

발 간 등 록 번 호

안내서-1348-01

국민의 더 건강한
내일을 위한 정부혁신

보다나은 식약처

건강기능식품 기능성 평가 가이드

(민원인 안내서)

요독물질 관련

2023. 12.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

지침서 · 안내서 제 · 개정 점검표

명칭	건강기능식품 기능성 평가 가이드 (요독물질 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 12 월 일		
담당자 확 인(부서장)		
이 해 영		

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

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

전화번호: 043-719-4402

팩스번호: 043-719-4420

제·개정 이력

연번	제·개정번호	승인일자	주요내용
1	안내서-1348-01	2023.12.	제정

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

※ 약어	3
------------	---

I 서론	4
-------------	----------

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

1. 개요	4
2. 보건학적 중요성	12

III 기능성 시험 방법	16
----------------------	-----------

1. 바이오마커의 선정	16
2. 주요 바이오마커의 측정 방법	22
3. 시험 설계 시 고려사항	29
4. 안전성 평가	36

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

건강기능식품의 기능성 개요

□ 기능성 정의

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

□ 기능성 구분

건강기능식품의 기능성은 3가지로 구분할 수 있다.

○ 건강기능식품의 기능성 구분

기능성 구분	기능성 내용	기능성을 가진 원료 또는 성분
영양소 기능	인체의 정상적인 기능이나 생물학적 활동에 대한 영양소의 생리학적 작용	영양소
생리활성 기능	인체의 정상기능이나 생물학적 활동에 특별한 효과가 있어 건강상의 기여나 기능 향상 또는 건강 유지·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 기능1)	○○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 기능2)	○○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

AGEs	Advanced glycosylation end products
β 2-MG	β 2-microglobulin
CKD	Chronic kidney disease
CKD-EPI	CKD Epidemiology Collaboration
Cr	Creatinine
CRP	C-Reactive Protein
dROMs	Derivative reactive oxygen metabolites
eGFR	Estimated glomerular filtration rate
EUTWG	European Uremic Toxin Work Group
GFR	Glomerular filtration rate,
GEC	Glomerular endothelial cell
GFR	Glomerular filtration rate,
GBM	Glomerular basement membrane
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GST	Glutathione S-transferase
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IS	Indoxyl sulfate
KDIGO	Kidney Disease Improving Global Outcome
MAPKs	Mitogen activated protein kinases
MC	Mesangial cell
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MDA	Malondialdehyde
PEC	Parietal epithelial cell
PCS	p-cresyl sulfate
PTH	Parathyroid hormone
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosterone System
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
SOD	Superoxide Dismutase
TNF- α	Tumor necrosis factor- α

I 서 론

이 가이드는 건강기능식품 기능성원료를 개발하는 연구자 및 영업자에게 식품의약품 안전처의 기능성(요독물질 관련)에 대한 바이오마커 등의 정보를 제공함으로써 산업체의 기능성원료 연구개발에 적정을 기하고 효율성을 높이고자 작성되었다.

II 일반적 사항

1. 개요

가. 콩팥의 구조

콩팥은 체내 후복막(retroperitoneum)에 위치한 장기로 좌우로 하나씩 위치하고 있다. 콩팥의 실질은 피질과 수질로 나누어지고, 피질에는 80~120만개의 네프론(nephron)이 있으며, 네프론은 신소체(보우먼낭+사구체)와 세뇨관으로 구성되어 있다(그림 1). 네프론 안에서는 사구체 여과(glomerular filtration), 세뇨관 재흡수(tubular reabsorption), 세뇨관 분비(tubular secretion) 과정을 통해 소변이 형성되며, 콩팥에서 만들어진 소변은 신배, 신우 및 요관을 거쳐 방광에 저장된 후 요도를 통하여 몸 밖으로 배출된다.

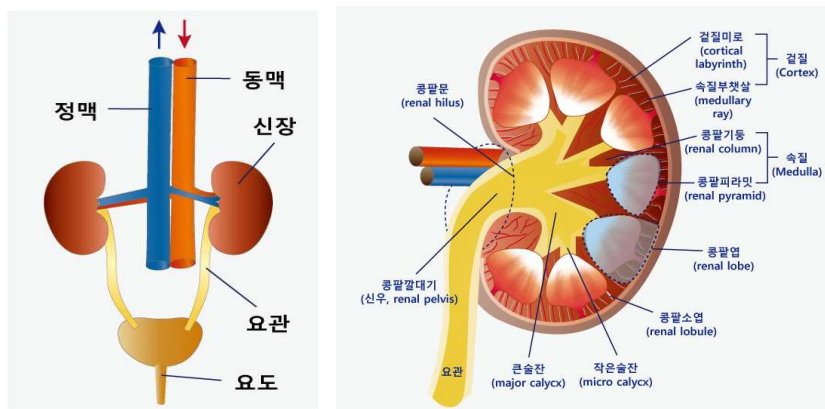


그림 1. 콩팥의 구조

[출처: 대한콩팥학회, <https://www.ksn.or.kr/general/disease>]

사구체는 모세혈관 덩어리로 glomerular endothelial cell(GECs, 내피세포), podocyte(발세포), mesangial cell(MCs, 혈관사이세포), parietal epithelial cell(PECs, 벽측상피세포)로 구분된다(그림 2). 발세포는 cell body에서 뻗어나온 microtubule로 이루어져 있고(primary process), primary process에서 뻗어 나온 두 번째 및 세 번째 process는 액틴으로 이루어져 있다. Process의 말단 부위가 발과 같은 모양을 하고 있기 때문에 foot process 라고 한다. 발세포와 GEC는 glomerular basement membrane(GBM)이라는 세포외기질을 공유하고, 콩팥의 여과에 중추적인 기능을 하는 glomerular filtration barrier를 구성하는데 중요한 역할을 한다.

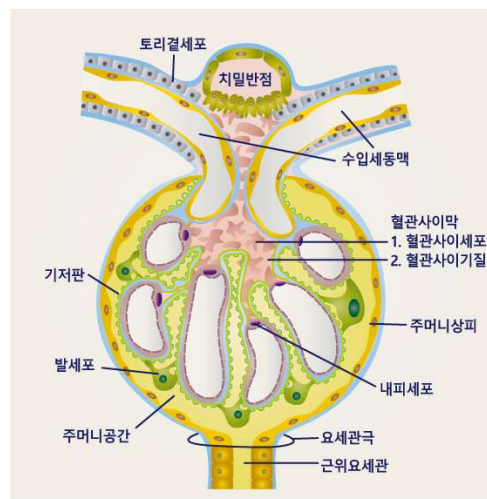


그림 2. 사구체의 세포 구성

[출처: 대한콩팥학회, <https://www.ksn.or.kr/general/disease>]

나. 콩팥의 기능

콩팥의 주요 기능은 영양소 섭취 및 대사 등의 결과로 생성된 체내 노폐물을 배설하는 작용과 혈압조절, 조혈 기능, 무기질 평형 유지에 관여한다.

(1) 배설작용 및 체액조절

소변의 형성은 혈장 성분이 사구체를 통해 보먼 주머니를 통해 여과(ultrafiltration) 되면서 이루어지며, 수분이나 작은 용질들은 투과되지만 단백질과 같은 큰 분자들은 투과되지 못한다. 콩팥은 단백질의 대사산물인 요소, 요산, 크레아티닌, 질소 분해산물을 배설하게 하나 사구체의 여과력이 저하되면 혈액 내 단백질 대사산물이 노폐물로 축적된다.

(2) 내분비조절

(가) 혈압조절

체내 혈액량 혹은 혈압이 감소하면 신동맥압이 저하되고, 신동맥압의 저하는 콩팥에서 레닌(renin)을 분비한다. 레닌은 혈압상승을 유도하는 물질로서 안지오텐신(angiotensine)과 알도스테론을 연속적으로 자극하여 혈관을 수축시키고, 세뇨관에서의 나트륨 재흡수를 촉진하여 체액을 증가시켜 전체적으로 혈압을 상승시키게 된다(Renin-Angiotensin-Aldosterone System, RAAS, 그림 3). 콩팥 기능 이상 시 RAAS의 이상발현을 유발하여 비정상적으로 조절이 힘들게 된다.

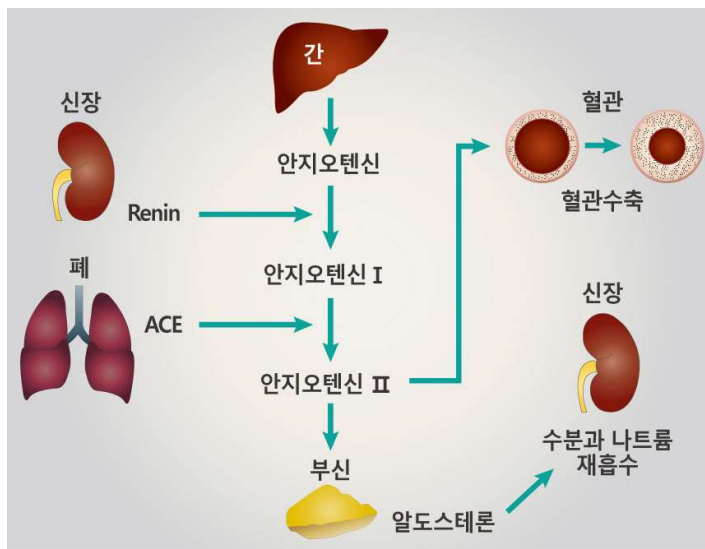


그림 3. Renin-Angiotensin-Aldosterone System

[출처: Vargas-Rodriguez et al., Front Med. 2022,13:8:758414]

(나) 조혈조절

콩팥 피질의 간질세포에서는 골수에서 적혈구의 생성을 자극하는 에리트로포이에틴(erythropoietin)을 생성하며, 콩팥 기능 이상 시 에리트로포이에틴의 생성 감소로 인해 빈혈이 발생하게 된다.

(다) 무기질 평형 조절

칼슘, 인, 비타민 D의 대사에 관여하여 무기질 평형을 유지한다. 콩팥에서 $25(\text{OH})\text{D}_3$ 가 비타민 D 활성형인 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 으로 전환된다. 혈액 내 인이나 칼슘의 농도가 저하되어 부갑상샘 호르몬(parathyroid hormone, PTH)의 분비량이 증가될 경우에 비타민 D가 활성화되어 장에서의 칼슘과 인의 흡수를 증가시킨다.

