있다.

### ■ 프로스타글란딘 E2

면역 세포가 활성화되어 IL-1, IL-6와 같은 사이토카인이 분비되어 뇌 혈관의 내피세포에 작용하여 내피세포에서 프로스타글란딘 합성 효소군에 의해 프로스타글란딘 E2라는 물질이 만들어진다. 궤양성 대장염을 포함한 장의 염증 반응에 있어서 장 점막 손상을 유발하는 물질로 판단한다.

## ③ 세포 주위 투과성 (paracellular permeability) 검사

세포 주위 투과성은 세포 간 공간을 통해 상피세포를 가로질러 물질이 이동하는 것을 의미하고, 장점막단백질의 인산화를 통해 조절된다. Claudins와 occludin은 TJ의 두 가지 주요 전단막 단백질로, 서로 다른 이온이나 큰 분자에 대한 paracellular permeability를 주로 결정한다.

## ④ 장점막 단백질 인산화

장점막 단백질의 인산화는 장점막의 기능과 구조를 조절하는 기능을 가진다. 대표적인 장점막 단백질은 myosin light chain, tight junction 등이 있다. Myosin light chain II (MLC-2)는 장점막의 paracellular 투과성을 조절하는 중요한 단백질로, 장의 paracellular 투과성을 변경하는 데 중요한 역할을 한다. MLC-2의 인산화는 perijunctional actomyosin ring의 수축에 대한 생화학적 표지로, apical junctional complex를 조절하여 paracellular 투과성을 증가시킨다. MLC-2의 인산화는 주로 myosin light chain kinase (MLCK)와 rho-associated coiled-coil containing protein kinase (ROCK)에 의해 조절된다. 염증성 사이토카인이 장점막에 작용하면, MLCK가 활성화되고, 이로 인해 MLC-2의 인산화가 증가하게 된다. 이는 actomyosin ring의 수축을 촉진하고, tight junction protein complex에 대한 actin의 고정을 감소시켜 장점막의 투과성을 감소시키게 된다.

## ⑤ 장세포상하층부 전기저항치(transepithelial electrical resistance, TER)

TER은 막에 의한 전기저항을 나타내는 값으로 세포의 tight junction에 의해 형성된

저항을 측정하는데 활용할 수 있는 방법이다.

## (다) 장내 미생물 불균형

### ① 소장내 세균 과증식

소장내 세균 과증식은 소장 내 세균의 수가 증가하거나 비정상적인 종류의 세균 양이 증가한 경우를 의미하며, 장 기능 이상으로 인해 소장내 세균이 증식하게 되면, 소장 세균에 의해 소장 내 단쇄지방산의 생성이 증가하고, 설사를 유발하게 된다.

### ② 단쇄지방산

복합 탄수화물은 대부분 아세트산, 프로피온산, 부티르산 등의 단쇄지방산을 생성하는 데, 특히 부티르산을 생산하는 점은 장내축의 기능에 있어 중요하며, 장표피 세포벽을 공고하게 하고, 면역계를 향상시키는 점에서 장내 불편감의 개선시키는 작용을 할 수 있다.

### ③ 트립토판수산화효소

IBS군에서의 비정상적인 세로토닌 신호 전달에 유발하는 효소이며 식이성 트립토판으로부터 세로토닌을 생성하는 효소이다.

### ④ 세로토닌

5-HT, 또는 세로토닌은 중추신경계와 장내신경계에서 발견되는 신경전달물질로, 장의 기능에도 중요한 역할을 한다. 장내에서의 흡수와 이송, 그리고 액체 분비 등의 조절에 관여하며, 기능의 이상은 과민성 장증후군 등의 장 장애를 유발할 수 있다. 세로토닌 수준이 증가하면 장의 운동성이 증가하여 설사형 IBS를 유발할 수 있고, 세로토닌 수준이 감소하면 장의 운동성이 감소하여 변비형 IBS를 유발할 수 있다. 이러한 작용 기전으로 세로토닌 수용체에 대한 약물치료가 진행되고 있다.

## (라) 배변 장애

### ① 배변횟수

배변횟수에 따라 경험하고 있는 장불편감의 개선 여부를 파악할 수 있다.

### ② Anti-diarrhea activity

동물 실험에서 진행하며, anti-diarrhea activity를 통해 시험물질이 설사를 억제하거나 완화하는 능력을 평가하는 것이다. 대표적으로는 기름나무 오일로 유발된

설사, 장내 유동성 증가, 그리고 장관 운동성 테스트 등이 있고, 대변의 양과 빈도, 장내 액체의 양과 운동성 등 다양한 매개변수를 측정함으로써 이루어진다.

### ③ FWC (fecal water content)

Fecal water content는 대변의 수분 함량을 나타낸다. 일반적으로, 대변은 약 75%의 수분과 25%의 고형물로 구성되고, 고형물은 소장에서 소화되거나 흡수되지 못한 음식물의 잔여물, 대장에서 분해된 세균, 그리고 상피세포 등을 포함한다. 따라서, fecal water content는 대변의 물질 구성을 이해하는 데 중요한 요소이다.

### ④ Behavioral pain responses

동물모델에서 통증에 대한 행동 반응을 분석할 수 있으며, 통증에 따라 다양한 행동 양상을 나타내게 된다. 복부를 핥는 것, 하복부를 바닥에 짓누르는 것, 복부를 짹 뺏는 것 등을 포함할 수 있다.

## (마) 임상적 증상

### ① 대변 특성 점수

대변 특성 점수는 대변의 물리적 특성을 평가하는 척도이며, 대변의 색깔, 무게, 모양, 빈도 등을 포함할 수 있다. 대변의 특성은 건강 상태, 특히 장 건강을 평가하는 데 중요한 정보를 제공한다.

### ② 복부 불편감 점수

복부 불편감 점수는 복통, 배변의 변화, 복부 팽만감 등에 대한 복부의 불편감이나 통증의 정도를 평가하는 척도이며, 복부의 불편감이나 통증의 심각도, 지속도 등을 측정한다.

### ③ 과민성 장증후군 시각유사척도 설문지

과민성 장증후군의 증상을 평가하는 데 사용되는 도구이며, 복통, 배변 습관의 변화 등과 같은 IBS의 주요 증상을 평가한다.

## 2. 바이오마커의 측정방법

### 가. 배변활동원활

#### (1) 변 중량

실험동물 혹은 사람의 배변 활동 후 빠른 시간 내에 변을 채취하여 즉시 저울을 이용해 습중량을 측정한다. 1일 평균 변 무게는 연속되는 3-5일 동안의 총 습중량을 측정하여 평균을 구한다.

#### (2) 변의 굳기 및 형태

##### (가) 변의 수분함량

실험동물 혹은 사람의 배변 직후 변의 습중량을 측정한 뒤, 변을 냉동건조하여 건중량을 측정한다. 습중량에서 건중량을 뺀 값을 변의 수분량으로 한다.

##### (나) 변의 형태(Bristol stool form scale)

브리스톨 대학에서 개발된 7단계 측정도구를 사용해서 육안으로 변 굳기의 단계를 측정한다. 타입 1, 2에 속하는 경우 변비일 가능성이 높으며, 3, 4단계는 정상적인 변의 상태이다. 5, 6, 7은 단계가 높아질수록 설사에 가깝고 위급한 증상이다. 하지만, 이 경우 변의 굳기(농도)에만 초점이 맞춰져있어 잔변감과 복부 더부룩함 또는 복부 팽만감 등 다른 부작용을 파악하기는 어렵다.

#### THE BRISTOL STOOL FORM SCALE

|        |                                                                                     |                                                 |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Type 1 |  | Separate hard lumps, like nuts (hard to pass)   |
| Type 2 |  | Sausage-shaped but lumpy                        |
| Type 3 |  | Like a sausage but with cracks on its surface   |
| Type 4 |  | Like a sausage or snake, smooth and soft        |
| Type 5 |  | Soft blobs with clear-cut edges (passed easily) |
| Type 6 |  | Fluffy pieces with ragged edges, a mushy stool  |
| Type 7 |  | Watery, no solid pieces ENTIRELY LIQUID         |

[출처 : Aliment Pharmacol Ther. 2016 Oct;44(7):693-703]

### (3) 소화관 운동능

#### (가) 대장통과시간(intestinal transit time)

대장통과시간 측정방법은 다양한데, 방사선비투과물질(radio- opaque pellets)을 다량 1회 섭취하거나 소량 매끼 식사 때마다 복용한 후 대변으로 나올 때까지 걸리는 시간을 측정하는 방법들이 있다. 다른 방법들은 방사선비투과물질이나 방사능을 나타내는 시험물질을 복용한 후 복부를 각각 방사선이나 감마-카메라로 촬영한다. 또한 대장통과시간이 지나치게 짧은 것은 설사와 관련이 있기 때문에 설사의 개선을 평가할 때 대장통과시간을 활용하기도 한다.

