

산 · 학 · 연 논문

건강기능식품의 면역기능 평가

김지연[†] · 이연경 · 강윤정 · 이경진 · 서일원 · 박경식 · 장귀현 · 김성주
유지현 · 유순영 · 이해영 · 홍진환 · 김명철

식품의약품안전청 영양기능식품국

Biomarkers and Study Design to Measure Immunomodulation in Health/Functional Food

Ji Yeon Kim[†], Yeon Kyung Lee, Yoon Jung Kang, Kyung Jin Lee, Il Won Seo, Kyoung Sik Park, Gui Hyun Jang, Seong Ju Kim, Ji Hyun Yoo, Soon-Young Yoo, Hye Young Lee, Jin Hwan Hong, and Myong Cheol Kim

Nutrition and Functional Food Bureau, Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea

목 적

면역 관련 기능은 건강기능식품을 개발하는 많은 연구자들이 관심을 가지고 있고 또 그 연구도 매우 활발한 분야이나, 대상자의 선정, 적합한 바이오마커 선택 등이 어려운 실정이다.

이에 식약청에서는 유럽, 일본의 과학자 모임에서 발간한 면역 관련 기능성 평가 가이드라인을 기초로, '04년도에 우리청에서 발간한 “건강기능식품의 기능성 시험 가이드”를 참고하여 환자가 아닌 사람들을 대상으로 면역기능을 확인하는 인체적용연구(특히 무작위배정 인체적용시험)에서 사용하는 대상자의 특성, 널리 사용하는 바이오마커를 정리하였다. 본 가이드라인을 개발하기 위해서 우리청에서는 국내 면역 관련 전문가들을 모시고 「건강기능식품 면역기능평가 자문위원회」를 구성하였다. 자문위원회에서는 면역 기능을 구분하고, 대상자별 특성, 바이오마커의 종류를 모두 검토하였으며, 외국의 자료를 바탕으로 작성된 내용을 검토하여 우리나라 건강기능식품 개발 연구에 적합한 가이드라인으로 개발하였다. 면역은 저하와 증강이 잘 조화를 이루어야 하는 기능이므로, 면역 증강을 목적으로 하는 기능성과 민감해진 면역 기능(알레르기)을 조절해주는 기능성의 2가지로 구분하여 정리하였다.

면역기능에 영향을 미치는 요인

유전적 요인 및 환경적 요인

환경적 요인으로는 여러 환경 요인에 대한 사전 노출

경험 등을 들 수 있으며, 대표적인 것으로는 예방 접종이 있다.

나이

나이는 감염에 대한 저항을 결정하는 중요한 요인이다. 성인에서는 항원에 특이적인 세포성·체액성 면역반응이 주요한 면역기능이나 어린아이는 주로 자연면역기능(innate immunity)에 의지한다. 많은 문헌에서 노인들의 면역기능이 저하되어있다고 보고하고 있으나, 실제로는 일부 면역반응의 경우는 노인이라 하더라도 감소하지 않고 오히려 증가한다는 보고도 있다. 따라서 최근에는 나이가 들수록 면역반응은 감소하는 것이 아니라 면역기능 조절에 장애가 나타난다고 인식되고 있다.

성별

성별 또한 면역반응에 영향을 미치는 주요한 요인이다. 감염, 외상, 패혈증 등에 대한 반응은 성별에 따라 매우 차이가 있는데, 이는 oestrogen(estrogen), progesterone 등의 성호르몬이 면역계에 영향을 미치며, 특히 여성의 경우 생리와 임신에 의한 영향이 크기 때문이다. 따라서 면역기능을 확인하는 연구에서는 성별의 차이뿐만 아니라 여성의 생리주기, 호르몬 치료 여부에 관한 사항도 함께 고려하여야 한다. Oestrogens는 일반적으로 면역 기능을 증진시키고 testosterone과 같은 androgens는 체액성·세포성 면역을 억제하여, 여성들이 일반적으로 남성에게 비해 바이러스 감염에 저항이 더 강하다고 보고되고 있으나, 반대로 여성들은 자가면역질환에 걸릴 위험이 높다고 한다.

[†]Corresponding author. E-mail: jiyun_kim@kfdsa.go.kr
Phone: 02-380-1317, Fax: 02-359-0025

심리적 스트레스

임파조직의 신경을 발달시키는 자율신경계와 스트레스 호르몬 또한 면역기능에 영향을 미친다. Catecholamine과 glucocorticoids 등과 같은 스트레스 호르몬은 면역 기능의 잠재적 조절인자이며, 만성적 정신적 스트레스는 타액의 IgA 수치를 떨어뜨리는 것으로 알려져 있다. 강도 높은 운동을 하는 동안 스트레스 호르몬은 올라가며, 급격하게 운동 강도를 올리는 것이 일시적으로 면역기능을 떨어뜨리는 원인이 된다는 것 또한 잘 알려져 있는 사실이다.

영양상태

일반적인 영양상태 또한 면역기능과 관련이 높다. 비만을 유발하는 과 영양상태는 염증과 관련이 있으며, 영양결핍상태는 자연면역(innate immunity)과 획득면역(adaptive immunity) 기능에 관여한다.