(3) 체내 항상성 조절

체내 생리 조절의 유지를 위해서는 체내 항상성 유지가 매우 중요하며, 특히 체액의 일정한 상태를 유지하는 것이 중요하다. 사구체의 여과액은 신세뇨관을 통과하는 동안 나트륨, 칼륨, 염소 이온 등의 전해질 및 수소이온의 흡수, 분비 과정을 거쳐 소변으로 배설되는 물과 이온들의 양이 결정되며, 이를 통해 체액량, 삼투압, 전해질량과 농도, 산성도 등이 조절된다.

다. 콩팥 기능 손실의 진단

크레아티닌은 체내 근육에서 규칙적으로 일정량 분비되고 콩팥으로 배설되는 물질로서 혈액내 항상 일정량으로 존재한다. 따라서 콩팥 기능 상실에 따라 크레아티닌 배설 능력이 감소하게 되면, 혈중 크레아티닌 농도가 증가하게 된다.

콩팥 기능의 측정은 사구체 여과율을 측정하는 것이 가장 정확한 방법이지만, 그 측정 방법이 어렵기 때문에 혈청 크레아티닌(Creatinine, Cr) 수치를 검사하고 이를 통해 콩팥 기능 수치인 Glomerular Filtration Rate(GFR)를 계산하여 사용하고 있다. 주로 총 GFR을 주요 지표로 활용하고 있으며, 개별 단위의 네프론 GFR을 산정할 수는 없기 때문에 전체 콩팥 기능을 평균 네프론값으로 나누어 사용하고 있다.

또한 콩팥의 기능이 손실된 경우 콩팥에서 소변의 단백질 필터능이 저해되어 알부민이 소변을 통해 배출되게 된다. 알부민은 분자량이 작기 때문에 콩팥 손상시 초기 단계에서 소변 검출이 된다. 지속적으로 알부민뇨가 발생한다면, 향후 콩팥 질환 진행의 위험성을 높이고, 심혈관계질환 등의 합병증 발병 위험도가 높아지며, 그에 따른 사망률도 높아진다.

라. 콩팥 기능 손실 관여 인자

(1) 요독물질

요독물질은 정상적으로 소변을 통해 체외로 배출되는 물질이 다양한 원인으로 체내 저류되면서 정상적인 생리기능이 저해시키는 물질로 정의된다. 요독물질은 점진적으로 콩팥기능을 손상시키게 되며, CKD 환자에게 나타나는 여러 증상을 유발하는 원인이 된다. 요독물질 중 단백질 결합화합물은 심혈관계를 비롯한 다양한 조직의 손상을 촉진하며, 혈중에서 제거되기 어려운 세포독성 분자로 알려져 있다.

European Uremic Toxin Work Group(EUTWG)은 참조 값을 포함한 유용한 정보와 함께 요독 물질의 종류를 제시하고 있다. 크레아티닌, BUN, β 2-마이크로글로불린 등 광범위한 분자량을 갖는 다양한 물질들이 있으며, 식이 및 체내 대사 특히 미생물 대사에서 파생되어 광범위하게 연구되고 있는 요독 물질은 인독실 설페이트(indoxyl sulfate, IS), p-크레실 설페이트(p-cresyl sulfate, PCS) 등이 있다. 이러한 요독 물질은 염증반응을 과도하게 촉발시키고 콩팥 질환 진행, 심혈관 질환, 미네랄 및 뼈 장애 등의 합병증에 복합적으로 작용하게 되며, 사망 위험 증가와 관련이 있다(그림 4). 특히 CKD 환자의 장내 미생물총은 장내균에서 유래한 IS와 PCS와 같은 요독 물질(uremic toxin) 생성을 촉진하는 단백질 분해 세균은 증가해 있고, 단쇄지방산을 생성하는 Prevotellaceae, Lactobacillaceae와 같은 당화성세균(saccharolytic bacteria)은 감소해 있는 불균형 상태인 것으로 알려져 있다.

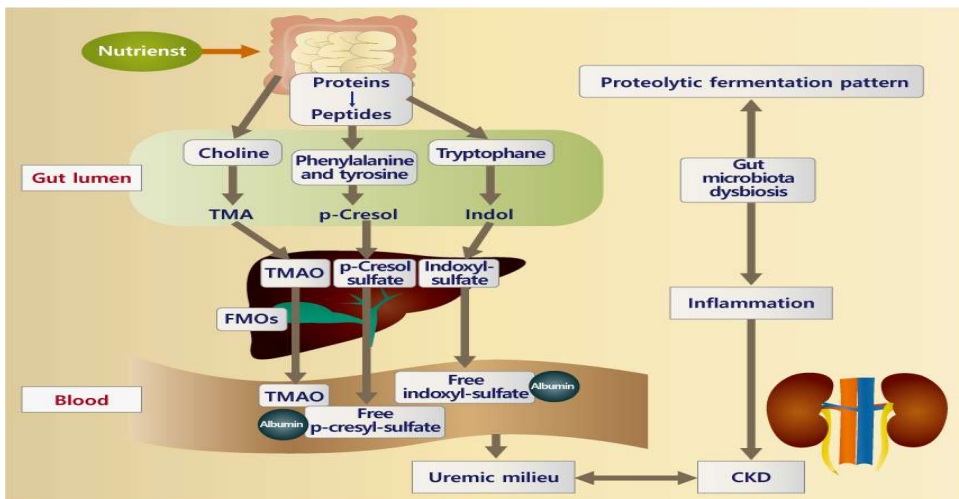


그림 4. 요독물질

[출처: Mihai et al., J Immunol Res 2018:2180373, 2018]

요독물질을 제거하는 방법은식이조절(고탄수화물식, 고식이섬유식, 저단백식), 당화균 미생물을 증가시키는 방법이 있다. 또한 oral sorbent 를 사용하는 방법과 콩팥이식의 방법도 있고, tubular secretion을 보존하여 콩팥기능을 지속적으로 유지하는 방법이 있다(그림 5). 추출물을 이용한 요독물질의 저해는 주로 콩팥기능을 지속적으로 유지하는 방법에 포함된다.

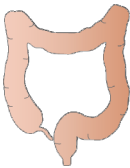
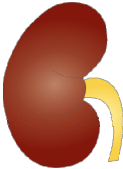
타겟	방법
	식이 조절 - 고탄수화물식, 고식이섬유식, 저단백식 - ↑ Saccharolytic activity - ↓ 장 통과 시간 2. 흡수 기전 조절 - oral sorbent AST-120
	3. 신장기능 유지 - 여과기능 보존 4. 대체요법 - 혈액투석 - 신장이식

그림 5. 요독물질 배출 기전

[출처: Mihai et al., J Immunol Res 2018:2180373, 2018]

(2) 면역물질

요독물질은 C-반응성 단백질(CRP), 산화질소(NO) 및 활성화된 NF- κ B의 활성화를 현저히 증가시켜 염증 상태의 발병 및 진행에 매우 중요한 역할을 한다(그림 6). 이는 IL-6, IL-1과 같은 전염증성 사이토카인의 수준을 증가시키는 것 뿐 아니라 부갑상선 호르몬 분비를 억제시킨다. 이 과정은 염증 상태의 악화를 초래한다. 염증과 염증 반응은 콩팥 내 미세순환 조절 및 관류 분포를 수정하거나 방해하여, 콩팥 손상을 유도하여 만성콩팥병 진행을 가속화시킨다.

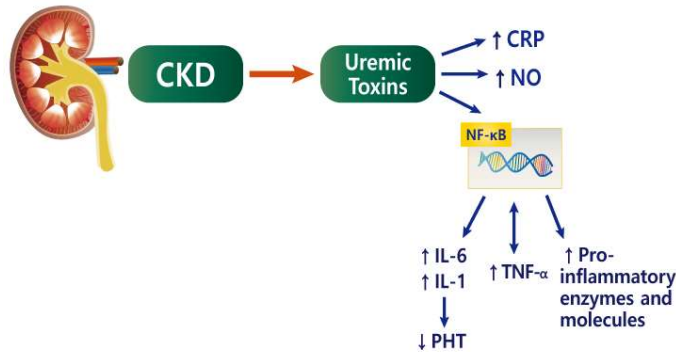


그림 6. CKD, 요독물질 및 염증인자와의 관계

[출처: Rapa et al., Int J Mol Sci 21:263, 2020]

염증 수치의 증가는 eGFR과 역의 상관관계가 있다. 염증 지표에는 acute phase protein인 hs-CRP, fibrinogen, albumin등이 해당되고, cytokine으로는 IL-1 β , IL-1RA(receptor antagonist), IL-6, TNF- α 등이 포함되며, 이들 지표는 모두 eGFR이 낮아질수록 유의적으로 높아진다.

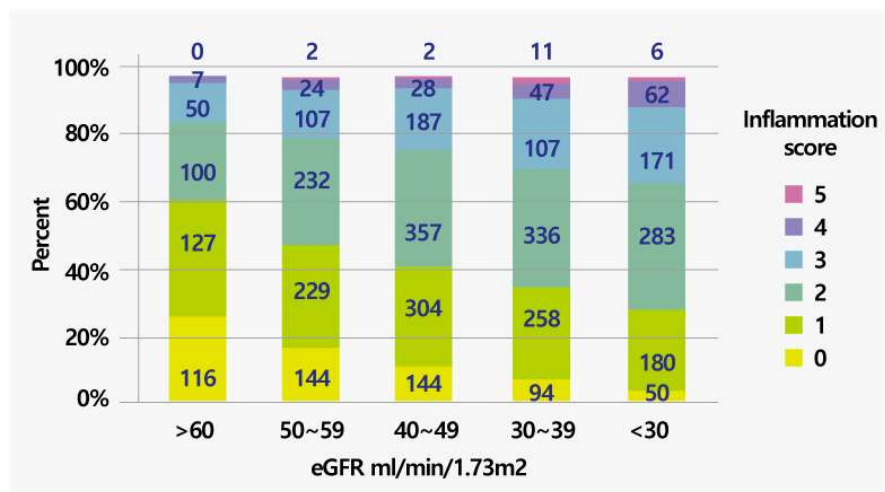


그림 7. eGFR에 따른 염증지표 분포

[출처: Gupta et al., Clin J Am Soc Nephrol 7: 1938–1946, 2012]

(3) 산화물질

산화스트레스는 만성 콩팥병의 사망률과 직접적으로 관련성을 보이는 전통적인 요인은 아니지만, 만성 콩팥병의 진전에서 산화적 스트레스는 매우 중요한 인자로 작용한다. 만성콩팥병의 경우 산화적 방어시스템이 손상된 경우가 많고, 이는 질병의 심각성을 증가시킨다. 초기 만성콩팥병 단계에서도 산화적 스트레스 지표가 매우 높은 것으로 확인이 되며, 이는 만성콩팥병 1단계에서 4단계에 이를때까지 지속적으로 증가된다. 산화적스트레스 지표로는 활성산소종 및 활성질소종이 있으며, 이들 지표는 eGFR와 유의한 상관관계를 나타낸다.