##### ① 방사선비투과물질(Radio-opaque pellets)

방사선비투과물질(radio-opaque pellets)을 이용한 대장 통과시간 측정법에는 다량(20개)을 1회 섭취하거나 매끼 식사 때마다 복용한 후 대변으로 나올 때까지 걸리는 시간을 측정하는 방법들이 있다. 다량을 1회만 섭취한 방법은 총 마커보다 적은 양의 배설물에 의존해야하고 오차가 많이 나기 때문에, 14일간 10개의 마커를 아침식사와 함께 섭취하고 하루에 한번씩 복부 방사선 촬영하는 방법이 제시되었다. 환자는 평소 식단을 유지하여야하며 검사기간동안 완하제를 복용하여서는 안된다. 정확도를 보완하기 위해 분변을 수집하여 추가적으로 분석한다.

##### ② 동위원소표지(Isotope labelled test meal)

금식한 상태로 방사선 동위원소인  $^{111}\text{In}$ 이나  $\text{Tc-99M}$ 을 투여하여 신틸레이션 카메라로 촬영한다. 소장과 대장 둘다 통과시간을 측정하는데 유용하며 따로 배변을 수집할 필요가 없다.

#### (나) 장관 운동능

동물연구에서 사용할 수 있는 방법으로 소화관 부위를 떼어내어 근육절편의 수축력과 수축빈도, 수축 장력 값을 장관운동기록법(physio graph)을 이용하여 분석한다. 이외에도 황산바륨을 이용한 방법이 있는데, 동물실험에서 일정기간 시험물질을 제공한 후 16시간 절식시키고 소장의 운동에 영향을 주는 물질과 함께 10% 황산바륨을 경구투여 한다. 그 다음 소화관 부위를 떼어내어 황산바륨의 이동거리를 구해 소화관 운동능을 평가한다.

### (4) 임상적 증상

배변횟수, 배변량, 변 굳기(stool consistency), 변의 색, 변의 냄새, 배변 후 상쾌함,

잔변감, 통변감, 가스생성 등에 대해서 대상자가 Likert 척도 또는 시각적 아날로그 척도(VAS)를 이용하여 평가하는 방법이 널리 이용되고 있다.

## 나. 장관 면역 조절

### (1) 점막 장벽 기능(mucosal barrier function) 평가

내시경 또는 수술 시 장 점막을 생검하여 점막층의 비극성 수준(hydrophobicity)을 직접 측정하거나 수술을 통해 장점막 일부를 얻어 이온 또는 특정 지표(만니톨, EDTA, peroxide 등)의 통과 수준을 전위차(electrical potential differences)로 기록하여 실시간 모니터링하는 방법이 있다. 하지만 이 방법들은 침습적 방법(invasive method)으로 인체연구에 적용하기에는 어려움이 따른다. 이러한 어려움을 해소하기 위해 다음과 같이 점막 장벽 기능을 간접적으로 측정할 수 있는 비침습적 방법도 개발되어 있다.

#### (가) 장 투과성 검사(intestinal permeability test)

이 방법은 경구 섭취한 시험물질의 소변 배설량을 측정하는 원리를 기본으로 하고 있는데, 이 때 사용하는 시험물질은 장관에서 수동확산(passive diffusion)에 의해 구조 변화 없이 흡수될 수 있어야 하고, 체내에서 대사되지 않고 소변을 통해 배설되어야 하며, 소변에서 쉽게 검출 가능해야 한다. 보통 분자량이 다른 시험물질로 함께 사용하여, 'transcellular permeability pathways'와 'paracellular permeability'를 동시에 측정한다.

가장 많이 사용하는 방법으로는 만니톨(mannitol)과 락툴로오스(lactulose)를 동시에 사용하여 측정하는 방법이 있다. 만니톨은 transcellular pathway에 의해 장관을 쉽게 통과할 수 있으나 락툴로오스는 보통 장관에서 거의 흡수되지 않는다. 하지만 장관 장벽 기능에 이상이 생긴 경우 장 투과도가 증가되어 paracellular pathway를 통해 락툴로오스가 과량 투과되게 된다. 결과적으로 소변 내 락툴로오스:만니톨 비율이 증가하게 된다. 검사 방법은 공복에 만니톨과 락툴로오스가 일정량 혼합된 용액을 마시고 난 뒤 일정시간 후 소변을 채취하여 소변 내 성분을 분석하여 체내 흡수된 양을 측정해 장 투과성 정도를 판정한다. 락툴로오스 대신 셀로비오스(cellobiose)를 만니톨 대신 람노오스(rhamnose)를 사용하기도 한다.

대장의 경우 장운동이 느리기 때문에 세균 증식이 빠르고, 독소도 상당 수준 축적되게 되므로 장점막 장벽 기능은 특히 대장에서 중요한데, 이 방법은 주로 소장



장 투과성을 반영한다는 제한점이 있다. 동위원소( $^{51}\text{Cr}$ -EDTA,  $^{99}\text{Tc}$ -DTPA)를 경구 섭취하여 소변 중 배설수준을 측정하는 방법도 있으나 방사능 노출 등의 문제로 널리 사용되지는 않는다.

#### (나) 장내 세균 전위 평가(bacterial translocation test)

간접적으로 혈청 내독소(endotoxin)를 측정할 수도 있으나 건강한 사람들의 경우 혈청에서 내독소가 감지되지 않을 수 있다는 단점이 있다. 이외에도 혈청에 존재하는 세균의 16S rRNA를 중합효소연쇄반응(PCR)을 통해 증폭하여 염기배열을 확인하고, 변 검체에서 세균의 존재를 확인하는 방법도 이용된다. 비침습적이기는 하나 소요 시간이 길고, 고도의 분석기술이 필요하다는 제한점이 있다.

#### (다) 점막 장벽 온전성(mucosal barrier integrity)

변에서  $\alpha$ 1-antitrypsin (A1AT)의 함량을 측정하여 평가할 수 있다. 이 단백질은 일반적으로 혈청 트립신 저해제(serum trypsin inhibitor)로 알려져 있는데, 다양한 범위의 단백질 분해효소의 작용을 저해하는 역할을 한다. 염증성 세포로부터 나오는 효소, 특히 호중구의 엘라스타아제(neutrophil elastase)로부터 조직을 보호하는 역할을 하는데, 급성 염증 반응에서 농도가 급격히 증가한다. 이 외에도 알파 디펜신( $\alpha$ -defensin), 베타 디펜신( $\beta$ -defensin), 칼프로텍틴(calprotectin), 라이소자임(lysozyme), 호중구-유래 엘라스타아제(neutrophil-derived elastase)등의 항균성 펩타이드, E-카드헤린(E-cadherin), 성장인자(growth factors), 밀착연접 단백질(tight junction molecules) 등을 측정하기도 한다.

#### (라) 뮤신 분비 및 유전자 발현

동물의 결장 조직에서 뮤신 mRNA 발현을 RT-PCR로 정량하거나 뮤신 분비를 방사성 동위원소 면역측정법을 이용하여 측정한다.

#### (마) 장세포상하층부 전기저항치

세포실험에서는 세포를 12-transwell plates에  $0.25 \times 10^6/\text{well}$ 로 seeding하고 volume을 2ml로 맞추어 배양한다. 세포를 DPBS로 세척하고 두군데에 Hanks' Balanced Salt Solution을 더해주고, LJE 또는 LJE-Fs ( $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 처리 후 6시간 동안 배양하고, LPS ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ )를 처리한 후 24시간 동안 배양한다. 최종 Millicell-ERS resistance system 을 활용하여 측정한다.

동물 모델에서는 동물 장 조직을 떼어내어 십이지장, 회장, 결장으로 분리하고 차가운 oxygenated Krebs-Ringer bicarbonate buffer (KRB buffer)에 담갔다가

0.237 cm<sup>2</sup> aperture Using chambers에 놓는다. 점막표본은 안락 후 10분 이내에 1.5 mL의 KRB buffer에 담가 준비한다. 10 mM of glucose와 10 mM of mannitol을 함유한 bathing solution을 물이 순환하며 산소를 공급할 수 있는데 욕조에 넣고 온도를 37도로 맞추고, 조직을 욕조 안에 넣은 후 유체저항을 보정한 전압클램프로 Ag-AgCl 전극을 이용하여 상피전위차와 단락 전류를 구하고, 옴의 법칙에 따라 TER을 계산한다.

#### (바) intestinal fatty acid binding protein(I-FABP)

I-FABP는 혈액 및 조직에서 정량할 수 있으며, 소장 및 대장 조직에서 RNA를 추출하고, mRNA 발현을 RT-PCR(real time-polymerase chain reaction)로 정량할 수 있다. 혈액 중 정량은 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)을 이용할 수 있다. 시료 준비는 혈액의 경우는 전혈을 채취하고 즉시 원심분리를 실시(1500 × g, 4℃, 15분)하여 혈청 혹은 혈장을 분리하여 사용한다. 소변의 경우는 소변 수집 후 원심분리를 실시(1500 × g, 4℃, 15분)하여 소변 중 debris를 제거하고 사용하도록 한다.