식이습관

지방이나 단백질의 섭취, 비타민/무기질 보충제의 섭취, 음주는 면역기능에 영향을 미치며, 특정 영양성분의 결핍 또한 면역기능에 큰 영향을 줄 수 있다.

저 영양상태는 개발도상국의 문제만이 아니다. 전체 국민의 영양상태가 좋은 선진국이라 하더라도 노인, 신생아, 식습관 장애자, 습관성 음주자 등은 저 영양상태를 보일 수 있다.

비타민이나 무기질 등의 미량 영양소의 섭취가 부족하여 결핍증을 가지고 있는 성인에게 영양보충제를 섭취하게 하면 면역기능이 좋아질 수 있으나, 과도한 영양보충제의 섭취는 오히려 해로울 수 있다.

질병

영양상태가 좋은 사람들에게서 질병은 면역에 영향을 주는 중요한 인자이다. 일반적인 상황에서 사람의 면역체계는 침입한 병원체를 공격하도록 조절되나, 이러한 면역체계가 손상이 되면 자기 자신의 조직까지도 파괴할 수 있다. 이는 만성적인 염증이나 자가면역질환으로 발전하게 되는데, 류마티스성 관절염이 그 대표적인 예이다. 이러한 상태의 사람들에게는 식이 등으로 면역기능을 자극하는 방법은 적합하지 않으며, 비정상적으로 올라간 면역체계를 낮추어주는 것이 바람직할 수 있다.

면역증강 관련 기능에 사용되는 바이오마커

시험 대상자

건강한 성인 : TH1은 세포 내에 존재하는 병원체에 대항하여 싸울 수 있는 세포성 면역 반응의 주요한 촉진

인자이며, TH2는 세포 밖에 있는 병원체에 대항하는 항체를 생성하는 체액성 면역 반응의 주요 촉진 인자이라 할 수 있다.

항원제시세포는 미성숙 T 세포가 TH1과 TH2로 분화하는데 중요한 역할을 한다. 몇몇 사이토카인은 TH1과 TH2의 신호전달에 관여하기도 하는데, IFN- γ 는 TH1의 증식을 촉진하지만 TH2의 성장은 방해하며, IL-4는 TH2의 세포 증식을 유도하는 반면 TH1의 세포증식은 방해한다. TH1 계열의 사이토카인은 세포성-매개(cell-mediated) 면역반응과 관련이 있는데, 특히 IFN- γ , IL-2 등은 탐식세포를 활성화시키고 세포독성 T 세포에 관여하는 살해성 작용에 관련한다. 반면 IL-4, IL-5, IL-8, IL-13 등의 TH2 계열의 사이토카인은 체액성 면역과 관련이 있으며, IgE 관련 알레르기 반응이나 조직을 손상시킬 수 있는 호산구(eosinophils)를 활성화 시킨다. IL-4와 IL-13은 B 세포의 분화를 유도하여 항체를 생산하고, IL-5는 호산구를 자극한다. 이러한 사이토카인의 환경이 TH1/TH2의 비율을 결정하게 되는데, 항원제시세포가 활성화되며 분비되는 IL-12와 자연살 세포(Natural Killer cell, NK cell), 비만세포, 호염기구에서 분비되는 IL-4는 각각 TH1과 TH2의 활성화를 촉진하는 중요한 사이토카인이다.

건강한 성인에서 특정 면역지표 중 하나가 약간의 변동이 있다 하더라도 임상적으로는 의미가 없을 수 있다. 여기에는 두 가지 이유가 있다. 첫째로 사람의 면역체계는 이런 변동에 대해 다른 보완체계에 의해 정상으로 회복할 수 있는 능력을 가지고 있기 때문이고, 두 번째로는, 섭취 후 면역세포를 분리하여 *in vitro* 상에서 높은 농도의 자극 물질을 투여해서 관찰되는 면역지표의 변화량이 어느 수준이 되어야 사람의 면역체계에 영향을 미칠 수 있는지에 대해 알 수 없기 때문이다. 건강한 사람의 정상적인 범위 내 변화가 면역기능에 실제로 영향을 미칠 수 있는지조차 아직까지 명확하게 알려져 있지 않다. 물론 자연살세포 활성 증가는 면역 증강과 관련성이 높다고 알려져 있기는 하나, 식품 또는 식품 성분과 면역기능과의 관련성을 보기 위해서는 여러 가지 지표를 동시에 검토하여야 하는 것이다.

궁극적으로 식품 또는 식품성분이 면역기능에 영향을 미치는지 보기 위해서는 임상적으로 의미가 있는 감염 사례, 감염 증상 등에 관한 관찰이 있어야 할 것이다. 감염 증상 등과 같은 지표가 측정되었다면, 면역기능을 확인하는 지표의 변화는 그 식품의 작용기전을 예측할 수 있도록 할 것이다.