핵의 활성화를 유도하는 malondialdehyde(MDA), peroxynitrite(ONOO-) 및 최종당화생성물(AGEs)과 같은 산화 스트레스 지표는 NF- κ B(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer)를 활성화시키고, 이는 결과적으로 사이토카인 및 접착 분자의 증가시켜 염증 반응을 촉진시킨다. 또한 산화 스트레스 상태는 Nrf2 활성을 감소시키며, catalase(CAT) 및 superoxide dismutase(SOD) 등의 발현을 감소시켜 산화적 스트레스 상태를 더욱 악화시키게 된다.

요독물질은 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase를 활성화시켜 주로 ROS를 증가시키게 되며, 산화적 손상지표인 MDA 및 ONOO- 수준도 증가시킨다. 또한 Nrf2 발현을 감소시켜, 항산화 시스템의 불균형을 유도한다(그림 8).

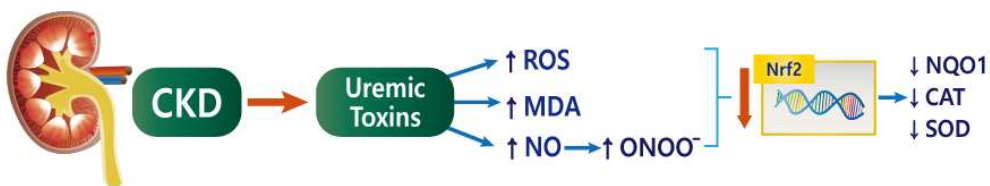


그림 8. CKD, 요독물질 및 산화적스트레스와의 관계

[출처: Rapa et al., Int J Mol Sci 21:263, 2020]

2. 보건학적 중요성

콩팥 기능의 손실은 급성 원인 이외에도 노화에 따라 자연스럽게 발생하며, 연령의 증가에 따라 지속적으로 사구체(네프론) 상실이 야기된다. 실제 연구에서는 30대 이후부터는 지속적으로 GFR이 감소하며, 여성에서는 eGFR이 40세 이상에서 남성에서는 eGFR이 45세 이상에서 90mL/min/1.73m^2 미만으로 감소되는 것으로 보고되었다(그림 9).

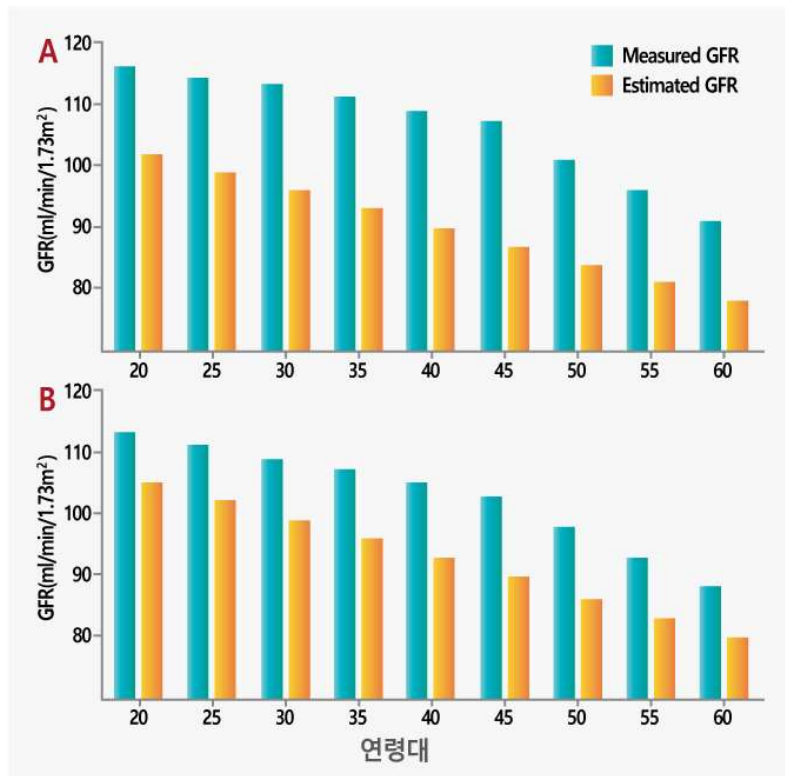


그림 9. 연령에 따른 사구체여과율의 변화. (A)여성 (B) 남성

[출처: Denic et al., Structural and Functional Changes With the Aging Kidney.

Adv Chronic Kidney Dis 23(1):19-28, 2016]

노화로 인해 사구체여과율이 감소하면, 체내 염증수치가 높아지며, 산화적 스트레스 지표가 높은 것으로 보고되고 있다. 요독물질의 경우는 혈중 수준이 높아지면, 염증수치와 산화적 스트레스 지표를 더욱 자극하게 되어, 신기능 저하, 심혈관 합병증 유발로 연결될 수 있다. 이에, 요독물질 감소를 통해 정상적인 콩팥기능 유지에 도움을 주는 것은 보건학적인 의미가 있다.

〈참고〉 만성 콩팥병 진단 및 진료가이드

(1) 진단

만성 콩팥병은 위험인자를 가지고 있다가 실제로 콩팥 실질의 손상이 발생하고, 콩팥 기능의 손실, 신부전까지 일련의 과정으로 진전된다. 콩팥 손상에 따라 1-5단계로 구분되고, 만성 콩팥병은 3개월 이상 콩팥 손상의 표지가 있거나 추정 사구체여과율이 60 mL/min/1.73 m² body surface area 미만인 경우로 정의되고, 콩팥 손상 표지로는 알부민뇨가 있거나, 소변 내 이상 침사 소견이 있는 경우, 콩팥 방사선학적 이상이 있는 경우, 신조직 검사상 이상이 있는 경우 등을 포함한다. 1-2단계는 콩팥의 손상은 있으나 기능의 정상 혹은 약간 소실된 정도이다(그림 10). 3단계부터는 실제 만성콩팥병으로 진단되는 단계이며, 3단계로 eGFR에 따라 subgroup으로 나눈다. 만성콩팥병 초기에는 저하된 콩팥의 기능을 보완하기 위해 손상되지 않은 네프론의 여과율을 증가시켜 특별한 증상 없이 콩팥 질환이 진행된다. 그러나 만성콩팥병 3-5단계는 콩팥의 섬유화와 기능 조직 상실로 인해 수분과 전해질 장애 증상이 나타난다.

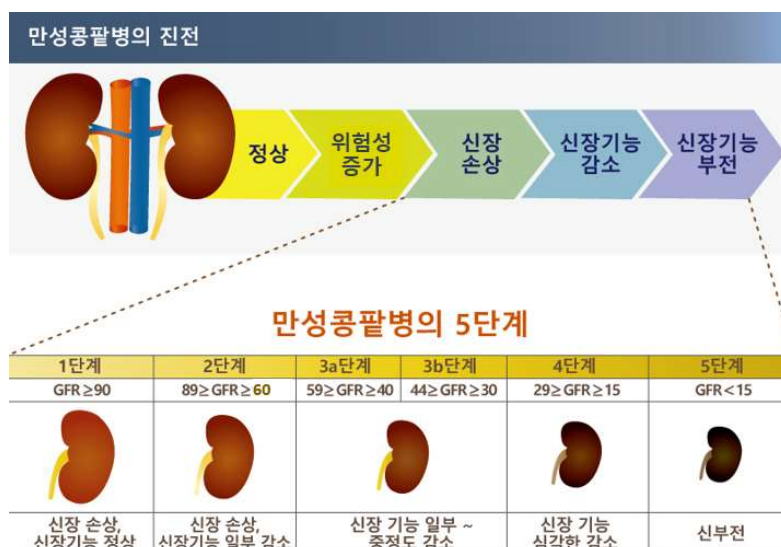


그림 10. 만성 콩팥병의 단계

[출처: CDC, www.cdc.gov/kidneydisease/prevention-risk.html, 2022]

[만성 콩팥병 1기]: 콩팥 기능 수치가 정상 혹은 증가되어 있는 경우로서 콩팥 기능 즉 사구체 여과율은 정상이지만 콩팥병의 초기 증거가 발견된 경우가 이에 속한다. 예를 들면 콩팥 기능 지표인 크레아티닌은 정상이지만 소변검사 결과 혈뇨나 단백뇨 같은 이상소견이 나오는 현상이 3개월 이상 지속되거나 초음파검사에서 양쪽 콩팥 크기가 작아져 있는 경우이다.

[만성 콩팥병 2기]: 2기에서도 역시 3개월 이상의 콩팥 손상의 증거인 요 검사 이상 및 초음파상 콩팥 크기의 감소가 동반되는 경우이다.

[만성 콩팥병 3기]: 콩팥 기능이 감소하여 초기 증상들이 나오며 다른 혈액검사 이상(빈혈, 칼슘 또는 안심 수치 이상 등)이 동반된다.

[만성 콩팥병 4기]: 콩팥 기능이 더욱 감소하여 요독 증상과 합병증이 관찰되는 시기이다. 전신 쇠약감, 식욕 감소, 구토, 어지러움, 가려움 등과 같은 요독 증상이 더 심해지며 여러 기관의 합병증이 동반된다. 혈액검사 소견의 정도도 점점 나빠진다.