### (2) 염증반응 및 면역 조절

#### (가) 사이토카인

사람의 경우, 침습적인 방법을 이용하는 데에 어려움이 있기 때문에 혈청, 혈장, PBMC에서 효소면역측정법으로 정량하는 것이 일반적이다. 또한 장에서의 염증반응을 측정하는 것이므로 변에서 사이토카인을 측정할 수도 있다. 동물의 경우는 대장 조직에서의 이들 사이토카인 생성을 효소면역측정법으로 정량하거나 대장 점막에서 RNA를 추출하여 사이토카인 mRNA 발현을 RT-PCR로 정량하는 것이 일반적이나 연구에 따라 회장 등 다른 장 조직에서도 측정 가능하다.

#### (나) 면역 작용

##### ① Phagocytic activity(식균작용)

동물이나 사람의 전혈(whole blood)을 채취하여 식균 작용이나 식균활동에 참여하는 세포의 수를 유세포 분석기(flow cytometry)등의 방법을 사용하여 측정할 수 있다. 식균 작용 측정은 oxidative burst와 함께 측정될 수 있다.

##### ② Oxidative(respiratory) burst

동물이나 사람의 전혈(whole blood)을 채취하여 oxidative burst에 참여하는 세포의

수 또는 각 세포의 활성(activity)를 유세포 분석기(flow cytometry)등의 방법을 사용하여 측정할 수 있다.

### ③ IgG, IgA

장 세척액(intestinal washings)이나 동물의 대장 조직에서 IgG와 IgA의 농도를 효소면역측정법 등으로 측정하거나 변에서 측정할 수 있다. 또한 혈청에서 측정할 수도 있다. IgG와 IgA 농도의 변화는 비정상적인 Th2 세포의 반응으로 인한 염증을 완화와 연관지어 해석한다.

### ④ 림프구아형(lymphocyte subsets)

세포분석기(flow cytometry)를 이용하여 동물이나 사람의 전혈(whole blood)에서 구성 변화를 측정한다.

### ⑤ T-세포 조절인자(CD4+CD25high, CD4+LAP+)

동물이나 사람의 전혈(whole blood)을 채취하여 oxidative burst에 참여하는 세포의 수 또는 각 세포의 활성(activity)를 유세포 분석기(flow cytometry)등의 방법을 사용하여 측정할 수 있다. Foxp3 mRNA 발현은 대장 점막에서 RNA를 추출하여 사이토카인 mRNA 발현을 RT-PCR로 정량한다.

## (다) 염증 반응 관련 인자

### ① Leukotriene B4(LTB4)

동물모델의 경우 시험물질의 섭취가 시험동물 대장 조직 내 LTb4 생성에 미치는 영향을 관찰하여 장손상 개선 효과를 평가하며, 사람의 경우 혈청과 혈장에서도 측정 가능하다.

### ② Prostaglandin E2(PGE2)

동물의 대장 조직에서 효소 면역측정법(enzyme immunoassay)을 통해 측정하거나 사람의 혈장, PBMC에서 측정할 수도 있다.

### ③ C-Reactive Protein(CRP)

10-40 mg/L 의 농도는 만성 염증 또는 바이러스 감염을 나타낸다. 동물이나 사람의 혈청이나 혈장에서 측정할 수 있다.

### ④ Inducible nitric oxide synthase(iNOS)

동물의 대장 조직에서 발현을 측정하거나 사람의 경우 PBMC에서 측정할 수 있다.

## ⑤ NF-κB

동물의 대장 조직에서 RT-PCR, western blot을 이용하여 발현을 측정하거나 사람의 경우 PBMC에서 측정할 수 있다.

## ⑥ MPO(Myeloperoxidase)활성

시험동물의 대장 조직에서 활성을 측정할 수 있으며, 사람의 경우 혈청과 혈장에서 측정 가능하다.

## ⑦ Calprotectin

Calprotectin은 대장 내 비특이적인 염증에 대한 간접지표로서 분변에서 대개 ELISA법을 사용하여 측정한다.

## (라) 적혈구 침강 속도(Erythrocyte Sedimentation Rate;ESR)

적혈구 침강 속도는 혈장에서 적혈구가 이동하는 속도인데, 이는 혈장 내 적혈구의 크기와 농도에 따라 달라진다. 항응고제가 포함된 전혈을 수직으로 세우고, 1시간 후 맨 위 눈금에서 적혈구가 침강한 곳까지의 길이를 mm로 표시한 것이 ESR이다. 적혈구는 rouleaux 형성(초기 10분), 일정 속도 침강(40분), RBC packing(10분)의 과정을 거쳐 혈장으로부터 밑으로 가라앉는다. 동물이나 사람의 전혈에서 측정하며, 염증, 조직손상으로 인해 ESR이 증가하게 된다.

## (3) 장의 조직학적 평가

장관 면역 조절에 문제가 있는 경우 단핵구와 같은 염증세포 침윤 등으로 인해 조직에서의 만성 염증 소견을 나타내게 된다. 장 손상 정도(부종, 미란, 염증 정도, 괴사 및 궤양의 정도 등)를 장 조직을 절편으로 만들고 H&E 이중염색으로 장 점막 조직을 염색해 현미경을 통해 관찰하여 점수화하여 평가할 수 있다.

H&E 염색은 파라핀 제거 또는 탈랍 단계-수화-1차염색-분별-청색화단계-중화단계-2차염색-탈수-투명화의 단계를 거친다. 일반적으로 자일렌 또는 자일렌 대체제와 같은 용제를 사용하여 유리 슬라이드에 점착된 절편에서 파라핀을 제거하고, 조직 절편에 수분을 주입한다. 파라핀 제거와 수화 이후에 헤마톡실린을 이용하여 1차염색을 진행하고, 이때는 핵 내 염색질과 핵막이 주로 염색된다. 그 후 청색화 단계 및 중화단계를 거치고 에오신을 이용한 2차 염색을 진행한다. 조직 절편에서 수분을 제거하고, 조직 절편의 알코올을 투명화 용제를 사용하여 투명화 단계를 거치게 된다.

표 6. 장의 조직학적 평가 척도(현미경 관찰)

| 점수 | 전체적 형태 (Gross morphology)          |
|----|------------------------------------|
|    | 〈궤양 (ulceration)〉                  |
| 0  | 궤양 없음 (no ulcer)                   |
| 1  | 3mm 미만의 작은 궤양 (small ulcers < 3mm) |
| 2  | 3mm 이상의 큰 궤양 (large ulcers > 3mm)  |
|    | 〈염증 (inflammation)〉                |
| 0  | 없음 (no inflammation)               |
| 1  | 경도 염증 (mild inflammation)          |
| 2  | 중증도 염증 (moderate inflammation)     |
| 3  | 고도 염증 (severe inflammation)        |
|    | 〈손상 깊이 (depth lesion)〉             |
| 0  | 없음 (none)                          |
| 1  | 점막하 (sub mucosa)                   |
| 2  | 고유근층 (muscularis propria)          |
| 3  | 장막 (seros)                         |
| 8  | 최대 점수 (maximum score)              |

[출처: 건강기능식품의 기능성 시험 가이드-위장관 관련 기능성 시험. 513-597. 2004]

#### (4) 지사 효과

인체 연구에서는 연구 대상자의 기록 내용을 근거로 설사가 완화될 때까지 소요된 시간을 측정할 수 있다. 지사효과가 처음 나타날 때까지의 소요시간(time to first relief, TFR)이 24시간 이내일 경우 조기효과가 있는 것으로 간주하며, 완전한 지사효과가 나타나는 때까지의 소요시간(time to complete relief, TCR)은 TFR 이후 48시간 동안 형태 있는 대변만을 보거나 또는 배변이 없는 경우 처음 시험물질 복용 시간으로부터 48시간의 시작 시간까지로 한다.

#### (5) 임상적 증상

설사의 심한 정도를 자가 판단하여 작성하도록 하고 이를 근거로 Likert scale 또는 VAS를 이용하여 평가함으로써 장 건강에 문제가 있는 대상자들의 임상 증상 개선도를 평가할 수 있다.

## 라. 장내 미생물 개선

### (1) 세균 동정 및 세균 수

장내 세균 동정 및 세균 수의 측정은 배변을 혐기성 chamber에 수집하고 배변 sample 0.1 g을 0.05% L-cysteine hydrochloride hydrate가 포함된 증균배지 brain heart infusion(BHI) broth 900 $\mu$ l에 접종시킨다.  $10^3$  과  $10^5$ 의 희석액을 100 mm 한천 plates에 도말하고 37℃에서 배양하여 콜로니의 수를 counting한다. 세균을 동정하기 위해 선택배지를 사용하여 특정한 미생물의 수를 검출할 수 있다.

### (2) 메타지노믹스(metagenomics)

분변 sample을 PBS로 세척하고 QIAamp DNA stool Mini kit를 이용하여 DNA를 추출한다. PCR primer는 Bifidobacterium genus group, Bacteroides fragilis group, Staphylococcus aureus, Akkermansia muciniphila 등 장 내 미생물의 특성화된 올리고뉴클레오티드를 사용한다. PCR 증폭 및 검출은 ABI PRISM 7300-PCR sequence detection system로 수행한다.