노인 : 노화는 면역반응에 있어 아주 중요하고 다양한 변화를 가져온다. TH1 세포, IgG, IgA 등은 나이가 들어감에 따라 감소하고 prostaglandin(PG) E₂, TH2 계열은 증가한다. 이러한 변화의 원인은 호르몬의 변화, 항원 노출

의 축적 등으로 추정되며, 이는 세포성 면역의 감소로 이어지게 된다. 반면 비특이성 면역은 노화 과정에 덜 영향을 받게 되고, 염증반응은 증가하게 된다. 노화에 따른 T 세포 기능의 변화는 림프구의 감소와 IL-2 합성의 감소로 연결된다. 하지만 이러한 변화는 아주 건강한 노인에게는 의미가 없다.

일반적으로, 노화가 진행됨에 따라 세포독성 T세포는 감소하나 CD4+ 세포는 영양상태가 정상이라면 그대로 유지된다. 사이토카인의 생산뿐 아니라 단핵구의 기능도 큰 변화를 겪지 않으며, 일부에서는 오히려 증가하기도 한다. 단핵구의 지속적 활성화는 PGE₂와 과산화물 생성을 증가시켜 세포성 면역이 저해되는 결과를 초래한다.

염증 반응은 노화와 관련한 면역 반응 중 매우 중요한 것이다. 염증과정은 노인기에 오랫동안 진행되는데, 이 과정이 오랫동안 진행되면 영양상태가 고갈되게 되며 더 이상 사용할 영양분이 없어지면 노인의 건강에 치명적인 위협을 주게 된다. 저 영양상태는 노인의 면역체계에 많은 영향을 준다. 특히 에너지가 낮은 단백질의 섭취는 면역을 저하시키고, 이는 모든 종류의 면역체계에 영향을 미치게 된다. 따라서 저 영양상태의 노인은 감염의 위험에 많이 노출되어 있다고 할 수 있다.

영유아 : 갓 태어난 신생아는 면역학적으로 완벽하다. 신생아의 면역체계는 감염을 조절할 수 있으며 적절한 예방접종에 반응할 수 있다.

어른과 영유아의 면역체계는 아주 다르다. 이 차이는 다음의 2가지 요인에서 기인하는데, 하나는 면역체계의 미성숙이고 다른 하나는 외부 항원에 대한 적은 노출경험이다. 외부 항원에 대한 노출 경험이 적으므로 후천적 면역반응(acquired immune system)은 출생 시에는 불완전하다.

운동선수 : 심한 운동을 하는 운동선수들, 특히 강한 지구력을 필요로 하는 운동선수들은 일반인들보다 감염에 더 민감하다. 몇몇 연구결과에 따르면 일반인들에 비해 운동선수들은 목의 통증, 독감과 같은 증상을 더 많이 호소하고 있는데, 이는 과격한 운동으로 발생하는 스트레스로 인해 면역 세포들의 수와 능력이 저하되기 때문으로 추정된다.

운동하는 동안에는 호흡 횟수와 깊이가 증가하므로 공기 중 병원균에의 노출이 증가하게 된다. 또한 장 투과성이 높아짐에 따라 장내 미생물의 내독소가 순환계로 들어오게 된다. 일반인들의 경우 적당한 운동이 면역력을 높여주지만, 고강도의 운동을 장기간 지속하는 경우에는 면역기능이 건강에 좋지 않은 방향으로 진행하게 된다. 순간적인 운동량의 증가와 감염의 진행은 그 추이가 매우 유사하다.

극심한 운동을 하게 되면, 운동 바로 직후에는 백혈구,

TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, 대식세포의 염증 단백질-1과 IL-1 수용체 길항제, C-Reactive Protein(CRP) 등과 같은 염증성 사이토카인이 증가한다. 특히 운동 중 활성화된 근육섬유에서의 IL-6 분비량이 크게 증가됨을 관찰할 수 있는데, 이대로 IL-6의 증가가 지속되는 경우 T 세포에 의하여 분비되는 IL-2와 IFN- γ 는 결과적으로 감소하게 된다. 이러한 사이토카인의 변화는 TH1/TH2의 균형을 깨뜨려 면역 체계를 TH2 방향으로 전환시키고, 그 결과 세포 내의 병원균에 대한 신체 방어 기능이 감소하게 되는 것이다. 또한 운동 중에는 면역기능에 영향을 미친다고 알려진 호르몬의 변화도 일어나며, 탐식성 중성구와 자연 살 세포의 수 및 활성은 급격한 운동 후 빠르게 증가하다가 지속적인 고강도 운동 후에는 감소한다. 항원제시세포의 기능도 운동에 의하여 영향을 받는데, 탐식세포의 주조직 적합성 복합체(macrophage MHC) 중 class II의 발현, 항원제시기능도 감소한다고 보고되고 있다.

운동을 중단한 운동선수들의 백혈구의 숫자는 일반인들보다 낮은 경향이 있다. 혈중 백혈구 수가 감소하는 것은 haemodilution 때문으로 추정되는데, 이는 운동 중 골수로부터의 백혈구 분비 감소, 백혈구의 세포고사, kinetic의 변화에서 기인한다.