[만성 콩팥병 5기]: 콩팥 기능이 거의 남아 있지 않게 되어 체내 노폐물의 축적으로 인해 발생하는 요독 증상이 대부분 발생하는 시기이며, 이 시기를 말기 신부전이라고도 한다.

(2) 진료지침

임상에서 만성콩팥질환에 대한 가장 일반적인 진료가이드는 CKD-EPI(CKD Epidemiology Collaboration) 방정식을 사용하여 혈청 크레아티닌 농도에서 추정된 사구체 여과율(eGFR)과 알부민뇨를 기준으로 제시된다(그림 11). Kidney Disease Improving Global Outcome(KDIGO)에서 발표한 만성 콩팥병 가이드라인에서는 사구체 여과율과 알부민뇨를 적어도 일년에 한 번 이상 확인하여 만성 콩팥병의 진행을 확인하는 것으로 권고하고, 사구체여과율과 알부민뇨 범주에 따른 진행위험에 따라 모니터링 빈도를 제시하였다.

[만성 콩팥병 1기]: 콩팥 기능에 문제는 없지만, 소변검사 결과 혈뇨나 단백뇨 같은 이상소견이 나오는 경우는 원인을 밝히고, 예방이 필요하다.

[만성 콩팥병 2기]: 정기적인 콩팥 내과 검진과 생활 습관 개선의 노력이 있어야 반드시 병의 진행을 막거나 지연시킬 수 있다.

[만성 콩팥병 3기]: 이 시기에 말기 신부전으로 진행을 막기 위한 적절한 치료가 가장 중요하며 생활 습관 개선과 더불어 콩팥 내과 전문의에 의한 진료보다도 중요하게 된다. 이 시기에 만성 콩팥병 자체로 인해서도 고혈압이 발생하는 경우가 많으며 혈압의 적절한 조절도 매우 중요하다.

[만성 콩팥병 4기]: 콩팥 기능이 3기보다 더욱 감소하므로, 합병증의 치료 및 말기 신부전을 대비해야한다.

[만성 콩팥병 5기]: 신대체 요법인 투석 혹은 콩팥 이식이 요구되는 단계이다.

구분				알부민뇨 정도		
				A1	A2	A3
				Normal – mildly increased	Moderately increased	Severely increased
				<30 mg/g <3 mg/mmol	30-299 mg/g 3-29 mg/mmol	≥ 300mg/g ≥ 30mg/mmol
사구체여과율 정도 (ml/min/1.73 ²)	G1	Normal or high	≥90	1 if CKD	Treat 1	Refer 2
	G2	Mildly decreased	60-89	1 if CKD	Treat 1	Refer 2
	G3a	Mildly to moderately decreased	45-59	Treat 1	Treat 2	Refer 3
	G3b	Moderately to severely decreased	30-44	Treat 2	Treat 3	Refer 3
	G4	Severely decreased	15-29	Refer 3	Refer 3	Refer 4+
	G5	Kidney failure	<15	Refer 4+	Refer 4+	Refer 4+

그림 11. GFR과 알부민뇨 범주에 따른 진행위험(색으로 표현) 및 모니터링 빈도의 가이드
(1년당 측정횟수)

[출처: Vassalotti et al., Am J Med 129(2):153-162, 2016]

표 1. 만성콩팥병 단계별 임상증상과 관리

콩팥병 단계	콩팥기능	증상 및 검사 이상	치료방침
1기	90% 이상	없음, 정상 크레아티닌	원인 인자를 밝히고 예방
2기	60~89%	없음, 정상 혹은 약간 상승	적극적인 치료로 회복가능
3기	30~59%	피곤함, 식욕부진 등 증상, 크레아티닌상승, 빈혈 등 증상발현	말기 신부전으로의 진행 속도를 감소시키는 치료
4기	15~29%	3기 보다 증상이 더욱 심해짐	합병증의 치료 및 말기신부전의 준비
5기	15% 미만	불면증, 구토, 가려움증, 호흡곤란 등의 평상 시 생활을 할 수 없는 상태	신대체 요법(투석, 이식)

[출처: 분당서울대병원 신장내과, 만성콩팥병]

III 기능성 시험 방법

1. 바이오마커의 선정

가. 유형별 바이오마커

콩팥에서의 요독물질배출 기능성을 확인하기 위한 시험관시험, 동물시험 및 인체적용시험의 바이오마커는 아래의 표를 참고할 수 있다.

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

표 2. 콩팥에서의 요독물질배출 기능성 확인을 위한 바이오마커

구분	바이오마커	측정가능한 연구유형		
		<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	<i>human</i>
요독물질	혈중 크레아티닌		○	○
	β 2-microglobulin(β 2-MG)		○	○
	총 Indoxyl sulfate(IS)와 유리 IS		○	○
	총 p-cresyl sulfate(PCS)와 유리 PCS		○	○
면역지표	C 반응 단백질		○	○
	사이토카인(IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1)	○	○	○
항산화지표	활성산소종(ROS) 및 derivative reactive oxygen metabolites (dROMs)	○	○	○
	지질과산화물(MDA)		○	○
	최종당화산물 (AGEs)		○	○
	항산화 효소		○	○
기전	NF- κ B pathway	○	○	
	MARKs pathway	○	○	
	장내 균총변화*	○	○	○
임상지표	추정 사구체여과율(eGFR)			○

* 장내 균총변화는 프로바이오틱스 실험시 활용할 수 있음

나. 바이오마커 설명

(1) 요독물질

(가) 혈중 크레아티닌(serum creatinine)

크레아틴은 근육을 수축시키는 데에 필요한 에너지를 생산하는 순환의 일부분이며, 크레아티닌은 크레아틴 화합물의 분해물로부터 근육에서 생성되는 노폐물이다. 크레아틴과 크레아티닌 모두 비교적 일정한 속도로 몸에서 생산된다. 거의 모든 크레아티닌은 콩팥을 통해 배출되므로 혈액 내 농도는 콩팥 기능에 대한 좋은 지표이다. 생산되는 양은 근육 양에 따라 달라지기 때문에 여성과 어린이보다 남성에서 조금 더 높다. 혈중 정상범위는 0.7~1.4 mg/100 mL 정도이며, 혈액 내 크레아티닌의 증가는 콩팥 내 혈관 손상, 콩팥의 세균 감염, 세뇨관 손상, 콩팥 결석, 요관 폐색, 콩팥으로의 혈류 감소, 전립선 질환 등을 의미한다.

(나) β 2-microglobulin(β 2-MG)

β 2-MG은 혈액 투과 장치인 사구체를 통과하여 체내에 필요한 수분, 단백질, 비타민, 무기질 등을 흡수하는 신세뇨관에서 재흡수된다. 정상적으로 β 2-MG은 소변에 매우 소량 존재하지만 신세뇨관이 손상되거나 질환이 있는 경우에는 재흡수가 감소하여 소변 내 농도가 증가한다.

(다) 총 Indoxyl sulfate와 유리 Indoxyl sulfate(IS)

요독물질 중 하나인 IS는 트립토판의 장내 미생물 대사 산물이다. 알부민에 대한 높은 친화력으로 단백질에 결합되어 있으며 혈청 내 결합분율은 85~97% 정도이다. 자유 형태의 IS는 관상 동맥 재협착의 독립적인 예측 인자로 보고된다.

(라) 총 p-cresyl sulfate과 유리 p-cresyl sulfate(PCS)

요독물질 중 하나인 PCS는 티로신(또는 페닐알라닌)의 장내 미생물 대사 산물이다. 알부민에 대한 친화력이 높으며, 혈청 내 결합 분율은 85~97% 범위에 있다. 자유 형태의 PCS 농도는 CKD 및 혈액 투석 환자의 혈관 석회화, 동맥경화 및 사망 위험과 관련이 있는 것으로 보고된다.

(2) 면역지표

(가) C반응 단백질(C-Reactive Protein, CRP)

CRP는 체내 급성 염증이나 조직 손상이 일어났을 때, 간에서 생성되어 혈액 속에 증가하는 급성 반응물질이다. CRP 수치는 통증이나 발열 등 다른 감염 증상보다 먼저 상승할 수 있어 염증 질환을 확인하는 데 유용하게 사용되는 지표이다. 건강한 사람의 혈액에서는 1 mg/L 미만의 낮은 농도로 유지되지만, IL-6, TNF- α , IL-1 β 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.

(나) Cytokine: IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1

사이토카인은 세포 사이의 신호전달을 매개하는 단백질로서, 인터루킨(interleukin, IL), 인터페론(interferon, IFN), 종양괴사인자(tumor necrosis factors, TNF), chemokine 등이 있다. 사이토카인은 활성화된 대식세포나 림프구에 의해 생성되어 분비된다. 특히 IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1(monocyte chemoattractant protein-1)는 전염증성 사이토카인이며, 과도한 반응시 질병의 이환율 및 사망률을 증가시키게 된다.

(3) 항산화지표

(가) 활성산소종(Reactive oxygen species, ROS) 및 derivative reactive oxygen metabolites(dROMs)

ROS는 산소 원자를 포함한, 화학적으로 반응성 있는 분자이다. 생물체 내에서 생성되는 산소의 화합물로 생체 조직을 공격하고 세포를 손상시키는 산화력이 강한 산소이다. 정상적인 세포 내 활성작용과정에서 생성되며 세포분화, 유전자의 발현, 사이토카인에 대한 반응 정도를 포함한 다양한 생물학적 과정에 연관되어 있다. ROS의 항상성을 유지하는 것은 세포 성장과 생존에 매우 중요하다. 산화스트레스는 ROS의 생성과 이를 제거하는 항산화 반응 간의 불균형으로 인해 세포 내의 ROS가 증가하여 세포내 구성성분인 핵산 및 DNA, 단백질, 지질 등을 산화시켜 염증을 유발하고 세포사를 발생시킨다. 이는 노화나 고혈압, 동맥질환 등의 질환을 유도하는 주요 원인으로 알려져 있다. 신장에서 ROS는 arachidonate metabolism과 prostanoid 생성을 증가시켜 세포 손상을 유도한다. dROM의 경우, 최근에 밝혀진 활성산소종의 대사체 바이오마커로서 만성콩팥병 진단에서 주요하게 확인되는 바이오마커이다.

