

건강기능식품 기능성 평가 가이드

(민원인 안내서)

청력 관련

2023. 12.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

지침서 · 안내서 제 · 개정 점검표

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

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

등록대상 여부	☐ 이미 등록된 지침서 · 안내서 중 동일 · 유사한 내용의 지침서 · 안내서가 있습니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 기존의 지침서 · 안내서의 개정을 우선적으로 고려하시기 바랍니다. 그럼에도 불구하고 동 지침서 · 안내서의 제정이 필요한 경우 그 사유를 아래에 기재해 주시기 바랍니다. (사유 :)	
	☐ 법령(법 · 시행령 · 시행규칙) 또는 행정규칙(고시 · 훈령 · 예규)의 내용을 단순 편집 또는 나열한 것입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 단순한 사실을 대외적으로 알리는 공고의 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 1년 이내 한시적 적용 또는 일회성 지시 · 명령에 해당하는 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 외국 규정을 번역하거나 설명하는 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 신규 직원 교육을 위해 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 정리한 자료입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
☞ 상기 사항 중 어느 하나라도 '예'에 해당되는 경우에 지침서 · 안내서 등록 대상이 아닙니다. 지침서 · 안내서 제 · 개정 절차를 적용하실 필요는 없습니다.		
지침서 · 안내서 구분	☐ 내부적으로 행정사무의 통일을 기하기 위하여 반복적으로 행정사무의 세부기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용)	☐ 예(☞지침서) ☒ 아니오
	☐ 대내외적으로 법령 또는 고시 · 훈령 · 예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것입니까? (민원인용)	☒ 예(☞안내서) ☐ 아니오
기타 확인 사항	☐ 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설 · 강화하거나 민원인을 구속하는 내용이 있습니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고 지침서 · 안내서 제 · 개정 절차를 진행하시기 바랍니다.	
상기 사항에 대하여 확인하였음.		
2023년 12월 일		
담당자 확 인(부서장)		
이 해 영		

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

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술방식(‘~하여야 한다’ 등)에도 불구하고 민원인 여러분께서 반드시 준수하셔야 하는 사항이 아님을 알려드립니다. 또한, 본 안내서는 2023년 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 영양기능연구과으로 문의하시기 바랍니다.

전화번호: 043-719-4402

팩스번호: 043-719-4420

제·개정 이력

연번	제·개정번호	승인일자	주요내용
1	안내서-1346-01	2023.12.	제정

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

※ 약어	3
------------	---

I 서론	5
-------------------	---

II 일반적 사항	5
------------------------	---

1. 개요	5
-------------	---

2. 보건학적 중요성	19
-------------------	----

III 기능성 시험 방법	21
----------------------------	----

1. 바이오마커의 선정	21
--------------------	----

2. 주요 바이오마커의 측정 방법	31
--------------------------	----

3. 시험 설계 시 고려사항	43
-----------------------	----

4. 안전성 평가	52
-----------------	----

IV 참고문헌	53
----------------------	----

건강기능식품의 기능성 개요

□ 기능성 정의

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

□ 기능성 구분

건강기능식품의 기능성은 3가지로 구분할 수 있다.

○ 건강기능식품의 기능성 구분

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

□ 건강기능식품 기능성 원료의 기능성 내용과 인정기준

건강기능식품 기능성 원료의 기능성 내용과 인정기준은 다음과 같다.

○ 건강기능식품 기능성 원료의 기능성 내용과 인정기준

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

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

약 어

ABR	Auditory brainstem response
AIF	Apoptosis-inducing factor
ARHL	Age-related hearing loss
ASHA	American Speech language-Hearing Association
ASSR	Auditory steady state response
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CPS	Cycle per second
dB	decibel
dB SPL	decibel sound pressure level
dB SL	decibel sensation level
dB HL	decibel hearing level
DPOAE	Distortion product OAE
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase
GPx	Glutathione peroxidase
H&E	Haematoxylin and eosin
HC	Hair cell
HEI-OC1	House Ear Institute–Organ of Corti 1
HHIE	Hearing handicap inventory for the elderly
HHIE-S	Hearing handicap inventory for the elderly-screening version
HIF-1	Hypoxia-inducible factor-1
HINT	Hearing in noise test
HORAC	Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity
HTL	Hearing threshold level
Hz	Hertz
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
ISO	International Organization for Standardization

KHHIE	Korean version of Hearing handicap inventory for the elderly
KHHIE-S	Korean version of Hearing handicap inventory for the elderly-screening version
KS-BWL-A	Korean Standard Bisyllabic Word List for Adults
MCL	Most comfortable loudness level
mtDNA	Mitochondrial DNA
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
NIHL	Noise-induced hearing loss
OAE	Otoacoustic emission
ODIHL	Ototoxic drug-induced hearing loss,
PBS	Phosphate buffered saline
PTA	Pure-tone audiometry
RCT	Randomized, controlled trial
Real time-PCR	Real time-Polymerase Chain Reaction
ROS	Reactive oxygen species
SDT	Speech discrimination Test
SEM	Scanning electron microscopy
SGN	Spiral ganglion neuron
SNHL	Sensorineural hearing loss
SOAE	Spontaneous otoacoustic emission
SOD	Superoxide dismutase
SRT	Speech recognition threshold
SSHL	Sudden sensoryneural hearing loss
TEOAE	Transient evoked otoacoustic emission
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) mediated dUTP Nick End Labelling
UB-OC1	University of Bristol-Organ of Corti 1
UCL	Uncomfortable loudness level
VOT-E36	Ventral Otocyst-Epithelial cell line number 36
WHO	World Health Organization
WRS	Word recognition score

I 서론

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

II 일반적 사항

1. 개요

가. 청각기관과 소리

(1) 청각기관의 구조

청각기관은 외이, 중이, 내이로 구성되어 있다. 외이는 귓바퀴와 외이도로 구성되어 있는데 귓바퀴는 피부와 연골로 만들어져 있고, 스피커와 깔대기 같은 모양으로 소리를 모으는 작용을 한다. 소리는 외이도를 통해 고막으로 전달된다. 고막은 두께 0.1 mm, 직경 약 8~9 mm의 세로가 긴 타원형의 얇은 막이며, 외이도를 통해 들어 온 소리는 고막을 진동시킨다. 중이는 고실, 이관, 유양 돌기부로 구성되어 있고, 내이는 달팽이관, 전정 및 세반고리반으로 되어 있다. 고막의 진동은 청소골(이소골)에 의해 증폭되어 달팽이관에 전달된다. 달팽이관 입구에서는 고주파를 인식하고 뒤쪽으로 갈수록 저주파를 인식한다. 달팽이관은 전달받은 소리의 진동 상태를 분석하여 뇌신경에 전달한다. 내이는 소리에너지를 신경신호로 전환시키는 기계적인 자극을 감지하는 유모세포(hair cell, HC)를 포함하고 있다. 유모세포는 나선신경절(spiral ganglion)의 신경세포에 분포되어 있는데, 유모세포는 손상된 후에는 재생이 되지 않는다. 유모세포의 고사(death)는 결과적으로 나선신경절세포(spiral ganglion neurons, SGN)의 퇴화를 가져온다(그림 1).

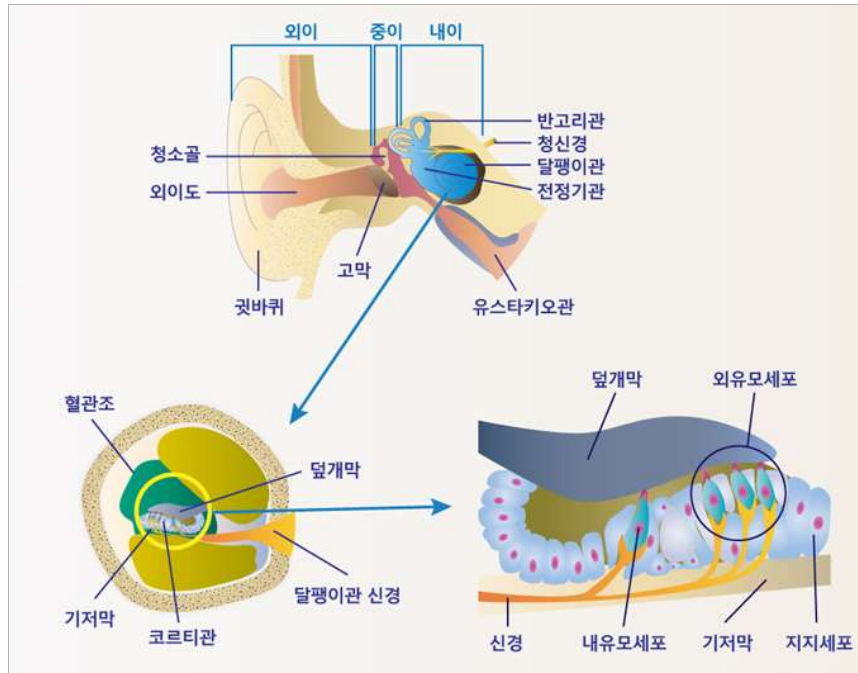


그림 1. 청각기관의 구조

[출처: N Engl J Med 377(25): 2465-2473, 2017]

(2) 소리

소리는 음원의 진동에 의해 생성되어 주변의 공기 분자를 움직이는 파동으로, 멀리 떨어진 공기 분자로 확산되어 청각기관에 전달된다.

주파수(frequency)는 소리의 높고 낮음을 말하고 단위시간(1초)에 반복된 cycle의 수(cycle per second, CPS)이며, 단위는 Hertz(Hz)이다. 진폭(amplitude)은 소리 크기로 단위는 데시벨(decibel, dB)이다. 데시벨의 종류에는 dB SPL(sound pressure level, 물리적 압력의 크기), dB SL(sensation level, 개인의 청력 역치), dB HL(hearing level, 정상 청력을 가진 사람이 들을 수 있는 최소 가청역치(hearing threshold level, HTL)등이 있다. 인간의 가청영역 주파수는 20~20,000 Hz이고 회화영역은 250~2,000 Hz 정도이다 (그림 2, 표 1).

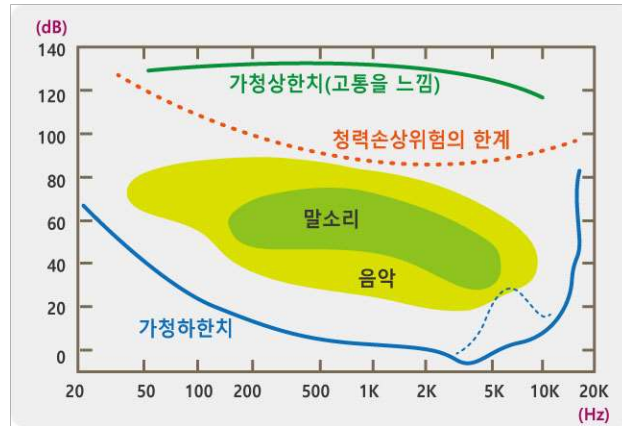


그림 2. 인간의 가청역과 소리 크기 분포

[출처: 산업재해예방 안전보건공단. 직업건강 가이드라인, 2015]

표 1. 소리크기와 일상생활의 예

SPL(dB)	해당 음압의 소리	위험도
0	들을 수 있는 한계	
10	낙엽 스치는 소리	
20	조용한 도시의 아파트	
30	속삭임	
40	조용한 라디오 음악	
50	낮은 목소리의 대화	
60	정상적인 크기의 대화	불쾌한 자극
70	고속 승용차	대화 불가능
80	교통량이 많은 거리	위험함
90	큰 트럭	손상 가능함
100	판금 공장	
110	착암기, 전기톱	
120	프로펠러 비행기	매우 위험함
130	고통을 느끼는 한계	
140	제트기 엔진	

[출처: 산업재해예방 안전보건공단. 직업건강 가이드라인, 2015]

나. 난청 및 청력

(1) 난청의 분류

난청(hearing loss)은 외이, 중이, 내이 및 신경전달경로 중 어느 부분의 이상으로 청력이 감소된 상태이다. 난청은 전음성 난청, 감각신경성 난청, 혼합성 난청(전음성과 감각신경성 혼합)으로 분류된다.

(가) 전음성 난청(Conductive hearing loss)

외이와 중이에 장애가 있는 경우로, 원인으로는 중이에 물이 차거나, 알레르기, 중이의 감염, 귀인두관의 기능 이상, 고막에 구멍이 생김, 중양(암은 아니나 외이와 중이를 막을 수 있음), 귀지에 의해 외이도 막힘, 외이도염, 외이도의 기형, 중이 안의 뼈 이상 등이 있다.

(나) 감각신경성 난청(Sensorineural hearing loss, SNHL)

감각신경성 난청은 내이와 내이로부터 뇌로의 신경경로에 장애가 있는 것으로 그 원인은 복잡하고 선천적, 후천적 요인에 의해 발생한다. 선천적 청력손실은 출생이나 초기 발달과정에 발생하며 후천적 청력손실은 노화, 소음 노출, 이독성 약물복용 등에 의해 발생한다. 감각신경성 난청은 회복 혹은 치료가 어려운데 그 이유는 유모세포와 신경조직들이 손상되면 재생이 되지 않기 때문이다. 감각신경성 난청에는 노화성 난청, 소음성 난청, 이독성 난청, 돌발성 난청 등이 있다.

① 노화성 난청(Age-related hearing loss, ARHL)

노화성 난청은 노인성 난청(presbycusis)이라고도 하며, 평생 청각신경계가 받는 모든 손상에 의해 청력이 손상된 것을 의미하며 감각신경성 난청의 가장 일반적인 형태이다. 노화성 난청은 노화 과정뿐 아니라 유전적인 요인, 소음, 혈관성 또는 대사성 요인, 이독성 약물 노출 등에 의해 발생한다.

② 소음성 난청(Noise-induced hearing loss, NIHL)

소음성 난청은 청각기관이 85 dB 이상의 매우 강한 소리에 지속해서 노출되면 내이의 유모세포 손상 때문에 나타나는 감각신경성 난청이다. 대부분 산업현장에서 발생하는 여러 음역이 섞여 있는 소음에 노출되는 경우에 발생한다. 소음 노출이 중단되면 손상당한 청각

세포에 한해서 퇴행성 변화가 나타나며, 이미 손상된 청력 이상으로 악화하지 않는다. 과거의 소음 노출에 의해 더 민감하게 반응하지 않으며, 지속적인 소음 노출이 단속적인 소음 노출보다 더 위험한 특징을 보인다.

③ 이독성 난청(Ototoxic drug-induced hearing loss, ODIHL)

이독성 난청은 약물복용에 의한 부작용으로 나타나는 감각신경성 난청이다. 주로 항암제와 항생제의 섭취로 나타난다. 예를 들어 Cisplatin은 항암제로 두경부의 편평세포암 치료에 흔히 사용되는 약물로 복용 초기에는 외유모세포의 변성을 일으키고, 계속 복용하면 내유모세포의 변성을 초래하여 고주파수에서 시작되어 저주파수로 청력손실을 유발하는데 청력손실은 약물 복용량에 비례한다. Aminoglycosides 항생제(예: gentamycin 등)도 신장독성, 이독성 등의 부작용이 있으며, 특히 이독성으로 인해 귀의 유모세포와 신경을 손상해 청력손실을 일으킨다.

④ 돌발성 난청(Sudden sensoryneural hearing loss, SSSL)

돌발성 난청은 갑작스럽게 발생하는 것으로 일측성 또는 양측성 청력손실이 나타나며, 초기에 정확한 진단과 적절한 치료가 되지 않으면 영구적인 청력 장애를 초래하는 감각신경성 난청의 한 종류이다. 돌발성 난청은 순음청력 검사에서 3개 이상의 연속 된 주파수에서 30 dB 이상의 청력 손실이 3일(72시간) 이내에 갑자기 나타나는 것으로 정의된다. 돌발성 난청의 원인으로 전신적 염증 상태, 혈전이나 혈관 경련 등에 의한 내이의 혈액 순환장애, 바이러스 감염, 자가면역질환, 청신경 종양, 내이 막 파열 등이 논의되고 있으나 아직 원인이 확실하지 않다. 돌발성 난청은 연중 3월과 4월에 가장 높은 발생률을 보이고 상기도 감염과 관련된 기후 인자들의 연중 변이와 일치하고, 미세먼지 농도와 돌발성 난청의 발생은 유의한 상관관계가 있다고 보고되었다. 치료법으로 steroid 호르몬제를 일차적으로 사용하는 경우가 많으며 항바이러스제, 항생제, 이노제, 혈관확장제, 혈장 증량제 및 고압산소요법 등을 사용하고 있으나 치료법에도 이견이 많다.