하지만 젊은 운동선수들을 대상으로 수행한 몇몇 시험에서는 면역기능의 저하가 발견되지 않았다. 따라서 이러한 운동으로 인한 영향은 장기간 운동에 의한 효과이며, 오랜 기간 고강도의 운동을 지속하게 되면 자가면역과 획득면역 모두 저하되게 되는 것으로 추정된다. 그 이유로는 고강도의 운동으로 인한 스트레스성 호르몬의 지속적인 노출, 과도한 운동의 반복으로 인한 면역기능의 회복 기회 저하, 혈중 글루타민 농도 저하, 보체 농도 저하 등을 들고 있다.

시험설계

면역체계는 다양한 요인에 의하여 영향을 받으므로, 좋은 결과를 얻기 위해서는 시험 디자인이 중요하다. 모든 요인들을 동시에 조절할 수는 없으나, 시험 결과에 영향을 크게 미치는 핵심적인 요소들은 조절되어야 한다.

연령(젊은 사람에 비하여 노인의 면역 능력이 낮으므로), 성별(생리 중인 여성, 경구 피임제 복용 여성, 호르몬 치료 중인 여성은 매개체 및 사이토카인의 분비에 영향을 받음), BMI(BMI 범위를 넓게 설정할 경우, 비만과 관련한 염증을 가진 대상자가 포함되어 있을 수 있으므로) 등은 중요한 요인이다. 식이조절 또한 매우 중요하다. 영양상태는 면역 상태를 반영하는데, 특히 미량 영양소가 결핍된 대상자가 비타민제를 복용하게 된다면 면역기능에 큰 영향을 받을 것이다. 음주와 프로바이오틱스의 섭취, 운동,

흡연 등도 면역기능에 영향을 주므로 시험기간 동안 조절되어야 한다.

대상자의 특성에 의한 혼동요인에 비해 기술적 요인은 조절이 쉽다. 시험 대상자군 선택과 대조군 설정을 적절하게 하여야 한다. 면역세포의 24시간 주기 리듬을 감안하여 혈액 채취 시간, 혈액 채취 이전의 공복 시간이 모두 동일하게 설정하여야 하는데, 일반적으로 혈액은 하룻밤의 공복기간을 거친 후 오전 7시에서 10시 사이에 채취한다. 환경적 요인을 조절하기 위하여 계절의 영향도 감안하여야 하며, Run in periods와 교차 설계에서의 wash out period도 잘 계획하여야 한다. 시험 기간 또한 결과에 영향을 미치는 중요한 요소이다. 면역반응을 위한 시험에서는 적절한 시험 기간을 정하기가 어려우나 단기간의 시험이 필요한 연구인지, 장기간의 시험이 필요한 연구인지를 잘 고려하여야 한다.

바이오마커

면역기능은 조직, 세포 등 다양한 수준에서 측정할 수 있다. 병원균의 노출과 신체 방어능 사이의 균형을 반영하는 지표는 감염으로 인한 생존율, 발병률 같은 임상적 지표이나, 병원균에 의한 자연적인 노출은 통제하기 어렵고 예측할 수 없다는 단점이 있다.

이것을 극복하기 위하여 생체 내에서 면역 반응을 일으키는 백신이나 미생물을 사용하여 통제된 시험을 수행할 수 있다. 이러한 반응은 모델 감염으로 인해 나타나는 반응을 관찰할 수 있는 주요한 정보가 된다.

그 다음으로는 전 생체 내(*ex vivo*) 시험을 통해 면역 반응을 관찰할 수 있다. 이들 지표와 임상적 의미 간의 관계는 아주 명확하지 않지만 민감도가 높아서 작용기전에 관한 좋은 정보를 제공한다.

마지막으로 circulating factor(총 Ig, 보체 단백질, acute-phase 단백질, 사이토카인, 사이토카인 수용체)와 면역세포를 혈중에서 직접 측정하는 방법이 있다. 이러한 지표는 면역 자극에 의한 반응을 직접적으로 확인할 수는 없으나, 생체 내에서 진행되는 반응을 반영할 수 있다.

생체 내(*in vivo*) 반응—백신에 대한 반응 : 일반적으로 사멸 또는 활성을 감소시킨 병원균을 사용하는 백신을 이용하는 방법을 사용한다. 백신에 대한 반응은 백신 특이적인 항체를 측정하여 확인할 수 있으며, 이 외에도 몇몇 백신의 경우에는 지연형 과민반응(delayed type hypersensitivity, DTH)이나 림프구 증식의 측정, 백신 항원을 자극시켜 림프구가 생산하는 사이토카인을 측정하는 방법 등으로 세포성 면역 반응을 확인할 수도 있다.

백신의 접종으로 인한 면역반응은 체내에서 기억되는 반응이므로 피험자는 한 가지 백신에 대해서 1회만 시험

에 참여하여야 하며, 시험군 간에 비교가 이루어져야 한다. 또한 백신 반응에 대한 개체 간의 차이도 크다. 간혹 초기 백신에 대한 항체 보유능으로 계층을 나누어야 하는 경우도 있으며, 백신 접종 이후 평형에 도달하기까지의 기간은 약 3주에서 몇 달이 걸릴 수도 있다.