(나) 지질과산화물 (Malondialdehyde, MDA)

Peroxynitrite(ONOO-)는 활성질소종(reactive nitrogen species, RNS)종 하나이며, 염증, 감염 등과 같이 특정한 상태에서 대량 생성되어 강한 조직 파괴력을 나타내며, 활성산소종인 $\cdot\text{O}_2^-$ (superoxide anion radical) 보다 독성이 더 강한 것으로 알려져 있다. 세포 내 지질, 단백질, DNA의 산화 및 니트로화 과정을 통해 세포질 효소 활성의 저해를 일으켜 세포사를 야기한다. 지질과산화물(MDA)은 peroxynitrite(ONOO-) 형성의 최종 산물이며, 세포 중 다가불포화지방산의 과산화로 인해 발생하는 물질이다. 과산화물질은 산화스트레스를 지속적으로 유도하며, T세포와 B세포를 자극하여 과도한 염증반응을 야기한다.

(다) 최종당화산물(Advanced glycosylation end products, AGEs)

포도당은 혈중 혹은 혈관벽의 단백질과 반응하여 초기에는 가역적 당화산물(Schiff base)을 생성한다. 아마도리 산물을 중간 대사물로 하며, 최종 당화산물(AGEs)이 생성된다. 최종당화산물은 노화에 따라 지속적으로 혈관벽에 축적되고, 죽상동맥경화를 촉진시키게 된다. 특히 당뇨병으로 인한 콩팥질환의 발병에 주요한 원인물질로 보고되고 있다. 최종당화산물은 세포에 존재하는 수용체인 RAGE(AGEs 수용체)와 결합하여 활성산소종의 생성 및 염증성 사이토카인의 생성과 같이 세포의 손상을 줄 수 있는 물질의 생성을 촉진한다.

(라) 항산화 효소

체내에는 지속적으로 발생하는 활성산소를 제거하거나 손상된 세포를 치유할 수 있는 항산화 체계가 있다. 항산화 효소계로 SOD, Catalase, glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase(GST) 등이 있다. SOD는 $[\text{2O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2]$ 의 반응을 촉매하며, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 와 H_2O_2 를 제거하는 것은 체내 활성산소종의 생성을 줄이는데 필수적이다. SOD는 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 기의 $\text{HO}^\cdot$ 로의 환원을 촉매함으로써 산화 반응을 조절한다. 항산화 물질인 glutathione은 환원형 glutathione (GSH)과 산화형 glutathione(GSSG)으로 존재하는데, 체내 환원형 glutathione 수준이 높을 때 항산화 작용이 원활히 수행될 수 있다. GR은 산화형 glutathione을 환원형 glutathione으로 변환시키는 반응을 촉매함으로써 glutathione의 항산화 작용을 간접적으로 돕는다.

(4) 기전 지표

(가) NF- κ B pathway

NF- κ B는 세포질에서 I κ B와 결합되어 불활성화 상태로 있다가 자극에 의해 I κ B가 인산화되어 분해되면 NF- κ B는 핵내로 들어가 다양한 사이토카인의 합성을 촉진한다. p50과 p65는 NF- κ B 전사인자의 핵심 단백질이다. p65는 세포질내에서 인산화되고 핵내로 유입되어 p50과 dimer를 형성할 수 있으며, dimer의 경우 MCP-1의 유전자 발현을 증진시키고, 이는 대식세포 활성을 더욱 촉진시켜, 과도한 염증반응을 야기하게 된다.

(나) MAPKs pathway(p38s, JNKs)

MAPK signaling pathway는 세포 외부로 부터 오는 자극을 받아 세포내로 신호전달하여 세포 반응을 일으키는 과정이다. 자극이라 하면 성장인자나 분열촉진 인자일수도 있고 세포에 위해한 자극일 수도 있다. MAPK는 자극이 있기 전까지 inactive 상태로 세포질에 존재한다. MAPKs pathway는 ① Extracellular signal-regulated kinases (ERKs) ② c-Jun N-terminal kinases(JNKs) ③ p38 mitogen-activated protein kinases (p38s)로 구분된다. ERKs는 대개 성장 인자와 mitogens에 의해 인산화되고, JNKs와 p38s는 세포스트레스나 염증성 사이토카인에서 활성화된다. 따라서 JNKs와 p38s 신호전달경로는 염증반응의 주요 신호전달경로로 사용할 수 있다.

(다) 장내균총변화

장내 서식하는 세균의 수와 종류를 측정함으로써 요독물질 생성을 저해하는 장내 환경의 적합성을 판단하는 데 이용된다. 장내 균총은 장내균에서 유래한 IS와 PCS와 같은 요독 물질(uremic toxin) 생성을 촉진하는 Enterobacteriaceae 등은 증가해 있고, 단쇄지방산을 생성하는 Prevotellaceae, Bifidobacteriaceae, Lactobacillaceae와 같은 당화성세균(saccharolytic bacteria)은 감소해 있는 불균형 상태인 것으로 알려져 있다.

(5) 임상 지표

(가) 추정 사구체여과율(estimated Glomerular Filtration Rate, eGFR)

콩팥 내의 미세 필터인 사구체는 노폐물을 제거하고 몸 안의 주요 성분들이 소실되는 것을 방지한다. 사구체여과율은 사구체에 의해 분당 걸러지는 혈액의 양을 말하며, 콩팥 기능을 반영한다. 체액이 여과되는 속도를 사구체여과율(eGFR)이라고 하며, 사구체여과율을 계산할 때는 혈중 시스타틴 C와 크레아티닌의 농도로 간접적으로 계산한다. 기존에 많이 사용하고 있는 크레아티닌은 일정 수준으로 나타나기는 하지만, 체중, 식이, 연령, 성별 등에 의해 영향을 받는다. 콩팥 기능의 표지자인 시스타틴C(Cys-C)는 시스테인 단백질분해효소 억제제로서 연령, 성별, 비만도, 혈당 변화 등 다양한 조건이나 급성 염증반응에서도 일정하게 생성되는 물질이다. 크레아틴보다 정밀도가 높기는 하지만, 측정 방법이 상대적으로 까다롭고 검사 비용이 높다는 단점이 있다. 사구체여과율의 감소는 콩팥 내 사구체의 기능 저하로, 콩팥 기능이 감소했음을 의미한다. 추정 사구체여과율(estimated Glomerular Filtration Rate, eGFR)의 감소는 기저값으로부터 25% 이상 감소하면 GFR 범주가 악화되는 것으로 정의하고, 1년에 $5\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ 이상의 지속적인 감소가 있다면 급속히 진행하는 것으로 간주한다.

2. 주요 바이오마커의 측정 방법

가. 요독물질

(1) 혈중 크레아티닌(serum creatinine)

크레아티닌 농도는 혈액을 수집하고, 반자동분석기를 사용한다. 간단하게는 100 μ L creatinine standard(1 mg/100 mL)를 1000 μ L monoreagent buffer : NaOH 313 mmol/L, picric acid 8.73 mmol/L와 혼합하고 25℃에서 5분간 인큐베이션한 후 35℃도 흡광도를 분석한다.

(2) β 2-microglobulin(β 2-MG)

β 2-MG은 24시간 요 β 2-MG은 소변을 채취하여 측정 시까지 -20℃에 보관하는 것이 좋다. 또한 β 2-MG는 소변 중 pH가 산성이면 쉽게 분해되므로 이것을 방지하기 위하여 요중 pH가 6-8이 되도록 1.0 M NaOH를 첨가하여 중화시킨다. β 2-MG의 측정은 상용화된 kit(Coat-A-Count β -2 Microglobulin IRMA kit)를 사용하여 방사면역측정법으로 측정할 수 있다.

(3) 총 Indoxyl sulfate와 유리 Indoxyl sulfate(IS)

총 IS분석을 위해서 혈청 샘플을 이용하며, ultra-performance liquid chromatography (UPLC)-MS/MS system을 이용하여 분석한다. 표준물질로 0.2 mg/L의 3-Indoxyl sulfate-d4 potassium salt(IS-d4)를 사용한다. 샘플을 30초 동안 혼합한 후 13,400×g에서 15분 동안 원심분리한다. 상층액을 물로 10배 희석한 후 각 상층액 5 mL를 UPLC-MS/MS 시스템에 주입한다. 유리 IS 정량을 위해서 100mL의 혈청을 3000MWCO 필터를 사용하여 37℃에서 10,621×g에서 30분 동안 원심분리한 후 총 IS 분석을 위해 준비된 샘플과 동일한 방식으로 50 mL 분취액의 여액을 전처리한다. 총 IS 및 유리 IS 정량은 동일한 검량선을 사용하여 정량할 수 있다.

샘플은 30℃에서 Acquity UPLC BEHC 18 컬럼(2.1×100mm, 1.7mm 입자 크기)에 주입한다. 이동상 유속은 0.45 mL/분, 이동상은 증류수 중 0.1%(v/v) 포름산(이동상 A), 아세트오니트릴 중 0.1% 포름산(이동상 B)으로 구성한다. 선형 구배 설정은 0-1 min, 80% A; 1.0~1.7 min, 80%~20% A; 1.7~1.8 in, 20%~5% A; 1.8~3.4 min, 5% A; 3.5 min,

80% A로 설정하며, run time은 5.5분으로 진행한다. 건강인에서 총 IS 수준은 0.05~3.02 mg/L 이하이며, reference interval은 0.05~1.15 mg/L 이하이다.