(다) 혼합성 난청(Mixed hearing loss)

전음성 난청과 감각신경성 난청이 동시에 나타나는 경우로, 외이, 중이, 내이와 신경에 장애가 있는 경우이다. 원인으로서는 전음성 난청과 감각신경성 난청을 일으키는 모든 요인이 될 수 있다. 예를 들어 직업적으로 소음에 노출된 상태에서 중이에 물이 찰 수 있으며, 한가지 원인보다 두 가지 원인이 함께 작용하면 더 심각한 상태가 될 수 있다.

(2) 난청 기준

난청의 기준은 순음청력검사 결과에 따르며 American Speech language-Hearing Association(ASHA), Centers for Disease Control and Prevention(CDC), World Health Organization(WHO), ISO(International Organization for Standardization, 1969) 등에서 제시된 기준들이 사용된다(표 2). 연구설계에 따라 난청의 기준을 선택할 수 있다.

표 2. 난청 기준

구분	Hearing loss range (dB HL)			
	ASHA	CDC	WHO	ISO
Normal	-10~15	≤25	≤20	10~26
Slight	16~25	-		-
Mild	26~40	26~40	20~<35	27~40
Moderate	41~55	41~55	35~<50	41~55
Moderate-severe	56~70	56~70	50~<65	56~70
Severe	71~90	71~90	65~<80	71~90
Profound	≥91	≥91	80~<95	≥91
Complete/deafness	-	-	≥95	-

[출처: Clark JG. Uses and abuses of hearing loss classification. ASHA 23:493-500, 1981;
<https://www.asha.org/public/hearing/degree-of-hearing-loss>);
https://www.cdc.gov/nchs/data/nhanes/2015-2016/manuals/2016_Audiometry_Procedures_Manual.pdf; World Health Organization. World report hearing. 2021.]

(3) 청력검사

청력검사는 사람의 의사소통능력 중 청취 능력을 직·간접적으로 확인하는 검사이다. 청력검사는 청력 감소의 원인이 외이 및 중이의 장애(전음성 난청)에 의한 것인지, 내이의 달팽이관이나 그 이상의 중추의 신경 기능장애(감각신경성 난청)에 의한 것인지에 대한 진단에 사용된다. 청력검사는 청력손실의 유·무, 청력손실의 정도 및 유형을 확인하고, 원인을 진단하고 치료 방향을 설정하며, 치료 효과를 판정하는 데 기초로 사용된다.

청력검사는 선별검사(screening audiometry)와 진단검사(diagnostic audiometry)로 구별되고, 선별검사는 다수의 피검자를 대상으로 청력손실의 유·무를 선별하는 방법이고, 진단검사는 선별 청력검사에서 청력손실이 의심되거나 청력손실을 자각하여 의학적인 처치나 청각 재활을 원하는 대상자에게 실시하는 방법으로 청력손실의 정도와 유형 등을 좀 더 정밀하고 객관적으로 측정할 수 있다.

청력검사는 주관적 청력검사(subjective audiometry)와 객관적 청력검사(objective audiometry)로 나뉘며, 주관적 청력검사는 소리 자극에 대한 인지 여부를 피검자의 주관적 판단에 의존하는 것으로 예로는 순음청력검사(pure tone audiometry, PTA), 어음청각검사(speech audiometry)등이 있다. 객관적 청력검사는 소리자극에 의해 발생한 청각전달로의 다양한 신호를 객관적으로 기록하는 것으로 예로는 청성유발반응(auditory evoked response), 이음향방사(otoacoustic emission, OAE)등이 있다(표 3).

시험물질이 청력유지에 도움을 주는지를 관찰하는 동물실험에서는 주로 객관적 청력검사 방법인 청성뇌간반응이 주지표로 가장 많이 사용되고 청성지속반응과 변조이음향방사(distortion product otoacoustic emissions, DPOAEs)가 부지표로 사용할 수 있다. 인체적용시험에서는 주관적 청력검사 방법인 순음청력검사가 주지표로 가장 많이 사용되며, 어음인지역치(speech recognition threshold, SRT)가 부지표로 사용되기도 한다. 연구목적에 적합한 청력검사를 선정하여 실시해야 한다.

표 3. 주요 청력검사 종류

구분	종류	특징
주관적 청력검사	순음청력검사 (pure tone audiometry, PTA)	주관적 청력검사 중 가장 기본이 되며, 주파수별 청력역치를 구함. 청력손실의 유형과 형태 등을 평가하며 난청의 정도와 청각장애 정도를 판정하는 기준으로 사용된다.
	어음청력검사 (speech audiometry)	단음절, 이음절, 문장 등을 이용하여 회화 어음에 대한 능력을 검사하여, 실제 대화 상황에서의 의사소통 능력을 확인할 수 있다. 의사소통에서 어음을 사용하여 민감성(sensitivity) 및 인지도(recognition)등의 능력을 평가할 수 있다. 난청 환자의 사회 적응 능력과 장애를 평가할 수 있다. - 어음청취역치(speech recognition threshold, SRT):이음절어를 제시하고 50% 인지할 수 있는 최소 강도 수준 측정 - 어음명료도검사(speech discrimination score)(=어음인지도): 듣기 편안한 강도에서 단음절 단어를 제시하고 얼마나 정확히 인지하는지를 백분율로 계산함 - Hearing in noise test(HINT):소음이 있는 상황에서 간단한 문장의 인지수준 측정 - 쾌적레벨(most comfortable loudness level, MCL):가장 편안하게 자극음을 인지할 수 있는 레벨 - 불쾌레벨(uncomfortable loudness level, UCL):자극음이 불쾌/불편할 정도로 큰 레벨
객관적 청력검사	이음향방사 (otoacoustic emission, OAE)	이음향방사는 순음청력검사로는 알 수 없는 달팽이관의 민감한 변화를 추적할 수 있다. - 유발 이음향방사(evoked otoacoustic emissions, OAE); 변조 이음향방사(distortion product otoacoustic emissions, DPOAEs), 일과성 유발 이음향방사(transient evoked otoacoustic emissions, TEOAEs) - 자발 이음향방사(spontaneous otoacoustic emissions, SOAEs)
	청성유발반응 (auditory evoked response)	순음청력검사에 의한 난청을 판정할 때 신뢰도를 높이기 위해 객관적인 청력검사 방법으로 전기생리학적 특성을 분석하는 청력 역치를 측정하며, 청신경계의 신경학적 병변을 평가한다. - 청성뇌간반응 검사(auditory brainstem response, ABR) - 청성지속반응검사(auditory steady state response, ASSR)

[출처: J Clinical Otolaryngol 19:25-35, 2008; Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 58(3):182-186, 2015; J Clinical Otolaryngol 28(2): 192-198, 2017; Commun Sci Disord 25(1):142-155, 2020]

다. 노화성 난청

건강기능식품으로 ‘청력유지’에 도움을 줄 수 있는 난청의 범위를 검토해보면, 전음성 난청은 외이와 중이의 구조적 장애나 질병에 의한 것으로 건강기능식품으로 도움을 받을 수 있는 범위에 속하지 않는다. 감각신경성 난청은 여러 원인에 의해 청각세포가 손상되는 것인데 소음(소음성 난청)이나 약물(이독성 난청)에 의한 손상은 소음이나 약물 등 난청을 유발하는 원인을 제거하면 청력손실이 더 이상 진행되지 않는 특징이 있다. 노화성 난청은 감각신경성 난청의 가장 일반적인 형태로, 일생 동안 청각신경계가 받는 모든 손상에 의해 청력이 손상된 것을 의미한다. 그러므로 ‘청력유지’에 도움을 줄 수 있는 건강기능식품의 기능성은 노화와 관련하여 지속적이며, 자연적으로 감소가 일어나는 청각세포의 손상을 지연시키는데 도움을 줄 수 있는 것을 범위로 하는 것이 적합하다고 판단된다. 그러므로 본 ‘노화로 인해 감소될 수 있는 청력유지에 도움을 줄 수 있음’ 평가 가이드는 감각신경성 난청 중 노화성 난청을 대상으로 기능성 원료의 기능성을 평가하는 것으로 범위를 설정하였다.

(1) 노화성 난청의 특징

노화성 난청(노인성 난청, presbycusis)은 일생 동안 청각신경계가 받은 손상에 의해 청력이 손실되는 것으로 나이가 증가함에 따라 발생이 증가하며, 주로 노인에서 나타난다. 노화성 난청은 노화 과정뿐 아니라 유전적인 요인, 소음, 혈관성 또는 대사성 요인, 이독성 약물 노출 등에 의해서도 발생할 수 있다. 노화성 난청의 청력손실은 청력 역치의 상승과 함께 중추신경계의 언어 인지 능력이 저하되는 증상을 보이고, 특히 소음 환경에서 중추신경계의 청각처리능력이 저하되어 어음 분별력 및 소리의 위치 감각이 떨어지게 된다. 즉, 노화성 난청이 있는 사람은 같은 청력을 지닌 젊은 사람에 비해 소음 조건에서의 언어 인지 능력이 유의적으로 낮은 특징을 보인다. 이는 노화 과정에서 말초신경계와 중추신경계의 손상이 함께 나타나기 때문에 노화로 인한 인지 저하가 난청과 함께 나타나 소음 조건에서의 언어 인지 능력에 부정적인 영향을 줄 수 있기 때문이다.

노화성 난청은 양측 대칭성으로 초기에는 1,000 Hz 이상의 고주파수대역의 청력이 저하되기 시작하며, 점차적으로 저음과 중간 음역대까지 청력이 저하된다. 청력 감소는 30대부터 시작되나, 1,000 Hz 부근의 회화영역에 청력감소가 생겨 실제로 잘 안 들린다고 느끼게 되는 때는 40~60세이고, 60대가 되면 질병, 외상, 퇴행성 변화 등의 요인에 의하여 저주파 대역에서도 청력이 감소한다. 일반적으로 40세 이하 젊은 층은 8,000Hz

영역에서 청력손실치가 감소하는 반면, 50세 이후는 연령이 증가할수록 8,000Hz 영역에서 청력손실치가 증가된다. 그러나 노화성 난청 시작 연령대와 진행형태, 난청 정도는 개인적인 편차가 심하다. 60대 남성의 고음 영역의 청력검사에서 최하위 10%에서는 55~75 dB의 청력 역치를 보이며, 최상위 10%에서는 10 dB 보다 더 좋은 결과를 보이기도 한다.

그리고 초기에는 순음청력검사를 통해 소음성 난청과 구별이 가능하지만 난청이 진행된 이후에는 청력검사만으로 구별하기 어렵다. 소음성 난청의 경우 저음역(2,000 Hz 이하)에서 40 dB 이상, 고음역에서는 75 dB 이상의 청력손실이 일어나지 않으나, 노인성 난청과 중복되면 그 기준을 초과할 수 있다.

(2) 노화성 난청의 진단

순음청력검사를 500, 1,000, 2,000, 4,000 Hz 에서 실시하여 청력 역치를 4분법 혹은 6분법으로 평균 청력 역치를 산출한다. 임상적으로 양측 귀 평균 청력 역치가 26 dB HL 이상, 기도 청력과 골도 청력 차이가 10 dB 미만인 감각신경성 난청이면서, 양측 귀의 청력 손실이 차이가 20 dB 이하로 대칭적인 경우 노화성 난청으로 진단한다.

(3) 노화성 난청의 분류

노화에 의한 청력기관의 조직학적 변화는 유모세포와 신경세포의 손실, 조직의 변성, 달팽이관 측벽의 세포사멸 등이 있다. 이러한 말초와 중추성 청각기관의 노화가 노화성 난청의 주요 원인이다. 노화성 난청은 생리학적인 특징과 청력도에 따라 감각성, 신경성, 대사성, 달팽이관 전도성, 중간성, 혼합성으로 분류된다(표 4).

표 4. 노화성 난청 분류

구분	특징
감각성 노화성 난청	내이의 유모세포와 지지세포의 전반적인 손상으로 달팽이관의 기저부 말단에서 손상이 발생한다. 청력검사 상에서 저주파수대에서는 정상이나 고주파수대에서 급격한 청력 감소가 나타나는 급하강형 청력도가 나타난다.
신경성 노화성 난청	구심성 청신경세포 수가 정상 신생아의 50% 이하로 감소한 것으로 달팽이관 기저부에서의 감소가 더 심하여 저주파수대와 비교하면 고주파수대에서의 청력손실이 더 심한 하강형 청력도가 나타난다.
대사성 노화성 난청	달팽이관 외벽과 혈관조(stria vascularis)가 30% 이상 소실된 것으로 내림프 조성이 변화하고, 유모세포에서 사용되는 에너지대사에 문제가 생긴 것이다. 저주파수대와 고주파수대의 청력손실이 비슷한 수평형 청력도가 나타난다.
달팽이관 전도성 노화성 난청	달팽이관 기저막의 유리질화(hyalinization)와 코르티관의 강직이 원인으로 고주파수대에서 손상이 시작되어 청력손실이 양측에서 진행되면서 저음역으로 전파되는 하강형의 청력도가 나타난다.
혼합성 노화성 난청	위의 네 가지 유형 중 두 가지 이상의 청력손실이 결합된 형태를 말하며, 다양한 청력도가 나타난다.
중간성 노화성 난청	위의 유형 기준에 맞지 않는 경우를 말한다.

[출처: An Otol Rhinol Laryngol 102(1 pt 2):1-16, 1993; 청능재활 8:224-237, 2012; Commun Sci Disord 22(1):170-176, 2017; 동국의학 12(1): 66-74, 2005; Hanyang Med Rev 35:78-83, 2015]

(4) 노화성 난청의 발생기전

노화성 난청의 기전으로는 산화스트레스 증가, 산화적 손상으로 인한 미토콘드리아 DNA 손상 증가, 유모세포와 spiral ganglion neuron(SGN) 등의 청각기관 세포의 세포사멸 증가, 염증 상태 변화, 달팽이관으로의 혈액공급 감소로 인한 저산소증, 나이와 관련된 혈관 변화 등이 논의되고 있다.

(가) 산화스트레스

산화스트레스는 유모세포의 손상을 일으킬 수 있다. 세포 내 미토콘드리아에서는 ATP 생산을 위한 전자전달계가 작용하는 동안 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 부산물로 생산된다. ROS(superoxide($\cdot O_2^-$)와 hydroxyl radical($\cdot OH$))들은 매우 불안정하므로 핵 DNA, 미토콘드리아 DNA(mtDNA), 세포막, 세포 내 정상 단백질들을 손상시킨다. 그러므로 산화스트레스가 오랫동안 축적되면 달팽이관 기능이 손상되어 노화성 난청이 발생할 수 있다. 즉, 산화스트레스에 노출되면 유모세포에서는 ROS와 유리기가 생산되고, 이러한 물질들은 세포손상과 세포사(cell death)를 일으킨다. 그러므로 항산화기능을 하는 물질들은 이러한 ROS와 유리기 생산을 억제하여 산화스트레스를 억제하여 유모세포의 손실을 억제하여 청력을 유지할 수 있다는 보고들이 있다.

한편, 체내에는 항산화시스템이 존재하여 산화스트레스로부터 체내 손상을 방어할 수 있다. 체내 항산화시스템인 항산화효소에는 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase(Gpx) 등이 있다. SOD는 superoxide(O_2^-)을 과산화수소(hydrogen peroxide, H_2O_2)와 산소(O_2)로 전환시키며, catalase와 Gpx는 과산화수소를 물(H_2O)과 산소로 분해하여 안전한 물질로 만든다. 항산화효소의 활성은 노화와 함께 감소한다는 보고가 있으므로 노화와 함께 유모세포의 손상이 증가하여 난청이 발생할 수 있다.