—지연형 과민반응 : 지연형 과민반응은 항원을 피하로 접종시켜 관찰하는 국소적인 세포성 면역반응으로서, 면역반응의 기억을 최소화 할 수 있다. 지연형 과민반응은 나이, 수술 환자의 생존율 등과 역 상관관계를 보인다. 지연형 과민반응은 통제되지 않은 상태에서의 항원 노출력에 의존하기 때문에 개체간의 차이가 매우 커 소규모의 시험에는 적합하지 않을 수 있다. 또한 지연형 과민반응을 정량하는 방법의 표준화가 반드시 필요하다. 강한 지연형 과민반응 이후 피험자들은 종종 반응을 집중된 부위에서 변색이나 자극을 경험하기도 한다. 이러한 단점들도 불구하고 지연형 과민반응은 생체 내에서 세포성 면역 반응을 확인할 수 있는 가장 민감한 반응이다.

전 생체 내(*ex vivo*) 반응—자연면역 기능(Innate immune function) : ① 탐식세포 활성화 : 탐식능은 외부 침입 병원균의 제거에서 매우 중요한 역할을 한다.

② 자연살세포 활성화 : 자연살세포는 크기가 크며, T 세포도 아니고 B 세포도 아니나 바이러스나 세포 내의 병원균의 방어에서 중요한 역할을 한다. 자연살세포는 감염되거나 변형된 세포를 사멸시키며, 이들 세포 활성화에서는 IL-2가 중요한 역할을 한다. 자연살세포 활성화는 사이토카인에 의존적으로 활성화되기 때문에, 식품을 이용한 면역 반응 시험에서 가장 민감한 지표이다.

③ 단핵구-유래 매개체들 : 감염이 발생하면 많은 면역 매개체들이 활성화된다. 그람 음성 세균이나 LPS로 말초 혈액 단핵구나 전체 혈액세포를 자극시키면 이러한 매개체들이 생성된다. 이는 ELISA 방법을 사용하여 측정한다.

④ 항원제시세포 기능 : 단핵구, 탐식세포, 수상돌기세포들은 항원제시세포로 작용하여 그들 본연의 탐식세포로서의 역할 이외에 획득면역에서도 중요한 역할을 한다. 탐식세포의 Toll like receptor(TLR)가 특정한 probe를 탐지하면, 보조-자극 분자(co-stimulatory molecule(CD80/86))과 구조적 적합성 복합체 class II 단백질을 발현하고, 사이토카인 생산이 증가하게 된다.

—획득면역 기능(Adaptive immune system) : ① 림프구 증식 : 림프구는 휴지기 상태로 있다가 자극을 받으면 활성화되거나 증식을 시작한다. 림프구의 활성화나 증식은 *ex vivo*에서 concanavalin A(conA)나 phytohemagglutinin(PHA)로 자극시킨 후 측정할 수 있으나, 세포 배양 환경에서 세포를 분리하고 배양하는 동안 우 태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)을 사용한 배지 내에 여러 호르

몬, 영양분에 노출되고 세포 간 접촉이 생기므로 생체 내와는 크게 다르다는 것을 명심하여야 한다. 또한 가능하면 세포 당 사이토카인 생성능(function of cytokine production/cell)을 측정하는 것이 바람직하나, 어떠한 세포가 어떤 사이토카인을 생성하며, 어떤 세포에 영향을 미치는 영양성분이 다른 세포에도 영향을 미치는지 등을 정확히 파악하는 것은 매우 어렵다. 만약 FBS가 사용되었다면 실험에서는 하나의 batch에서 나온 FBS를 사용하는 것이 중요하다. 림프구의 증식은 면역 기능을 확인하는데 종종 사용되는 방법 중 하나이고 비교적 쉬운 시험이다. 하지만 결과의 편차가 심한 경우가 종종 있는데, 이는 서로 다른 자극원 때문에 림프구 활성화 cascade에서 림프구들이 서로 다른 상태에 있기 때문으로 추정된다.

② 림프구 활성화: 림프구의 활성화는 표지 단백질을 측정하여 확인될 수 있다. 이는 바로 혈액을 채취하여 측정할 수 있으나 앞에서 설명한 세포 증식처럼 자극원을 사용하여 *ex vivo*에서 측정할 수도 있다.

③ 림프구-유래 매개체들: 림프구의 활성화와 증식이 깊은 상관관계가 있다고 하더라도 림프구의 기능을 확인하는 것이 필요하다.

TH의 기능은 사이토카인 생산으로 확인될 수 있다. TH1과 TH2는 사이토카인의 종류에 따라 구분될 수 있고, 사이토카인의 농도가 세포의 활성을 의미한다고 할 수 있다. TH1은 일반적으로 IL-2, IFN- γ 를 생산하고, TH2는 IL-4, IL-5, IL-13을 생산한다. 또한 regulatory T 세포는 IL-10과 TGF- β 를 생산한다.