(4) 총 p-cresyl sulfate과 유리 p-cresyl sulfate(PCS)

총 PCS 분석을 위해 혈청 샘플을 이용하며, Ultra-performance liquid chromatography (UPLC)-MS/MS system을 이용하여 분석한다. 내부 표준물질로 0.2 mg/L의 p-cresyl sulfate-d7(PCS-d7) 을 사용한다. 샘플을 30초 동안 혼합한 후 13,400×g에서 15분 동안 원심분리한다. 상층액을 물로 10배 희석한 후 각 상층액 5 mL를 UPLC-MS/MS 시스템에 주입한다. 유리 PCS 정량화를 위해서는 100 mL 혈청을 3000MWCO 필터를 사용하여 37℃에서 10,621×g에서 30분 동안 원심분리한 후 총 PCS 분석을 위해 준비된 샘플과 동일한 방식으로 50 mL 분취액의 여액을 전처리한다. 총 PCS 및 유리 PCS 정량은 동일한 검량선을 사용하여 정량할 수 있다. 샘플을 30℃에서 Acquity UPLC BEHC 18 컬럼 (2.1×100 mm, 1.7 mm 입자 크기)에 주입한다. 이동상 유속은 0.45 mL/분, 이동상은 증류수 중 0.1%(v/v) 포름산 (이동상 A), 아세토니트릴 중 0.1% 포름산 (이동상 B)으로 구성한다. 선형 구배 설정은 0-1 min, 80% A; 1.0~1.7 min, 80%~20% A; 1.7~1.8 min, 20%~5% A; 1.8~3.4 min, 5% A; 3.5 min, 80% A로 설정하며, run time은 5.5분으로 진행한다. 건강인에서 총 PCS 수준은 0.05~9.87 mg/L 이하이며, reference interval은 0.05~5.33 mg/L 이하이다.

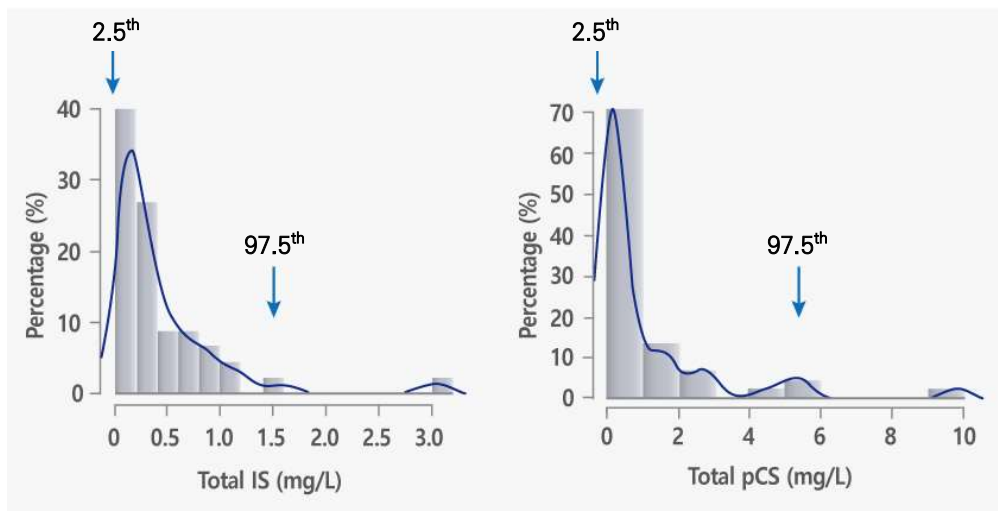


그림 12. 총 IS (왼쪽)과 총 PCS (오른쪽) 참고 농도

[출처: Lin et al., J Food Drug Anal. Apr;27(2):502-509, 2019]

나. 면역지표

(1) C 반응단백질(CRP)

CRP 값은 시험물질을 섭취시킨 인체의 혈액에서 측정할 수 있으며, turbidimetric immunoassay를 이용하여 분석할 수 있다.

(2) 사이토카인(IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1 등)

시험물질을 처리한 세포나 시험물질을 섭취시킨 실험동물의 혈액 또는 조직, 인체의 혈액에서 사이토카인의 양, 단백질 발현과 유전자 발현을 측정할 수 있다. 사이토카인의 양은 ELISA assay에 의해, 단백질 발현은 전기영동법, 유전자발현은 RT-PCR 방법으로 mRNA 발현 수준을 측정할 수 있다. 사이토카인은 상용화된 ELISA kit를 사용하여 측정할 수 있으며, 항체를 직접 well에 코팅하여 측정할 수 있다. 사이토카인의 개별 항체를 coating 용액에 희석하여 micro well에 코팅한 후 4℃에서 하룻밤 방치한다. 각 well을 washing 용액으로 세척한 후 시료를 분주한다. 실온에서 방치한 다음 washing 용액으로 세척하고, antibody Avidin-HRP conjugated를 처리한다. 실온에서 방치 및 세척 한 다음 TMB 기질을 분주하여 어두운 곳에서 방치 한 후 stop 용액을 넣고 흡광도를 측정한다.

전기영동법을 통한 단백질 발현을 측정하기 위해 시료를 균질화한 후 상층액을 얻어 단백질을 정량한다. 일정량의 단백질을 SDS-PAGE로 분리한 후, membranes에 이동시킨다. Membranes은 skim milk나 BSA로 blocking 과정을 거친 후, 개별 사이토카인 1차 항체를 첨가하여 반응시킨다. 그 후 2차 항체를 첨가하여 반응시킨 다음 ECL 용액으로 반응시켜 X-ray film에 노출시킨 다음 각각의 band를 정량화한다. RT-PCR 방법으로 mRNA 발현을 측정하기 위해 시료에 Trizol을 넣어 균질기로 분쇄하여 chloroform을 첨가한 후 혼합하여 방치 후, 원심분리한다. 원심분리 상층액을 회수하여 2-propanol을 혼합하여 방치한다. 이를 다시 원심분리한 후 80% 에탄올로 세척하여 건조시킨다. 추출한 RNA는 DEPC water에 녹여 first strand cDNA로 합성한다. 합성된 cDNA에 개별 사이토카인(IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1 등)의 primer를 반응시켜 타겟 유전자를 증폭시킨 후, 유전자 발현량을 분석한다.

다. 항산화지표

(1) ROS 및 dROMs

Dichlorofluorescein(DCF) assay 또는 electron spin resonance(ESR) spectroscopy로 측정한다. DCF assay 원리는 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DH)는 세포 내 ROS와 반응하여 형광물질(DCF)을 만들어 내는 것으로, 이 시약을 세포 속에 넣어 발생하는 형광을 측정함으로써 세포 내의 ROS 수준을 측정할 수 있다. ESR 분석기기를 이용한 spin trapping은 ROS 수준을 직접적으로 검출할 수 있는 방법이다. 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide(DMPO) 또는 1,2-dihydroxybenzene 3,5-disulfonic acid(Tiron)와 반응시켜 spin adduct를 형성한 후 ESR spectroscopy를 통해 측정할 수 있다.

(2) 지질과산화물(MDA)

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

MDA 분석을 위해 혈액 샘플은 10,000×g, 4℃, 5분 원심분리하며, 콩팥 조직은 ice-cold 100mM tris-cocodylate buffer에서 균질화 (50mg/mL 하고 10,000 g, 4℃, 5분 원심분리한다. 0.5mL normal saline + 2mL of TBA-TCA mixture와 혼합한 후 100℃에서 10분간 가열하고, 상온에서 식혀 4000 ×g, 10분간 원심분리한다. 그 후 분광광도계를 이용하여 535nm에서 검출한다.

(3) 최종당화산물(AGEs)

효소면역측정법(ELISA)에 의해 측정가능하다. 간단하게는 96 well plate에 *in vitro*에서 생성된 최종당화산물 샘플을 코팅완충액 (50 mM carbonate buffer ; pH9.6)과 1:2 비율로 섞어 최종 부피가 100 μ l가 되도록 한 후 37℃에서 2시간 방치한다. 0.05% PBS-T(PBS + 0.05% Tween 20)로 세 번 세척 후 1% casein solution으로 blocking 한다. 한 시간 방치한 후 PBS-T로 세 번 세척한다. AGEs(6D12) 또는 CML(NF-1G) antibody를 1:1000으로 희석 후 well당 100 μ l 로딩 후 상온에서 1시간 방치한다. PBS-T로 세 번 세척 후 horseradish peroxidase(HRP)-linked goatanti-mouse antibody를 1:1000으로 희석한 후 100 μ l를 로딩하여 1시간 방치한다. PBS-T로 세척 후 100 μ l의 기질 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine을 첨가한다. 5분 방치 후 반응 정지 용액 (1M H₂SO₄)을 100 μ l 첨가 후 ELISA reader로 흡광도 450 nm로 측정한다.

조직을 이용하여 AGEs를 측정할 수도 있다. 파라핀 포매조직을 5 μ m 두께로 박절하고, 자일렌과 에탄올에서 탈파라핀 시킨 후 버퍼에서 처리 및 수세하여 blocking 한 후, anti-AGEs antibody를 이용하여 overnight 반응시킨다. PBS로 3회 세척하고 HRP labeled streptavidin biotin kit를 이용해 반응시킨 후 3,3' diaminobenzidine(DAB)로 발색하여 광학현미경에서 관찰한다.

(4) 항산화효소(catalase activity, SOD 등)

Catalase 효소 활성분석을 위해서는 수집된 혈액을 원심분리하여 전처리하거나, 콩팥조직을 염산 용액에서 균질화하여, 10,000×g, 4℃, 10분간 원심분리하여 전처리한다. 큐벳에 0.5 mL의 과산화수소(H₂O₂)와 2.5 mL의 증류수를 혼합하여 분광광도계를 이용하여 분석하고, 흡광도는 240 nm에서 6회 연속 기록(30초 간격)으로 측정한다.

SOD의 경우는 혈액 샘플은 10,000×g, 4℃, 20분 원심분리하며, 콩팥 조직은 ice-cold 100mM tris-cocodylate buffer에서 균질화 (50 mg/mL) 하여 전처리한다. SOD에 의한 pyragallol auto-oxidation의 억제 비율로 추정한다. 분광광도계 큐벳에 2 mL buffer¹⁾, 2M pyragallol 100 μ l, 상층액 10 μ l 을 넣고 흡광도 420 nm에서 3분간 기록한다.