(나) 미토콘드리아 손상

세포 내 미토콘드리아에서는 전자전달계를 통하여 ATP가 생산되고 이 과정에서 ROS가 생산되므로 미토콘드리아는 산화적 손상이 일어나는 주요 장소이다. 나이가 증가함에 따라 ROS 생산은 증가하고, 지속적인 ROS에 노출되면 미토콘드리아 DNA(mtDNA)에서 돌연변이가 일어날 수 있고, 세포막, 전자전달계와 같은 미토콘드리아의 주요 구성 성분들의 손상을 일으킬 수 있다. 이러한 손상이 축적되면 미토콘드리아의 기능 이상과 에너지 고갈을 일으키고 결과적으로 조직의 손상이 초래된다. 결과적으로 노화와 함께 산화스트레스 축적으로 인해 미토콘드리아의 산화적 손상이 나타나면, 달팽이관에서의 유모세포와 SGN

감소가 나타나 청력이 손실되고 노화성 난청이 발생할 수 있다. 그러므로 미토콘드리아의 기능이 유지되면 청력손실을 억제할 수 있을 것이다.

(다) 세포사멸

세포사멸은 일반적으로는 더 이상 필요하지 않거나 기관에 해를 주는 세포를 제거하는 과정이지만, 정상기능을 해야 할 세포가 사멸과정을 일으키면, 세포가 죽고 조직이 손상당하게 된다. 세포사멸에는 세포사멸을 촉진이나 억제를 조절하는 인자들(Bcl-2, Bax, Bak, Bid, Bad, p53, c-Jun 등)과 효소(caspases)가 관여한다. 세포사멸은 caspases의 활성화로 시작되는데 caspases는 initiator(caspases initiator 2, 8, 9, 10), executioner(caspases 3, 6, 7), inflammatory(caspases 1, 4, 5)로 구분된다. 세포가 심각한 스트레스에 노출되면 미토콘드리아 경로를 통하여 initiator caspase 9, 8가 활성화되고 다음에 executioner인 caspases 3와 7이 활성화되고, 결과적으로 DNA 분절, 핵단백질, cytoskeleton, protein cross-linking의 파괴, phagocytic cell에서 ligand의 발현이 일어난다. Caspase-의존적인 경로에서, apoptosis-inducing factor(AIF)와 EndoG가 미토콘드리아에서 분비되며 핵으로 이동된다. 세포사멸은 세포 내 DNA가 수선되지 않으며 외부세포로 부터 스트레스를 받거나 세포 안에 정상적으로 접하지 않는 단백질이 축적될 때, 유리기와 활성산소종의 생산이 증가할 때, cytoplasmic pH 가 산성으로 변화하거나, 단백질 변성 등이 일어나면 일어난다.

유모세포와 신경세포는 산화스트레스에 의해 세포사멸을 촉진하는 경로(예, caspase 9, MAPK, cJNK)와 억제하는 경로(예, Bcl-2)의 균형 변화로 세포사멸이 조절될 수 있다. 유모세포와 신경세포에서 세포사멸이 촉진되면 청각기관이 손상되어 노화성 난청이 발생할 수 있다.

(라) 염증

나이가 증가함에 따라 체내에서 면역노화과정이 일어나고 면역반응이 일어나는 동안이나 면역반응 후에 proinflammatory 단백질의 생산조절이 효과적으로 일어나지 않는다. 결과적으로 여러 조직에서 지속해서 높은 염증반응이 관찰되는 만성 염증 상태가 될 수 있는데 이는 노화의 특징적인 과정으로 인식되고 있다. 만성 염증 상태에서는 IL-1 α , IL-2, TNF- α 등과 같은 사이토카인과 NF- κ B가 활성화된다. 이러한 만성 염증 상태는 노화 과정에 따라 내이에서도 나타나며, 내이의 기능장애 및 형태학적 손상을 일으켜 청력손실의 위험을 증가시킨다.

(마) 혈관활성 및 혈액공급

말팔이관에 적절한 혈액공급이 안 되어 저산소증이 되면 산화스트레스가 증가하게 된다. 그러므로 말팔이관에 적절한 혈액공급을 하고 혈압을 낮추고, 혈관 활성과 내피 기능을 개선하면 청각손실이 감소하는 것을 억제할 수 있다는 보고가 있다.

노화성 난청의 발생 기전은 그림 3과 같다.

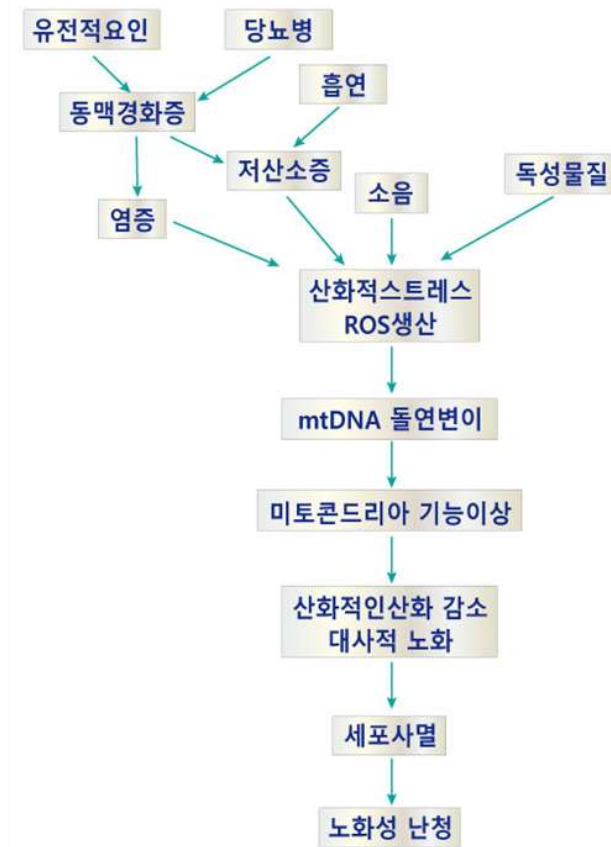


그림 3. 노화성 난청 발생 기전

[출처: Hear Res 303:30-38, 2013]

2. 보건학적 중요성

세계보건기구(World Health Organization, WHO)는 국제장애분류(International Classification of Impairments, Disabilities and Handicaps)에서 청각 손상(hearing impairment)이 있는 사람들에 대하여 장애(disability)로 인정하였다. 또한, 청각장애를 신체적인 결함인 청력손실의 문제에 국한하지 않고 청력손실로 인한 사회 참여 제한, 정서적인 좌절감 등으로 개인이 겪는 다양한 듣기의 어려움으로 규정하고 있다.

노화성 난청의 청력저하 속도는 초기에는 서서히 진행되어 난청을 인지하지 못하며, 나이가 들수록 청력저하 속도가 급격히 빨라진다. 정상 성인의 연구에서 남성이 여성보다 나이 증가에 따라 청력 역치가 빠르게 증가한다는 보고가 있다(그림 4).

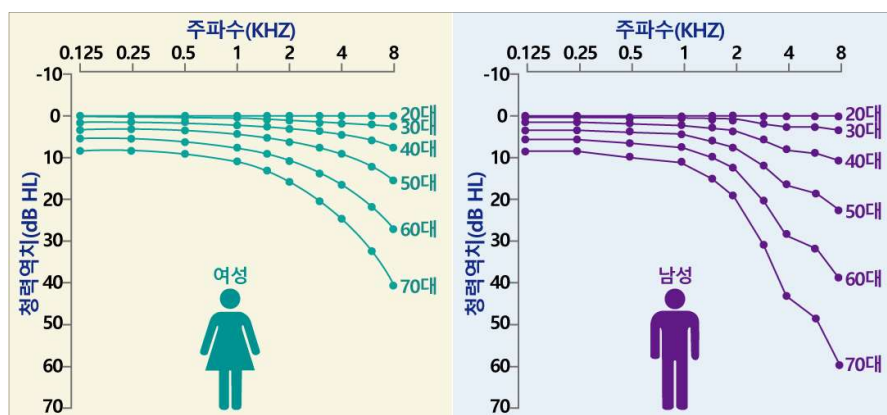


그림 4. 나이 증가에 따른 청력 감소

[출처: J Clin Med 14;9(1):218, 2020]

노인의 청력감소는 다른 사람과의 의사소통에 문제가 생겨 가족과 친구들로부터 사회적, 정서적 고립감을 느끼며, 우울증을 느끼는 경우도 증가한다. 또한, 청력손실은 기억력, 사고력 등과 같은 인지 기능도 저하해, 난청을 방치하면, 난청의 정도가 심해질수록 인지 장애와 치매 위험률이 증가 될 수 있다는 보고도 있으므로 난청은 삶의 질을 낮출 수 있는 중요한 보건문제라고 할 수 있다.

우리나라 건강보험심사평가원 자료에서 전음성 및 감각신경성 청력 소실 환자 수를 보면 2017년 352,846명에서 2020년 412,270명으로 청력 소실 환자 수는 증가하는 추세이다. 국내 청각 장애인의 84.8%가 만 50세 이상으로 고령화에 따른 청각장애가 매우 높게 나타났다.

2017년 노인실태조사에 의하면 우리나라 66세 이상 노인의 10.2%가 청력저하로 어려움을 겪고 있고, 급속한 고령화에 의해 노인의 청력 저하 인구 비율이 증가할 것으로 예상하였다.

난청에는 유전적인 면, 환경적인 면, 심리적인 면 등 여러 인자가 영향을 준다. 유전적인 면을 보면, 난청이 있는 형제가 있는 경우는 그렇지 않은 경우에 비해 4배 이상의 청력손실의 위험이 있다고 보고되었다. 환경적인 인자로는 흡연, 식이, 소음, 약물복용(aminoglycoside, cisplatin, salicylate 등), 체질량지수 등이 노화성 난청과 관련 있다. 흡연과 간접흡연은 용량 의존적으로 청력감소의 위험 비를 증가시킨다. 난청과 식이와의 관련성을 보면 건강하지 않은 식생활과 장기간의 영양손실 등이 난청에 영향을 줄 수 있는데 포화지방산과 콜레스테롤은 적게 섭취하는 반면, 과일과 채소, 다불포화지방산(오메가-3지방산), 단일불포화지방산, 식이섬유, vitamin A, C, E와 같은 항산화제의 섭취가 많으면 노화성 난청의 위험을 감소시킬 수 있다는 보고들이 있다. 체질량지수는 청력손실과 비례한다고 보고되었다. 우리나라의 경우 경도 이상의 난청 비율이 과체중 그룹에서 21.8%, 비만인 그룹에서 21.2% 고도비만 그룹에서 24.1%로 나타났고 과체중 그룹에서 난청의 위험이 1.312배 높다고 보고되었다. 심리적인 요인으로 우울감을 호소하는 노인에서 그렇지 않은 노인에 비해 청력 이상을 호소할 확률이 2배 높아진다는 보고가 있다.

이 외에 체내 산화 불균형 상태와 동반 질환이 노화성 난청과 관련이 있다. 노화와 함께 체내 활성산소종의 생산은 증가하지만, 산화스트레스에 방어하는 기전은 감소하며, 이러한 산화적 불균형이 노화된 달팽이관의 기능을 변화시켜 난청 발생위험이 증가한다. 난청과는 여러 질환이 관련하지만, 특히 노화성 난청에서는 순환기계 질환(뇌졸중, 관상 심장질환 등), 혈행 장애를 초래할 수 있는 고혈압, 고지혈증, 당뇨, 신부전증 등이 관련된다. 순환기계 질환들은 저음영역 대의 난청을 일으키고, 고지혈증과 당뇨병에서는 고음 영역 대의 난청을 일으킨다고 보고되었다.

노화성 난청의 위험을 감소시키는 가장 중요한 방법은 노화성 난청의 위험인자들을 피하는 것이다. 소음 환경에 노출되지 않고, 난청에 영향을 줄 수 있는 순환기계 질환, 당뇨 같은 전신혈 질환의 관리가 중요하다. 남자는 담배, 술, 두부외상, 여성은 약물복용이 관련이 있으므로 이에 주의를 해야 한다. 즉, 정상 체중을 유지하고, 적절한 운동, 스트레스 관리, 술과 담배를 줄이는 건강한 생활 유지가 노화성 난청의 위험을 감소시키는 방법이 될 수 있다. 또한 청력이 감소하지 않고 유지될 수 있는 것을 도와주는 기능성을 가진 안전한 기능성 원료를 포함하는 식품을 섭취하는 것도 도움을 줄 수 있을 것이다.

III 기능성 시험 방법

1. 바이오마커의 선정

가. 연구유형별 바이오마커

노화로 인해 감소될 수 있는 청력 유지에 도움을 줄 수 있으므로 기능성 관련 바이오마커*는 아래의 표를 참고할 수 있다.

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

표 5. 청력관련 기능성에 대한 바이오마커

구분	바이오마커	측정 가능한 연구유형		
		<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	Human
청력 검사	순음청력검사(Pure tone audiometry, PTA)			O
	어음청력검사(Speech audiometry): 어음청취역치(SRT), 어음명료도검사(SDT)			O
	이음향방사(Otoacoustic emission, OAE): 변조이음향방사(DPOAE) 또는 일과성 유발 이음향방사(TEOAE)		O	O
	청성유발반응(Auditory evoked response): 청성뇌간반응(ABR), 청성지속반응(ASSR), Central gain hyperresponse		O	O
조직학적 분석	유모세포 수, 형태	O	O	
	SGNs 수, 형태		O	
항산화 상태	활성산소종(ROS) 생산	O	O	
	항산화효소 활성, 단백질 발현, mRNA 발현	O	O	
	항산화와 관련된 유전자 발현	O	O	
	Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity(HORAC) assay	O	O	
	Hypoxia-Inducible Factor-1(HIF-1)	O	O	

구분	바이오마커	측정 가능한 연구유형		
		<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	Human
미토콘드리아 기능	미토콘드리아 DNA 결손		O	
세포 사멸	세포사멸	O	O	
	세포사멸 관련 효소 활성화, 단백질 발현, mRNA 발현	O	O	
	세포사멸 관련 인자 단백질 발현, mRNA 발현	O	O	
염증	Nuclear factor kappa B(NF- κ B) 활성화, 단백질 발현, mRNA 발현	O	O	
	사이토카인 양, 단백질 발현, mRNA 발현	O	O	O
혈관 활성화 및 혈액 공급	eNOS 발현		O	
	말초혈관 혈류		O	
난청 선별 설문지	Hearing Handicap Inventory for the Adult (HHIA)			O
	Hearing Handicap Inventory for the Elderly (HHIE)			O

나. 바이오마커 설명

(1) 청력검사

(가) 순음청력검사(pure tone audiometry, PTA)

순음청력검사는 주관적 청력검사 중 가장 기본이 되는 검사로, 주파수별 청력역치(의사소통에서 중요한 주파수 범위인 250~8,000 Hz), 청력손실의 유형과 형태 등을 평가하며 난청의 정도를 판정하는 기준으로 사용된다.

자극음의 전달방법에 따라 기도 청력검사(air-conduction threshold audiometry)와 골도 청력검사(bone-conduction threshold audiometry)로 나뉘며, 기도 청력검사는 청각기관의 외이, 중이, 내이 및 청각신경의 청각 능력을 총괄적으로 검사하여 역치를 결정하는 것으로 전체 경로 중 어느 한 곳만 이상이 있어도 비정상적으로 나온다. 골도 청력검사는 진동체로 머리뼈를 진동시켜 머리뼈에 있는 내이를 직접 자극하여 청력을 측정하는 방법으로 외이나 중이를 우회하여 내이 반응을 직접 검사하는 방법이다. 전음성 난청은 외이와 중이의 병변으로 기도 청력검사에만 영향을 주며, 감각신경성 난청은 기도 청력검사와 골도 청력검사에서 모두 비슷한 영향을 준다. 그러므로 기도 청력검사는 난청의 정도를 반영하고, 골도 청력검사는 난청의 종류(전음성, 감각신경성, 혼합성)를 판정할 수 있다. 그러나 청력의 초기 손상 여부에 관해서는 판단하기 어렵고, 여러 주파수에 대한 청력을 확인하는 방법으로 수동적으로 처리하기 때문에 비용과 시간이 많이 소요되는 단점이 있다. 시험물질을 섭취한 인체에서 PTA가 감소하거나 유지되면 청력유지에 도움을 줄 수 있다고 해석할 수 있다.

