(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0106239
(43) 공개일자 2023년07월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6886 (2018.01) *C12Q 1/689* (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2022.01)
C12Q 1/689 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2022-0001901
(22) 출원일자 2022년01월06일
심사청구일자 2022년01월06일
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
유도현
경상남도 진주시 새평거로 111, 312동 1501호(평거동, 평거휴먼시아3단지)
배현아
경상남도 진주시 내동로348번길 5-6 (가좌동, 다온빌 301호)
(74) 대리인
위병갑

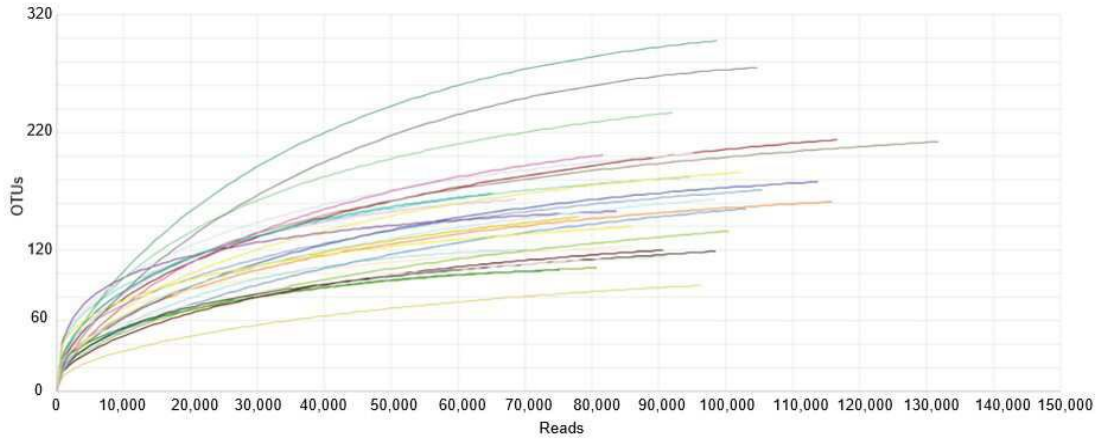
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **반려견의 종양질환 진단 방법**

(57) 요 약

본 발명은 반려견의 종양 진단 방법에 관한 것으로, 반려견의 질환 유무, 종양의 성질, 종양의 기원에 따른 반려견의 장내마이크로바이옴 변화를 분석하여 반려견의 종양질환을 진단하는 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545022826
과제번호	918018044SB010
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	포스트게놈신산업육성을위한다부처유전체사업(R&D)(농림부)
연구과제명	돼지, 소, 개의 건강관리 전략 수립을 위한 장내 마이크로바이옴 분석
기 여 율	1/1
과제수행기관명	강원대학교 산학협력단
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 반려견의 분변 시료에 존재하는 DNA를 추출하여 반려견의 미생물군유전체(microbiota)를 분석하는 단계;

(b) 종양질환을 가지고 있는 반려견과 종양질환을 가지고 있지 않은 반려견의 분변 시료에 존재하는 미생물을 비교하는 단계; 및

(c) 상기 단계 (b)에서, 종양질환을 가지고 있지 않은 반려견 보다 종양질환을 가지고 있는 반려견의 분변 시료에 존재하는 미생물의 상대적 풍부도가 증가하거나 감소하면 종양질환으로 진단하는 단계;를 포함하는, 반려견의 종양질환 진단방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 (c) 단계의 진단은 Proteobacteria 문(phylum)에 속하는 미생물의 상대적 풍부도가 증가하거나, Bacteroidetes 또는 Fusobacteria 문(phylum)에 속하는 미생물의 상대적 풍부도가 감소하면 종양질환으로 진단하는 것인, 반려견의 종양질환 진단방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 (c) 단계의 진단은 *Faecalimonas* 또는 *Bacteroides* 속(genus)에 속하는 미생물의 상대적 풍부도가 감소하거나, *Streptococcus* 속(genus)에 속하는 미생물의 상대적 풍부도가 증가하면 종양질환으로 진단하는 것인, 반려견의 종양질환 진단방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 (c) 단계의 진단은 *Acinetobacter*, *Rummeliibacillus* 또는 *Streptococcus* 속(genus)에 속하는 미생물의 상대적 풍부도가 증가하면 종양질환으로 진단하는 것인, 반려견의 종양질환 진단방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 (c) 단계의 진단은 *Bacteroides*, *Butyricicoccus*, *Longicatena*, *Enterococcus* 또는 *Eggerthella* 속(genus)에 속하는 미생물의 상대적 풍부도가 증가하면 공격적 종양(aggressive tumor)으로 진단하고, *Faecalimonas* 또는 *Clostridium* 속(genus)에 속하는 미생물의 상대적 풍부도가 증가하면 비공격적 종양(non-aggressive tumor)으로 진단하는 것인, 반려견의 종양질환 진단방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 (c) 단계의 진단은 *Blautia, Bacteroides, Veillonella, Longicatena* 또는 *Escherichia coli* 속(genus)에 속하는 미생물의 상대적 풍부도가 증가하면 B세포 기원 림프종 질환으로 진단하고, *Clostridium, Coprococcus, Fusobacterium, Clostridioides, Butyricicoccus, Eggerthella* 또는 *Faecalimonas* 속(genus)에 속하는 미생물의 상대적 풍부도가 증가하면 T세포 기원 림프종 질환으로 진단하는 것인, 반려견의 종양질환 진단방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 반려견의 종양질환 진단방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 마이크로바이옴이란 한 환경에서 서식하는 미생물과 미생물 전체 군집의 유전체 총합을 의미한다. 일반적으로 정상적인 장내마이크로바이옴은 미생물의 분포가 균형을 이루며 안정적인 군집을 유지한다. 그러나 외부적 요인 등에 의해 장내마이크로바이옴의 균형이 파괴되면 질환 발생 가능성이 높아진다. 한편 반려견 또한 장내마이크로바이옴과 건강이 관련되어 있다는 연구 결과들이 보고되고 있다.

[0003] 개의 장내마이크로바이옴에 대한 이전 연구에 따르면 성견의 장내 지배적인 세균 문(phylum)은 Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Fusobacteria, Actinobacteria로 알려져 있다. 상기 5개의 우세한 문과 소분류군의 상대적인 비율은 생활환경, 식이요법, 약물, 다양한 기저질환 등에 따라 변하게 되는데, 숙주의 건강과 항상성에 부정적인 영향을 미치는 장내 미생물의 구성의 변화를 세균불균형(dysbiosis)이라 한다. 세균불균형은 커뮤니티 미생물 구성적인 구조의 광범위한 변화에 의해 종의 다양성 감소, 특정 유기체의 상대적 비율 변화를 나타내며, 미생물군집의 작은 부분을 대표하는 공생체가 병원성 특징을 발달시킨다고 알려져 있다.

[0004] 최근 반려견의 급성설사병 질환과 관련된 장내마이크로바이옴 균총 변화에 대해 보고된 바 있다. 급성설사병에 걸린 반려견과 건강한 반려견의 분변 미생물 균총을 비교했을 때, 급성 설사병이 있는 반려견에서는 정상군에 비해 블라우티아(*Blautia*), 패칼리박테리움(*faecalibacterium*) 등의 미생물이 감소하고, 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*)가 증가하는 것으로 나타났다. 또한 급성 설사와 구토를 보이는 개에게 락토바실러스(*Lactobacillus*) 등과 같은 프로바이오틱스를 급여하였을 때, 급여하지 않은 경우에 비해 정상 분변의 형태로 회복되는 시간이 빠른 것으로 나타났다. 반려견의 장내마이크로바이옴은 장내 환경에만 영향을 미치는 것이 아니라 아토피, 치매 등의 질환과도 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되고 있다.

[0005] 이에 본 발명은 반려견의 종양질환 유무에 따른 장내마이크로바이옴의 변화를 분석하여 반려견의 종양 예후를 예측 또는 진단하는 방법을 제공하고자 한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 제10-2273311호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 반려견의 장내마이크로바이옴 변화를 분석하여 반려견의 종양질환을 진단하는 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 (a) 반려견의 분변 시료에 존재하는 DNA를 추출하여 반려견의 미생물군유전체(microbiota)를 분석하는 단계; (b) 종양질환을 가지고 있는 반려견과 종양질환을 가지고 있지 않은 반려견의 분변 시료에 존재하는 미생물을 비교하는 단계; 및 (c) 상기 단계 (b)에서, 종양질환을 가지고 있지 않은 반려견 보다 종양질환을 가지고 있는 반려견의 분변 시료에 존재하는 미생물의 상대적 풍부도가 증가하거나 감소하면 종양질환으로 진단하

는 단계;를 포함하는, 반려견의 종양질환 진단방법을 제공한다.