1) buffer 조성 : 50 mM tris(pH=8.2), 50 mM cocodylic acid (pH=8.2), 1 mM ethylene diamine tetra acetic acid(EDTA), 10 mM hydrochloric acid(HCl)

라. 기전 지표

(1) NF- κ B pathway

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

전기영동법을 통한 단백질 발현을 측정하기 위해 시료를 균질화한 후 상층액을 얻어 단백질을 정량한다. 일정량의 단백질을 SDS-PAGE로 분리한 후, membranes에 이동시킨다. Membranes은 skim milk나 bovine serum albumin(BSA)로 blocking 과정을 거친 후, NF- κ B 1차 항체를 첨가하여 반응시킨다. 그 후 2차 항체를 첨가하여 반응시킨 다음 enhanced chemiluminescence(ECL) 용액으로 반응시켜 X-ray film에 노출시킨 다음 각각의 band를 정량화한다. RT-PCR 방법으로 mRNA 발현을 측정하기 위해 시료에 Trizol을 넣어 균질기로 분쇄하여 클로로포름을 첨가한 후 혼합하여 방치 후, 원심분리한다. 원심분리 상층액을 회수하여 2-propanol을 혼합하여 방치한다. 이를 다시 원심분리한 후 80% 에탄올로 세척하여 건조시킨다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate(DEPC) water에 녹여 first strand cDNA로 합성한다. 합성된 cDNA에 NF- κ B 의 primer를 반응시켜 타겟 유전자를 증폭시킨 후, 유전자 발현량을 분석한다.

mRNA 수준을 콩팥조직에서 측정한다. Trizol 혹은 상용화 kit(RNA purification kit) 등을 이용해 총 RNA를 분리하고, 추출한 RNA는 DEPC water에 녹여 first strand cDNA로 합성한다. 합성된 cDNA에 각 전사인자의 primer를 반응시켜 타겟 유전자를 증폭시킨 후, 유전자 발현량을 분석한다.

(2) Mitogen activated protein kinases(MAPKs) pathway

MAPKs는 시험물질을 처리한 세포나 시험물질을 섭취시킨 실험동물의 혈액 또는 조직에서 단백질 발현과 유전자 발현을 측정할 수 있다. 단백질 발현은 전기영동법으로, 유전자 발현은 RT-PCR 방법으로 mRNA 발현 수준을 측정할 수 있다. 전기영동법을 통한 단백질 발현을 측정하기 위해 시료를 균질화한 후 상층액을 얻어 단백질을 정량한다. 일정량의 단백질을 SDS-PAGE로 분리한 후, membranes에 이동시킨다. Membranes은 skim milk나 BSA로 blocking 과정을 거친 후, MAPKs(p-p38, p38, JNK, p-JNK 등) 1차 항체를 첨가하여 반응시킨다. 그 후 2차 항체를 첨가하여 반응시킨 다음 ECL 용액으로 반응시켜 X-ray film에 노출시킨 다음 각각의 band를 정량화한다.

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

(3) 장내 균총변화

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 μ L에 접종시킨다. 미생물 희석액을 100 mm 한천 plates에 도말하고, 37°C에서 배양하여 콜로니의 수를 counting한다. 세균을 동정하기 위해 선택배지를 사용하여 특정한 미생물의 수를 검출할 수 있다.

또한, 미생물군 분류학적 구성을 분석하기 위해 분변 DNA 추출, 라이브러리 준비 및 16S 리보솜 RNA(rRNA) 유전자 시퀀싱을 진행할 수도 있다.

마. 임상 지표

(1) 추정 사구체여과율

체액이 여과되는 속도를 사구체여과율(GFR)이라고 하며, 사구체여과율을 계산할 때는 혈중 시스타틴 C와 크레아티닌의 농도로 간접적으로 계산(추정 사구체여과율, eGFR)한다. 기존에 많이 사용하고 있는 크레아티닌은 일정 수준으로 나타나기는 하지만, 체중, 식이, 연령, 성별 등에 의해 영향을 받는다. 콩팥 기능의 표지자인 시스타틴 C(Cys-C)는 시스테인 단백분해효소 억제제로서 연령, 성별, 비aks도, 혈당 변화 등 다양한 조건이나 급성 염증반응에서도 일정하게 생성되는 물질이다. 크레아틴보다 정밀도가 높기는 하지만, 측정방법이 상대적으로 까다롭고 검사비용이 높다는 단점이 있다.

3. 시험 설계 시 고려사항

가. 시험관 시험

(1) 시험계

세포실험의 경우 신장상피세포(HEK293T cell), HK-2 cell, MRK-52E cell을 사용할 수 있으며, 산화적 스트레스 상태 및 염증 촉진 반응을 유도하고, 시험물질을 이용하여 이의 개선 정도를 살펴볼 수 있다.

표 3. 세포의 특성

구분	내용
HEK293T cell	HEK293T cell는 낙태된 태아 신장세포에서 분리된 세포
HK-2 cell	성인 남성의 신장 근위세뇨관에서 분리된 세포
NRK-52E cells	설치류에서 분리된 콩팥세뇨관 상피 세포

(2) 바이오마커

시험물질의 작용 기전을 설명하기 위한 RNA, 단백질 발현도를 측정할 수 있다.

(3) 통계처리

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

나. 동물시험

(1) 실험 동물계

콩팥 질환 동물모델은 허혈 또는 당뇨병 유도 모델을 사용하거나, 카드뮴, 아데닌, pantoprazole 등으로 콩팥 질환은 유도하는 모델을 사용하고 있다.

실험적 만성신병증인 passive Heymann nephritis(PHN)에서 보체활성화는 사구체기저막과 발세포의 손상을 유발시켜 단백뇨를 일으키는 것으로 알려져 있다. Sprague-Dawley(SD) rat에 체중 100 g 당 15 mg의 pantoprazole(PAN)을 복강내 주사하면, PAN 투여후 3일째부터 단백뇨가 발생하기 시작하여 대부분 7~10일째에 최고치를 나타낸다. 생쥐(mouse)에서는 PAN을 투여해도 발세포 손상 및 단백뇨가 잘 유발되지 않기 때문에 이를 고려할 필요가 있다.

표 4. 동물모델과 유도방법 사례

유도시약	종	유도방법	장단점
Folic acid	Mouse/rat	250 mg/kg, 1 time I.P. Injection	간단
Cadmium	Mouse/rat	1.2~6 mg/kg/day oral administration 또는 injection 1주 이상 소요	유도용량은 다양하지만, 다른 기관에 독성을 나타낼 수 있음
Adenine	Mouse/rat	0.15~0.75%(w/w) 로 식이 혼합 유도 시 16주 이상 소요	시간이 걸림(16주)
Streptozotocin * DKD(diabetic kidney disease) model	Mouse/rat	60~65 mg/kg single I.P. injection (rats, 30~40 mg/kg) 5 injections(mice)	시간이 걸림, 약물 농도는 다양하게 진행할 수 있음
5/6 Nx (nephrectomy)	Mouse/rat	수술 요함	유도 시 감염이나 콩팥 출혈이 발생할 수 있음
UUO (unilateral ureteral obstruction)	Mouse/rat	7~14 days 소요	비교적 용이하고, 재현성이 높음
PAN(pantoprazole) 등	rat	3 day 소요	-

(2) 바이오마커

시험물질의 작용기전을 설명하기 위해 바이오마커의 양, 활성, 단백질 발현, mRNA 발현 등을 측정한다. 동물실험의 경우 요독물질, 면역지표, 항산화지표 등을 분석하고 시험물질의 기능성을 종합적으로 평가한다.

(3) 통계처리

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

다. 인체적용시험

(1) 시험대상

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

(가) 시험대상자(예시)

- 18세 이상 남녀
- 추정 사구체 여과율(eGFR) ≥ 60 mL/min/1.73m² (만성콩팥병 1-2단계)
- 뇨중 알부민이 30mg/g (또는 3 mg/mmol) 미만

(나) 대상자 배제기준(예시)

- 질병상태
 - 콩팥병증 수술자, 콩팥이식 수술자
 - 콩팥투석(혈액 투석, 복막 투석 포함)이 필요한 경우
 - 초음파 등 영상검사 시 양측 신장의 구조적 이상이 있는 자
 - 급성 신장 손상(급성신부전)이 확인된 자
 - 당뇨 및 고혈압 환자(약물로 조절되지 않는자)
- 약물복용
 - 12개월내 특정 질환 치료를 위한 면역조절제(또는 면역억제제) 복용자
 - 비타민K 길항제(와파린 등) 또는 기타 항혈전제 복용자
 - 시험에 영향을 미칠 수 있는 일반의약품 및 건강기능식품(크레아틴 등) 복용자
- 알레르기
 - 시험물질에 대한 알레르기/부작용이 있는 자
- 생리적 상태
 - 임신수유부
- 기타
 - 최근 3개월 내 다른 임상실험 참가자
 - 그 외 연구자에 의해 실험에 부적합하다고 판단되는 자

*** 프로바이오틱스가 시험물질인 경우는 다음의 대상자를 제외함

- 1) 항생제 복용자
- 2) 현재 또는 지난 4주 이내 프리바이오틱스 또는 프로바이오틱스 복용자
- 3) 염증성 장질환, 장암, 과거 결장직장 수술 이력자 또는 기타 심각한 장 장애)
- 4) 임신, 당뇨병, 체강 질병, HIV 질병, 악성 고혈압, 초승달 모양 사구체신염, 면역 억제제 복용자, 즉시 투석이 예상되는 사람들

(2) 시험설계

투여식품의 효과를 알아보기 위해서 위약군(placebo) 또는 대조군(control)과 투여군(test)을 함께 비교하는 것이 바람직하며, 위약군(placebo)이 있는 경우 시험자와 피험자 모두 투여하거나 투여받는 식품이 어떤 것인지 알 수 없도록 이중맹검법(double blind randomization)을 시행하도록 한다.

섭취 기간은 최소 12주 이상이 바람직하며, 3~24개월 정도의 중재 기간이 주로 연구되고 있다. 측정은 섭취 전, 섭취 후 6주, 12주에 반드시 측정한다.

(3) 바이오마커

인체적용시험에서 기능성을 확인할 수 있는 직접적인 지표로서 혈중 요독물질 등을 반드시 측정하도록 하며, 면역 및 항산화지표 등을 측정하여 종합적으로 기능성을 평가할 수 있다.