(나) 어음청력검사

① 어음청취역치(speech recognition threshold, SRT)

SRT 검사는 청각기능을 평가할 뿐만 아니라 언어를 이해하는 의사소통 능력을 평가하는 검사방법으로 노화성 난청 연구에서 많이 사용된다. 순음청력검사는 순음을 귀로 듣고 반응하는 것이며, SRT 검사는 어음을 듣고 뇌에서 뜻을 인지하여 따라 말하는 것으로 중추신경계에 가까운 검사이다. SRT는 강강적 이음절어를 제시했을 때의 결과를 심리측정기능 곡선(psychometric function curve)으로 나타냈을 때 50%를 인지하는 수치 또는 중앙치(median)를 의미한다. 노화성 난청은 신경이 노화되어 나타나는 것으로

순음을 탐지하는 것에 비해 어음을 인지하는 검사에 많은 영향을 준다. PTA와 SRT 검사는 자극음의 차이가 있으나 서로 상관관계가 높다. PTA와 SRT 모두 나이가 많아짐에 따라 상승하나 PTA 증가보다 SRT의 증가가 더 높게 나타난다. PTA와 SRT는 성별에 의한 차이가 없으나 HTL을 주파수별로 살펴보면 나이가 많아짐에 따라 1,000 Hz를 기준으로 여성은 저주파수, 남성은 고주파수가 상대적으로 많은 역치의 변화를 나타낸다. 시험물질을 섭취한 인체에서 SRT가 높아지거나 유지되면 청력유지에 도움을 줄 수 있다고 해석할 수 있다.

② 어음명료도(speech discrimination test, SDT)

SDT는 듣기 편안한 강도에서 단음절 단어를 제시하고 얼마나 정확히 인지하는지를 백분율로 계산한다. 시험물질을 섭취한 인체에서 SDT 유지되면 청력유지에 도움을 줄 수 있다고 해석할 수 있다.

(다) 이음향방사(Otoacoustic emission, OAE)

① 변조이음향 방사(distortion product OAE, DPOAE)

DPOAE는 침습적이고, 객관적인 청력검사인 이음향방사(evoked otoacoustic emissions, OAE)에 속한다. DPOAE는 두 가지 순음을 주었을 때 각 순음의 정배수가 아닌 주파수를 달팽이관에서 발생하는 것을 말한다. 즉, 기본음을 낮은 주파수의 자극음부터 각각 f_1 , f_2 이라고 하며 두 가지의 소리를 주었을 때 달팽이관에서 f_1 , f_2 에 대한 정배수 주파수를 가진 조화음(harmonics, mf_1 또는 nf_2) 이외에 $mf_1 \pm nf_2$ 식의 주파수를 가진 소리를 만들어 낼 수 있다는 것이다. 여러 개의 변조 산물 중 $2f_1 - f_2$ 의 주파수에서 가장 큰 반응을 보인다. DPOAE는 500~8,000 Hz의 넓은 주파수 범위에서 측정하는데 500~5,000 Hz에서 거의 모든 정상 청력을 가진 사람에서 관찰되며, 1,000~2,000 Hz 범위에서 가장 높은 발현률을 나타낸다. DPOAE는 노화성 난청환자에서 고음역에서의 청력손실을 객관적으로 추적하여 달팽이관의 활동성 감소를 확인할 수 있다. DPOAE는 정상청력을 가진 사람에서는 잘 나타나며, 청력역치가 15 dB를 넘지 않으면 DPOAE는 항상 나타나며 역치가 50 dB를 넘으면 나타나지 않는다. DPOAE의 나이에 따른 변화는 순음청력검사에서 청력이 떨어지는 것보다는 그 변화가 적게 나타난다. DPOAE는 노화성 난청환자에서 고음역에서의 청력손실을 객관적으로 추적하여 청력재활의 예후를 판단하는데 사용할 수 있다. 시험물질을 섭취한 실험동물이나 인체에서 DPOAE가 유지되면 청력유지에 도움을 줄 수 있다고 해석할 수 있다.

② 일과성 유발 이음향방사(transiently evoked OAE, TEOAE)

TEOAE는 click(transient)이나 tone pip 자극 후 4~15 msec에 유발되며 자극음의 주파수를 반영하므로 여러 주파수대를 반영한다. 양성 기준은 echo response 5 dB SPL, 50% 이상의 reproducibility를 기준으로 한다.

(라) 청성유발반응

① 청성뇌간반응(auditory brainstem response, ABR)

ABR은 전기신경자극을 기록하여 청력손실 유·무, 정도, 유형, 부위를 진단하는 검사방법이다. 순음청력검사는 주관적인 검사이므로 ABR 역치를 확인하여 신뢰도를 확보할 필요가 있다. 검사과정의 피침습적이고, 재현성이 높으며 순음청력과 상관계수가 높은 장점이 있다. 그러나 자극음으로 사용하는 클릭음(click)은 2,000~4,000 Hz의 고주파수 청력을 반영하므로 저주파수 영역의 역치측정에는 제한점이 있다. 또한 자극음의 강도가 30~90 dB HL로 제한되어 있어 90 dB이상의 고도난청에서는 정확한 정보를 얻는데 어려움이 있다. ABR은 각 주파수의 동시측정이 불가능하고 파형분석의 숙련된 기술과 경험이 필요하며, 객관적인 검사임에도 불구하고 검사자의 주관적인 판단에 의존적이라는 제한점이 있다. 시험물질을 섭취한 실험동물이나 인체에서 ABR가 감소하거나 유지되면 청력유지에 도움을 줄 수 있다고 해석할 수 있다.

② 청성지속반응(auditory steady-state responses, ASSR)

ASSR은 지속적인 음자극에 대한 청각전달로의 지속적인 반응으로 변조된 순음에 의해 유발된 반응을 측정하는 것으로, ABR의 단점을 보완한 측정방법이다. ABR에 비해 자극이 좀 더 주파수 특이적이며, 넓은 청력검사 역치 범위를 지니는 등의 장점이 있다. ABR과 ASSR 간에는 전체적으로 높은 상관계수를 보이고, ABR에 비해 ASSR가 순음청력검사의 주파수별 역치와 상관관계가 높다. 그리고 ABR은 검사자의 주관적인 판단에 의존적이지만 ASSR은 자동화된 알고리즘이 반응 유무를 결정되어 객관적이고 신뢰성 있는 검사이다. 그러나 ASSR은 ABR에 비해 더 많은 시간이 소요된다. 시험물질을 섭취한 실험동물이나 인체에서 ASSR이 감소하거나 유지되면 청력유지에 도움을 줄 수 있다고 해석할 수 있다.

(2) 조직학적 분석

(가) 유모세포 수와 형태

달팽이관의 유모세포는 감각신경성 난청의 주요 병리학적 부위로서 특히 외유모세포의 세포 세포막의 경화, 지질 성분, 유동성은 달팽이관의 정상 전기운동기능과 증폭의 중요한 역할을 한다. 노인에게서 보이는 청력장애는 일반적으로 내이에 있는 유모세포가 퇴화하여 노인성 난청이라 불리는 감각신경성 청력 손실을 준다. 시험물질을 섭취한 실험동물의 달팽이관에서의 유모세포의 수가 대조군보다 증가하거나 형태변화가 없으면 청력유지에 도움을 줄 수 있다고 해석할 수 있다.

(나) SGN 수와 형태

달팽이관에서 SGN 수는 달팽이관에서 일어나는 손상을 나타내는 정확한 지표이며, 인체에서는 노화성 난청과 관련성을 나타낸다. 시험물질을 섭취한 실험동물의 달팽이관에서의 SGN 수 감소가 억제되고, lipofuscin granules, 핵 등의 소기관 형태가 유지되는 것은 청력유지에 도움을 줄 수 있다고 해석할 수 있다.

(3) 항산화상태

(가) 활성산소종(ROS) 생산

산화스트레스는 나이와 관련된 달팽이관의 손상에 관여한다. 나이가 증가함에 따라 ROS 생산은 증가하고, 지속적으로 ROS에 노출되면 미토콘드리아 DNA(mtDNA)에서 돌연변이가 일어날 수 있고, 세포막, 전자전달계와 같은 미토콘드리아의 주요 구성 성분들의 손상을 일으킬 수 있다. 결과적으로 활성산소종의 생산 증가는 미토콘드리아에 산화적 손상을 주고, 노화 과정과 함께 달팽이관에서의 유모세포와 SGN 수 감소가 나타나 청력손실을 일으킨다. 시험물질을 처리한 세포와 시험물질을 섭취한 동물의 달팽이관에서 ROS 생산이 감소한다는 것은 달팽이관의 조직손상을 억제하여 청력유지에 도움을 줄 수 있다고 해석할 수 있다.

(나) 항산화효소 활성, 단백질 발현, mRNA 발현

산화스트레스에 대한 체내 방어기전으로 항산화효소 시스템이 존재한다. 항산화 효소(SOD, GPx, catalase 등) 활성과 단백질 발현과 mRNA 발현을 측정하여 체내

항산화시스템을 평가할 수 있다. 시험물질을 처리한 세포와 시험물질을 섭취한 동물의 달팽이관에서 항산화 효소 활성과 단백질, mRNA 발현이 증가한다는 것은 달팽이관의 산화스트레스로부터 조직 손상을 방어하여 청력유지에 도움을 줄 수 있다고 해석할 수 있다.

(다) 항산화와 관련된 유전자 발현

산화스트레스에 대해 체내 항산화작용을 조절하는 유전자(Hmox1, Mgst1, Gsta4 등)가 있다. 시험물질을 처리한 세포와 시험물질을 섭취한 실험동물의 달팽이관에서 항산화상태를 조절하는 유전자의 발현이 증가하면 산화스트레스로부터 조직 손상을 방어하여 청력유지에 도움을 줄 수 있다고 해석할 수 있다.

(라) Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity(HORAC) assay

산화스트레스는 달팽이관의 손상을 일으키므로 항산화 상태를 평가하는 HORAC assay는 항산화상태를 평가하는 바이오마커로 사용된다. 시험물질을 처리한 세포와 시험물질을 섭취한 실험동물의 달팽이관에서 HORAC assay 결과 항산화 상태가 증가하면 청력유지에 도움을 줄 수 있다고 해석할 수 있다.

(마) Hypoxia-Inducible Factor-1(HIF-1)

Hypoxia-inducible factor-1(HIF-1)는 산소항상성에서 결정적인 역할을 한다. 달팽이관의 저산소증 상태에서 미토콘드리아에서 ROS 생산이 폭발적으로 일어나고 HIF-1 축적이 발생하므로 HIF-1 는 산화상태를 평가하는 바이오마커로 사용된다. 시험물질을 처리한 세포와 시험물질을 섭취한 실험동물의 달팽이관에서 HIF-1 생산량이 감소하는 것은 청력유지에 도움을 줄 수 있다고 해석할 수 있다.

(4) 미토콘드리아 DNA 결손

달팽이관에서 산화스트레스 증가는 미토콘드리아 DNA에 손상을 주고, mtDNA del4977 (인체), mtDNA del4834(쥐) 결손을 일으킬 수 있다. mtDNA 결손 증가는 난청의 위험을 증가시키는 원인 중 하나로 평가된다. 시험물질을 처리한 세포나 실험동물에서 미토콘드리아 DNA 결손이 감소되면 청력유지에 도움을 줄 수 있다고 해석할 수 있다.

(5) 세포사멸

(가) 세포사멸

노화성 난청 발생의 중요한 기전으로 유모세포, SGN 등 청각기관 세포의 세포사멸 증가로 세포 수가 감소하는 것이 알려져 있다. 시험물질을 처리한 세포나 실험동물의 달팽이관에서 유모세포와 SGN의 세포사멸이 감소되면 청력유지에 도움을 줄 수 있다고 해석할 수 있다.

(나) 세포사멸 관련 효소 활성화, 단백질 발현, mRNA 발현

세포사멸은 caspases의 활성화로 시작된다. Caspases는 initiator(caspases initiator 2, 8, 9, 10), executioner(caspases 3, 6, 7), inflammatory(caspases 1, 4, 5)로 구분되어 있다. 세포가 심각한 스트레스에 노출되면 미토콘드리아에서 caspase 8, 9가 활성화되고, 그 다음 caspases 3와 7이 활성화되고, 결과적으로 DNA 분절, 핵 단백질, cytoskeleton, protein cross-linking의 파괴, phagocytic cell에서 ligand의 발현이 일어 세포사멸이 일어난다. 그러므로 시험물질을 처리한 세포나 실험동물의 달팽이관에서 caspases 활성화와 단백질 발현, mRNA 발현이 감소되면 청력유지에 도움을 줄 수 있다고 해석할 수 있다.

(다) 세포사멸 관련 인자 단백질 발현, mRNA 발현

세포사멸은 여러 가지 단백질(Bcl-xL, Bax, Bak, Bid, Bad, p53, c-Jun 등)이 관여하는 과정이다. 그러므로 시험물질을 처리한 세포나 실험동물의 달팽이관에서 세포사멸을 억제하는 인자의 단백질 발현이나 mRNA 발현이 증가하거나, 세포사멸을 증가시키는 인자의 단백질이나 mRNA 발현이 감소하면 청력유지에 도움을 줄 수 있다고 해석할 수 있다.

(6) 염증

(가) Nuclear factor kappa B(NF- κ B)

Nuclear factor kappa B(NF- κ B)는 세포질에서 I κ B와 결합되어 불활성화 상태로 있다가 자극에 의해 I κ B가 인산화되어 분해되면 NF- κ B는 핵내로 들어가 다양한 전 염증 사이토카인의 합성을 촉진시킨다. 시험물질을 처리한 세포나 시험물질을 섭취한 실험동물의

달팽이관에서 NF- κ B의 활성화나 단백질 발현, mRNA 발현이 감소하면 전염증 사이토카인의 발현을 감소시키고, 염증개선을 통해 청력유지에 도움을 줄 수 있다고 해석할 수 있다.

(나) 사이토카인

사이토카인은 면역세포에서 분비되는 수용성 단백질로 면역세포의 증식과 활성화, 분화의 조절과 염증세포를 활성화시킨다. 또한 사이토카인은 다른 사이토카인의 생성을 증가 또는 억제하는 등 외부 항원에 대한 여러 면역세포 간의 협력을 증대하고, 혈관 내피세포의 표면 부착인자의 발현을 유도하여 면역세포를 염증 부위로 모이게 하는 등 면역반응에서 중요한 역할을 한다. 노화성 난청 발생의 중요한 기전의 하나로 만성 염증 상태 증가가 알려져 있다. 그러므로 시험물질을 처리한 세포나 실험동물에서 염증을 일으키는 사이토카인의 양이나 단백질 발현, mRNA 발현이 감소하면 청력유지에 도움을 줄 수 있다고 해석할 수 있다.

(7) 혈관활성 및 혈액공급

(가) eNOS(endothelial nitric oxide synthase) 발현

eNOS는 달팽이관을 포함한 다양한 기관에서 혈관구조를 보호하는 기능을 한다. 시험물질을 섭취한 동물의 달팽이관에서 eNOS의 발현이 증가하였다는 것은 달팽이관의 혈관이 정상적으로 유지되어 혈액공급이 정상적으로 되어 청력유지에 도움을 줄 수 있다고 해석할 수 있다.

(나) 달팽이관 혈류

나이가 증가함에 따라 달팽이관의 혈류가 감소하는 것은 달팽이관을 손상시켜 청력손실의 원인이 될 수 있다. 실험동물에서 달팽이관의 혈류량이 감소가 되면 ROS 생산이 증가하고, 미토콘드리아 DNA 결손이 증가하여 결과적으로 청력손실이 나타나는 것을 확인하였다. 그러므로 시험물질 섭취에 의해 달팽이관의 혈류량이 증가하는 것은 청력유지에 도움을 줄 수 있다고 해석할 수 있다.