[0009] 본 발명에 있어서, 상기 (c) 단계의 진단은 Proteobacteria 문(phylum)에 속하는 미생물의 상대적 풍부도가 증가하거나, Bacteroidetes 또는 Fusobacteria 문(phylum)에 속하는 미생물의 상대적 풍부도가 감소하면 종양질환으로 진단하는 것이 좋다.

[0010] 본 발명에 있어서, 상기 (c) 단계의 진단은 *Faecalimonas* 또는 *Bacteroides* 속(genus)에 속하는 미생물의 상대적 풍부도가 감소하거나, *Streptococcus* 속(genus)에 속하는 미생물의 상대적 풍부도가 증가하면 종양질환으로 진단하는 것이 좋다.

[0011] 본 발명에 있어서, 상기 (c) 단계의 진단은 *Acinetobacter*, *Rummeliibacillus* 또는 *Streptococcus* 속(genus)에 속하는 미생물의 상대적 풍부도가 증가하면 종양질환으로 진단하는 것이 좋다.

[0012] 본 발명에 있어서, 상기 (c) 단계의 진단은 *Bacteroides*, *Butyricicoccus*, *Longicatena*, *Enterococcus* 또는 *Eggerthella* 속(genus)에 속하는 미생물의 상대적 풍부도가 증가하면 공격적 종양(aggressive tumor)으로 진단하고, *Faecalimonas* 또는 *Clostridium* 속(genus)에 속하는 미생물의 상대적 풍부도가 증가하면 비공격적 종양(non-aggressive tumor)으로 진단하는 것이 좋다.

[0013] 본 발명에 있어서, 상기 (c) 단계의 진단은 *Blautia*, *Bacteroides*, *Veillonella*, *Longicatena* 또는 *Escherichia coli* 속(genus)에 속하는 미생물의 상대적 풍부도가 증가하면 B세포 기원 림프종 질환으로 진단하고, *Clostridium*, *Coprococcus*, *Fusobacterium*, *Clostridioides*, *Butyricicoccus*, *Eggerthella* 또는 *Faecalimonas* 속(genus)에 속하는 미생물의 상대적 풍부도가 증가하면 T세포 기원 림프종 질환으로 진단하는 것이 좋다.

발명의 효과

[0014] 본 발명은 반려견의 질환 유무, 종양의 성질, 종양의 기원에 따른 반려견의 장내마이크로바이옴 변화를 분석하여 반려견의 종양질환을 진단하는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 종양질환 유무에 따른 개의 분변 시료에 대한 16S rRNA 유전자의 희박곡선(rarefaction curves)을 나타낸 도이다.

도 2는 종양질환 유무에 따른 그룹의 α-diversity를 나타낸 도이다.

도 3 내지 도 5는 종양질환 유무에 따른 그룹의 β-diversity를 나타낸 도이다.

도 6은 종양질환 유무에 따른 상위 문(phylum) 및 상위 속(genus)을 나타낸 도이다.

도 7은 종양질환 유무에 따른 LEfSe 분지도이다.

도 8은 종양질환 유무에 따른 LEfSe 분석 결과, 속(genus) 수준의 상위 미생물을 나타낸 도이다.

도 9는 종양질환 유무에 따른 LEfSe 분석 결과, 종(species) 수준의 상위 미생물을 나타낸 도이다.

도 10은 공격적 종양 그룹과 비공격적 종양 그룹의 생존곡선을 나타낸 도이다.

도 11은 공격적 종양 그룹과 비공격적 종양 그룹의 백혈구와 호중구 수, 적혈구용적률을 나타낸 도이다.

도 12는 공격적 종양 그룹과 비공격적 종양 그룹의 α-diversity를 나타낸 도이다.

도 13은 속(genus) 수준에서 공격적 종양 그룹과 비공격적 종양 그룹의 미생물군을 비교한 도이다.

도 14는 B세포 기원 림프종 그룹과 T세포 기원 림프종 그룹의 생존곡선을 나타낸 도이다.

도 15는 B세포 기원 림프종 그룹과 T세포 기원 림프종 그룹의 α-diversity를 나타낸 도이다.

도 16은 문(phylum) 수준에서 B세포 기원 림프종 그룹과 T세포 기원 림프종 그룹의 미생물군 구성을 비교한 도이다.

도 17은 속(genus) 수준에서 B세포 기원 림프종 그룹과 T세포 기원 림프종 그룹의 미생물군 구성을 비교한 도이다.

도 18 내지 도 20은 B세포 기원 림프종 그룹과 T세포 기원 림프종 그룹의 피어슨 상관관계를 분석한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명은 반려견의 장내마이크로바이옴 변화를 분석하여, 반려견의 종양질환 유무, 종양의 성질, 종양의 기원을 진단할 수 있는 반려견 종양질환 진단방법에 관한 것이다.

[0017] 마이크로바이옴(microbiome)은 마이크로비오타(microbiota)와 게놈(genome)의 합성어이다. 장내마이크로바이옴은 다양한 미생물로 이루어져 있는데, 건강한 환경일수록 미생물 종의 다양성이 높아 생태계가 안정적인 반면, 질환 등에 의해 건강하지 못한 환경일수록 장내 미생물 다양성이 낮아진다. 이에 본 발명은 반려견의 종양질환에 따른 장내마이크로바이옴 분석을 통해 반려견의 종양질환을 진단하는 방법을 제공한다.

[0018] 구체적으로, 본 발명은 반려견의 분변 시료에서 특정 미생물의 상대적 풍부도가 증가하거나 감소함에 따른 반려견의 종양질환을 진단하는 방법에 관한 것으로, (a) 반려견의 분변 시료에 존재하는 DNA를 추출하여 반려견의 미생물군유전체(microbiota)를 분석하는 단계; (b) 종양질환을 가지고 있는 반려견과 종양질환을 가지고 있지 않은 반려견의 분변 시료에 존재하는 미생물을 비교하는 단계; 및 (c) 상기 단계 (b)에서, 종양질환을 가지고 있지 않은 반려견 보다 종양질환을 가지고 있는 반려견의 분변 시료에 존재하는 미생물의 상대적 풍부도가 증가하거나 감소하면 종양질환으로 진단하는 단계;를 포함하는 반려견의 종양질환 진단방법을 제공한다.

[0019] 본 발명에 있어서, 상기 종양질환은 림프성 또는 비림프성 종양질환이며, 상기 림프성 종양질환은 바람직하게는 림프절종(lymphadenopathy)일 수 있다. 또한, 상기 비림프성 종양질환은, 바람직하게는 비만세포 종양(Mast cell tumor), 유선암(Mammary gland carcinoma), 이소성 갑상선 종양(Ectopic thyroid tumor), 침샘편평세포암(Salivary gland squamous cell carcinoma), 다엽성 골육종(Multilobular osteosarcoma), 갑상선 C 세포 암종(Thyroid C cell carcinoma), 신장세포암종(Renal cell carcinoma), 후복막 혈관육종(Hemangiosarcoma), 간암종(Hepatic carcinoma), 폐섬유육종(Pulmonary fibrosarcoma)일 수 있다.

[0020] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 보다 자세히 설명한다. 다만, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0022] **<준비예 1> 림프종, 비림프성 종양, 정상 그룹 분류**

[0023] 본 발명에서는 8마리의 림프종 질환이 있는 개, 11마리의 비림프종 종양질환이 있는 개, 9마리의 건강한 개를 이용하였다. 표 1에 림프종 그룹을, 표 2에 비림프성 종양 그룹을, 표 3에 정상 그룹의 품종, 성별, 연령을 나타내었다.

표 1

[0025]

No	Breed	Sex	Age (years)	Diagnosis	Stage
Lymphoma					
1	Dogo Canario	SF	7	Multicentric T-cell	IVb
2	Coton de tulear	SF	8	Multicentric T-cell	Vb
3	Maltese	SF	11	Multicentric B-cell	IVb
4	Mixed	SF	9	Non-epitheliotropic cutaneous T-cell	
5	Mixed	SF	16	Multicentric T-cell	IVb
6	Dachshund	SF	10	Multicentric B-cell	IVa
7	Miniature Poodle	F	5	Multicentric B-cell	IVb
8	Golden Retriever	SF	11	Multicentric T-zone (indolent)	

[0027] 림프종(Lymphoma) 그룹에는 7마리의 중성화된 암컷(Spayed Female, SF)과 1마리의 암컷(female, F)이 포함되었다. 평균 연령은 9.9 ± 2.9세이며, 평균 체중은 10.4 ± 9.2 kg이었다. 이들은 일반적인 림프절병증(lymphadenopathy)을 보였고, 다심성(multi-centric) Ⅳ 또는 Ⅴ 림프종으로 진단되었다. 4번은 여러개의 피하 결절과 골격근, 장 점막과 장막, 오른쪽 눈의 홍채와 모양체, 방광의 점막하에서 림프모세포 침윤을 보였다. 기저 질환으로 췌장염과 장벽 림프종이 있었던 2번, 4번을 제외하고 나머지 개는 분변 미생물군 조성에 중대한 영향을 미칠 수 있는 위장 징후 또는 전신 질환이 없었다.