T 세포의 기능을 확인하기 위해 림프구들을 배양하고, 자극원으로 자극시킨 후 배양액에서 사이토카인의 함량을 측정하는데, 일반적으로 ELISA 방법을 사용하나 간혹 mRNA, enzyme-linked immunoblot, 유세포분석 등을 사용하기도 한다. TH1, TH2, regulatory T cell의 기능을 모두 확인하기 위해서는 사이토카인 클러스터가 분석되어야 한다. 즉, 림프구에서 유래한 사이토카인의 생산으로부터 TH 세포의 면역조절기능에 관한 기전 정보를 획득할 수 있다.

세포독성 T 세포는 antigen-loaded MHC-matched target cell의 lysis로 확인될 수 있다. 하지만 사람의 MHC haplotype이 매우 다르기 때문에 이 방법을 식품 시험에서 사용하기는 어렵다. 이 외에도 perforin, granzymes 등을 측정하는 방법이 있으나 임상적인 의미와 연관시키기가 있다.

④ 항체생성: B 세포의 기능은 *ex vivo*에서 항체의 생산을 측정하는 것으로 확인할 수 있다. 항체 생산능은 혈액 등에서 바로 측정할 수 있으나, *ex vivo*에서 세포를 배양시킨 후 mitogen이나 LPS 등을 사용하여 자극 시켜서 측정하는 것이 많은 정보를 획득할 수 있는 방법이다.

알레르기 관련 면역조절에 사용되는 바이오마커

시험 대상자

알레르기(allergy)란 그리스어인 「allos」에서 유래되었으며 이는 「변형된 것」을 의미하며, 1906년 프랑스 학자 Clemens Von Pirquet가 처음으로 알레르기란 용어를 사용하였다. 그는 알레르기를 ‘이물질에 대한 신체의 잘못된 변화된 능력’으로 정의하였는데, 이는 면역학적 반응을 포함하는 극히 광범위한 정의였다. 현재 알레르기는 ‘다양한 항원에 대한 면역계의 반응으로 발생하는 질병’으로 보다 제한된 의미로 정의된다.

알레르기는 과민반응(hypersensitivity reactions)으로서 면역 반응들의 여러 유해반응들 중 하나이다. 이런 유해 반응들은 조직 손상을 일으키며 심각한 질병을 일으킬 수 있는 면역 반응들을 말한다. 과민반응은 Coombs와 Gell에 의하여 I형부터 IV형까지의 네 가지 유형으로 분류되었으나 실제로는 증상이나 시간의 경과에 의하여 4개 형태가 중복 혹은 연속해서 발생한다. 대표적인 알레르기 반응으로는 피부 알레르기, 꽃가루 알레르기, 코 알레르기가 있으며, 이러한 알레르기를 가진 사람들에게서는 혈중 IgE 농도가 상승하고, 염증성 사이토카인의 함량이 증가하여 알레르기 증상을 일으키는 표적 항원이나 케모카인 발현 증가가 나타난다고 알려져 있다.

코 알레르기: 흡입은 알레르겐 출입구의 가장 흔한 통로이다. 많은 사람들은 흡입 항원에 대하여 재채기나 코 흘쩍거림으로 나타나는 약한 알레르기를 가지고 있다. 화분과 같은 항원들에 의해 비강점막 하에 있는 점막 비만세포들이 활성화되어 단백 함유물질들을 분비하게 되면, 화분이 비강통로의 점막을 통과하여 확산해 들어갈 수 있게 된다. 코 알레르기는 심한 소양감과 재채기, 비강통로를 폐쇄할 정도의 국소적인 부종, 전형적으로 호산구가 풍부한 코분비물(콧물), 그리고 히스타민 분비에 의한 코자극 등의 특징을 가지고 있다.

기관지 알레르기: 기관지 알레르기는 하루기도 점막 아래의 비만세포의 알레르겐 유발 활성화에 의해 시작된다. 기관지 알레르기는 수초 내에 기관지를 수축시키고 수분 및 점액의 분비를 증가시켜 폐내에 흡입된 공기를 잡아 가둔다. 따라서 심각하게 진행되면 호흡이 점점 어려워진다. 기관지 알레르기는 TH2 림프구, 호산구, 호중구 그리고 다른 백혈구 수 등을 많이 증가시키거나 유지시키며, 기관지의 만성염증으로 이어진다.

피부 알레르기: 피부는 대다수 알레르겐들의 출입구에 대한 효과적인 방어벽을 형성하나, 소량의 알레르겐이 국소적으로 주입되면 방어벽은 무너질 수 있다. 표피나 진피로의 알레르겐 침입은 국소적인 알레르기 반응을 유

발한다. 피부에서의 국소적 비만세포가 활성화되면 즉시 혈관투과성을 국소적으로 증가시켜 수분(혈장 단백질과 혈장 액)의 혈관 외 이동으로 부종을 일으킨다. 또한 활성화된 비만세포는 신경축삭반사(nerve axon reflex)를 통하여 국소 신경 말단으로부터의 화학물질 분비를 자극한다. 이는 주변 결체조직의 혈관을 확장시켜 주변 피부를 빨갱게 만드는데, 궁극적으로 나타나는 이러한 피부병변을 팽창발적 반응(wheal-and-flare reaction)이라 부른다. 일부 개인에게서는 대략 8시간 후에 반응이 확산되고, 지속된 부종반응이 후기반응의 결과로서 나타나기도 한다. 알레르겐에 의해 활성화된 비만세포가 분비한 히스타민은 피부에 가려움을 동반하는 붉은 팽창을 일으킨다.