(8) 난청 선별 설문지

(가) Hearing Handicap Inventory for the Adult(HHIA)

HHIA는 노인의 청력 정도를 정량화하기 위해 개발된 HHIE의 수정판으로 65세 이하의 성인을 대상으로 하는 설문지이다. 난청 성인 환자가 주관적으로 느끼는 청력 정도를 정량화하여 파악할 수 있는 설문지이다. 설문지는 총 25개의 항목으로 구성되었으며, 그 중 3 문항은 HHIE 설문지에서 은퇴한 노인들에게만 적용되는 항목을 성인의 직장생활과 관련된 항목으로 수정한 것이다. HHIA는 ‘아니오’ 0점, ‘가끔’ 2점, ‘예’는 4점으로 하여, 25문항의 총점으로 0점에서 100점으로 산출된다. 0~16점은 청각 장애를 자각하지 않는 것으로, 17~42점은 경도~중등도의 청각 장애를 지각하고 있는 것으로, 43점 이상은 심각한 수준으로 청각 장애를 지각하고 있는 것으로, 100점은 완전한 장애 상태로 판정한다. 9점 이상 변화 시 유의적인 차이가 있다고 판정한다.

(나) Hearing Handicap Inventory for the Elderly(HHIE)

HHIE는 난청이 노인의 일상생활에 미치는 영향을 기능적으로 평가하기 위한 목적으로 Ventry와 Weinstein가 1982년에 개발하였으며, 미국 언어청각협회(American Speech-Language-Hearing Association, ASHA)에서 노인의 난청을 선별하는 검사로 HHIE를 사용할 것을 권고하고 있다. KHHIE(Korean version of Hearing Handicap Inventory for the Elderly)는 HHIE을 변안한 것으로, 신뢰도와 타당도를 검증하여 표준화되었다. 총점은 문항별 점수를 합산하여 0점에서 100점으로 산출하고, 합계 점수가 점수가 0~16점까지는 청각장애를 자각하지 않는 것으로, 17~42점까지는 경도~중등도의 청각장애를 지각하고 있는 것으로, 43점 이상은 심각한 수준으로 청각장애를 지각하고 있는 것으로 판정한다. 9점 이상 변화 시 유의적인 차이가 있다고 판정한다.

KHHIE-S는 KHHIE 25문항 중 사회적/상황적 측면 5문항, 감정적인 측면 5문항을 선별하여 총 10문항으로 구성하여 손쉽게 평가하는 도구로 사용된다. KHHIE-S 점수는 0~40점으로 점수가 클수록 장애로 인한 불편이 큰 것으로, 10~40점은 KHHIE-S에서 장애가 있는 것으로 판단한다. KHHIE와 KHHIE-S는 한국 노인에게 있어서 난청이 일상생활에 미치는 영향을 평가할 경우와 선별을 목적으로 평가할 때 적절한 검사 도구로 사용된다.

2. 주요 바이오마커의 측정 방법

가. 청력검사

(1) 순음청력검사(pure tone audiometry, PTA)

PTA는 인체에서 순음청력기기를 이용하여 기도청력은 일반적으로 125, 250, 500, 1,000, 2,000, 3,000, 4,000, 8,000 Hz 주파수를 검사하고, 골도청력은 일반적으로 250, 500, 1,000, 2,000, 3,000, 4,000 Hz 주파수를 검사한다. 모든 주파수에서 10 dB 하강~5 dB 상승법에 의해 역치를 구하고, 양측 귀를 검사한다. 순음청력평균은 500, 1,000, 2,000, 3,000 Hz 역치의 합을 4등분하여 소수점 둘째 자리 이하는 버리거나, 500(a), 1,000(b), 2,000(c), 4,000(d) Hz 역치의 합을 6분법 $[(a+2b+2c+d)/6]$ 에 의하여 소수점 이하는 버리고 구한다.

(2) 어음청력검사

(가) 어음청취역치(speech recognition threshold, SRT)

SRT는 인체에서 국제표준 IEC 60645-2(1993)에서 제안한 방법을 사용하여 측정한다. 한국산업표준 일반용 이음절어표(Korean Standard Bisyllabic Word List for Adults, KS-BWL-A)의 목록을 임의대로 결정하여 쾌적수준에서 친숙화 과정을 마친 목록의 12개 단어 중 2개를 무작위로 지정하여 기준 역치를 기준으로 20 dB SL의 크기에서 들려주고, 정반응과 오반응을 O, X로 표기한다. 2개 단어 중 한 개 이상 맞으면 5 dB를 낮추어 목록 내 사용하지 않은 단어로 다시 들려준다. 2개의 단어를 모두 오반응을 보이면 검사를 종료하고 해당 음압레벨을 기록한다. 그리고 쾌적수준에서 친숙화 과정을 마친 목록의 12개 단어를 무작위로 들려주고 정반응 수를 표기한다. 정반응이 50% 미만일 경우 본 과정에서 검사한 음압레벨보다 5 dB를 높이고, 50% 초과일 경우 5 dB를 낮추어 친숙화 과정을 마친 다른 목록의 단어로 재검사를 한다. SRT는 50%의 경계를 찾는 것이므로 이전 검사의 결과와 재검사의 정반응률이 50%를 기준으로 이전 검사와 다르게 나오면 검사를 종료하고 결과를 검사지에 기록한다. 검사 결과로 선형보간법(linear interpolation)을 사용하여 50%의 정반응을 나타내는 SRT를 계산한다.

(나) 어음명료도검사(speech discrimination test, SDT)

SDT는 일상생활에서 사용하는 한국산업표준 일반용 단음절표(Korean standard monosyllabic word lists for adults, (KS-MWL-A)를 이용하여 25개 또는 50개 단어표를 이용하여, 쾌적레벨(최적안정역치, the most comfortable level of loudness, MCL)에서 어음을 듣고 이를 따라 말하거나 받아쓰도록 하여 정확히 들은 어음수를 백분율로 나타낸다.

(3) 이음향방사

(가) 변조이음향 방사(distortion product OAE, DPOAE)

DPOAE는 시험물질을 섭취한 실험동물이나 인체적용검사에서 측정한다. 실험동물은 동물의 DPOAE를 측정하는 기기를 이용하며, 기기에 따라 검사방법에 차이가 있다. 실험동물은 마취를 한 상태에서 진행하며, 변조이음향방사측정치의 f_2/f_1 의 비는 1.22로 고정하고 자극음의 강도는 L1과 L2에 대해 각각 60 dB SPL과 55 dB SPL의 수준으로 한다. 측정된 변수 중 DP audiogram의 $f_2 = 2,002$ Hz, $f_2 = 4,004$ Hz, $f_2 = 6,348$ Hz 주파수 영역에서의 echo amplitude를 비교한다. 인체실험도 인체용 DPOAE를 측정하는 기기를 이용하며, 기기에 따라 검사방법에 차이가 있다. 방음실에서 진행하며 검사할 귀에 프로브를 삽입하고, 자극음은 65/55dB, 주파수간 간격은 f_2/f_1 를 1.22로 고정한다. 500-8,000 Hz의 주파수에서 자극음을 들려주고 DPOAE자료를 수집하며 일반적으로 60초 정도 진행되며, 같은 방법으로 다른 쪽 귀도 실시한다.

(나) 일과성 유발 이음향방사(transiently evoked OAE, TEOAE)

TEOAE는 귀에 클릭음, tone burst, 또는 tone pip과 같은 일과성 음(transient sound)을 주면 나타나는 이음향방사를 말한다. 자극음 중 클릭음은 짧은 시간 안에 넓은 음역의 주파수부위를 검사하기 위하여 사용되며 이상적으로는 0.3 kHz와 8 kHz 사이의 주파수를 일정하게 포함하는 음역을 자극하고 기록할 수 있어야 한다. 짧은 자극 폭을 가지고 있는 tone burst도 좁은 부위의 주파수대를 평가하는데 사용된다. TEOAE를 측정하기 위해서는 클릭음 또는 tone burst를 줄 수 있는 음원과 반응을 측정할 수 있는 민감한 마이크로폰이 필요하며 깨끗한 TEOAE를 측정하기 위해서는 자극음에 의해 생기는 가공물(artifact)를 제거하여야 한다.

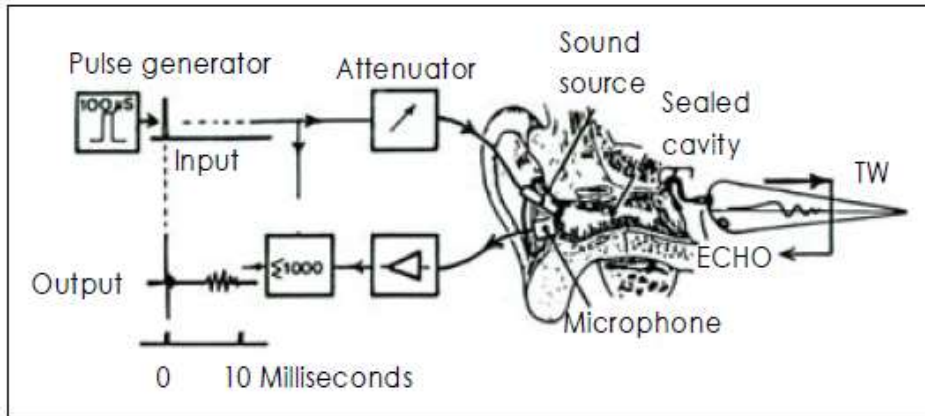


그림 5. TEOAEs를 위한 전형적인 기록장치 개요도

[출처: J Clinical Otolaryngol 19; 25-35, 2008]

현재 가장 일반적으로 사용되는 가공물 제거 방법은 비선형 감별법(non-linear differential technique)이다. 자극을 줄 때 네 개의 음자극을 사용하되, 처음 세 개는 같은 극성의 적은 진폭의 음을 사용하고, 네 번째는 반대되는 극성으로 진폭이 3배 큰 음을 사용한다. 나중에 각각 네 개의 자극에 의한 반응을 평균 가산하면 자극음과 외이의 울림 등의 가공물이 상쇄된다. 이와 함께 각 세트의 자극을 두개의 버퍼에 저장하여 동시에 혹은 차례로 평균 가산하여 두개의 파형을 얻어 이를 비교함으로써 재현성(reproducibility)을 확인한다. 이외에도 반응강도를 표현하는 지표로는 서로 독립적인 것은 아니지만 평균 방사반응의 상대적 강도, 주변소음(background noise)의 평가, 소음과 음향방사의 비교 등이 있다. TEOAE가 있는지를 판단하는 기준은 일단 비선형적으로 높은 자극음에서 포화되는 성질을 보이는 파형의 확인이 필요하며, 두번째는 FFT상 뚜렷하게 돌출된 주파수 특이적인 첨부를 보이면서 높은 상호연관성 혹은 재현률을 보여야 한다.

(4) 청성유발반응

(가) 청성뇌간반응(auditory brainstem response, ABR)

ABR은 시험물질을 섭취한 실험동물이나 인체적용시험에서 측정한다. 실험동물은 마취시킨 후 체온을 유지하기 위해 핫패드 위에 올려 놓고 실시한다. ABR은 방음실에서 이루어지며, 실험동물용 ABR을 측정하는 기기를 이용하여 전기적으로 기록한다. 마이크는 실험동물의 외이관에 위치하고, 반응을 측정할 귀의 귓바퀴 피부 아래에 전전극을 삽입하고, 기준이 되는 전극은 두뇌 윗부분 피하에 삽입한다. 음자극은 마이크를 통하여 300 Hz에서 3000 Hz까지 클릭(click)음을 자극을 12.5회/초, 자극횟수 1,024 회로 주어 90 dB에서 10 dB 간격으로 역치까지의 뇌간유발 반응을 구하며 역치 근처에서는 5 dB간격으로 구한다. 인체실험은 피검자는 최대한 안정을 취하도록 한 후 침대에 누운 채 검사를 한다. ABR 검사는 자극음으로 클릭(click)음을 사용하고, 클릭음은 삽입형 이어폰을 통해 10.66회/초의 자극빈도로 교대상으로 자극한다. 고강도 90 dB HL에서 시작하여 10 dB 간격으로 자극 강도를 감소시키며, 역치를 구한다. 필터는 100~3,000 Hz의 주파수 대역통과 필터를 사용하고, 1,000회 이상 평균 가산하여 유발전위를 기록한다.

(나) 청성지속반응(auditory steady-state responses, ASSR)

ASSR은 시험물질을 섭취한 실험동물이나 인체적용시험에서 측정한다. 실험동물은 500, 1000, 2000, 4000, 8000, 10000, 12000, 14000, 16000 Hz에서 evoked potential averaging system을 이용하여 전기적으로 차단되며, 이중벽으로 방음되는 공간에서 실험동물용 측정기기를 선택하여 측정한다. 인체실험에서 ASSR 검사는 자극음을 500, 1000, 2000, 4000 Hz 네 가지로 100% 진폭변조(amplitude modulation), 10% 주파수 변조(frequency modulation)하고 변조주파수(modulation frequency)는 각각 74, 81, 88, 95 Hz로 한다. 음자극에 의해 유발된 뇌파의 성분 중 자극음의 변조주파수와 동일한 주파수를 가진 성분의 위상(phase)을 분석한다. 자극음을 10 dB 간격으로 역치를 구하고, ASSR 역치의 평균은 6분법에 의하여 소수점 이하는 버리고 구한다.

나. 조직학적 분석

(1) 유모세포 수와 형태

시험물질을 처리한 세포와 시험물질을 섭취한 실험동물에서 측정한다. 실험동물을 마취시킨 후 내이 부분을 적출하여 달팽이관을 얻는다. 세포를 배양한 후 시험물질을 처리하고 유모세포 수를 MTT assay로 측정한다. 달팽이관은 4% 포름알데히드를 포함하는 PBS(phosphate buffered saline)에 24시간 동안 담가둔 후 10% ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)용액에서 1주일 이상 탈석회화 시키고 파라핀 블록에 포매시킨다. 파라핀 블록을 슬라이드에 4 μ m 두께로 잘라 haematoxylin & eosin(H&E)으로 염색한다. 유모세포 수는 달팽이관의 중간 부분과 기저 부분에서 측정하며, 핵의 존재로 세포를 구별한다. 유모세포의 생존율은 정상 청력을 가진 실험동물의 세포 수를 기준으로 실험군 실험동물의 세포 수에 대한 비율로 계산한다.

또한 Scanning electron microscopy(SEM)를 이용하여 시험물질을 섭취한 실험동물에서 세포 수와 형태를 관찰할 수 있다. 달팽이관을 적출 한 후 2.5% glutaraldehyde/0.1 M phosphate buffer에서 24시간 고정한 후 2% osmium tetroxide cacodylate buffer에 2시간 더 고정한다. Micro-dissection 후에 에탄올로 탈수시키고, 금으로 코팅한 후 SEM으로 관찰하여 유모세포 수와 형태적인 변화도 관찰할 수 있다.

(2) SGN 수와 형태

시험물질을 섭취한 실험동물에서 측정한다. 실험동물을 마취시킨 후 내이 부분을 적출하여 달팽이관을 얻는다. 달팽이관은 4% 포름알데히드를 포함하는 PBS(phosphate buffered saline)에 24시간 동안 담가둔 후 10% ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)용액에서 1주일 이상 탈석회화 시키고 파라핀 블록에 포매시킨다. 파라핀 블록을 슬라이드에 4 μ m 두께로 잘라 haematoxylin & eosin(H&E)으로 염색을 하고 현미경으로 관찰한다. SGN 수는 달팽이관의 중간 부분과 기저 부분에서 이미지프로그램을 이용하여 측정하고 mm²당 세포 수로 표현한다. SGN의 미세구조(lipofuscin granules, 핵)등의 형태는 transmission electron microscopy를 이용하여 관찰한다.

다. 항산화 상태

(1) 활성산소종(ROS) 생산

시험물질을 처리한 세포와 시험물질을 섭취한 실험동물의 달팽이관에서 항산화상태를 측정하기 위해 활성산소종의 생산량을 측정한다. 세포에서는 총 활성산소종을 측정할 수 있는 상용화된 kit를 이용하여 제조사의 방법에 따라 측정할 수 있다. 실험동물에서는 달팽이관 조직 균질액에서 상용화된 kit를 사용하여 측정할 수 있으며, 달팽이관 조직 절편을 만들어 4-HNE로 염색하여 측정할 수 있다.