표 2

[0029]

No	Breed	Sex	Age (years)	Diagnosis
Non-lymphoid tumor				
9	Miniature Poodle	NM	12	Mast cell tumor
10	Dachshund	SF	14	Mammary gland carcinoma
11	Golden Retriever	F	12	Ectopic thyroid tumor
12	Miniature Pinscher	NM	19	Salivary gland squamous cell carcinoma
13	Siberian Husky	F	8	Multilobular osteosarcoma
14	Maltese	NM	10	Thyroid C cell carcinoma
15	Maltese	SF	9	Renal cell carcinoma
16	Mixed	SF	14	Hemangiosarcoma
17	Samoyed	NM	10	Ectopic thyroid tumor
18	Maltese	SF	13	Hepatic carcinoma
19	Great Pyrenees	SF	10	Pulmonary fibrosarcoma

[0031] 비림프성 종양(Non-lymphoid tumor) 그룹에는 4마리의 중성화된 수컷(Neutered Male, NM), 5마리의 중성화된 암컷, 2마리의 암컷이 포함되었다. 평균 연령은 11.9 ± 3.0세이며, 평균 체중은 14.6 ± 12.6 kg이었다. 각각 비림프성 종양의 기원은 위장관 외에서 기원하였으며, 비만세포 종양(Mast cell tumor), 유선암(Mammary gland carcinoma), 이소성 갑상선 종양(Ectopic thyroid tumor), 침샘편평세포암(Salivary gland squamous cell carcinoma), 다엽성 골육종(Multilobular osteosarcoma), 갑상선 C 세포 암종(Thyroid C cell carcinoma), 신장세포암종(Renal cell carcinoma), 후복막 혈관육종(Hemangiosarcoma), 간암종(Hepatic carcinoma), 폐섬유육종(Pulmonary fibrosarcoma)이었다. 췌장염과 만성신장질환을 각각 기저질환으로 앓았던 11번, 16번 개를 제외하고 나머지 개는 진단된 종양 외에 분변 미생물군 조성에 유의미한 영향을 미칠 수 있는 위장 징후 또는 전신 질환이 없었다. 또한 림프종 그룹과 비림프성 종양 그룹 간에는 평균 체중에 유의한 차이가 없었다.

표 3

[0033]

No	Breed	Sex	Age (years)
Healthy			
20	Maltese	F	4
21	Maltese	NM	1
22	Mixed	NM	4
23	Maltese	SF	8
24	Maltese	NM	8
25	Bichon Frise	NM	2
26	Maltese	NM	3
27	Miniature Poodle	NM	unknown
28	Miniature Poodle	NM	12

[0035] 정상(Healthy) 그룹에는 7마리의 중성화된 수컷, 1마리의 중성화된 암컷, 1마리의 암컷이 포함되었다. 평균 연령은 5.3 ± 3.7세이며, 관련 기저 질환이 없으며, 분변 미생물군 조성에 중대한 영향을 미칠 수 있는 위장 징후 또는 전신 질환이 없었다.

[0037] **<실험예 1> 질환 유무에 따른 임상병리학적 분석**

[0038] 종양질환 유무에 따른 개의 임상병리학적 분석을 위해 각 그룹의 개들로부터 혈액을 채취하여 혈구 수 및 혈청 생화학적 분석을 수행하였다. 전체 혈구 수 분석에는 Procyte Dx hematology analyzer(IDEXX, Westbrook, ME, USA), 산-염기 균형 및 전해질 농도 분석에는 Nova pHOX analyzer(Nova Biochemical, Waltham, MA, USA), 혈청 생화학적 분석에는 Catalyst Dx® chemistry analyzer(IDEXX, Westbrook, ME, USA), 응고 분석에는 Coag DxTM analyzer with citrate PT and citrate aPTT cartridges(IDEXX, Westbrook, ME, USA), 소변 분석에는 VetLab UA Analyser(IDEXX, Westbrook, ME, USA)를 사용하였다. 피브리노겐은 Millar 방법을 이용하여 분석하였다.

표 4

[0040]

Variables	Lymphoma (n = 8)	Non-lymphoid tumor (n = 11)	*P*-value	Reference range
White blood cell ($\times 10^9$/L)	15.69 ± 8.70	13.46 ± 8.49	0.582	5.05-16.76
Neutrophil ($\times 10^9$/L)	11.11 ± 7.34	11.31 ± 9.05	0.840	2.95-11.64
Lymphocyte ($\times 10^9$/L)	2.89 ± 4.27	2.81 ± 4.49	0.600	1.05-5.1
Eosinophil ($\times 10^9$/L)	0.25 ± 0.36	0.23 ± 0.26	0.492	0.06-1.23
Platelet ($\times 10^9$/L)	224.88 ± 122.25	309.09 ± 165.94	0.238	148-484
Hematocrit (%)	37.91 ± 6.26	42.07 ± 9.66	0.303	37.3-61.7
Fibrinogen (g/L)	3.59 ± 0.67	5.60 ± 0.23	0.048*	2.0-4.0
Glucose (mg/dL)	98.38 ± 16.70	119.73 ± 50.12	0.265	70-143
Blood urea nitrogen (mg/dL)	25.75 ± 22.87	20.73 ± 14.80	0.778	7-27
Creatinine (mg/dL)	1.03 ± 0.83	0.98 ± 0.35	0.894	0.5-1.8
Albumin (g/dL)	2.96 ± 0.45	3.27 ± 0.33	0.100	2.2-3.9
Globulin (g/dL)	3.39 ± 0.95	4.08 ± 0.80	0.012*	2.5-4.5
Ionized calcium (mmol/L)	1.26 ± 0.07	1.30 ± 0.03	0.161	1.12-1.42
Lactate (mmol/L)	1.97 ± 0.86	1.83 ± 1.63	0.285	0.5-2.5

[0042] 림프종 그룹은 비림프성 종양 그룹에 비해 평균 피브리노겐 및 글로불린 농도가 낮게 나타났으며, 이외의 매개변수는 두 그룹간에 큰 차이를 보이지 않았다.

[0044] **<실험예 2> 질환 유무에 따른 박테리아 다양성(Bacterial diversity) 및 분변 미생물군 구성**

[0045] 종양질환 유무에 따른 개의 분변 미생물군유전체(microbiota) 구성을 분석하기 위해 분변 시료를 이용하여 16S rRNA 유전자 앰플리콘 시퀀싱(amplicon sequencing)을 수행하였다.

[0046] 박테리아 유전자 시퀀싱을 위해 FastDNA Spin Kit(MP Biomedicals, Irvine, CA, USA)를 사용하여 냉동 분변 샘플로부터 총 DNA를 추출하고 NanoDrop 2000 UV-vis 분광광도계 Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 최종 DNA 농도를 측정하였다. 16S rRNA 유전자의 V3-V4 가변영역의 증폭 및 시퀀싱을 수행하였다. 샘플은 341F/805R PCR 프라이머(포워드 프라이머(forward primer) 341F 시퀀스 : 5′-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3′ , 리버스 프라이머(reverse primer) 805R 시퀀스 : 5′ GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3′)로 증폭하는 동안 바코드를 표시한 후 QIAquick PCR 정제 키트(Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 PCR 산물을 정제하였다. PCR은 94 ℃에서 3분,

30초간 94 ℃, 40초간 53 ℃, 1분간 72 ℃의 28 사이클 및 72 ℃에서 5분간 최종 신장 단계를 거쳤다. 혼합 앰플리콘을 풀링하고, 제조사의 지침에 따라 Illumina MiSeq Sequencing System(Illumina, San Diego, CA, USA)을 이용하여 시퀀싱을 수행하였다.

[0047] 16S rRNA 유전자 서열은 오픈 소스 소프트웨어 파이프라인을 사용하여 처리되었고, raw reads는 quality control(QC) 분석을 거쳤으며, Trimmomatic(version 0.32)를 사용하여 low-quality reads(< Q25)를 필터링하였다. QC 후, PANDAseq를 사용하여 paired-end 시퀀스 데이터를 병합하였다. 프라이머는 0.8의 유사성 컷오프에서 ChunLab 인하우스 프로그램으로 시간을 측정하였다. 시퀀스 오류를 수정하기 위해 DUDE-Seq를 사용하여 노이즈를 제거하였다. EzBioCloud 데이터베이스는 분류학적 할당을 수행하고 97 % 미만의 베스트 히트 유사도를 포함하는 chimeric reads를 감지하는데 사용되었다. 이후, 시퀀스 데이터는 CD-HIT 및 UCLUST를 사용하여 클러스터링 되었다. α-diversity 및 β-diversity 분석은 CLcommunity 소프트웨어(version 3.46, ChunLab, Inc.)를 사용하여 수행하였다.