때때로 보다 오래 지속되는 염증반응이 피부에서 나타나는데, 이것은 주로 아토피가 있는 어린이들에서 발생한다. 이들 어린이들은 습진(eczema) 혹은 아토피성 피부염이라 부르는 지속적인 피부 발적이 생기는 만성염증반응을 유발한다. 습진의 원인은 잘 알려져 있지 않으나 TH2 세포들과 IgE가 관여하는 것으로 추측된다.

음식물 알레르기 : 알레르겐을 섭취하는 경우, 두 가지 종류의 알레르기 반응이 일어난다. 위장관계 점막 내 비만세포가 활성화되면, 상피세포를 통한 수분소실과 평활근의 수축이 일어나고 설사와 구도가 유발된다. 또한 정확한 이유는 알 수 없지만 진피와 피하조직 내에 있는 결체조직 비만세포들이 아마도 혈류 내로 흡수된 알레르겐을 섭취한 후 활성화될 수 있으며, 이럴 경우 결국에는 두드러기가 발생한다.

시험설계

알레르기를 확인하는 시험은 알레르기의 종류에 따라 시험방법, 판단기준 등을 다르게 사용하여야 한다. 또한 관여하는 신체 내의 기관에 따라 다른 지표를 사용해야 한다. 알레르기 관련 인체적용시험에서는 임상적 지표와 생화학적 지표에서 각각 1가지 이상이 유의하게 개선되는 것이 바람직하다.

바이오마커

임상지표 : 대표적인 알레르기 관련 임상 지표로서 다음과 같은 것들이 널리 이용되고 있다. 특히 알레르기 관련 효과에서는 임상 증상의 개선이 동반되지 않으면 그

알레르기 종류	임상지표
피부 알레르기(아토피성)	SCORAD 점수
코 알레르기	비염 증상 점수, 항원비내 유발 검사
기관지 알레르기	기관지 천식 지표
음식 알레르기	음식 경구 부하 시험

의미가 적다고 간주될 수 있다.

임상지표 중 피부반응을 이용하는 시험에서는 그 결과가 연령, 나이, 인종, 피부반응시험의 부위에 따라서 차이가 있을 수 있으나, 성별이나 시간에 따른 변화는 미미하다. 부위별로는 성인의 경우 등(back)이 전박부에 비하여 예민도가 강하며, 전박부에서는 앞면(volar side)이 예민하다. 또한 위약성 반응의 가능성을 줄이기 위하여 항원 사이의 간격은 2~3 cm 이상으로 하는 것이 좋다. 피부 반응도는 소아기에서부터 점차 증가하는데, 음식물 항원의 경우 생후 3개월부터, 흡입성 항원의 경우에는 3세경부터 양성 반응이 나타날 수 있다. 이후, 히스타민에 대한 반응도 혹은 IgE 항체 자체가 연령이 증가함에 따라서 다시 감소하므로, 50세 이후의 피부반응도는 감소할 수 있다.

혈액검사-혈청 총 IgE 항체 측정 : 알레르기 중 특히 피부 알레르기의 경우는 일반적으로 혈청의 IgE 함량이 높다. 하지만 상당수 성인들에서는 피부 알레르기를 가지고 있으나 혈청 총 IgE 함량이 정상범위에 속하는 경우도 있다.

-항원-특이매체유리(Antigen-specific mediator release)검사 : 알레르겐 특이 항원에 의하여 활성화된 비만세포는 히스타민을 포함한 prostaglandin(PG), leukotrien(LK)들을 유리하여 직접 증상을 유발시키기도 하고 이들 매개체들이 호산구 등의 염증세포의 침윤을 유도하기도 하는데, 침윤된 세포가 활성화되면서 방출되는 물질에 의해 염증반응이 지속된다. 혈청학적 검사 중에는 이러한 일련의 알레르기 염증반응에 관여하는 세포를 체외에서 직접 활성화시키고 유리되는 화학매체를 관찰하여 알레르기의 원인이나 염증정도를 판단하는 방법이 있으며, 이 외에도 직접 혈청 내에서 유리된 매체를 측정하는 방법도 있다.

① 호염기구(비만세포와 유사) 히스타민 유리능 검사: 특정 알레르겐에 대한 감각 여부를 생체 외에서 검사하는 방법이다. 시험 대상자의 혈액에서 분리한 호염기구를 특정한 알레르겐과 반응시키고 유리되는 히스타민의 양을 측정하며, 형광 또는 방사면역반응(radioimmunoassay, RIA)을 이용한다. 예민도와 특이도는 특이적 IgE 항체를 측정하는 경우와 비슷하다.