(2) 항산화효소 활성, 단백질 발현, mRNA 발현

시험물질을 처리한 세포와 시험물질을 섭취한 실험동물의 달팽이관에서 항산화상태를 측정하기 위해 항산화효소(SOD, GPx, catalase 등)의 활성과 단백질 발현, mRNA 발현을 측정할 수 있다. 항산화효소의 활성은 상용화된 kit를 이용하여 제조사의 방법에 따라 측정하고, 항산화효소의 단백질 발현은 항체를 이용한 western blotting 방법에 따라 측정하며, mRNA 발현은 real-time PCR 방법으로 측정한다.

(3) 항산화와 관련된 유전자 발현

시험물질을 처리한 세포와 시험물질을 섭취한 실험동물의 달팽이관에서 측정한다. 항산화상태를 측정하기 위해 항산화작용과 관련된 유전자(Hmox1, Mgst1, Gsta4 등)의 단백질 발현은 항체를 이용한 western blotting 방법으로, mRNA 발현은 real-time PCR 방법으로 측정한다.

(4) Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity(HORAC) assay

HORAC assay는 시험물질을 처리한 세포와 시험물질을 섭취한 실험동물의 달팽이관에서 항산화활성을 알아보기 위해 측정한다. 세포를 배양한 후 시험물질을 처리하고, 상용화된 OxiSelect™ HORAC activity assay kit를 사용하여 제조사의 방법에 따라 측정한다.

(5) Hypoxia-Inducible Factor-1(HIF-1)

HIF-1는 시험물질을 처리한 세포와 시험물질을 섭취한 실험동물의 달팽이관에서 측정한다. 세포와 달팽이관 조직을 균질화한 후 항체를 이용한 western blotting으로 측정한다.

라. 미토콘드리아 DNA 결손

실험물질을 섭취한 동물의 청신경세포, stria vascularis에서 DNA를 분리하고, PCR (polymerase chain reaction), 젤 전기영동을 실행하여 미토콘드리아 DNA 결손을 관찰한다. 미토콘드리아 cytochrome b, ND-1 16S rRNA로 시료에 미토콘드리아 DNA가 있다는 것을 확인하고, 일반적인 노화 관련 미토콘드리아 DNA 결손(예: mtDNA4834(취)) 증가를 관찰한다.

마. 세포사멸

(1) 세포사멸

시험물질을 처리한 세포와 시험물질을 섭취한 실험동물의 달팽이관에서 세포사멸 정도를 TUNEL assay나 Annexin V/PI staining 등의 방법으로 측정한다. 세포사멸이 일어난 세포에서 DNA 조각을 측정하기 위해 TUNEL(Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) mediated dUTP Nick End Labelling) assay와 Annexin V/PI staining은 상용화된 kit를 사용하여 제조사의 방법에 따라 측정할 수 있다.

(2) 세포사멸 관련 효소 활성화, 단백질 발현, mRNA 발현

시험물질을 처리한 세포와 시험물질을 섭취한 실험동물의 달팽이관에서 세포사멸을 조절하는 caspase의 활성화와 단백질 발현, mRNA 발현을 측정한다. Caspase(caspase 3, 7, 8, 9)의 활성화는 luminescent assay로 제조사의 방법에 따라 측정한다. Caspase 단백질 발현은 항체를 이용한 western blotting 방법에 따라 측정하고, mRNA 발현은 real-time PCR 방법으로 측정한다.

(3) 세포사멸 관련 인자 단백질 발현, mRNA 발현

시험물질을 처리한 세포와 시험물질을 섭취한 실험동물의 달팽이관에서 측정한다. 세포와 달팽이관 조직에서 세포사멸과 관련된 인자(Bcl-xL, Bax, Bak, Bid, Bad, p53, c-Jun, cytochrome c, cleaved ERK 등)의 단백질 발현은 항체를 이용한 western blotting 방법으로, mRNA 발현은 real-time PCR 방법으로 측정한다.

바. 염증

(1) Nuclear factor kappa B(NF- κ B)

NF- κ B는 시험물질을 처리한 세포나 시험물질을 섭취시킨 실험동물의 달팽이관에서 측정한다. 시험물질을 처리한 세포에서 NF- κ B 활성은 luciferase activity assay로 측정하고, 단백질 발현은 항체를 이용한 western blotting 방법으로, mRNA 발현은 real-time PCR 방법으로 측정한다. 실험동물에서는 달팽이관의 절편을 제작한 후 면역조직화학법으로 측정하거나, 조직 균질액에서 NF- κ B 단백질 발현은 항체를 이용한 western blotting 방법으로 mRNA 발현을 real-time PCR 방법으로 측정한다.

(2) 사이토카인

사이토카인(IL-1b, IL-6, IL-10, Cat, Gss, O3fa1, TGF- β , INF γ , TNF- α 등)은 시험물질을 처리한 세포나 시험물질을 섭취한 실험동물의 혈액과 달팽이관 조직에서 측정한다. 혈액내 사이토카인의 양은 사용화된 ELISA Kit를 사용하여 제조사의 방법에 따라 측정한다. 실험동물의 달팽이관 조직절편에서 면역조직화학법으로도 측정할 수 있다. 세포나 동물 조직에서 사이토카인의 단백질 발현은 항체를 이용한 western blotting 방법으로, mRNA 발현은 real-time PCR 방법으로 측정한다.

사. 혈관활성 및 혈액공급

(1) eNOS(endothelial nitric oxide synthase) 발현

eNOS 발현은 시험물질을 섭취한 실험동물에서 측정한다. 실험동물의 내이 부분을 적출하여 달팽이관을 얻고, 달팽이관은 4% 포르말데히드를 포함하는 PBS(phosphate buffered saline)에 24시간 동안 담가둔 후 10% ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)용액에서 1주일 이상 탈석회화 시키고 파리핀 블록에 포매시킨다. 파라핀 블록을 슬라이드에 4 μ m 두께로 잘라 조직절편을 만든다. eNOS는 1차, 2차 항체를 이용하여 염색하여 단백질 발현을 측정한다.

(2) 달팽이관 혈류

달팽이관 혈류 측정은 시험물질을 섭취한 실험동물에서 측정한다. 혈류량 측정기기(laser-Doppler flowmeter)를 이용하여 측정한다. 실험동물의 왼쪽 고포를 확인하고 절개하여, 점막을 제거한 후 측정기기의 탐침을 달팽이관의 기저회전에 위치하고, 달팽이관 혈류의 최대 output을 측정한다.

아. 난청 선별 설문지

(1) Hearing Handicap Inventory for the Adult(HHIA)

HHIA는 65세 이하의 성인을 대상으로 청력 정도를 정량화하는 설문지이다(그림 5). 총 25개의 항목으로 구성되었으며, 3문항은 HHIE 설문지에서 성인의 직장생활과 관련된 항목으로 수정하였다. HHIA는 ‘아니오’ 0점, ‘가끔’ 2점, ‘예’는 4점으로 하여, 25문항의 총점으로 판정한다. 0~16점은 청각장애를 자각하지 않는 것으로, 17~42점은 경도~중등도의 청각장애를 자각하고 있는 것으로, 43점 이상은 심각한 수준으로 청각장애를 자각하고 있는 것으로, 100점은 완전한 장애상태로 판정한다.

(2) Hearing Handicap Inventory for the Elderly(HHIE)

HHIE는 노인을 대상으로 하는 청력 장애 정도를 정량화하는 설문지이고 K-HHIE는 HHIE의 표준화된 한국어 번역본이다. K-HHIE는 사회/상황적 특성(S) 12문항과 정서적 특성(E) 13문항, 총 25문항으로 구성되어 있다. 대상자는 전문가와의 인터뷰나 직접 지필 방식으로 문항별로 ‘아니오’ 0점, ‘가끔’ 2점, ‘예’는 4점으로 하여 채점하며, 총점은 문항별 점수를 합산하여 0점에서 100점으로 산출한다. 합계 점수가 0~16점까지는 청각장애를 자각하지 않는 것으로, 17~42점까지는 경도~중등도의 청각장애를 자각하고 있는 것으로, 43점 이상은 심각한 수준으로 청각장애를 자각하고 있는 것으로 해석할 수 있다(그림 6).

KHHIE-S(KHHIE-screening version)는 KHHIE 25문항 중 사회적/상황적 측면 5문항, 감정적인 측면 5문항을 선별하여 총 10문항으로 구성하여 손쉽게 평가하는 도구로 사용된다. KHHIE-S 점수는 0~40점으로 점수가 클수록 장애로 인한 불편이 큰 것으로, 10~40점은 KHHIE-S에서 장애가 있는 것으로 판단한다. 한국 노인의 난청을 선별하기 위한 KHHIE-S의 기준은 외국과 같이 8점을 기준으로 한다(그림 7).

Instructions: The purpose of the scale is to identify the problems your hearing loss may be causing you. Check Yes, Sometimes, or No for each question. Do not skip a question if you avoid a situation because of a hearing problem.

		Yes (4)	Sometimes (2)	No (0)
S-1.	Does a hearing problem cause you to use the phone less often than you would like?	_____	_____	_____
E-2.*	Does a hearing problem cause you to feel embarrassed when meeting new people?	_____	_____	_____
S-3.	Does a hearing problem cause you to avoid groups of people?	_____	_____	_____
E-4.	Does a hearing problem make you irritable?	_____	_____	_____
E-5.*	Does a hearing problem cause you to feel frustrated when talking to members of your family?	_____	_____	_____
S-6.	Does a hearing problem cause you difficulty when attending a party?	_____	_____	_____
S-7.*	Does a hearing problem cause you difficulty hearing/understanding coworkers, clients, or customers?	_____	_____	_____
E-8.*	Do you feel handicapped by a hearing problem?	_____	_____	_____
S-9.*	Does a hearing problem cause you difficulty when visiting friends, relatives, or neighbors?	_____	_____	_____
E-10.	Does a hearing problem cause you to feel frustrated when talking to coworkers, clients, or customers?	_____	_____	_____
S-11.*	Does a hearing problem cause you difficulty in the movies of theater?	_____	_____	_____
E-12.	Does a hearing problem cause you to be nervous?	_____	_____	_____
S-13.	Does a hearing problem cause you to visit friends, relatives, or neighbors less often than you would like?	_____	_____	_____
E-14.*	Does a hearing problem cause you to have arguments with family members?	_____	_____	_____
S-15.*	Does a hearing problem cause you difficulty when listening to TV or radio?	_____	_____	_____
S-16.	Does a hearing problem cause you to go shopping less often than you would like?	_____	_____	_____
E-17.	Does any problem or difficulty with your hearing upset you at all?	_____	_____	_____
E-18.	Does a hearing problem cause you to want to be by yourself?	_____	_____	_____
S-19.	Does a hearing problem cause you to talk to family members less often than you would like?	_____	_____	_____
E-20.*	Do you feel that any difficulty with your hearing limits or hampers your personal or social life?	_____	_____	_____
S-21.*	Does a hearing problem cause you difficulty when in a restaurant with relatives or friends?	_____	_____	_____
E-22.	Does a hearing problem cause you to feel depressed?	_____	_____	_____
S-23.	Does a hearing problem cause you to listen to TV or radio less often than you would like?	_____	_____	_____
E-24.	Does a hearing problem cause you to feel uncomfortable when talking to friends?	_____	_____	_____
E-25.	Does a hearing problem cause you to feel left out when you are with a group of people?	_____	_____	_____

그림 6. Hearing Handicap Inventory for the Adult(HHIA)

[출처: Ear Hear 12(5):355-357, 1991]

본 설문지는 청력 이상으로 인한 불편함을 측정하기 위한 것입니다. 각각의 질문에 네, 가끔, 아니오 라고 답해주시시오. 귀하의 청력 이상을 감추기 위해 질문을 건너 뛰지 말아주시시오.

No.	문항	예(4)	가끔(2)	아니오(0)
S-1	청력 이상으로 전화를 원하는 것보다 덜 사용합니까?			
E-2	청력 이상으로 새로운 사람을 만날 때 난처하십니까?			
S-3	청력 이상으로 여러 사람들과 함께 있는 것을 피합니까?			
E-4	청력 이상으로 짜증이 납니까?			
E-5	청력 이상으로 가족들과 대화할 때 좌절감을 느낍니까?			
S-6	청력 이상으로 모임에 참석했을 때 어려움을 느낍니까?			
E-7	청력 이상으로 스스로 "바보스럽다" 또는 "멍청하다"고 느끼신 적이 있습니까?			
S-8	누군가 속삭일 때 알아듣기가 어렵습니까?			
E-9	청력 이상으로 스스로 장애가 있다고 느낍니까?			
S-10	청력 이상으로 친구, 친척, 이웃들을 방문할 때 어려움을 느낍니까?			
S-11	청력 이상으로 종교 집회에 원하는 것보다 덜 참석합니까?			
E-12	청력 이상으로 성격이 과민해졌습니까?			
S-13	청력 이상으로 친구, 친지, 이웃들을 원하는 만큼보다 덜 방문하게 됩니까?			
E-14	청력 이상으로 가족들과 말다툼을 하시게 됩니까?			
S-15	청력 이상으로 TV나 라디오를 들을 때 어려움을 느낍니까?			
S-16	청력 이상으로 쇼핑을 원하는 것 보다 덜 합니까?			
E-17	청력 이상이나 이로 인한 어려움으로 실망한 적이 있습니까?			
E-18	청력 이상으로 혼자 있고 싶다고 느낍니까?			
S-19	청력 이상으로 가족들과 대화를 덜 하게 됩니까?			
E-20	청력 이상이 귀하의 개인 생활이나 사회생활을 제한하거나 방해한다고 느낍니까?			
S-21	청력 이상으로 친척이나 친구들과 식당에 있을 때 어려움을 느낍니까?			
E-22	청력 이상으로 우울하다고 느낍니까?			
S-23	청력 이상으로 TV나 라디오 청취를 원하는 것보다 덜 하게 됩니까?			
E-24	청력 이상으로 친구들과 대화할 때 불편함을 느낍니까?			
E-25	청력 이상으로 여러 사람들과 함께 있을 때 소외된다고 느낍니까?			

총 점수: _____

E 점수: _____

S 점수: _____

그림 7. Korean version of Hearing Handicap Inventory for the Elderly(KHHIE)

[출처: 대한이비인후과학회지 두경부외과학 54(12), 828-834, 2011]

순번	질 문 내 용	항상 그렇다 (4)	때때로 그렇다 (2)	그렇지 않다 (0)
1	잘 들리지 않기 때문에 낯선 사람을 만났을 때 부끄럽습니까?			
2	잘 들리지 않기 때문에 가족 또는 다른 사람과 이야기 할 때 어려움을 느끼십니까?			
3	다른 사람이 작은 목소리로 속삭일 때 듣기가 어렵습니까?			
4	잘 들리지 않기 때문에 자신이 장애를 가졌다고 생각합니까?			
5	잘 들리지 않기 때문에 친구, 친척 혹은 이웃을 방문했을 때 어려움을 경험한 적이 있습니까?			
6	모임, 파티 또는 종교예식에 참여하고 싶어도 잘 들리지 않기 때문에 생각만큼 잘 참여하지 못하십니까?			
7	잘 들리지 않기 때문에 가족 또는 다른 사람과 말다툼을 하게 됩니까?			
8	텔레비전이나 라디오를 듣는데 어려움이 있습니까?			
9	잘 들리지 않아서 본인의 성격이나 사회생활이 달라진다고 생각하십니까?			
10	잘 들리지 않기 때문에 친척이나 친구들과 식당에 갔을 때 어려움을 경험하신 적이 있습니까?			

그림 8. Korean version of Hearing Handicap Inventory for the Elderly-screening version(KHHIE-S)

[출처: 청능재활 8:224-237, 2012]

3. 시험 설계 시 고려사항

가. 시험관 시험

(1) 시험계

노화로 인해 감소될 수 있는 청력 유지에 도움을 줄 수 있음에 사용될 수 있는 세포주로는 HEI-OC1, UB-OC1, VOT-E36, 유모세포, 면역관련세포 등이 있으며, 실험동물의 달팽이관에서 직접 채취한 유모세포와 SGN 등을 사용할 수 있다(표 6).