### (3) 장내 세균에 의한 부패산물 측정

시험동물이나 사람의 변에서 이들 부패산물의 농도를 측정하여 유해균이 증가했음을 판단할 수 있다. 세포 실험에서도 측정 가능하다.

### (4) 장내 유해효소( $\beta$ -glucuronidase) 활성 측정

시험동물이나 사람의 변을 증류수로 희석하고 혐기적 배양하여 효소반응액과 혼합하여 반응을 시킨 뒤 원심분리 하여 흡광도를 측정한다.  $\beta$ -glucuronidase 활성이 낮을수록 흡광도는 낮게 측정되며 유해균의 증식 억제 효과를 나타내어 장내 환경을 개선하였다고 판정한다.

### (5) 장내 pH

pH는 시험동물이나 사람의 변을 증류수로 희석하고 pH meter를 이용하여 측정한다. 세포 실험에서도 측정 가능하다.

## (6) 단쇄지방산(short chain fatty acids)

세포 실험에서 측정할 수 있고, 동물이나 사람의 변에서 측정한다.

## (7) 탄소원 이용능

HPLC로 배양 전 배지에서의 탄소원을 정량하고 배양 후 배지에 잔존해 있는 탄소원을 정량해서 소모된 탄소원을 측정해 백분율로 당이용률을 계산할 수도 있다.

## (8) 항균기능 ( $\beta$ -defensin-2)

장 상피세포를 24시간 배양 후 배지에 0.5 $\mu$ g/ml *Escherichia coli* 055:B5 LPS, 2 nM 17 $\beta$ -Estradiol, 1  $\mu$ M cyclodextrin-encapsulated progesterone을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양조에서 배양한 세포주로부터 12시간 후세포 pellet를 획득한다. 또한 0.5  $\mu$ g/ml LPS와 2 nM 17 $\beta$ -estradiol, 1  $\mu$ M progesterone를 함께 처리하고 12시간 배양하여 상피세포의 pellet을 모아 배지를 완전히 제거한 후 총 RNA를 분리한다. RNA 분리 후 cDNA를 합성후 PCR을 이용하여 mRNA를 발현시킨다.

## (9) 장 상피 세포에 대한 병원균 접착저해 활성

시험관 시험에서 장 세포 유사(enterocyte-like) 세포인 Caco-2 세포나 HT-29 세포에 유익균인 비피더스균, 병원균인 *E. coli* 를 각각 처리하거나 함께 처리한 후 접착된 세균의 수를 비교함으로써 유익균의 병원균 접착저해 활성을 측정할 수 있다.

# 마. 장 불편감 완화

## (1) 장 기능 이상

### (가) 대장통과 시간

방사선비투과물질(Radio-opaque pellets)을 이용한 대장 통과시간 측정법에는 다량(20개)을 1회 섭취하거나 매끼 식사 때마다 복용한 후 대변으로 나올 때까지 걸리는 시간을 측정하는 방법들이 있다. 다량을 1회만 섭취한 방법은 총 마커보다 적은 양의 배설물에 의존해야 하고 오차가 많이 나기 때문에, 14일간 10개의 마커를 아침식사와 함께 섭취하고 하루에 한번씩 복부 방사선 촬영하는 방법이 제시되었다.

환자는 평소 식단을 유지하여야 하며 검사기간 동안 완하제를 복용하여서는 안된다. 정확도를 보완하기 위해 분변을 수집하여 추가적으로 분석한다. 혹은 금식한 상태로 방사선 동위원소인  $^{111}\text{In}$ 이나  $\text{Tc-99M}$ 을 투여하여 신틸레이션 카메라로 촬영한다.

#### (나) 직장항문압 측정 검사

검사자의 지시에 따라 검사대로 올라가, 왼쪽으로 누운 상태로 양쪽 다리를 배쪽으로 굽힌 자세를 취한다. 그 후 항문을 통해 작은 풍선이 달려 있는 가느다란 관을 삽입하여 직장에 위치시킨다. 검사 기구를 통해 직장 내 압력 및 감각 능력, 항문관의 수축·이완 시의 압력, 기타 직장 항문 반사 기능 등을 측정한다.

### (2) 장막 염증작용 및 투과성 조절

#### (가) 림프구 아형

세포분석기(flow cytometry)를 이용하여 동물이나 사람의 전혈(whole blood)에서 구성 변화를 측정한다.

#### (나) 사이토카인, 프로스타글란딘 E2

동물의 대장 조직에서 효소면역측정법을 통해 측정하거나 사람의 혈장, PBMC에서 ELISA를 이용하여 측정할 수 있다.

#### (다) 세포 주위 투과성(paracellular permeability) 검사

Caco-2 cells monolayers를 가로지르는 fluorescein isothiocyanate-conjugated dextran(FITC-dextran)의 흐름을 활용하여 투과성 측정한다. 구체적으로는 Caco-2 세포를 배양하여 단층을 형성하고, 배양된 Caco-2 세포 단층의 상부에 FITC-dextran을 처리한다. 처리 후 일정 시간 동안 FITC-dextran의 흐름을 분석하여 투과성을 측정한다. 일반적으로 투과성이 증가하면 FITC-dextran의 flux가 증가한다는 원리를 이용한다. 시험물질이 tight junction에 미치는 영향을 알 수 있으며, tight junction를 강화하면 FITC-dextran의 flux가 감소하고, TJ를 약화시키면 flux가 증가한다.

#### (라) 장점막 단백질 인산화

장점막 단백질의 인산화는 MLCK, pMLC, tight junction proteins에서 측정할 수 있으며, ELISA kit를 이용하여 발현량을 측정할 수 있다. 발현 수준은 정상 대조군의 %로 표시하여 비교할 수 있다.



### (마) 장세포상하층부 전기저항치(transepithelial electrical resistance, TER)

세포실험에서는 세포를 12-transwell plates에  $0.25 \times 10^6$ /well로 seeding하고 volume을 2 ml로 맞추어 배양한다. 세포를 DPBS로 세척하고 두군데에 Hanks' Balanced Salt Solution을 더해주고, LJE 또는 LJE-Fs( $100 \mu\text{g/mL}$ ) 처리 후 6시간 동안 배양하고, LPS( $1 \mu\text{g/mL}$ )를 처리한 후 24시간 동안 배양한다. 최종 Millicell-ERS resistance system을 활용하여 측정한다.

동물 모델에서는 동물 장조직을 떼어내어 십이지장, 회장, 결장으로 분리하고 차가운 oxygenated Krebs-Ringer bicarbonate buffer (KRB buffer)에 담갔다가  $0.237 \text{ cm}^2$  aperture Using chambers에 놓는다. 점막표본은 안락후 10분 이내에 1.5ml의 KRB buffer에 담가 준비한다. 10 mM of glucose와 10 mM of mannitol을 함유한 bathing solution을 물이 순환하며 산소를 공급할 수 있는데 욕조에 넣고 온도를  $37^\circ\text{C}$ 로 맞추고, 조직을 욕조 안에 넣은 후 유체저항을 보정한 전압클램프로 Ag-AgCl 전극을 이용하여 상피전위차와 단락 전류를 구하고, 옴의 법칙에 따라 TER을 계산한다.

## (3) 장내미생물불균형

### (가) 소장 내 세균 과증식

SIBO는 수소 호기 검사를 통해 간접적으로 진단할 수 있다. 수소 호기 검사란 포도당 또는 락툴로스를 복용한 이후에 장관의 세균과 반응하여 생성되는 수소와 메탄가스의 양을 측정한다.

### (나) 단쇄지방산

세포 실험에서 측정할 수 있고, 동물이나 사람의 변에서 측정한다.

### (다) 트립토판수산화효소

트립토판 수산화효소 활성을 확인하기 위해 TPH1(tryptophan hydroxylase 1) Inhibitor Screening Assay Kit를 사용할 수 있다. 구체적으로, 시료를 DMSO에 용해시킨 후 96 well에  $10 \mu\text{L}$ 의 화합물을 넣고  $40 \mu\text{L}$ 의 TPH1 효소를 첨가한다. 이어  $50 \mu\text{L}$ 의 TPH1 반응 용액을 추가한 후 마이크로플레이트는 알루미늄 호일로 차광하고,  $4^\circ\text{C}$ 에서 4시간 동안 배양한다. 이후  $10 \mu\text{L}$ 의 quench 솔루션을 추가하고 Flexstation3 microplate reader에서 형광 발색 정도를 읽어 TPH1 활성을 측정한다.

### (라) 세로토닌

5-HT 생성정도는 면역조직화학적 염색을 통해 조직 중 발현정도를 살펴볼 수 있으며, 웨스턴 블롯을 통해 단백질 정량을 진행할 수 있다. 먼저 조직을 고정하고 파라핀 블록을 제작한다. 절편을 제작하고 파라핀 embedded 섹션의 경우 탈파라핀화를 진행한다. 1차 항원과 2차 항원을 처리하고 발색과정을 통해 발현정도를 살펴본다. 웨스턴블롯은 조직에서 단백질을 추출하여 단백질 샘플을 준비하고, SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 통해 단백질을 크기별로 분류한다. 분류된 단백질을 membrane으로 전달하고, blocking 단계를 거쳐 비특이적인 반응을 최소화한다. 그 후 1차 항원, 2차 항원 반응을 진행하고, 발색과정을 통해 단백질의 발현정도를 분석한다.