② CAST(cellular allergen stimulation test)- ELISA: 알레르기성 염증반응에서는 히스타민보다 강력한 알레르기 반응을 유도하는 매개체로서는 PGs와 LTs가 있다. 백혈구를 알레르겐으로 자극하면 히스타민 유리와 함께 PGs와 LTs들이 유리되므로 이들을 RIA 방법으로 측정함으로써 알레르기성 염증 반응을 확인할 수 있다.

-염증의 표지자 : ① 호산구 수(eosinophil count): 말초 혈액 내에서의 호산구 증가가 반드시 IgE가 개입된 알레

르기를 의미하는 것은 아니다. 일반적으로 호산구 수의 증가가 심할수록 염증 반응이 광범위하고 심하다는 사실을 시사하지만, 말초혈액 내의 호산구 증가 정도가 반드시 조직 내의 호산구 침윤정도를 반영하는 것은 아니므로 주의할 요한다. 호산구 수는 반드시 따로 측정하여야 하며, 총 백혈구 수에 비율을 곱하여 계산해서는 안된다.

② 혈청 내 유리된 매체 검사: Eosinophil Cationic Protein(ECP)은 알레르기 염증반응에 있어서 가장 중요한 작동 세포 중의 하나인 호산구의 과립 내에 존재한다. 호산구가 활성화되면 ECP를 분비하며, 이는 호산구의 활성화 및 분비의 지표로 널리 이용되어 왔다. 알레르기 증상이 심할수록, 또 호산구수가 증가할수록 호산구에서 유리되는 ECP의 수치가 증가한다.

ECP는 CAP 시스템으로 정확하게 측정할 수 있으나, 호산구는 대상자들의 임상증상 뿐만 아니라 노출된 물질, 특히 바이러스나 알레르겐에의 노출정도, 약물 사용 여부 등에 의해서도 영향을 받으며 호산구의 유리정도 개인 차이가 있을 수 있으므로, 단회 측정의 결과로 비교하는 것은 논란의 여지가 있을 수 있다.

또한, 결막이나 코점막과 같이 알레르겐 염증반응이 국한된 경우에는 혈청 내 ECP를 측정하는 것보다 국소 조직 내 ECP의 변화정도를 측정하는 것이 염증반응의 정도를 더욱 근접하게 반영할 수 있는 방법이다.

- 혈액 내 사이토카인 검사 : IgE를 포함한 모든 알레르기성 면역반응에 관여하는 알레르겐, 특히 T 세포를 관찰하기 위한 방법이다. 림프구 자극시험은 통상적으로 사용되지는 않지만 중요한 단서를 제공할 수 있다. 하지만 이 시험은 다소 비특이성을 가지므로 알레르겐마다 반응하는 세포가 다를 수 있는 환경을 고려하지 못하는 단점이 있다. 최근에는 유세포분석기를 이용하여 세포의 표현형과 세포내의 사이토카인을 직접 검색하는 방법이 개발되었다.

- 이 자료는 면역 기능을 연구하고 관련 제품을 개발하는 연구자와 산업체들을 위해 면역 관련 과학적 바이오마커 등을 정리한 것입니다. 건강기능식품 면역 기능 소재의 연구 개발을 위한 참고자료로서 활용하시기 바랍니다.
- 본 자료는 「건강기능식품 면역기능평가 자문위원회」의 자문을 받아 작성되었습니다. 자문회의는 2차례의 대면 회의와 2차례의 e-회람이 있었으며, 자문회의의 결과는 한국영양학회 추계 학술 심포지엄(2008.10.31, 한국과학기술회관에서 발표되었습니다).

[건강기능식품 면역기능평가 자문위원]

강경선	서울대학교 수의학과
강창률	서울대학교 약학대학
김규언	연세대학교 의과대학
노재열	성균관대학교 의과대학
박해심	아주대학교 의과대학
성승용	서울대학교 의과대학
손동화	한국식품연구원
권오란	이화여자대학교 식품영양학과

참고문헌

1. Albers R, Antoine JM, Bourdet-Sicard R, Calder PC, Gleeson M, Lesourd B, Samartin S, Sanderson IR, Van Loo J, Vas Dias FW, Watzl B. 2005. Markers to measure immunomodulation in human nutrition intervention studies. *Br J Nutr* 94: 452-481.
2. Cummings JH, Antoine JM, Azpiroz F, Bourdet-Sicard R, Brandtzaeg P, Calder PC, Gibson GR, Guarner F, Isolauri E, Pannemans D, Shortt C, Tuijelaars S, Watzl B. 2004. PASSCLAIM-gut health and immunity. *Eur J Nutr* 43: II118-II173.
3. Kaminogawa S, Nanno M. 2004. Modulation of immune functions by foods. *Evid Based Complement Alternat Med* 1: 241-250.
4. 식품의약품안전청. 2004. 건강기능식품 기능성 시험 가이드.