(4) 통계처리

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

1. 종속변수가 범주형일 경우

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

1.1. Chi-square test

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

1.2. McNemar's test

- 군 내의 전후 차이를 비교할 때 사용됨

2. 종속변수가 연속형이고 비교군이 2개일 경우

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

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

2.1.1. Wilcoxon's signed-ranks T-test

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

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

2.2.1. Wilcoxon's 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 배정 되므로, 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 일반적으로 활력징후, 심전도 검사, 혈액학적 검사, 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
- (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. 건강보험심사평가원,
<http://opendata.hira.or.kr/op/opc/olapMfrnIntrslInsInfo.do>
2. 분당서울대병원 신장내과, 만성콩팥병.
http://www.snuh.org/health/tv/view.do?seq_no=251
3. 이수봉. Middle molecule removal and its clinical importance. 대한신장학회지 23(2): S489-S500, 2004
4. 진호준, 김성권. 우리나라의 만성콩팥병. 대한내과학회지 76(5):511-514, 2009
5. Adesso S, Popolo A, Bianco G, Sorrentino R, Pinto A, Autore G, Marzocco S. The uremic toxin indoxyl sulphate enhances macrophage response to LPS. PLoS One 30:8(9):e76778, 2013
6. Amdur RL, Feldman HI, Gupta J, Yang W, Kanetsky P, Shlipak M, Rahman M, Lash JP, Townsend RR, Ojo A, Roy-Chaudhury A, Go AS, Joffe M, He J, Balakrishnan VS, Kimmel PL, Kusek JW, Raj DS; CRIC Study Investigators. Inflammation and progression of CKD: The CRIC study. Clin J Am Soc Nephrol 7:11(9):1546-1556, 2016
7. Annuk M, Zilmer M, Lind L, Linde T, Fellström B. Oxidative stress and endothelial function in chronic renal failure. J Am Soc Nephrol 12(12):2747-2752, 2001
8. CDC, www.cdc.gov/kidneydisease/prevention-risk.html, 2022
9. Chen A, Wei CH, Sheu LF, Ding SL, Lee WH. Induction of proteinuria by adriamycin or bovine serum albumin in the mouse. Nephron 69:293-300, 1995
10. Denic A, Glasscock RJ, Rule AD. Structural and functional changes with the aging kidney. Adv Chronic Kidney Dis 23(1):19-28, 2016

11. Dounousi E, Papavasiliou E, Makedou A, Ioannou K, Katopodis KP, Tselepis A, Siamopoulos KC, Tsakiris D. Oxidative stress is progressively enhanced with advancing stages of CKD. *Am J Kidney Dis* 48(5):752-760, 2006
12. Duranton F, Cohen G, De Smet R, Rodriguez M, Jankowski J, Vanholder R, Argiles A; European Uremic Toxin Work Group. Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol* 23(7):1258-1270, 2012
13. Falconi CA, Junho CVDC, Fogaca-Ruiz F, Vernier ICS, da Cunha RS, Stinghen AEM, Carneiro-Ramos MS. Uremic toxins: An alarming danger concerning the cardiovascular system. *Front Physiol* 14:12:686249, 2021
14. Gryp T, Vanholder R, Vaneechoutte M, Glorieux G. p-Cresyl Sulfate. *Toxins (Basel)* 29:9(2):52, 2017
15. Gupta J, Mitra N, Kanetsky PA, Devaney J, Wing MR, Reilly M, Shah VO, Balakrishnan VS, Guzman NJ, Girndt M, Periera BG, Feldman HI, Kusek JW, Joffe MM, Raj DS; CRIC Study Investigators. Association between albuminuria, kidney function, and inflammatory biomarker profile in CKD in CRIC. *Clin J Am Soc Nephrol* 7(12):1938-1946, 2012
16. Huang ST, Shu KH, Cheng CH, Wu MJ, Yu TM, Chuang YW, Chen CH. Serum total p-cresol and indoxyl sulfate correlated with stage of chronic kidney disease in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 44(3):621-624, 2012
17. Huang SY, Chen YA, Chen SA, Chen YJ, Lin YK. Uremic Toxins - novel arrhythmogenic factor in chronic kidney disease - related atrial fibrillation. *Acta Cardiol Sin* 32(3):259-264, 2016
18. Leong SC, Sirich TL. Indoxyl sulfate-review of toxicity and therapeutic strategies. *Toxins (Basel)* 30:8(12):358, 2016
19. Lin CJ, Wu V, Wu PC, Wu CJ. Meta-analysis of the associations of p-Cresyl Sulfate (PCS) and Indoxyl Sulfate (IS) with cardiovascular events and all-cause mortality in patients with chronic renal failure. *PLoS One* 14:10(7):e0132589, 2015

20. Lin YC, Lin YC, Hsu CY, Kao CC, Chang FC, Chen TW, Chen HH, Hsu CC, Wu MS; Taiwan Society of Nephrology. Effect modifying role of serum calcium on mortality-predictability of PTH and alkaline phosphatase in hemodialysis patients: An investigation using data from the Taiwan Renal Registry Data System from 2005 to 2012. *PLoS One* 24;10(6):e0129737, 2015
21. Lin CN, Wu IW, Huang YF, Peng SY, Huang YC, Ning HC. Measuring serum total and free indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate in chronic kidney disease using UPLC-MS/MS. *J Food Drug Anal* 27(2):502-509, 2019
22. Lu CL, Zheng CM, Lu KC, Liao MT, Wu KL, Ma MC. Indoxyl-Sulfate-Induced Redox Imbalance in Chronic Kidney Disease. *Antioxidants (Basel)* 10(6):936, 2021
23. Luimula P, Sandstrom N, Novikov D, Holthofer H. Podocyte-associated molecules in puromycin aminonucleoside nephrosis of the rat. *Lab Invest* 82:713-718, 2002
24. Mihai S, Codrici E, Popescu ID, Enciu AM, Albulescu L, Necula LG, Mambet C, Anton G, Tanase C. Inflammation-related mechanisms in chronic kidney disease prediction, progression, and outcome. *J Immunol Res* 6;2018:2180373, 2018
25. Poesen R, Evenepoel P, de Loor H, Kuypers D, Augustijns P, Meijers B. Metabolism, protein binding, and renal clearance of microbiota-derived p-Cresol in Patients with CKD. *Clin J Am Soc Nephrol* 7;11(7):1136-1144, 2016
26. Qi W, Niu J, Qin Q, Qiao Z, Gu Y. Astragaloside IV attenuates glycated albumin-induced epithelial-to-mesenchymal transition by inhibiting oxidative stress in renal proximal tubular cells. *Cell Stress Chaperones* 19(1):105-014, 2014
27. Qian Q. Inflammation: a key contributor to the genesis and progression of chronic kidney disease. *Contrib Nephrol* 191:72-83, 2017

28. Qiu Y, Qiu Y, Yao GM, Luo C, Zhang C. Natural product therapies in chronic kidney diseases: An update. *Nephrol Ther* 18(2):75-79, 2022
29. Rapa SF, Di Iorio BR, Campiglia P, Heidland A, Marzocco S. Inflammation and oxidative stress in chronic kidney disease-potential therapeutic role of minerals, vitamins and plant-derived metabolites. *Int J Mol Sci* 30:21(1):263, 2019
30. Rossi M, Campbell KL, Johnson DW, Stanton T, Vesey DA, Coombes JS, Weston KS, Hawley CM, McWhinney BC, Ungerer JP, Isbel N. Protein-bound uremic toxins, inflammation and oxidative stress: a cross-sectional study in stage 3-4 chronic kidney disease. *Arch Med Res* 45(4):309-317, 2014
31. Schaeffner ES, Ebert N, Delanaye P, et al. Two novel equations to estimate kidney function in persons aged 70 years or older. *Ann Intern Med* 157(7):471-481, 2012
32. Shlipak MG, Tummalaipalli SL, Boulware LE, Grams ME, Ix JH, Jha V, Kengne AP, Madero M, Mihaylova B, Tangri N, Cheung M, Jadoul M, Winkelmayer WC, Zoungas S; Conference Participants. The case for early identification and intervention of chronic kidney disease: conclusions from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney Int* 99(1):34-47, 2021
33. Snelson M, Biruete A, McFarlane C, Campbell K. A renal clinician's guide to the gut microbiota. *J Ren Nutr* 30(5):384-395, 2020
34. Stockler-Pinto MB, Saldanha JF, Yi D, Mafra D, Fouque D, Soulage CO. The uremic toxin indoxyl sulfate exacerbates reactive oxygen species production and inflammation in 3T3-L1 adipose cells. *Free Radic Res* 50(3):337-344, 2016
35. Stockler-Pinto MB, Soulage CO, Borges NA, Cardozo LFME, Dolenga CJ, Nakao LS, Pecoits-Filho R, Fouque D, Mafra D. From bench to the hemodialysis clinic: protein-bound uremic toxins modulate NF- κ B/Nrf2 expression. *Int Urol Nephrol* 50(2):347-354, 2018

36. Vanholder R, Schepers E, Pletinck A, Nagler EV, Glorieux G. The uremic toxicity of indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate: a systematic review. *J Am Soc Nephrol* 25(9):1897-1907, 2014
37. Wang YN, Ma SX, Chen YY, Chen L, Liu BL, Liu QQ, Zhao YY. Chronic kidney disease: Biomarker diagnosis to therapeutic targets. *Clin Chim Acta* 499:54-63, 2019
38. Watanabe H, Miyamoto Y, Honda D, Tanaka H, Wu Q, Endo M, Noguchi T, Kadowaki D, Ishima Y, Kotani S, Nakajima M, Kataoka K, Kim-Mitsuyama S, Tanaka M, Fukagawa M, Otagiri M, Maruyama T. p-Cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress by activation of NADPH oxidase. *Kidney Int* 83(4):582-592, 2013
39. Yang CY, Tarng DC. Diet, gut microbiome and indoxyl sulphate in chronic kidney disease patients. *Nephrology (Carlton)* 23 Suppl 4:16-20m 2018
40. Yoshikawa D, Ishii H, Suzuki S, Takeshita K, Kumagai S, Hayashi M, Niwa T, Izawa H, Murohara T. Plasma indoxyl sulfate and estimated glomerular filtration rate. *Circ J* 78(10):2477-82, 2014
41. Zhao M, Yu Y, Wang R, Chang M, Ma S, Qu H, Zhang Y. Mechanisms and efficacy of chinese herbal medicines in chronic kidney disease. *Front Pharmacol* 29:11:619201, 2021

건강기능식품 기능성 평가 가이드(민원인 안내서)

- 요독물질 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, 4409, 4417, 4419, 4422, 4428, 4431)