[0048] 림프종과 비림프성 종양 및 정상 그룹 간의 α-diversity는 OTUs(operational taxonomic units), ACD, Chao1, JackKnife, Simpson 및 Shannon 지수를 이용하여 비교하였다. OTUs, ACE, Chao1 및 JackKnife는 종 풍부도(richness)를 나타내고, Simpson 지수는 종 균일도(evenness)를 나타내고, Shannon 지수는 종 풍부도와 균일도를 모두 나타낸다. 세 그룹간의 β-diversity는 fast UniFrac distance matrix, Bray-Curtis 및 UPGMA 클러스터링을 기반으로 하는 PCoA(principal coordinates analysis)에 의해 비교하였다. LEfSe(Linear discriminant analysis (LDA) effect size) 분석은 Galaxy 프레임워크(http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/)를 사용하여 수행하였다. LEfSe 분석은 P값이 < 0.05이고, LDA 점수가 > 2.0인 정상 그룹의 분변에 풍부한 박테리아 분류군과 림프종 및 비림프성 종양이 있는 분류군을 식별하는 데 사용되었다.

[0049] 분변 시료에 대해 총 2,624,860 sequence reads를 확보하였으며, 평균적으로 93,745 sequence reads를 확보(범위 65,216~131,751)하였다. 도 1에 분변 시료에 대한 16S rRNA 유전자의 희박곡선(rarefaction curves)을 나타내었다. 분변 샘플의 Good's coverage는 > 99.96 % 로, 미생물 다양성을 분석하기에 충분한 것으로 나타났다.

[0050] 도 2에 종양 그룹(림프종 그룹 및 비림프성 종양 그룹)과 정상 그룹의 α-diversity를 나타내었다. OTUs, ACE, Chao1, JackKnife와 Simpson 지수는 종양 그룹이 정상 그룹에 비해 낮은 것으로 나타났으며, 종양 그룹이 정상 그룹에 비해 종 풍부도(richness)와 종 균일도(evenness)가 낮은 것을 확인하였다. 즉, 미생물 종 다양성을 나타내는 α-diversity는 종양 그룹이 정상 그룹에 비해 현저하게 낮은 것으로 나타났다.

[0051] 도 3 내지 5에 각 그룹의 α-, β-diversity를 분석한 결과를 나타내었다. 도 3은 β-diversity를 분석하는 방법 중의 하나인 UPGMA clustering 분석법으로, 각 샘플간의 다양성 거리를 측정하여 샘플 간의 종 구성의 차이를 분석한 결과이다. 도 4는 Unifrac과 Bray-Curtis를 기반으로 하여 종 풍부도(richness)를 분석한 결과이다. 수치가 0에 가까울수록 종 풍부도(richness)가 낮으며, 1에 가까울수록 종 풍부도(richness)가 높음을 의미한다. 도 5는 종 풍부도(richness)와 균일도(evenness)를 세부 항목으로 나누어 그룹 간 α-diversity를 분석한 결과이다. 도 3과 도 4에서 보듯이, 각 그룹간 β-diversity에는 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 한편 도 5에서 보듯이, 림프종과 비림프성 종양 그룹은 정상 그룹에 비해 OTUs, ACE, Chao1, JackKnife와 Simpson 지수가 낮게 나타나 종 풍부도(richness)와 종 균일도(evenness)가 모두 낮은 것으로 나타났다. 또한, 림프종 그룹은 비림프성 종양 그룹에 비해 OTUs, ACE, Chao1, JackKnife 지수가 모두 낮게 나타나, 림프종 그룹의 종 풍부도(richness)가 비림프성 종양 그룹에 비해 낮은 것으로 나타났다.

[0052] 한편, 25개의 문(phylum), 59개의 강(class), 119개의 목(order), 200개의 과(family), 551개의 속(genus)으로 OTUs 매핑되었다. 상위 7개의 문(phylum) 및 상위 20개의 속(genus)을 도 6에 나타내었다. 상위 7개의 문은 희귀 분류군과 미분류 문을 제외하고 Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobacteria이며, 상위 20개 속은 희귀 분류군과 미분류 속을 제외하고 *Enterococcus, Blautia, Escherichia, Clostridium, Faecalimonas, Bacteroides, Streptococcus, Romboutsia, Paeniclostridium, Lactobacillus, Staphylococcus, Pediococcus, Ruminococcus, Clostridioides, Terrisporobacter, Rummeliibacillus, Fusobacterium*이다. 문(phylum) 수준에서, 림프종 그룹과 비림프성 종양 그룹은 정상 그룹에 비해 Bacteroidetes, Fusobacteria의 상대적 풍부도가 감소하였으며, Proteobacteria의 상대적 풍부도는 증가하는 것으로 나타났다. 속(genus) 수준에서, 림프종 그룹과 비림프성 종양 그룹은 *Faecalimonas*와 *Bacteroides*가 정상 그룹에 비해 상대적 풍부도가 낮아졌으며, 비림프성 종양 그룹은 *Streptococcus*의 상대적 풍부도가 특히 증가하는 것으로 나타났다.

[0053] 도 7 내지 9에 LEfSe 분석 결과를 나타내었다. 도 7은 바깥쪽 고리에 문(phylum)을 표시하고, 안쪽 고리에 속

(genus)을 표시한 LEfSe 분석 결과에 따른 분지도이다. 정상(초록색), 림프종(빨간색), 비림프성 종양(파란색) 그룹 각각의 수준 내의 구성원을 나타내었다. 정상 그룹은 Bacteroidetes와 Actinobacteria 문(phylum)으로, 림프종 그룹은 Negativicutes 강(class)(in the phylum Firmicutes)으로 확인되었다.

[0054] 도 8에 속(genus) 수준(LDA 스코어 2.0 컷오프 기준)에서 각 그룹의 풍부한 속을 나타내었다. 정상(H) 그룹에서 7개속, 림프종(L) 그룹에서 2개속, 비림프성 종양(N) 그룹에서 2개속이 풍부한 것으로 나타났다. *Prevotella*와 *Phascolarctobacterium*은 특히 정상(H) 그룹에서 우세하였으며, *Acinetobacter*는 림프종(L) 그룹에서 우세하였고, *Rummeliibacillus*와 *Streptococcus*는 비림프성 종양(N) 그룹에서 우세한 것으로 확인되었다.

[0055] 도 9에 종(species) 수준(LDA 스코어 2.0 컷오프 기준)에서 각 그룹의 풍부한 종을 나타내었다. 정상(H) 그룹에서 17개종, 림프종(L) 그룹에서 1개종, 비림프성 종양(N) 그룹에서 6개종이 풍부한 것으로 나타났다. *Bacillus subtilis* group, unclassified *Bacteroides*, *Bacteroides plebeius*, unclassified *Prevotella*는 정상(H) 그룹에서 우세하였으며, *Bacteroides caccae*는 림프종(L) 그룹에서 우세하였고, *Clostridium maximum*, *Rummeliibacillus stabekisii*, *Lactococcus lactis* group, *Bifidobacterium longum* group, *Clostridium sardiniense* group, *Bacteroides dorei*가 비림프성 종양(N) 그룹에서 우세하였다.

[0057] **<실험예 3> 공격적 종양(aggressive tumor) 그룹과 비공격적 종양(non-aggressive tumor) 그룹의 혈액학적 매개변수 및 임상병리학적 분석**

[0058] 종양을 분류하는데 사용되는 신호, 임상특징 등을 기재하였다. 표 5에 공격적 종양(aggressive tumor) 그룹을, 표 6에 비공격적 종양(non-aggressive tumor) 그룹을 나타내었다.

표 5

[0060]

No	Breed	Sex	Age	Diagnosis	Clinical/clinicopathological signs	Response to therapy	Metastasis or recurrence	Survival time (days)
Aggressive tumor group (n = 9)								
1	Dogo canario	SF	7	Multicentric T-cell lymphoma stage IVb	Spleen honey comb sign	PD		3
3	Maltese	SF	11	Multicentric B-cell lymphoma stage IVb	Spleno&hepatomegaly	PR		240
4	Mixed	SF	9	NE-CTCL, systemic disseminated	Hepatomegaly, hepatic nodule	PD		41
5	Mixed	SF	16	Multicentric T-cell lymphoma stage IVb	Splenomegaly	PR		99
7	Maltese	NM	7	Multicentric high grade B-cell lymphoma stage IVb	Spleno&hepatomegaly			Censored
13	Siberian Husky	F	8	Multilobular osteosarcoma	Muscle (skull) metastasis	PD	0	1
15	Maltese	SF	9	Renal cell carcinoma	Bone (cervical vertebra) metastasis	PD	0	158
16	Mixed	SF	14	Retroperitoneal hemangiosarcoma	Intraabdominal metastasis	PD	0	Censored
17	Samoyed	NM	10	Ectopic thyroid tumor	DIC		0	2

표 6

[0062]