## (4) 배변장애

### (가) 배변횟수

배변횟수에 따라 경험하고 있는 장불편감의 개선 여부를 파악할 수 있다. 정상적 배변 횟수는 하루 3회 배변 ~ 일주일에 3회 배변이며, 변비는 1주 2회 이내일 경우로 판단한다.

### (나) Anti-diarrhea activity

동물 모델에서 설사를 유도(예: castor oil)하며, 시험물질 처리 후 anti-diarrhea activity를 확인한다. Castor oil 투여 후 첫 설사가 나오는 시간, 설사의 심각도, 지속 시간, 빈도 등을 측정하여 시험물질의 효과를 평가한다.

### (다) FWC (fecal water content)

Fecal water content를 측정하기 위해 수집된 fecal sample을 건조시킨다. 일반적으로 105℃에서 24시간 동안 건조기에서 건조한다. 건조 전후의 샘플 무게를 측정하여 수분의 양을 추정한다.

$$* \text{ water content\%} = [\text{wet weight of feces (g)} - \text{dried weight of feces (g)}] / \text{wet weight of feces (g)} \times 100\%$$

또한, Karl Fischer titration 방법을 사용할 수 있다. 이 방법은 iodine이 포함된 Karl Fischer 시약을 뷰렛을 이용하여 당량점을 지날 때까지 주입하면서 주입된 양을 이용하여 수분 함량을 측정하는 방법이다.

### (라) Behavioral pain responses

동물 모델에서 통증을 유도(예: capsaicin, formalin)하며, 시험물질 처리 후 통증 억제 정도를 측정하게 된다. 통증 억제 정도는 통증 반응의 심각도, 지속시간, 빈도 등을 측정하게 된다. 통증 반응은 핏는 것, 하복부를 바닥에 짓누르는 것, 복부를 짚는 것 등을 포함할 수 있다. 운동능력 측정시스템을 활용하여 실험동물의 움직임을 파악할 수 있다.

## (5) 임상적 증상

### (가) 대변 특성 점수

대변 특성 점수는 대변의 물리적 특성을 평가하는 척도이며, 대변의 색깔, 무게, 모양, 빈도 등을 포함할 수 있다. 대변의 특성은 건강 상태, 특히 장 건강을 평가하는 데 중요한 정보를 제공한다.

### (나) 복부 불편감 점수

복부 통증(abdominal cramps), 복부 더부룩함 또는 복부팽만(bloating), 트림(belching) 등의 불편감 수준에 대해 연구대상자가 Likert 척도, 시각적 아날로그 척도(VAS) 등을 통해 점수화할 수 있다. NRS의 경우 정도: 1~3점, 중등도: 4~6점, 중증: 7~10점으로 구분 기준이 존재한다.

### (다) 과민성 장증후군 시각유사척도 설문지(Visual Analogue Scale for Irritable Bowel Syndrome questionnaire, VAS-IBS questionnaire)

과민성 장증후군의 증상을 평가하는 데 사용되는 도구이며, 복통, 배변 습관의 변화 등과 같은 IBS의 주요 증상을 평가한다. 또는 IBS Severity Scoring System(IBM-SSS) 같이 과민성 장증후군에 특화된 설문지를 이용하여 불편감 개선을 평가할 수 있다.

표 7. VAS-IBS 설문지

|                                                   |                  |
|---------------------------------------------------|------------------|
| 본 검사지에 귀하의 최근 상황에 가장 가깝다고 생각하는 정도에 V표시를 하시기 바랍니다. |                  |
| 1. 당신은 얼마나 오랫동안 소화와 관련된 문제를 갖고 있었습니까?             | _____            |
| 2. 당신은 지난 2주간 복통과 관련된 느낌이 얼마나 있었습니까?              | 매우심함 _____ 매우 좋음 |

|                                                          |                                                         |
|----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| 3. 당신은 지난 2주간 설사와 관련된 느낌이 얼마나 있었습니까?                     | 매우심함_____매우 좋음                                          |
| 4. 당신은 지난 2주간 변비와 관련된 느낌이 얼마나 있었습니까?                     | 매우심함_____매우 좋음                                          |
| 5. 당신은 지난 2주간 복부팽만감이나 방귀에 관한 느낌이 얼마나 있었습니까?              | 매우심함_____매우 좋음                                          |
| 6. 당신은 지난 2주간 구역질이나 구토와 관련한 느낌이 얼마나 있었습니까?               | 매우심함_____매우 좋음                                          |
| 7. 당신은 지난 2주간 정신적 행복과 관련한 느낌이 얼마나 있었습니까?                 | 매우심함_____매우 좋음                                          |
| 8. 당신은 지난 2주간 당신의 일상의 삶에 영향을 미친 위장관계 문제들이 얼마나 있었습니까?     | 매우심함_____매우 좋음                                          |
| 9. 당신은 지난 2주간 갑자기 변이 나올 것 같은 느낌을 느낀 적이 있었습니까?            | <input type="checkbox"/> 네 <input type="checkbox"/> 아니오 |
| 10. 당신은 지난 2주간 화장실을 다녀와도 완전히 비운 것 같은 느낌이 들지 않은 적이 있었습니까? | <input type="checkbox"/> 네 <input type="checkbox"/> 아니오 |

출처: Annals of surgical treatment and research 2018;94(5):254-261

### 3. 시험 설계 시 고려사항

#### 가. 시험관시험

##### (1) 시험계

대부분 Caco-2 세포와 HT-29세포, Mast-Cell-Like Rat basophilic leukemia (RBL-2H3) 세포가 활용되고 있기 때문에 주 세포주 모델로 Caco-2, HT-29, RBL-2H3 등을 제시할 수 있다. 세포를 negative control 상태로 유도하기 위해서는 PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) 또는 CI (Calcium Ionophore) 등으로 RBL-2H3 세포를 자극할 수 있으며, 농도나 세포 자극 시간은 실험 목적에 따라 다를 수 있다.

표 8. 세포주 및 유도방법 예시

| 세포주     | 유도방법                          | 특성                  |
|---------|-------------------------------|---------------------|
| Caco-2  | enterotoxin                   | 감염상태 유도             |
| HT-29   | TNF- $\alpha$                 | 염증상태 유도             |
| HT-29   | IL-1 $\beta$                  | 염증상태 유도             |
| HT-29   | LPS                           | 염증상태 유도             |
| HT-29   | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 산화적 스트레스 상태유도       |
| RBL-2H3 | PMA 처리                        | 비만세포 활성화로 염증과잉상태 유도 |
| RBL-2H3 | IgE 처리                        | 염증과잉상태 유도           |
| RBL-2H3 | CI 처리                         | 비만세포 활성화로 염증과잉상태 유도 |

##### (2) 바이오마커

원료의 작용 기전을 설명하기 위하여 예상되는 대사 경로에 위치하고 있는 바이오마커의 양, 활성, 단백질 발현, mRNA 발현 등을 측정한다. 구체적으로는 과도한 염증반응억제 활성, 염증반응 관련인자, 장내미생물, 세균에 의한 부패 산물 등을 측정할 수 있다.

##### (3) 통계처리

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

## 나. 동물시험

### (1) 실험동물

장 건강개선 효과를 평가하기 위한 동물실험에는 랫트(rat), 마우스(mouse) 등의 설치류 모델이 일반적으로 사용된다. 실험동물에서 변비 유도 모델, 염증성 장질환모델, 과민성 장증후군 동물모델, 장내 균총변화 모델을 사용할 수 있다. 과민성 장증후군 모델은 스트레스로 유도하고, 스트레스 요인은 소음 노출(10분정도), 음용수 제한, 주사, 케이지 기울이기(45도 기울기, 1-4시간), 꼬리 잡기(1분), 식이제한(24시간) 등을 활용할 수 있다.

표 9. 동물모델 및 유도방법 예시

| 동물모델      |                      | 유도방법                                                                                                   |
|-----------|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 변비        | SD rat               | Loperamide-induced constipation                                                                        |
|           | Kunming mice         | Diphenoxylate-induced constipation                                                                     |
| 염증성 장질환   | Mice (BALB/c, male)  | DSS(dextran sodium sulfate)-induced Inflammatory Bowel Disease (급성 궤양유도)                               |
|           | Mice (C3H/HeJBir)    | TLR-4 결핍 모델(대장 전층 염증 반응)                                                                               |
|           | Mouse, rat, rabbit 등 | Trinitrobenzen sulfonic acid(TNBS) 유발 장염(직장 투여)                                                        |
| 과민성 장 증후군 | Rat (Sprague-Dawley) | Chronic Mild Stress Model: 소음 노출(10분정도), 음용수 제한, 주사, 케이지 기울이기(45도 기울기, 1-4시간), 꼬리 잡기(1분), 식이제한(24시간) 등 |
| 장내 균총 변화  | Mice (C57BL/6)       | Obesity model                                                                                          |
|           | Mice (C57BL/6)       | High fat diet induced model                                                                            |

### (2) 바이오마커

실험동물을 대상으로 원료의 경구 투여로 인한 장 건강 개선 지표를 측정한다. 원료의 작용 기전을 설명하기 위해 바이오마커의 양, 활성, 단백질 발현, mRNA 발현 등을 측정한다.