표 6. 청력관련 주요 세포의 특징

구분	내용
HEI-OC1	House Ear Institute-Organ of Corti 1(HEI-OC1) 세포는 감각신경성 난청 기능성 평가 실험에서 가장 많이 사용되는 세포주이다. HEI-OC1 세포에 독성 약물(예, neomycin, Cisplatin 등)을 처리하여 유모세포가 손상된 감각신경성 난청 모델로 사용된다. 또한 세포를 H ₂ O ₂ 에 단기간 노출시키면, 미토콘드리아 형태가 손상되고, 미토콘드리아 막의 potential이 감소하고, 미토콘드리아 호흡능력이 손상되어 노화성 난청 모델로 사용된다.
UB-OC1	University of Bristol-Organ of Corti 1(UB-OC1) 세포는 C57BL/6 마우스의 달팽이관에서 유래한 세포로 유모세포로 분화되기 전에 immortalizing gene인 H-2Kb-tsA58를 활성화시켜 죽지 않는 세포로 만들어졌다. 유모세포의 특징을 가지고 있으며, 유모세포의 퇴화, 약물개발 등 청각연구에 이용된다.
VOT-E36	Ventral Otocyst-Epithelial cell line number 36(VOT-E36) 세포는 C57BL/6 마우스 귀 소포의 복측부 상피세포부터 유래된 세포이다. 유모세포로 분화되기 전에 immortalizing gene인 H-2Kb-tsA58를 활성화시켜 죽지 않는 세포로 만들어졌다. 청력과 관련된 생리, 약물개발, 유전자 발현 연구에 사용된다.

[출처: J Ethnopharmacol 1;231:409-428, 2019; Nutrients 29;12(4):947, 2020; Cell Death Dis 1;9(8):827, 2018; Antioxidants (Basel), 24;8(4):109, 2019]

(2) 바이오마커

시험물질이 청력유지(노화성 난청)에 미치는 영향을 산화스트레스, 미토콘드리아 기능, 세포사멸, 염증, 혈관 활성화 및 혈액공급 등의 작용기전에 대한 바이오마커를 평가할 수 있다. 실험방법으로는 바이오마커의 양, 활성화, 단백질 발현, mRNA 발현 등을 측정한다.

(3) 통계처리

대조군과 시험군의 실험결과는 통계처리하여 바이오마커의 평균값과 표준편차를 구하고, $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 판정한다.

나. 동물시험

(1) 실험동물

동물실험을 할 때 고려하여야 가장 중요한 점은 실험에 사용한 동물모델이 인간에게 적절하게 적용될 수 있어야 한다는 것이다. 노화성 난청은 유전적인 면을 기초로 노화와 환경적 요인들이 작용하여 유모세포의 손실로 특징지어질 수 있다. 모든 면에서 인체의 노화성 난청을 대표할 수 있는 동물모델은 없으며 마우스, 쥐, 기니아 피그, 몽골리안 저빌(mongolian gerbil) 등 다양한 실험동물이 사용된다. 실험동물의 특징에 따라 동물실험 디자인이 달라질 수 있다. 노화성 난청에 대한 동물실험 디자인으로는 실험동물의 월령별로 시험물질의 효과를 1개월이나 3개월간 단기간에 비교하거나(예, Sprague-Dawley 랫트, 3, 6, 12, 18, 24개월령 비교), 노화 과정과 함께 시험물질을 투여하여 장기간의 효과(예, Fischer 344 랫트, 5개월에서 25개월까지 사육)를 관찰할 수 있다.

노화성 난청 연구에서 사용되는 주요 실험동물의 특징은 표 7과 같다.

표 7. 동물모델 예시

구분	내용
마우스	마우스는 청력 연구에서 가장 많이 사용되는 실험동물이다. 마우스는 인체와 청각기관 구조와 생리가 유사하며, 마우스 유전자의 99%가 인체의 상동염색체를 가지고 있다. 크기가 작고 수명이 짧아서 상대적으로 관리비용이 낮고, 유전적으로 표준화되어 있어, 청각기관의 기능적 연구를 하기 위한 유용한 모델로 사용된다. 마우스는 유전적으로 조작이 용이하여 인체 청력손실과 다양한 모델을 만들 수 있다. 난청과 관련된 유전자들은 Cdh23753A(ahl, cadherin23), Csr29358506-A(ahl4, citrate synthase), Gipc3 343A(ahl5, GIPC PDZ domain-containing family member), Fscn2R109H(ahl8, fascin actin-bundling protein 2, retinal) 등이 있다. 예를 들어 C57BL/6은 cadherin23 유전자에 의해 지속적인 고주파수의 청력손실이 유도된다. - C57BL/6J 마우스: 노화성 난청 연구에서 가장 많이 사용되는 실험동물로 달팽이관과 청각피질(auditory cortex)의 각 부위에서 퇴화를 보이며, 노화성 난청의 특징을 보인다. 생후 6개월이면 고주파수에서 유의적인 청력 손상이 나타나고, 12개월에는 낮은 주파수에서도 손상이 나타난다. 생후 12~15개월 사이에 달팽이관의 기저부(basal turn)와 특히 코르티관의 외유모세포의 퇴화가 나타나고, 지지세포의 퇴화도 나타난다. 24개월이 되면 코르티관의 기저부 구조가 인지되지 않으며, SGN에서 노화와 함께 심각한 손실이 나타나 구조가 완전히 손상된다. 수컷 보다는 암컷을 사용한다. - CBA/J 마우스: 생후 18개월까지는 청력이 유지되나 그 이후로 고주파수에서 시작하여 저주파수에서도 역치가 증가하며, 유모세포가 손실된다. CBA/J 마우스는 생후 3개월에는 유모세포의 손상 없이 4,000 Hz에서 auditory brainstem responses(ABR) 역치가 증가한다. 생후 18개월이 되면 주로 달팽이관의 외유모세포가 손실되며, 20~26개월이 되면 유모세포의 손실과 고주파수에서의 역치가 증가한다. - DBA/2J 마우스: 점진적이며, 심각한 청력손실이 나타나는데 유모세포의 손상이 나타난다. Cadherin23 유전자를 가지고 있으며 호흡사슬과 미토콘드리아 DNA의 돌연변이 등 미토콘드리아의 기능 이상을 일으켜 노화성 난청의 위험을 높인다. - SAMP(senescence accelerated prone mouse strain)-1 마우스: 높은 산화적 상태를 가지며, 청력손상과 같은 노화 촉진 모델로 사용된다. - BALB/cJ 마우스: 생후 19개월 까지 초기에 고주파수에서의 청력손실이 나타난다. - NOD.NON-H2nb1/LtJ (NOD.NON) 마우스: 주로 자가면역과 관련된 제1형 당뇨병과 관련된 증으로 노화성 난청 연구에서 사용된다.

구분	내용
쥐	- Fischer 344(F344) 랫트: 2개의 하위종인 DuCrI과 NHsd이 연구에 많이 사용된다. F344 rats의 두 종은 생후 12개월이 되면, 고주파수에서 빠르게 청력손실이 나타나며, 생후 18개월에는 낮은 주파수까지 청력손실이 나타난다. 점진적으로 DPOAE에서의 감소가 젊은 동물에서도 시작되고, 12~18개월에는 DPOAE가 존재하지 않는다. - Sprague-Dawley 랫트: 유모세포의 손실이 초반에 나타나며, 나이와 함께 점진적으로 지속된다. 생후 2개월에 외유모세포와 내유모세포 손실이 나타난다. 수컷 보다는 암컷을 사용한다.
기니아피그	기니아 피그는 비교적 큰 설치류이나 (암컷: 100~900 g; 수컷: 900~1,200 g), 매우 온순하여 물거나, 할퀴거나 하지 않으므로 실험실에서 쉽게 다룰 수 있다. 수명은 약 5~7년으로 가장 많이 사용되는 종은 Hartley and Dunkin-Hartley albino 종이다.
몽골리안 저빌	몽골리안 저빌은 생후 36개월부터 경미한 역치상승(15~35 dB)를 보이며, 고주파수에서 더 심하게 나타난다.

[출처: Gerontology 61(2):149-157, 2015; Exp Gerontol 46(6):413-425, 2011; Rejuvenation Res 16(6):475-478, 2013; Front Cell Neurosci 27:9:276, 2015; Hear Res 303:30-38, 2013; J Acoust Soc Am 146(5): 3743-3769, 2019; Mol Biol Rep 47(6):4723-4736, 2020]

(2) 바이오마커

시험물질의 작용기전을 설명하기 위해 청력검사, 산화스트레스, 미토콘드리아 기능, 세포사멸, 염증, 혈관 활성 및 혈액공급 등의 작용기전에 따른 바이오마커의 양, 활성, 단백질 발현, mRNA 발현 등을 측정한다. 한 가지 지표의 변화보다는 기전에 따른 일련의 바이오마커의 변화를 종합적으로 평가한다.

(3) 통계처리

대조군과 시험군의 실험결과는 통계처리하여 바이오마커의 평균값과 표준편차를 구하고, $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 판정한다.

다. 인체적용시험

(1) 시험대상

(가) 시험대상자 선정기준(예시)

○ 노화로 인해 감소될 수 있는 청력 유지에 도움을 줄 수 있음

- 만 65세 이상
- 순음청력검사에서 양측 귀 평균 청력 역치가 26 dB 이상에 해당하나 재활치료(보청기, 인공와우 등)가 필요하지 않은 자

(나) 시험대상자 제외기준(예시)

- 청력관련
 - 선천성 난청, 유전성 난청, 가족성 난청이 있는 자
 - 외이와 중이에 질환(내이염, 중이염, 메니에르증후군, 돌발성 난청) 있는 자
 - 난청으로 수술을 받은 자
 - 소음의 노출 이력이 있거나 소음성 난청으로 의료기관에서 진단받은 자
 - 재해성 폭발음의 노출 기간 혹은 직후 난청, 이명이 발생한 자
 - 85 dB이상의 연속음에 3년 이상 노출된 자
 - 여러 약물과 화학물질에 의해 발생할 수 있는 이독성에 노출 이력이 있거나 혹은 이독성 난청으로 의료기관에서 진단받은 자
 - 이독성을 유발하는 Cisplatin을 포함한 항암치료를 받은 자
 - 이독성을 유발할 수 있는 Aminoglycoside, Loop diuretics, Quinine의 노출 기간 혹은 직후 난청, 이명이 발생한 자
 - 유기용제의 노출 기간 혹은 직후 난청, 이명이 발생한 자
 - 측두골이 방사선치료영역에 포함된 방사선치료를 받은 자(예; 비인강 암, 두개저 암, 악성 뇌종양으로 방사선치료를 받은 경우)
 - 골절을 동반할 정도의 두개골 골절이 있거나 와우진탕으로 의료기관에서 진단받은 자
 - 청력검사를 시행할 수 없는 자
 - 기도청력과 골도청력 차이가 10 dB을 초과하는 자, 양측 귀의 청력손실 차이가 20 dB을 초과하는 자

○ 질병상태

- 약물 섭취에도 조절되지 않는 고혈압 환자(수축기혈압 >140 mmHg 또는 이완기혈압 > 90 mmHg)
- 약물 섭취에도 조절되지 않는 당뇨병 환자(HbA1c 7.0% 이상)
- 뇌 질환 환자

○ 약물복용 및 치료

- 혈액순환 개선제를 복용하는 자
- 지난 2개월 이내에 이독성 약물을 복용한 자

○ 알레르기

- 실험물질에 대한 알레르기/부작용이 있는 자

○ 기타

- 일상 활동이 어려운 자
- 최근 3개월 내 다른 인체적용시험 참가자
- 그 외 연구자에 의해 실험에 부적합하다고 판단되는 자

(2) 시험설계

무작위배정, 위약대조연구(Randomized, controlled trial, RCT)를 기본으로 한다. 시험 결과에 영향을 미칠 수 있는 중요한 요소(성별, 연령, 흡연, 음주습관, 혈행개선제 및 청력 관련 약물복용, 심장순환계질환자(뇌졸중, 일과성 허혈성 발작, 심근경색증, 불안정 가슴조임증, 관상동맥재관류와 회로 이식술, 복부대동맥류, 심부전), 심방세동이 있는 자, 고지혈증 환자, 빈혈이 있거나 재발 위험이 있는 자 등)가 편중되지 않도록 한다.

청력검사 간 오차가 5~10 dB 정도로 이를 감안하여 충분한 중재기간과 대상자 수로 인체적용시험을 설계하여야 한다.

(3) 바이오마커

시험물질의 작용기전을 설명하기 위하여 청력검사, 시험물질의 특징에 따른 바이오마커의 양, 활성, 단백질 발현, mRNA 발현 등을 측정한다. 한 가지 지표의 변화가 아닌 일련의 바이오마커의 변화를 종합적으로 평가한다.

(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. 고의경. 난청의 진단. J. Clinical Otolaryngol 14(2): 161-167, 2003
2. 건강기능식품 기능성평가 해설서, 식품의약품안전청, 2008
3. 「건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정」, 식품의약품안전처 고시 제2021-66호, 2023
4. 건강기능식품(개정판), 김미경, 권오란, 전향숙, 원혜숙, 김지연, 강병철, 제정환, 한재갑, 홍성화, 복혜숙, 김우선, 피재호, 박현용, 김현정, 교문사, 2010
5. 건강보험심사평가원. <http://opendata.hira.or.kr/op/opc/olap3thDsInfo.do>
6. 김건호, 김병훈, 이승열, 정재호, 변하영, 이승환. 급성 저음역 감각신경성 난청에서 호중구-림프구 비율 및 혈소판-림프구 비율의 의의. Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 63(12): 558-563, 2020
7. 김규상. 일반질환과 난청. 청능재활. 7: 1-9, 2011
8. 김동욱, 이태영, 최다혜, 김택영, 문현철. 65세 이상의 한국 성인에서 노인성 난청의 위험 인자 분석: 전쟁 참여 경험이 미치는 영향을 포함하여. Korean J Clin Geri 17(2): 68-73, 2016
9. 김보형, 노인성 난청의 환경 위험 요소들에 대한 고찰. Korean J 49: 962-967, 2006
10. 김봉영, 배명진. 연령이 고려된 양쪽 귀의 가청대역 청력측정에 관한 연구. 문화기술의 융합 7(1): 570-575, 2021
11. 김상훈, 여승근. 노인성난청. Hanyang Med Rev 35: 78-83, 2015
12. 노혜일, 이혜숙. 청신경병증이 아닌 성인의 순음청력검사와 청성지속반응검사의 역치값 불일치. Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 63(8): 350-357, 2020
13. 대한청각학회. 청각검사지침. 학지사, 2022
14. 문성균, 문형아, 정현경, Soli SD, 이준호, 박기현. 한국어 Hearing in Noise Test(HINT) 문장의 개발. Korean J Otolaryngol 48: 724-728, 2005
15. 박시내, 한규철, 조양선, 변재용, 신정은, 추호석, 천병철, 정종우, 채성원, 최재영. 한국어판 고령자 청력 장애 검사(K-HHIE) 설문지의 표준화: 타당도 및 신뢰도 검증. 대한이비인후과학회지 두경부외과학 54(12): 828-834, 2011

16. 박은선, 방정화, 이효정, 김형중. 청력 역치에 따른 음장 청성지속 반응의 유용성. 청능재활 7: 15-24, 2013
17. 박형주, 김홍찬, 신동주, 장철호. 국내 소아 및 성인에서의 순음청력검사와 청성 안정유발반응의 상관관계연구. Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 58(3): 182-6, 2015
18. 산업재해예방 안전보건공단. 직업건강 가이드라인-소음성 난청 예방관리. 2015
19. 서재현, 전은주, 박용수, 김주은, 김동현, 남인철, 이일환, 이호석. 클릭유발 청성뇌간반응과 순음청력검사의 평균 및 주파수에 따른 상관관계분석. Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 55: 764-770, 2012
20. 신명선, 허명진. 노인들의 연령에 따른 청각적 기능패턴 조사. 언어치료연구 20(2): 175-185, 2011
21. 신은영. 노년기 청력에 따른 삶의 질 평가 척도. 청능재활 8: 224-237, 2012
22. 안용휘, 윤지향, 오현식, 이은섭, 김동현, 윤지은, 심현준. 성인의 청력장애 판정에서 순음청력검사 및 청성뇌간반응과 청성지속반응의 상관관계 비교. J Clinical Otolaryngol 28(2): 192-198, 2017
23. 연정민, 이주희, 김대현, 이옥경. 차과기공 소음 노출이 치기공과 학생의 스트레스와 순음청력에 미치는 영향. 디지털융복합연구 14(4): 363-370, 2016
24. 오훈재, 최지윤, 조성일. 돌발성 난청의 연중 발생분포와 기후인자와의 관계. Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 57(12): 826-829, 2014
25. 이민영. 청력보호를 위한 유전자 치료. Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 60(6): 263-270, 2017
26. 이성은. 노인의 청력저하가 우울에 미치는 영향과 가족관계의 매개효과. 언어치료연구 26(3): 143-151, 2017
27. 이영미. 지역사회 거주 노인의 청력장애가 주관적 기억장애와 우울에 미치는 영향. 한국웰니스학회지 11(4): 277-298, 2016
28. 이영미, 박성일, 이수정. 난청노인의 주관적 청각장애지수에 영향을 미치는 변수 탐색. Commun Sci Disord 25(1): 142-155, 2020