No	Breed	Sex	Age	Diagnosis	Clinical/clinicopathological signs	Response to therapy	Metastasis or recurrence	Survivaltime (days)
Non-aggressive tumor group (n = 10)								
2	Coton de tulear	SF	8	Multicentric T-cell lymphoma stage Vb	Hepatomegaly, splenic & hepatic nodule	CR		Survival
6	Dachshund	SF	10	Multicentric high grade B-cell lymphoma stage IVa	Splenomegaly, spleen honey comb sign	CR		Survival
8	Golden Retriever	SF	11	Multicentric T-zone lymphoma (indolent type)	Hepatomegaly			Survival
9	Miniature Poodle	NM	12	Cutaneous mast cell tumor		PR	None	Survival
10	Dachshund	SF	14	Mammary gland carcinoma	Lung metastasis	PD	0	15
11	Golden Retriever	F	12	Ectopic thyroid tumor		CR	None	Survival
12	Miniature Pinscher	NM	19	Salivary gland squamous cell carcinoma	Local recurrence	PD	None	Censored
14	Maltese	NM	10	Thyroid C cell carcinoma		CR	None	Survival
18	Maltese	SF	13	Hepatic tumor (unknown origin)			None	Censored
19	Great Pyrenees	SF	10	Pulmonary fibrosarcoma		CR	None	67

[0064] 공격적 종양(aggressive tumor) 그룹에는 5마리의 림프종 그룹과 4마리의 비림프종 종양 그룹의 개가 포함되었으며, 비공격적 종양(non-aggressive tumor) 그룹에는 3마리의 림프종 그룹과 7마리의 비림프종 종양 그룹의 개가 포함되었다. 평균 연령에서는 두 그룹간에 유의한 차이가 없었다.

[0065] 공격적 종양(aggressive tumor) 그룹 중 림프종 진단 후 3일 생존한 1번 개와 41일 생존한 4번 개는 기존의 항암화학요법(L-asparaginase, vincristine and prednisolone)과 prednisolone을 사용한 완화 요법에 각각 반응하지 않았다. 3번, 5번 개는 림프종 진단 후 L-CHOP 프로토콜을 사용하여 화학 요법을 적용하였으나 전신 림프절 크기의 반복적인 증가와 감소를 보였고, 각각 8개월 및 3개월 후에 화학 요법에 반응을 보이지 않았다. 비림프성 종양으로 진단된 4마리의 개 중 신세포암으로 진단된 15번 개를 제외하고 3마리의 개에서 국소 림프절 침범(local lymph node involvement) 또는 원격 전이(distant metastasis)가 확인되었다. 15번 개는 화학요법을 위해 카보플라틴과 비스테로이드성 소염진통제(firocoxib)를 투여하였으나 진단 5개월 후 경추로의 전이가 확인되었고 사지마비를 동반한 신경학적 징후가 빠르게 진행되었으며 사망하였다.

[0066] 비공격적 종양(non-aggressive tumor) 그룹의 10마리 중 6마리는 생존하였으며, 유선암으로 진단되어 폐 전이 확인 후 2주만에 사망한 10번 개를 제외하고 다른 개는 진단 당시 전이를 나타내지 않았다. 10번 개는 폐 전이 1년 전에 양측 사슬 유방 절제술(bilateral chain mastectomy)을 받았고, 수술 후 1년간 개는 무증상이었다. 도 10에 생존 곡선을 나타내었다. 생존 곡선은 Kaplan-Meier curve를 사용하여 수행하였다. 비공격적 종양(non-aggressive tumor) 그룹의 생존 시간이 공격적 종양(aggressive tumor) 그룹의 생존 시간에 비해 긴 것으로 나타났다.

[0067] 도 11에 공격적 종양(aggressive tumor) 그룹과 비공격적 종양(non-aggressive tumor) 그룹의 혈액학적 매개변수를 나타내었다. 백혈구(white blood cell, WBC) 및 호중구(neutrophil) 수는 공격적 종양(aggressive tumor) 그룹에서 더 높게 나타났으며, 적혈구용적률(hematocrit, HCT)은 비공격적 종양(non-aggressive tumor) 그룹에

서 더 높게 나타났다.

[0068] 표 7에 공격적 종양(aggressive tumor) 그룹과 비공격적 종양(non-aggressive tumor) 그룹의 백혈구 및 호중구 수, 적혈구용적률을 제외한 임상병리학적 분석 결과를 나타내었다. 표 7에서는 두 그룹간에 유의한 차이가 없었다.

표 7

[0070]

Variables	Aggressive group (n = 9)	Non-aggressive group (n = 10)	*P*-value	Reference range
Lymphocyte ($\times 10^9$/L)	3.02 ± 5.02	2.69 ± 3.75	0.842	1.05-5.1
Eosinophil ($\times 10^9$/L)	0.30 ± 0.36	0.16 ± 0.10	0.842	0.06-1.23
Platelet ($\times 10^9$/L)	249.89 ± 145.61	295.90 ± 161.19	0.542	148-484
Fibrinogen (g/L)	5.12 ± 2.16	4.07 ± 1.70	0.333	2.0-4.0
Glucose (mg/dL)	123.78 ± 55.37	99.00 ± 13.92	0.188	70-143
Blood urea nitrogen(mg/dL)	26.78 ± 20.87	19.30 ± 15.69	0.278	7-27
Creatinine (mg/dL)	1.16 ± 0.78	0.86 ± 0.30	0.312	0.5-1.8
Albumin (g/dL)	3.06 ± 0.32	3.22 ± 0.47	0.392	2.2-3.9
Globulin (g/dL)	3.87 ± 1.21	3.72 ± 0.60	0.780	2.5-4.5
Ionized calcium (mmol/L)	1.27 ± 0.06	1.30 ± 0.05	0.250	1.12-1.42
Lactate (mmol/L)	2.24 ± 1.96	1.60 ± 0.52	0.965	0.5-2.5

[0072] **<실험예 4> 공격적 종양(aggressive tumor) 그룹과 비공격적 종양(non-aggressive tumor)그룹의 박테리아 다양성(Bacterial diversity) 및 분변 미생물군 구성**

[0073] 공격적 종양(aggressive tumor) 그룹과 비공격적 종양(non-aggressive tumor) 그룹의 미생물 다양성을 비교하였다.

[0074] 도 12에 공격적 종양(aggressive tumor) 그룹과 비공격적 종양(non-aggressive tumor) 그룹의 α-diversity를 나타내었다. OTUs, ACE, Chao1, JackKnife 지수가 공격적 종양(aggressive tumor) 그룹에서 낮게 나타나 종 풍부도(richness)가 낮은 것으로 확인되었으며, Simpson 지수는 공격적 종양(aggressive tumor) 그룹에서 높게 나타나 종 균일도(evenness)는 높은 것으로 확인되었다. 즉, 미생물 종 다양성을 나타내는 α-diversity는 공격적 종양 그룹이 비공격적 종양 그룹에 비해 현저하게 낮은 것으로 나타났다. 도 13에 속(genus) 수준에서 공격적 종양(aggressive tumor) 그룹과 비공격적 종양(non-aggressive tumor) 그룹의 미생물군 구성을 비교한 결과를 나타내었다. Bacteroides, Butyricicoccus, Longicatena, Enterococcus, Eggerthella는 공격적 종양(aggressive tumor) 그룹에서 증가하였으며, Faecalimonas, Clostridium는 비공격적 종양(non-aggressive tumor) 그룹에서 증가하는 것으로 나타났다.

[0076] **<실험예 5> B세포 기원 림프종과 T세포 기원 림프종의 임상적 특징 및 미생물 구성 비교**

[0077] 표 8에 B세포 기원 림프종 그룹과 T세포 기원 림프종 그룹의 림프종 stage와 면역 표현형(immunophenotype) 등을 나타내었다.

표 8

[0079]

No	Breed	Sex	Age	Immunophenotyping	Anatomic	Stage	Response to therapy	Survival time (days)	Progression
B-cell origin lymphoma (n = 3)									

3	Maltese	SF	11	CD3-/CD21+	Multicentric	IVb	PR	240	Aggressive
6	Dachshund	SF	10	CD3-/CD21+/CD79a-	Multicentric	IVa	CR	Alive until present	Non-aggressive
7	Maltese	NM	7	CD3-/CD21+	Multicentric	IVb		Unknown	Aggressive
T-cell origin lymphoma (n = 5)									
1	Dogo Canario	SF	7	CD3+/CD21-	Multicentric	IVb	PD	3	Aggressive
2	Coton de tulear	SF	8	CD3+/CD21-	Multicentric	Vb	CR	Alive until present	Non-aggressive
4	Mixed	SF	9	CD3+/CD79a-	Subcutaneous, disseminated		PR	41	Aggressive
5	Mixed	SF	16	CD3+/CD21+/CD79a-	Multicentric	IVb	PR	99	Aggressive
8	Golden Retriever	SF	11	CD3+/CD21+	Multicentric			88	Non-aggressive

[0081] 림프종 그룹의 3마리는 림프절 세침흡인검사(lymph node fine needle aspiration samples)에서 CD3-/CD21+로 나타나 다심성(multicentric) B세포 기원으로 진단되었다. 4마리는 CD3+/CD21- 또는 CD79a-로 나타나 다심성(multicentric) T세포 기원으로 진단되었고, 1마리는 피하 결절, 골격근, 장 점막 및 장막, 오른쪽 눈의 홍채 및 모양체, 방광의 점막하부의 부검 샘플의 면역조직화학을 통해 CD3+/CD79a- 파종성 T세포 림프종으로 진단되었다. 도 14에 B세포 기원 림프종 그룹과 T세포 기원 림프종 그룹의 생존곡선을 나타내었다. 평균 생존 시간에는 큰 차이가 없었다. 표 9에 임상병리학적 분석 결과를 나타내었다. 그룹의 마리수가 적어 임상병리학적 분석 결과간의 차이는 통계적으로 유의하지는 않았다.