### (3) 통계처리

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

## 다. 인체적용시험

### (1) 시험대상자

#### (가) 선정기준(예시)

##### [배변활동 원활(장운동개선)]

- Rome IV 기준 중 기능성 변비에 해당하는 경우
- 다음의 증상이 6개월 전에 시작되어 지난 3개월 동안 해당 증상이 2가지 이상인 경우
  - ① 배변시 과도하게 힘을 주는 경우가 배변 횟수의 25% 이상
  - ② 딱딱하고 덩어리진 변을 보는 경우가 배변 횟수의 25% 이상
  - ③ 배변 후 잔변감이 전체 배변 횟수의 25% 이상
  - ④ 배변시 항문 폐쇄감을 느끼는 경우가 배변 횟수의 25% 이상
  - ⑤ 배변을 돕기 위한 수조작이 필요한 경우가 배변 횟수의 25% 이상
  - ⑥ 주당 3회 미만의 배변인 경우

##### [장관면역 조절]

- 과체중/비만 등 만성질환자
- 주로 앉아서 하는 직업을 가진 자

##### [장내 유익균 증식, 유해균 억제]

- 건강한 성인
  - 단,식이통제조건을 만족해야함
  - 전체 대상자의 동일한 식사 조건이 가능해야함
  - 장내 세균에 영향을 줄 수 있는 항생제, 영양제, 우유 및 유제품, 알코올류 섭취 제한

##### [장 불편감 완화]

- 과민성 장 증후군 연관 증상(복통, 복부팽만 등)을 가진자로서 기질성 질환이 없는 건강한 성인

#### (나) 제외기준(예시)

##### [배변활동 원활(장운동개선)]

- 정기적으로 이완제를 복용하는 장기 변비인 경우
- 지난 30일 이내에 수술로 인해 변비가 발생한 경우
- 30일 이내에 배변 장애 및 급성 위장관 감염을 유발하는 심각한 유기적, 병리학적 변화를 경험한 경우

## [장 불편감 완화]

- 기질성 질환이 있는 자

## [공통사항]

## ○ 질병상태

- 원인이 있는 장관계질환(예: 크론병, celiac disease, 궤양성 대장염, 대장암)이 현재 있거나 지난 2년내에 있었던 자
- 장 수술을 받은 경우(gastrectomy, 또는 cholecystectomy, 단, 충수돌기염 및 제왕절개 제외)
- 바이러스 간질환(A, B, C형), 간경화, 모든 암, 만성 콩팥병, 심부전, 갑상선 질환이 있는 경우
- 직장 출혈, 체중 감소 등 경고증상이 있는 경우

## ○ 생리적 상태

- 임신부, 임신을 준비하는 사람
- 수유부

## ○ 약물복용

- 약물중독
- 우울증 약물 및 간기능개선제 복용시
- 직전 2주 이내에 항생제 또는 프로바이오틱스를 복용한 자
- 소화에 영향을 미칠 수 있는 보충제 복용자

## ○ 생활 습관

- 알코올 중독자
- 담배 중독 (담배 흡연) 10 개 / 일)

## ○ 알레르기

- 시험물질에 대한 알레르기/부작용이 있는 자
- 유당불내성 이외의 식품 알레르기나 불내성을 가진 자

## ○ 기타

- 최근 3개월 내 다른 임상 실험 참가자
- 그 외 연구자에 의해 실험에 부적합하다고 판단되는 사람
- 최근에 유행성 기생충 질환이 있는 지역을 여행한 경우

## (2) 시험설계

시험디자인은 무작위배정(randomization), 위약대조연구(Randomized, controlled trial, RCT)를 기본으로 한다. 연구대상자는 통계적으로 power calculation을 수행하여 대상자수 산출방법을 적절히 가지도록 한다.

연구에 참여한 연구대상자들의 기초 특성이 자세히 고려될 수 있도록 하며, 선정 및 배제기준을 고려하여 선택된 대상자의 기초특성에 대한 차이 분석이 필요하다. 특히 시험물질 순응도를 반드시 확인하여, 군간 순응도 차이가 나타나지 않도록 함이 권장된다.



식사의 종류, 식사의 질, 섭취량에 따라 장 관련 증상이 달라질 수 있기 때문에, 식사 및 영양관련 지표가 시험 수행 중 잘 통제되어야 한다. 시험 시작 전후(시험 중간 포함가능), 식사섭취량 혹은 식품섭취빈도를 조사하고, 유의적 차이가 없도록 통제한다. 주의 영양소는식이섬유이며 대장 내 세균에 의해 장 내 발효가 야기되는 우유 및 유제품의 통제도 필요하다. 그 외 혼돈요인으로 작용할 수 있는 신체활동, 수면, 스트레스 상태도 통제 조건에 포함시켜야 한다(실험 전후 혹은 군간 비교).

### (3) 바이오마커

원료의 기능성을 설명하기 위해 혈액이나 분비물을 이용하여 바이오마커의 양, 활성, 단백질 발현, mRNA 발현 등을 측정한다.

### (4) 통계처리

인구학적 자료 및 기초특성의 측정지표에 대한 통계분석 방법을 기술하고 분석군(ITT, FAS, PP)에 대해 명확하게 정의하여 주분석군 설정에 대한 설명이 계획서와 결과보고서에 기술되도록 한다. 또한, 기능성 평가지표에 대한 통계분석방법 및 중도탈락자 및 결측 처리에 대한 통계분석 방법을 명확히 한다. 연구 개시 후 측정 시기 및 방법의 변화가 있는 경우, 그 변경 사유를 기술하여야 하며, 층화 분석, 보정분석 등이 제출된 경우, 사전 계획 여부가 기술되도록 한다. 이때, 각 군별 기능성 평가지표에 대한 분석 결과에 사용된 통계분석 방법, 군간 통계적 유의성, 시험대상자 수, 평균, 표준편차 등이 확인될 수 있도록 하여야 하며 통계분석 방법의 변경이 있는 경우, 변경사항에 대해 기술하도록 한다. 시험결과는 대조군과 시험군을 통계적으로 비교하여  $p < 0.05$  수준에서 유의성을 판정한다.

## 1. 종속변수가 범주형일 경우

- 범주형 변수는 크게 명목 척도와 순위 척도로 구분할 수 있음
  - 명목 척도 : 성별, 국가, 흡연 여부 등 연속되지 않으며 범주 간 서열이 존재하지 않는 범주형 척도
  - 순위 척도 : 질병의 병기(1기, 2기, 3기) 등 연속되지 않으나 범주 간 서열이 존재하는 범주형 척도
- 연속형 변수는 수치화된 변수로 연속성이 있으며, 평균, 표준편차 등을 계산할 수 있는 변수임

### 1.1. Chi-square test

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

### 1.2. McNemar's test

- 군 내의 전후 차이를 비교할 때 사용됨

## 2. 종속변수가 연속형이고 비교군이 2개일 경우

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

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

#### 2.1.1. Wilcoxon's signed-ranks test

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

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

#### 2.2.1. Wilcoxon's rank sum T-test

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

### 2.3. Linear mixed effect model

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

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

### 3. 종속변수가 연속형일 경우 AND 비교군이 3개 이상일 경우

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

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

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

※ 변수 분포의 정규성 검정

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

### 4. 교란변수 보정이 필요한 경우

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

#### 4.1. ANCOVA

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

#### 4.2. Linear mixed effect model

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

## 4. 안전성 평가

인체적용시험에서 시험물질의 섭취로 인한 안전성 평가를 위해 활력징후, 심전도 검사, 혈액학적·혈액화학적 검사, 뇨검사를 실시하는 것이 일반적이며 기능성 원료의 특성과 기능성 내용에 따라 안전성 평가항목이 추가될 수 있다.