29. 이정엽, 이세아, 이상국, 김정태, 박승범, 김보경, 이종대. 청신경종양 환자에서 종양의 크기에 따른 임상양상, 청력 및 전정기능검사의 비교. Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg. 59(5): 361-365, 2016
30. 이채관. 소리의 종류와 크기에 따른 일과성 청력 역치 상승과 회복의 차이. 한국산업보건학회지 30(4): 387-393, 2020
31. 이현민, 박다희, 김동조, 최성원, 오세준, 공수근, 이일우. 전신 스테로이드 및 고실 내 스테로이드 주입술 병용 요법을 이용한 특발성 돌발성 난청의 치료에서 고실 내 스테로이드 주입 시작 시기에 따른 치료 결과. Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 63(10): 448-457, 2020
32. 장기홍, 여상원, 전은주, 박용수, 서병도. 실험적 소음성 난청동물에서 와우 유모세포의 변성 및 청력 역치의 변화. Korean J Audiol 2(1): 38-43, 1998
33. 장용주, 정필상, 황의진, 현민환, 조정석, 김영훈, 김윤환, 김민영, 이정구. 기니픽에서 청성뇌간유발반응검사, 일과성음에 의한 유발이음향방사 및 변조이음향방사를 통한 실험적 소음성 난청의 추적관찰. Korean J Otolaryngol 42: 1089-1092, 1999
34. 정동우, 김기식, 권오성. 정상 성인에서 외이도 폐쇄에 의한 청력의 변화. 동국의학 12(1): 66-74, 2005
35. 채세림. 청력검사의 이해. 대한임상생리검사학회. 추계온라인학술대회초록집 2021
36. 최성민, 김영혜, 손현미. 돌발성 난청 환자의 삶의 질과 고독감. 글로벌 건강과 간호 5(2): 45-54, 2015
37. 한국산업안전보건공단. 순음청력 검사에 관한 지침. 2021
38. 한국산업표준. 음향학-청력검사방법-제3부: 어음청각검사(KSI ISO 8253-3). 지식경제부 기술표준원. 2020
(<https://e-ks.kr/streamdocs/view/sd;streamdocsId=72059260375771579>)
39. 한수정. 청력저하 여부에 따른 노인의 삶의 질 관련 요인: 국민건강영양조사 자료(2016-2018년) 분석. 디지털융복합연구 19(2): 265-274, 2021
40. 한우재, 이동욱, 구미승, 김진숙. 난청 성인 및 노인용 설문지에 대한 문헌 분석. 청능재활 11(1): 3-16, 2015
41. 허영록, 이정학, 이경원. 연령에 따른 순음청력역치와 어음인지역치의 변화. 청능재활 8: 159-164, 2012

42. 홍빛나, 홍하나, 이정학. 노인성 난청 선별을 위한 검사도구 개발. 대한 청각학회지 8(1): 49-57, 2004
43. 홍성화. 이음향검사. J Clinical Otolaryngol 19: 25-35, 2008
44. Agrawal Y, Platz EA, Niparko JK. Prevalence of hearing loss and differences by demographic characteristics among US adults. Arch Intern Med 168(14): 1522-1530, 2008
45. Ahn JH, Kang HH, Kim TY, Shin JE, Chung JW. Lipoic acid rescues DBA mice from early-onset age-related hearing impairment. Neuroreport 27:19(13): 1265-1269, 2008
46. Bainbridge KE, Hoffman HJ, Cowie CC. Risk factors for hearing impairment among U.S. adults with diabetes: National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2004. Diabetes Care, 34(7): 1540-1545, 2011
47. Böttger EC, Schacht J. The mitochondrion: a perpetrator of acquired hearing loss. Hear Res 303: 12-19, 2013
48. Bowl MR, Dawson SJ. The mouse as a model for age-related hearing loss - a mini-review. Gerontology 61(2): 149-157, 2015
49. Castañeda R, Natarajan S, Jeong SY, Hong BN, Kang TH. Traditional oriental medicine for sensorineural hearing loss: Can ethnopharmacology contribute to potential drug discovery? J Ethnopharmacol 1:231: 409-428, 2019
50. Centers for Disease Control and Prevention. National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) audiometry procedures manual. https://www.cdc.gov/nchs/data/nhanes/2015-2016/manuals/2016_Audiometry_Procedures_Manual.pdf
51. Choi J, Chung WH. Age-related hearing loss and the effects of hearing aids. J Korean Med Associ 54(9): 918-924, 2011
52. Clark JG. Uses and abuses of hearing loss classification. ASHA 23: 493-500, 1981; <https://www.asha.org/public/hearing/degree-of-hearing-loss>
53. Crowson MG, Hertzano R, Tucci DL. Emerging Therapies for Sensorineural Hearing Loss. Otol Neurotol 38(6): 792-803 2017

54. Cunningham LL, Tucci DL. Hearing Loss in Adults. *N Engl J Med* 377(25): 2465-2473, 2017
55. Ding D, Jiang H, Chen GD, Longo-Guess C, Muthaiah VP, Tian C, Sheppard A, Salvi R, Johnson KR. N-acetyl-cysteine prevents age-related hearing loss and the progressive loss of inner hair cells in γ -glutamyl transferase 1 deficient mice. *Aging (Albany NY)* 8(4): 730-50, 2016
56. Esen E, Özdoğan F, Gürgen SG, Özel HE, Başer S, Genç S, Selçuk A. Ginkgo biloba and Lycopene are Effective on Cisplatin Induced Ototoxicity. *J Int Adv Otol* 14(1): 22-26, 2018
57. Fetoni AR, Piacentini R, Fiorita A, Paludetti G, Troiani D. Water-soluble Coenzyme Q10 formulation (Q-ter) promotes outer hair cell survival in a guinea pig model of noise induced hearing loss (NIHL). *Brain Res* 27;1257: 108-116, 2009
58. Fetoni AR, Picciotti PM, Paludetti G, Troiani D. Pathogenesis of presbycusis in animal models: a review. *Exp Gerontol* 46(6): 413-425, 2011
59. Fiorini AC, Costa OA Filho, Scorza FA. Can you hear me now? The quest for better guidance on omega-3 fatty acid consumption to combat hearing loss. *Clinics (Sao Paulo)*. 71(8):420-422, 2016
60. Fritze T, Teipel S, Óvári A, Kilimann I, Witt G, Doblhammer G. Hearing impairment affects dementia incidence. An analysis based on longitudinal health claims data in Germany. *Plos one* 11(7), 2013
61. Fujimoto C, Yamasoba T. Mitochondria-Targeted Antioxidants for Treatment of Hearing Loss: A Systematic Review. *Antioxidants (Basel)*. 24:8(4): 109, 2019
62. Garringer HJ, Pankratz ND, Nichols WC, Reed T. Hearing impairment susceptibility in elderly men and the DFNA18 locus. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 132: 506-510, 2006
63. Gorga MP, Neely ST, Hoover BM, Dierking DM, Beauchaine KL, Manning C. Determining the upper limits of stimulation for auditory steady-state response measurements. *Ear Hear* 25(3): 302-307, 2004

64. Han C, Someya S. Mouse models of age-related mitochondrial neurosensory hearing loss. *Mol Cell Neurosci* 55: 95-100, 2013
65. Heman-Ackah SE, Juhn SK, Huang TC, Wiedmann TS. A combination antioxidant therapy prevents age-related hearing loss in C57BL/6 mice. *Otolaryngol Head Neck Surg* 143(3): 429-434, 2010
66. Heo SD. Effectiveness of the Hearing Handicap Inventory for Elderly (HHIE) in measuring the current state of presbycusis. *Commun Sci Disord* 22(1): 170-176, 2017
67. International Electrotechnical Commission. Audiometers-Part 2: Equipment for Speech Audiometry (IEC 60645-2), 1993
68. Katsarkas A, Ayukawa H. Hearing loss due to aging (presbycusis). *J Otolaryngol* 15(4): 239-244, 1986
69. Kim KH, Lee B, Kim YR, Kim MA, Ryu N, Jung DJ, Kim UK, Baek JI, Lee KY. Evaluating protective and therapeutic effects of alpha-lipoic acid on cisplatin-induced ototoxicity. *Cell Death Dis* 1;9(8): 827, 2018
70. Kim SH, Won YS, Kim MG, Baek YJ, Oh IH, Yeo S G. Relationship between obesity and hearing loss. *Acta Oto-Laryngologica* 136(10): 1046-1050, 2016
71. Li-Korotky HS. Age-related hearing loss: quality of care for quality of life. *Gerontologist* 52(2): 265-271, 2012
72. Martínez-Vega R, Partearroyo T, Vallecillo N, Varela-Moreiras G, Pajares MA, Varela-Nieto I. Long-term omega-3 fatty acid supplementation prevents expression changes in cochlear homocysteine metabolism and ameliorates progressive hearing loss in C57BL/6J mice. *J Nutr Biochem* 26(12): 1424-1433, 2015
73. Morrell CH, Gordon-Sarant S, Pearson JD, Brant LJ, Fozard JL. Age and gender specific reference ranges for hearing level and longitudinal changes in hearing level. *J Acoust Soc Am*. 100(4): 1949-1967, 1996

74. Naert G, Padelou MP, Le Prell CG. Use of the guinea pig in studies on the development and prevention of acquired sensorineural hearing loss, with an emphasis on noise. *J Acoust Soc Am* 146(5): 3743-3769, 2019
75. Nevado J, Sanz R, Sánchez-Rodríguez C, García-Berrocal JR, Martín-Sanz E, González-García JA, Esteban-Sánchez J, Ramírez-Camacho R. Ginkgo biloba extract (EGb761) protects against aging-related caspase-mediated apoptosis in rat cochlea. *Acta Otolaryngol* 130(10): 1101-1112, 2010
76. Newman CW, Weinstein BE, Jacobson GP, Hug GA. Test-retest reliability of the hearing handicap inventory for adults. *Ear Hear* 12(5): 355-357, 1991
77. Oike H, Aoki-Yoshida A, Kimoto-Nira H, Yamagishi N, Tomita S, Sekiyama Y, Wakagi M, Sakurai M, Ippoushi K, Suzuki C, Kobori M. Dietary intake of heat-killed *Lactococcus lactis* H61 delays age-related hearing loss in C57BL/6J mice. *Sci Rep* 22:6:23556, 2016
78. Park DJ, Ha S, Choi, JS, Lee SH, Park JE, Seo YJ. Induced short-term hearing loss due to stimulation of age-related factors by intermittent hypoxia, high-fat diet, and galactose injection. *Int J Mol Sci* 21, 7068, 2020
79. Pham TNM, Jeong SY, Kim DH, Park YH, Lee JS, Lee KW, Moon IS, Choung SY, Kim SH, Kang TH, Jeong KW. Protective Mechanisms of Avocado Oil Extract Against Ototoxicity. *Nutrients* 29:12(4): 947, 2020
80. Ren HM, Ren J, Liu W. Recognition and control of the progression of age-related hearing loss. *Rejuvenation Res* 16(6): 475-478, 2013
81. Rodrigo L, Campos-Asensio C, Rodríguez MÁ, Crespo I, Olmedillas H. Role of nutrition in the development and prevention of age-related hearing loss: A scoping review. *Formos Med Assoc* 120(1) : 107-120, 2021
82. Salam SA, Mostafa F, Alnamshan MM, Elshewemi SS, Sorour JM. Thymoquinone ameliorates age-related hearing loss in C57BL/6J mice by modulating Sirt1 activity and Bak1 expression. *Biomed Pharmacother* 143: 112149, 2021

83. Sanz-Fernández R, Sánchez-Rodríguez C, Granizo JJ, Durio-Calero E, Martín-Sanz E. Accuracy of auditory steady state and auditory brainstem responses to detect the preventive effect of polyphenols on age-related hearing loss in Sprague-Dawley rats. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 273(2): 341-347, 2016
84. Saya N, Azarpisheh S, Gohari N. Determining the quality of life in the elderly with high frequency hearing loss before and after hearing aid fitting. *Aud Vest Res* 27(2): 111-115, 2018
85. Seidman MD. Effects of dietary restriction and antioxidants on presbycusis. *Laryngoscope* 110(5 Pt 1): 727-738, 2000
86. Souza MEDCA, Costa KVTD, Vitorino PA, Bueno NB, Menezes PL. Effect of antioxidant supplementation on the auditory threshold in sensorineural hearing loss: a meta-analysis. *Braz J Otorhinolaryngol* 84(3): 368-380, 2018
87. Tanigawa T, Shibata R, Kondo K, Katahira N, Kambara T, Inoue Y, Nonoyama H, Horibe Y, Ueda H, Murohara T. Soybean β -Conglycinin Prevents Age-Related Hearing Impairment. *PLoS One* 8:10(9): e0137493, 2015
88. Tavanai E, Mohammadkhani G. Role of antioxidants in prevention of age-related hearing loss: a review of literature. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 274(4): 1821-1834, 2017
89. Tavanai E, Mohammadkhani G, Farahani S, Jalaie S. Protective Effects of Silymarin Against Age-Related Hearing Loss in an Aging Rat Model. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg* 71(Suppl 2): 1248-1257, 2019
90. Tian CJ, Kim YJ, Kim SW, Lim HJ, Kim YS, Choung YH. A combination of cilostazol and Ginkgo biloba extract protects against cisplatin-induced Cochleo-vestibular dysfunction by inhibiting the mitochondrial apoptotic and ERK pathways. *Cell Death Dis* 21:4(2): e509. 2013
91. Tseng YC, Liu SH, Lou MF, Huang GS. Quality of life in older adults with sensory impairments: a systematic review. *Qual Life Res* 27(8): 1957-1971, 2018

92. Ventry IM, Weinstein BE. The hearing handicap inventory for the elderly: a new tool. *Ear & Hearing* 3(3): 128-134, 1982
93. Wang J, Puel JL. Presbycusis: An Update on Cochlear Mechanisms and Therapies. *J Clin Med* 14;9(1): 218, 2020
94. Wang Y, Qu Y, Chen X, Zhang P, Su D, Wang L, Yang F, Yang J. Effects of D-methionine in mice with noise-induced hearing loss mice. *J Int Med Res* 47(8): 3874-3885, 2019
95. WHO. International classification of functioning, disability and health. Geneva: World Health Organization. 2001
96. WHO. World report hearing. 2021
97. Wu J, Ye J, Kong W, Zhang S, Zheng Y. Programmed cell death pathways in hearing loss: A review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif* 53(11): e12915, 2020
98. Yamasoba T, Lin FR, Someya S, Kashio A, Sakamoto T, Kondo K. Current concepts in age-related hearing loss: epidemiology and mechanistic pathways. *Hear Res* 303: 30-38, 2013
99. Yang CH, Schrepfer T, Schacht J. Age-related hearing impairment and the triad of acquired hearing loss. *Front Cell Neurosci* 27(9):276, 2015

건강기능식품 기능성 평가 가이드(민원인 안내서)

- 청력 관련 -

발 행 인 : 박윤주

편 집 위 원 장 : 오금순

편 집 위 원 : 이해영, 김용무, 권광일, 고수일, 서은채, 이수은, 정유경, 이다선,
김규현, 이미영, 김남숙, 최정호, 전해련, 이세윤, 이민아

발 행 처 : 식품의약품안전평가원

발 행 일 : 2023. 12.

문 의 처 : 식품위해평가부 영양기능연구과
(043-719-4402)