표 9

[0083]

Variables	B-cell lymphoma (n = 3)	T-cell lymphoma (n = 5)	*P*-value	Reference range
White blood cell ($\times 10^9$/L)	11.07 ± 4.09	18.47 ± 9.93	0.393	5.05-16.76
Neutrophil ($\times 10^9$/L)	8.60 ± 3.71	12.62 ± 8.93	1.000	2.95-11.64
Lymphocyte ($\times 10^9$/L)	1.31 ± 0.98	3.84 ± 5.33	0.571	1.05-5.1
Eosinophil ($\times 10^9$/L)	0.44 ± 0.57	0.14 ± 0.13	0.571	0.06-1.23
Platelet ($\times 10^9$/L)	209.33 ± 124.50	234.20 ± 134.59	1.000	148-484
Hematocrit (%)	37.03 ± 4.03	38.44 ± 7.72	0.571	37.3-61.7
Fibrinogen (g/L)	4.19 ± 0.59	3.35 ± 0.57	0.190	2.0-4.0
Glucose (mg/dL)	105.00 ± 19.08	94.40 ± 15.92	0.571	70-143
Blood urea nitrogen (mg/dL)	16.33 ± 6.66	31.40 ± 28.04	0.786	7-27
Creatinine (mg/dL)	0.50 ± 0.10	1.34 ± 0.94	0.143	0.5-1.8
Albumin (g/dL)	2.97 ± 0.47	2.96 ± 0.49	0.786	2.2-3.9
Globulin (g/dL)	3.03 ± 0.40	3.60 ± 1.16	0.571	2.5-4.5
Ionized calcium (mmol/L)	1.29 ± 0.07	1.23 ± 0.07	0.229	1.12-1.42
Lactate (mmol/L)	2.47 ± 0.97	1.60 ± 0.64	0.400	0.5-2.5

[0085] 도 15에 B세포 기원 림프종 그룹과 T세포 기원 림프종 그룹의 α-diversity를 나타내었다. B세포 기원 림프종 그룹이 Simpson 지수가 비교적 높아 종 균일도(evenness)가 높은 것으로 나타났으나 이외의 지표에서는 유의미한 차이가 없어, 종 풍부도(richness)에는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 도 16에 문(phylum) 수준에서 B세포 기원 림프종 그룹과 T세포 기원 림프종 그룹의 미생물군 구성을 비교한 결과를 나타내었다. Proteobacteria, Bacteroidetes는 B세포 기원 림프종 그룹에서 증가하였으며, Fusobacteria, Actinobacteria는 T세포 기원 림프종 그룹에서 증가하였다. 도 17에 속(genus) 수준에서 B세포 기원 림프종 그룹과 T세포 기원 림프종 그룹의 미생물군 구성을 비교한 결과를 나타내었다. *Blautia*, *Bacteroides*, *Veillonella*, *Longicatena*, *Escherichia coli*는 B세포 기원 림프종 그룹에서 증가하였으며, *Clostridium*, *Coprococcus*, *Fusobacterium*, *Clostridioides*, *Butyricicoccus*, *Eggerthella*, *Faecalimonas*는 T세포 기원 림프종 그룹에서 증가하였다.

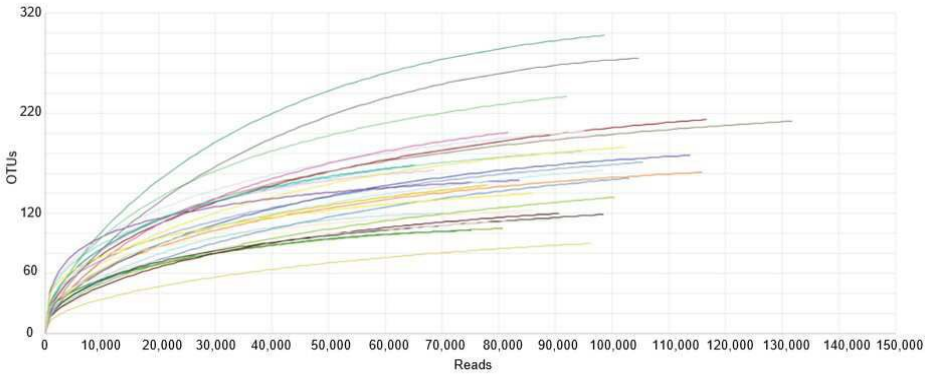
[0087] **<실험예 6> 피어슨(Spearman) 상관계수 분석에 의한 상관성 분석**

[0088] 분변 미생물군유전체(microbiota)의 특정 구성과 임상병리학적 데이터의 상관관계를 확인하기 위해 피어슨 상관계수 분석(Spearman's rank correlation coefficient analysis)을 수행하여 도 18 내지 20에 결과를 기재하였다.

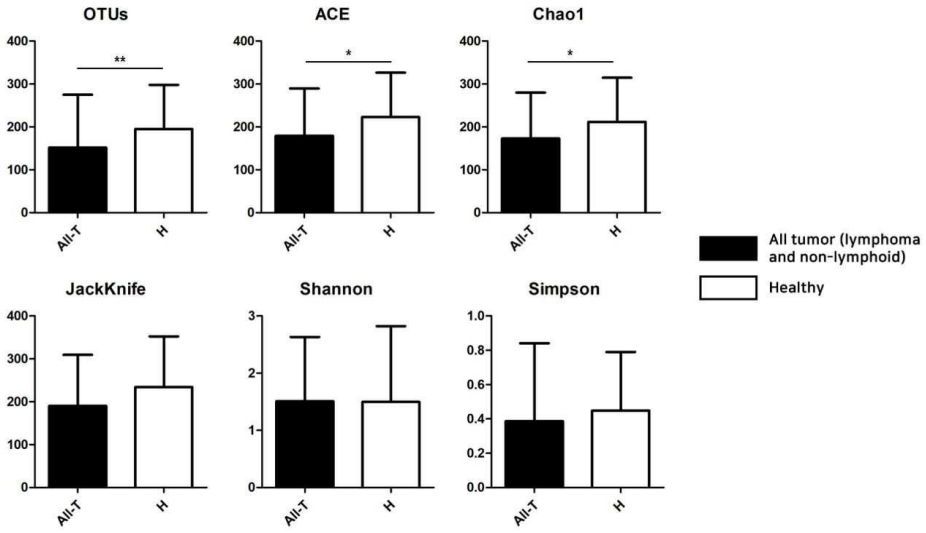
[0089] 도 18에서 보듯이, 문(phylum) 수준에서, Bacteroidetes와 혈청 포도당(serum glucose) 농도, Actinobacteria와 림프구(lymphocyte) 수, Fusobacteria와 혈청 포도당(serum glucose) 농도가 상관관계를 보였다. 도 19에서 보듯이, 속(genus) 수준에서, 림프구(lymphocyte) 수는 *Klebsiella*, *Butyricicoccus*, *Enterobacteriaceae*, *Turicibacter*와 상관관계를 보였으며, 총 백혈구(WBC) 수는 *Blautia*와 상관관계를 보였다. 헤마토크릿(Hematocrit)은 *Enterobacter*, *Actinomyces*와 상관관계를 보였으며, 혈소판(Platelet) 수는 *Klebsiella*, *Coprococcus*, *Enterobacteriaceae*와 상관관계를 보였다. 피브리노겐(Fibrinogen) 농도는 *Clostridium*과 상관관계를 보였다. 도 20에서 보듯이, 속(genus) 수준에서, 혈청 크레아티닌(Serum creatinine)은 *Eggerthella*, *Corynebacterium*과 상관관계를 보였으며, 혈청 글로불린(Serum globulin) 농도는 *Klebsiella*, *Enterobacteriaceae*와 상관관계를 보였다. 혈청 포도당(serum glucose) 농도는 *Bacteroides*, *Rummeliibacillus*, *Fusobacterium*와 상관관계를 보였다. 정맥혈 가스 분석에 의한 젖산(Lactate) 농도는 *Blautia*, *Paeniclostridium*과 상관관계를 보였고, 이온화된 칼슘 농도는 *Klebsiella*, *Eggerthella*, *Pediococcus*와 상관관계를 보였다.