※ [참고] 안전성 검사항목(예시)

- (활력징후) 체중, 체온, 맥박, 혈압 등
- (혈액학적 검사) WBC, RBC, Hb, Hct, PLT, MCV, MCH, MCHC, Neutrophil, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil 등
- (혈액화학적 검사) AST, ALT, BUN, creatinine, glucose, total protein, albumin, total cholesterol, LDL, HDL, triglyceride, GGT, ALP, CPK, LDH 등
- (뇨검사) pH, Nitrite, specific gravity, Protein, Glucose, Ketone, Bilirubin, Blood, Urobilinogen, Color 등

## IV

## 참고문헌

1. 「건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정」, 식품의약품안전처 고시 제 2021-66호, 2021
2. 식품의약품안전평가원. 건강기능식품 기능성 평가 가이드-장 건강에 도움을 줄 수 있음, 2015
3. 식품의약품안전평가원. 건강기능식품 기능성 평가 가이드-장 관련, 2020
4. 식품의약품안전평가원. 과민성 장증후군 치료제 임상시험 가이드라인. 2015
5. 미생물·면역분과학회. 최신면역학, 라이프사이언스, 2011
6. 권중구, 박경식, 박저호, 박재명, 박철희, 이광재, 박효진, 이종철, 대한소화기기능성질환운동학회. 과민성 장증후군 치료에 관한 임상진료지침. 대한소화기학회지. 5(2):82-99, 2011
7. 김정목. 염증성 장질환과 장내 미생물무리. 대한소화기학회지. 55:4-18, 2010
8. 김정목. 장내미생물무리의 구성과 대사가 건강과 질병에 미치는 영향, Korean J Gastroenterol. 62(4):191-205, 2013
9. 신정은, 정혜경, 이태희, 조윤주, 이혁, 송경호, 홍성노, 임현철, 이순진, 정순섭, 이준성, 이풍렬, 이광재, 최석채, 신인순, 대한소화기기능성질환운동학회 진료지침위원회. 만성 기능성 변비의 진단과 치료 임상 진료지침 개정안 2015. 대한내과학회지. 91(2):114-130, 2016
10. 이풍훈. 최근 5년간 과민 대장 증후군 진료 현황. 건강보험심사평가원 정책동향 11(6):46-57, 2017
11. 임정현, 김희선, 최은주, 심창구, 박효진. 지실 추출물이 기니 픽 위장관 운동에 미치는 영향 : in vitro, in vivo 연구, 대한소화관운동학회지. 24:7-17, 2008
12. Ahluwalia B, Magnusson MK, Böhn L, Störsrud S, Larsson F, Öhman L, Simrén M. Aloe barbadensis Mill. extract improves symptoms in IBS patients with diarrhoea: post hoc analysis of two randomized double-blind controlled studies. Therap Adv Gastroenterol. 14:17562848211048133, 2021
13. Ahluwalia B, Magnusson MK, Böhn L, Störsrud S, Larsson F, Savolainen O, Ross A, Simrén M, Öhman L. Randomized clinical trial: Effects of Aloe barbadensis Mill. extract on symptoms, fecal microbiota and fecal metabolite profiles in patients with irritable bowel syndrome. Neurogastroenterol Motil. 32(8):e13860, 2020
14. Altenbernd F, Schwarz L, Lipowicz B, Vissiennon C. Myrrh and chamomile flower extract inhibit mediator release from IgE-stimulated mast-cell-like RBL-2H3 cells. Plants (Basel). 11(24):3422, 2022

15. An HM, Park SY, Lee do K, Kim JR, Cha MK, Lee SW, Lim HT, Kim KJ, Ha NJ. Antiobesity and lipid-lowering effects of Bifidobacterium spp. in high fat diet-induced obese rats., *Lipids Health Dis.* 10(116):1-8, 2011
16. Andrew CN, Storr M. The pathophysiology of chronic constipation, *Can J Gastroenterol.* 25(B):16B-21B, 2011
17. Arie H, Nozu T, Miyagishi S, Ida M, Izumo T, Shibata H. Grape seed extract eliminates visceral allodynia and colonic hyperpermeability induced by repeated water avoidance stress in rats. *Nutrients.* 11(11):2646, 2019
18. Ayabe T, Satchell DP, Wilson CL, Parks WC, Selsted ME, Ouellette AJ. Secretion of microbicidal  $\alpha$ -defensins by intestinal paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol.* 1(2):113-118, 2000
19. Beong Ou Lim, Yong Jun Jeong, Mi Hyoun Park, Jong Dai Kim, Sung Joo Hwang and Byung Pal Yu. Immunoregulatory effects of saengshik on DSS-induced inflammatory bowel disease in mouse model system. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 36(1): 32-42. 2007
20. Bjarnason I, MacPherson A, Hollander D. Intestinal permeability: an overview. *Gastroenterology.* 108:1566-1581, 1995
21. Blake MR, Raker JM, Whelan K. Validity and reliability of the bristol stool form scale in healthy adults and patients with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther.* 44(7):693-703, 2016
22. Brandtzaeg P. History of oral tolerance and mucosal immunity. *Ann NY Acad Sci.* 778:1-27, 1996
23. Chang JH, Shim YY, Cha SK, Reaney MJ, Chee KM. Effect of Lactobacillus acidophilus KFRI342 on the development of chemically induced precancerous growths in the rat colon. *J Med Microbiol.* 61(3):361-368, 2012
24. Chey WD, Kurlander J, Eswaran S. Irritable bowel syndrome:a clinical review. *JAMA* 313:949-958, 2015
25. Choi Y, Kim N, Noh GT, Lee JY, Lee DH. The Efficacy and safety of GCWB104 (Flos Lonicera Extract) in Functional Dyspepsia: A single-center, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Gut Liver.* 14(1):67-78, 2020
26. Choudari CP, O'Mahony S, Brydon G, Mwantembe O, Ferguson A. Gut lavage fluid protein concentrations: objective measures of disease activity in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterology.* 104:1064-1071, 1993

27. Cocetta V, Giacomini I, Tinazzi M, Berretta M, Quagliariello V, Maurea N, Ragazzi E, Carnevali I, Montopoli M. Maintenance of intestinal epithelial barrier integrity by a combination of probiotics, herbal extract, and vitamins. *Minerva Pediatr* (Torino). doi: 10.23736/S2724-5276.23.07128-8, 2023
28. Cojocariu RO, Balmus IM, Lefter R, Hritcu L, Ababei DC, Ciobica A, Copaci S, Mot SEL, Copolovici L, Copolovici DM, Jurcoane S. Camelina sativa methanolic and ethanolic extract potential in alleviating oxidative stress, memory deficits, and affective impairments in stress exposure-based irritable bowel syndrome mouse models. *Oxid Med Cell Longev*. 2020:9510305, 2020
29. Duangjai A, Parseatsook K, Sajjapong W, Saokaew S. Assessment of polygonum odoratum flour. leaf extract on rat's ileum contraction and the mechanisms involved. *J Med Food*. 23(11):1169-1175, 2020
30. European Food Safety Authority(EFSA). PASSCLAIM-gut health and immunity. *Eur Nutr*. S2:43:II118-II173, 2004
31. European Food Safety Authority(EFSA). Guidance on the scientific requirements for health claims related to gut and immune function, *EFSA J*. 9(4):1-12, 2011
32. Gaya DR, Lyon TD, Duncan A, Neilly JB, Han S, Howell J, Liddell C, Stanley AJ, Morris AJ, Mackenzie JF. Faecal calprotectin in the assessment of Crohn's disease activity. *QJM*. 98(6):435-41, 2005
33. Geuking MB, Köller Y, Rupp S, McCoy KD. The interplay between the gut microbiota and the immune system, *Gut Microbes*. 5(3):411-418, 2014
34. González-Quilen C, Gil-Cardoso K, Ginés I, Beltrán-Debón R, Pinent M, Ardévol A, Terra X, Blay MT. Grape-seed proanthocyanidins are able to reverse intestinal dysfunction and metabolic endotoxemia induced by a cafeteria diet in wistar rats. *Nutrients*. 11(5):pii E979, 2019
35. Han L, Li T, Du M, Chang R, Zhan B, Mao X. Beneficial effects of potentilla discolor bunge water extract on inflammatory cytokines release and gut microbiota in high-fat diet and streptozotocin-induced type 2 Diabetic mice. *Nutrients*. 20;11(3) pii: E670, 2019
36. Hawrelak JA, Mayers SP. The causes of intestinal dysbiosis:A Review, *Altern Med Rev*. 9(2):180-197, 2004
37. Hollister EB, Gao C, Versalovic J. Composition and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effect on human health,