도면

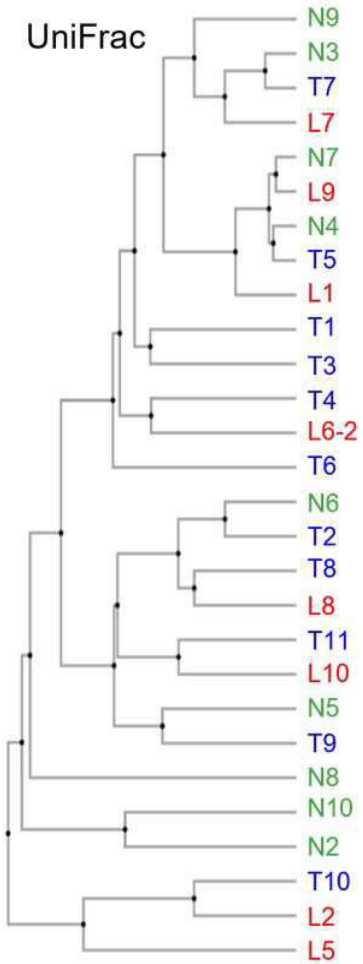
도면1



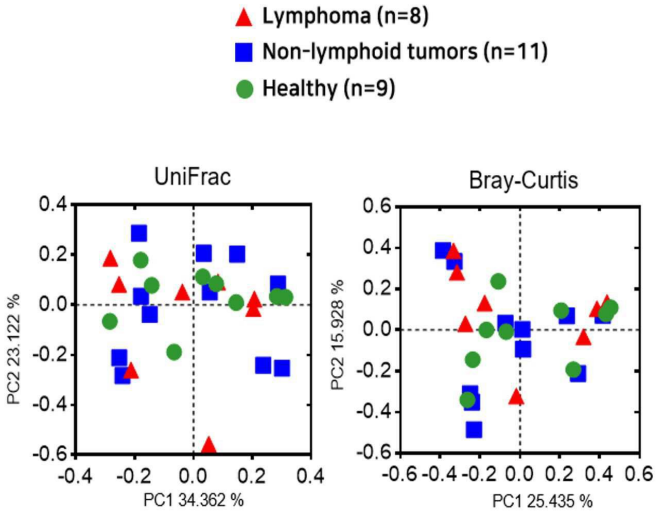
도면2


OTUs
ACE
Chao1
JackKnife
Shannon
Simpson
All-T
H
All tumor (lymphoma and non-lymphoid)
Healthy

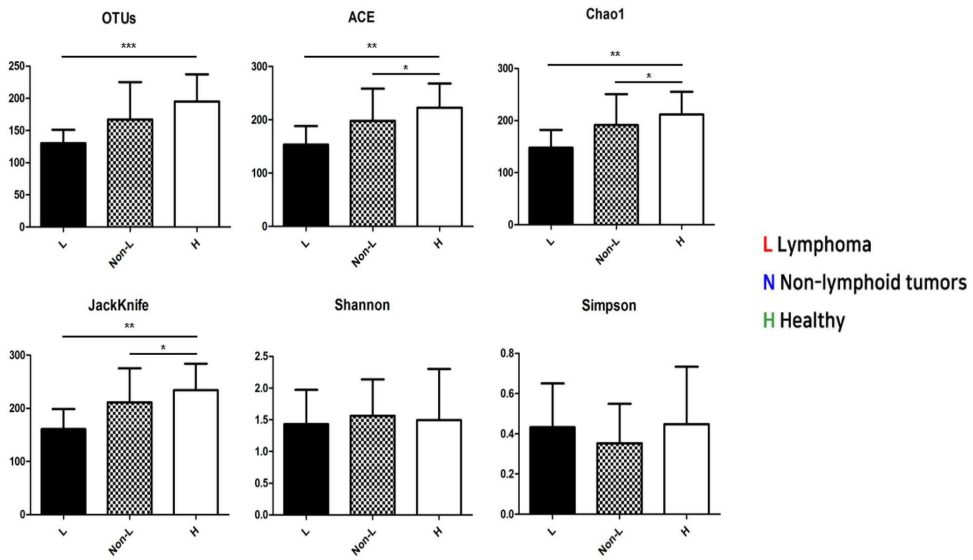
도면3


UniFrac
N9
N3
T7
L7
N7
L9
N4
T5
L1
T1
T3
T4
L6-2
T6
N6
T2
T8
L8
T11
L10
N5
T9
N8
N10
N2
T10
L2
L5

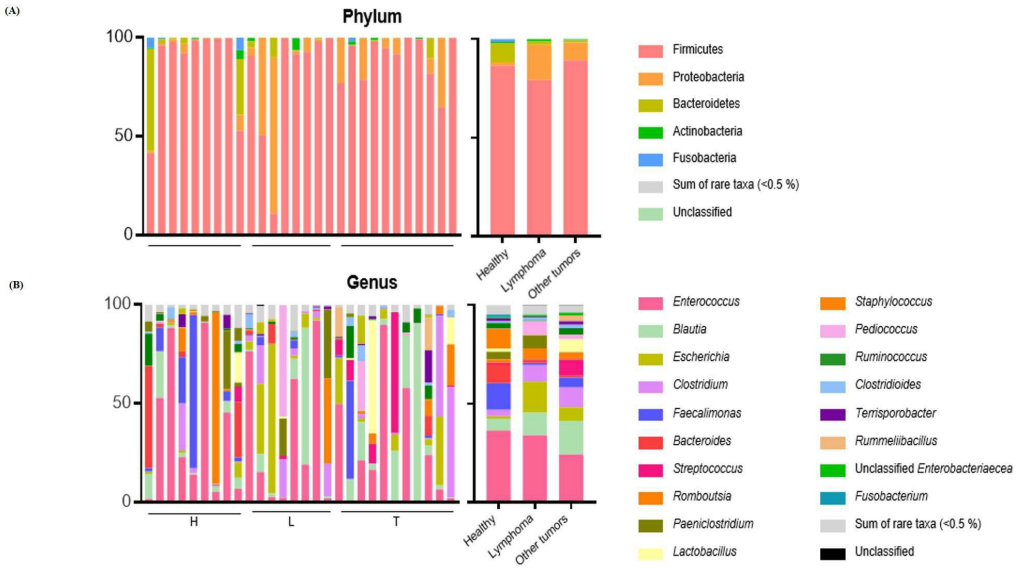
도면4


Lymphoma (n=8)
Non-lymphoid tumors (n=11)
Healthy (n=9)
UniFrac
Bray-Curtis
PC2 23.122 %
PC1 34.362 %
PC2 15.928 %
PC1 25.435 %

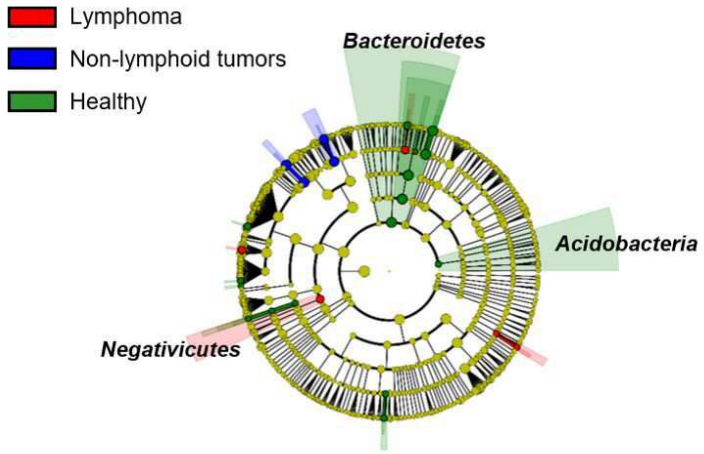
도면5


OTUs
ACE
Chao1
JackKnife
Shannon
Simpson
L
Non-L
H
L Lymphoma
N Non-lymphoid tumors
H Healthy

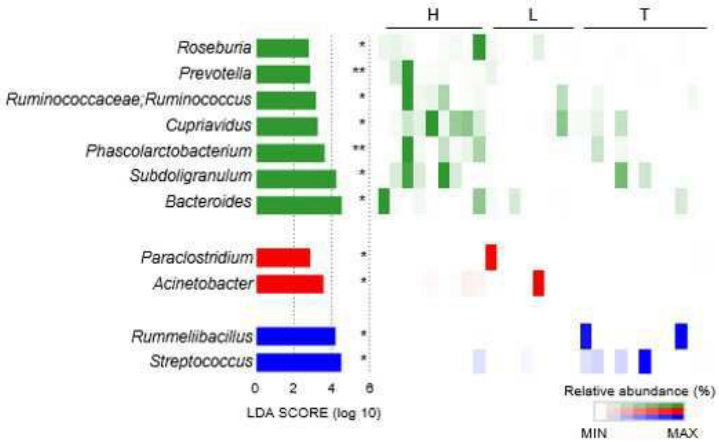
도면6


(A)
Phylum
100
50
0
Healthy
Lymphoma
Other tumors
Firmicutes
Proteobacteria
Bacteroidetes
Actinobacteria
Fusobacteria
Sum of rare taxa (<0.5 %)
Unclassified
(B)
Genus
100
50
0
H
L
T
Healthy
Lymphoma
Other tumors
Enterococcus
Blautia
Escherichia
Clostridium
Faecalimonas
Bacteroides
Streptococcus
Romboutsia
Paeniclostridium
Lactobacillus
Staphylococcus
Pediococcus
Ruminococcus
Clostridioides
Terrisporobacter
Rummeliibacillus
Unclassified Enterobacteriaecea
Fusobacterium
Sum of rare taxa (<0.5 %)
Unclassified