- Gastroenterology. 146:1449-1458, 2014
38. <https://iffgd.org/gi-disorders/lower-gi-disorders/diarrhea/>
  39. Ito H, Tanabe H, Kawagishi H, Tadashi W, Yasuhiko T, Sugiyama K, Kiriya S, Morita T., Short-chain inulin-like fructans reduce endotoxin and bacterial translocations and attenuate development of TNBS-induced colitis in rats. *Dig Dis Sci.* 54(10):2100-2108, 2009
  40. Jin Y, Blikslager AT. The Regulation of intestinal mucosal barrier by myosin light chain kinase/rho kinases. *Int J Mol Sci.* 21(10):3550, 2020
  41. Johanson JF, Kralstein J. Chronic constipation: a survey of the patient perspective. *Aliment Pharmacol Ther.* 25:599-608, 2007
  42. Jun DW, Park HY, Lee OY, et al. A population-based study on bowel habits in a Korean community: prevalence of functional constipation and self-reported constipation. *Dig Dis Sci.* 51:1471-1477, 2006
  43. Kalafateli M, Triantos C, Theocharis G, Giannakopoulou D, Koutroumpakis E, Chronis A, Sapountzis A, Margaritis V, Thomopoulos K, Nikolopoulou V. Health-related quality of life in patients with inflammatory bowel disease: a single-center experience. *Ann Gastroenterol.* 26(3):243-248, 2013
  44. Kamada N, Núñez G. Regulation of the immune system by the resident intestinal bacteria, *Gastroenterology.* 146(6):1477-1488, 2014
  45. Kim HJ, Cha RR, Kim HJ. Understanding the Rome IV: irritable bowel syndrome and functional diarrhea. *Korean J Med.* 92:366-371, 2017
  46. Kim JI, Kim P, Lee JH, Kim YJ, Yang NR, Baeg MK, Choi JS, Kim HJ, Kim J, Sunwoo YY, Lee JH, Ha H, Park TY. Effect of herbal extract granules combined with otilonium bromide on irritable bowel syndrome with diarrhoea: a study protocol for a randomised controlled trial. *BMJ Open.* 7(11):e018362, 2017
  47. Kwon JG, Park KS, Park JH, Park CH, Lee KJ, Park HJ, Rhee JC, the Korean Society of Neurogastroenterology and Motility. Guidelines for the treatment of irritable bowel syndrome. *Korean J Gastroenterol* 57(2):82-99, 2011
  48. Law IKM, Fang K, Pothoulakis C, Rankin CR. Aftipilin regulation of myosin light chain kinase activity promotes actin dynamics and intestinal epithelial barrier function. *Front Gastroenterol.* 1: 901404, 2022
  49. Lee JM. Relationship between symptom severity, sleep quality, and quality of life in patients with irritable bowel syndrome [master's thesis]. Daegu: Keimyung



- University. p1-62, 2012
50. Leonard SG, Sweeney T, Bahar B, Lynch BP, O'Doherty JV. Effect of dietary seaweed extracts and fish oil supplementation in sows on performance, intestinal microflora, intestinal morphology, volatile fatty acid concentrations and immune status of weaned pigs., *Br J Nutr.* 105(4):549-560, 2011
  51. Lewis SJ, Heaton KW. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time, *Scand J Gastroenterol.* 32(9):920-924, 1997
  52. Liu F, Zhang X, Ji Y. Total flavonoid extract from hawthorn (*Crataegus pinnatifida*) improves inflammatory cytokines-induced epithelial barrier defect. *Med Sci Monit.* 26:e920170, 2020
  53. Lopresti AL, Smith SJ, Rea A, Michel S. Efficacy of a curcumin extract (Curcugen™) on gastrointestinal symptoms and intestinal microbiota in adults with self-reported digestive complaints: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *BMC Complement Med Ther.* 21(1):40, 2021
  54. Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC. Functional bowel disorders, *Gastroenterology.* 130:1480-1491, 2006
  55. Maaser C and Kangnoff MF. Role of the intestinal epithelium in orchestrating innate and adaptive mucosal immunity. *Z Gastroenterol.* 40:525-529, 2002
  56. Mugie SM, Benninga MA, Di Lorenzo C. Epidemiology of constipation in children and adults: A systemic review, *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 25(1):3-18, 2011
  57. Na JR, Oh KN, Park SU, Bae D, Choi EJ, Jung MA, Choi CY, Lee DW, Jun W, Lee KY, Kim YJ, Kim S. The laxative effects of Maesil (*Prunus mume* Siebold & Zucc.) on constipation induced by a low-fibre diet in a rat model, *Int J Food Sci Nutr.* 64(3):333-345, 2013
  58. Ouellette AJ et al. Paneth cell defensins and innate immunity of the small bowel. *Inflamm Bowel Dis.* 7:43-50, 2001
  59. Park JJ, Chon NR, Lee YJ, Park H. The effects of an extract of *Atractylodes japonica* rhizome, SKI3246 on gastrointestinal motility in guinea pigs. *J Neurogastroenterol Motil.* 21(3):352-60, 2015
  60. Paroni R, Fermo I, Molteni L, Folini L, Pastore MR, Mosca A, Bosi E. Lactulose and mannitol intestinal permeability detected by capillary electrophoresis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 834(1-2):183-7, 2006
  61. Pérez-Berezo T, Ramírez-Santana C, Franch A, Ramos-Romero S, Castellote C,

- Pérez-Cano FJ, Castell M. Effects of a cocoa diet on an intestinal inflammation model in rats. *Exp Biol Med* (Maywood). 237(10):1181-1188, 2012
62. Peterson LW and Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Reviews. Immunology*. 14(3):141-153, 2014
63. Ruiz-Malagón AJ, Rodríguez-Sánchez MJ, Rodríguez-Sojo MJ, Vezza T, Pischel I, Algieri F, Rodríguez-Cabezas ME, Rodríguez-Nogales A, Gálvez J. Intestinal anti-inflammatory and visceral analgesic effects of a Serpylli herba extract in an experimental model of irritable bowel syndrome in rats. *Front Pharmacol*. 13:967644, 2022
64. Romagnuolo J, Schiller D, Bailey RJ. Using breath test wisely in a gastroenterology practice: an evidence-based review of indications and pitfalls in interpretation. *Am J Gastroenterol*. 97(5):1113-1126, 2002
65. Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases, *Gastroenterology*. 134(2):577-594, 2008
66. Schmulson MJ, Drossman DA. What Is New in Rome IV. *J Neurogastroenterol Motil*. 23(2):151-163, 2017
67. Scocco P, Forte C, Franciosini MP, Mercati F, Casagrande-Proietti P, Dall'Aglio C, Acuti G, Tardella FM, Trabalza-Marinucci M. Gut complex carbohydrates and intestinal microflora in broiler chickens fed with oregano (*Origanum vulgare* L.) aqueous extract and vitamin E. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 101(4):676-684, 2017
68. Suares NC, Ford AC. Prevalence of, and risk factors for, chronic idiopathic constipation in the community: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 106:1582-1591, 2011
69. Wardill HR, Bowen JM, Gibson RJ. Biomarkers of small intestinal mucosal damage induced by chemotherapy: an emerging role for the <sup>13</sup>C sucrose breath test. *J Support Oncol*. 11(2):61-7, 2013
70. Weir I, Shu Q, Wei N, Wei C, Zhu Y. Efficacy of actinidin-containing kiwifruit extract Zyactinase on constipation: a randomised double-blinded placebo-controlled clinical trial. *Asia Pac J Clin Nutr*. 27(3):564-571, 2018
71. Williams GM, Leary SD, Ajami NJ, Chipper Keating S, Petrosin JF, Hamilton-Shield JP, Gillespie KM. Gut microbiome analysis by post: Evaluation of the optimal method to collect stool samples from infants within a national cohort study. *PLoS*

- One. 14(6):e0216557, 2019
72. Wu L, Gao L, Jin X, Chen Z, Qiao X, Cui X, Gao J, Zhang L. Ethanol extract of mao jian green tea attenuates gastrointestinal symptoms in a rat model of irritable bowel syndrome with constipation via the 5-hydroxytryptamine signaling pathway. *Foods*. 12(5):1101, 2023
  73. Xu D, Gao J, Gilliland M 3rd, Wu X, Song I, Kao JY, Owyang C. Rifaximin alters intestinal bacteria and prevents stress-induced gut inflammation and visceral hyperalgesia in rats. *Gastroenterology*. 146(2):484-96, 2014
  74. Yang HS, Haj FG, Lee M, Kang I, Zhang G, Lee Y. Laminaria japonica extract enhances intestinal barrier function by altering inflammatory response and tight junction-related protein in lipopolysaccharide-stimulated caco-2 cells. *Nutrients*. 11(5):pii E1001, 2019
  75. Yu L, Huang C, Yang W, Ren Z, Li L, Cheng H, Lin C, Zhai L, Ning Z, Wong HX, Han Q, Jia W, Bian Z, Zhao L. Aqueous cinnamon extract ameliorates bowel dysfunction and enteric 5-HT synthesis in IBS rats. *Front Pharmacol*. 13:1010484, 2023
  76. Zhang S, Xu M, Sun X, Liu X, Choueiry F, Xu R, Shi H, Zhu J. Black raspberry extract shifted gut microbe diversity and their metabolic landscape in a human colonic model. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 1188:123027, 2022
  77. Zhu HM, Li L, Li SY, Yan Q, Li F. Effect of water extract from *Berberis heteropoda* Schrenk roots on diarrhea-predominant irritable bowel syndrome by adjusting intestinal flora. *J Ethnopharmacol*. 237:182-191, 2019

## 건강기능식품 기능성 평가 가이드(민원인 안내서)

- 장 건강 관련 -

---

발행인 : 강석연

편집위원장 : 오금순

편집위원 : 이순호, 김용무, 박유경, 서은채, 정유경, 이다선,  
성예지, 전해련, 류다연, 김기옥

발행처 : 식품의약품안전평가원

발행일 : 2024년 12월

문의처 : 식품위해평가부 영양기능연구과  
043-719-4402

---



**【부패.공익신고】 신고자 및 신고내용은 보호됩니다.**

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