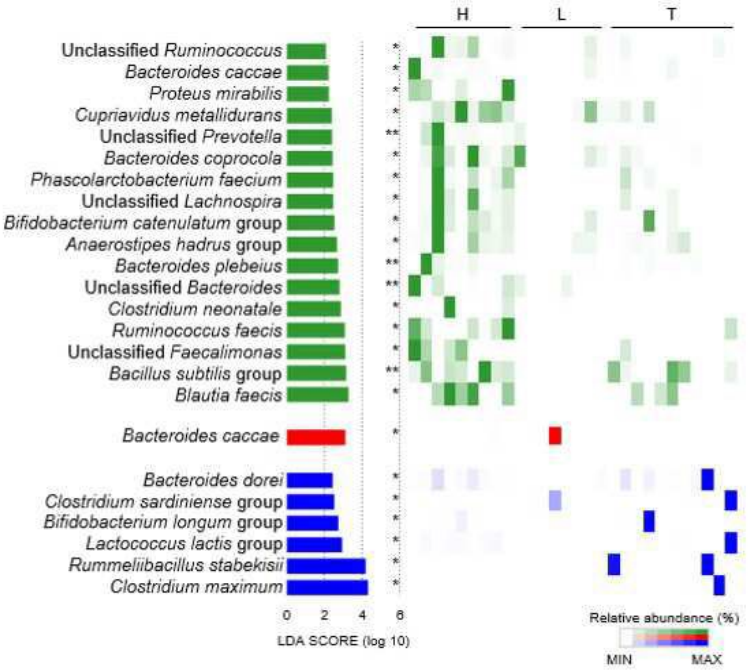
도면7


Lymphoma
Non-lymphoid tumors
Healthy
Bacteroidetes
Acidobacteria
Negativicutes

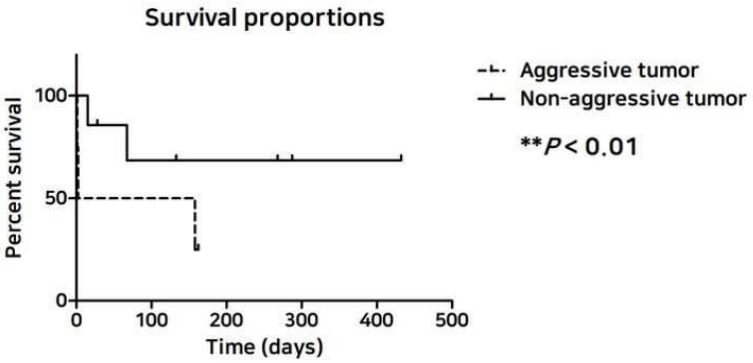
도면8


H
L
T
Roseburia
Prevotella
Ruminococcaceae;Ruminococcus
Cupriavidus
Phascolarctobacterium
Subdoligranulum
Bacteroides
Paraclostridium
Acinetobacter
Rummeliibacillus
Streptococcus
0
2
4
6
LDA SCORE (log 10)
Relative abundance (%)
MIN
MAX

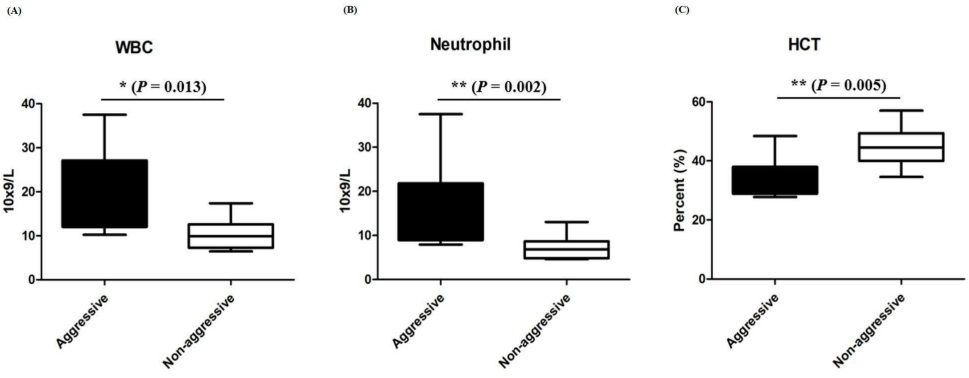
도면9



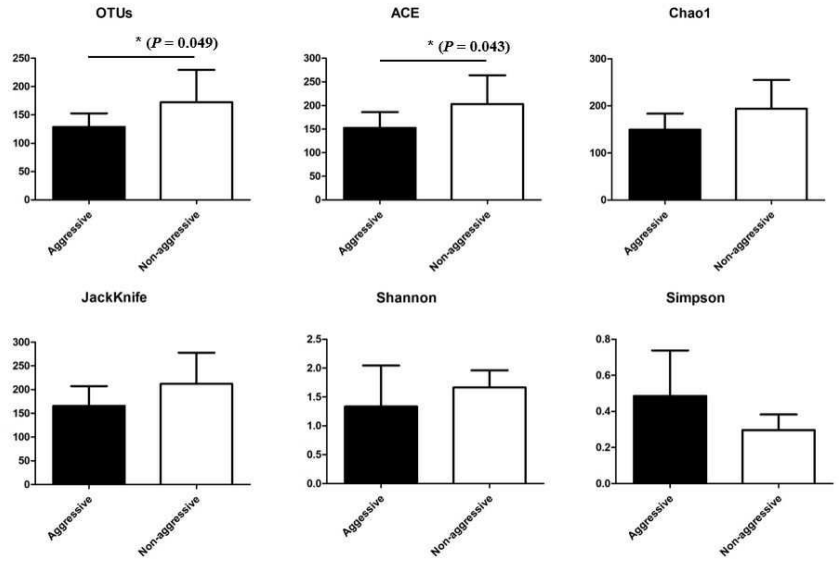
도면10



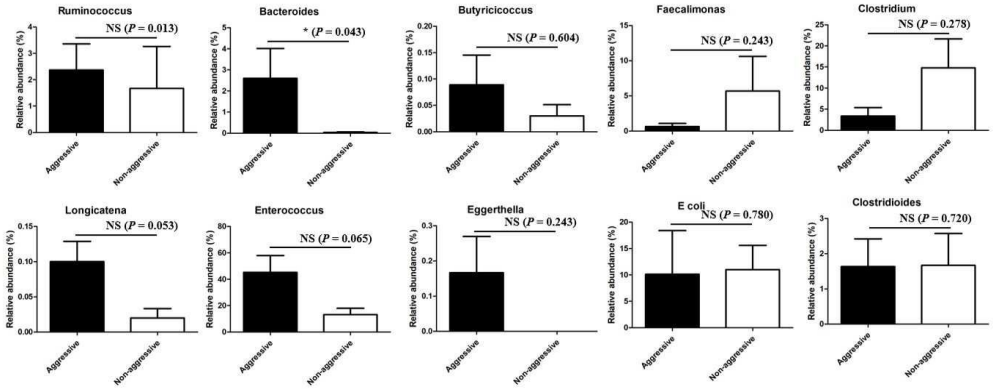
도면11



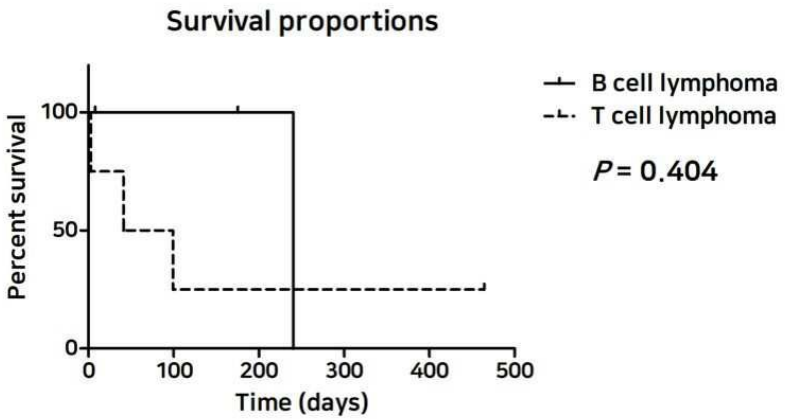
도면12



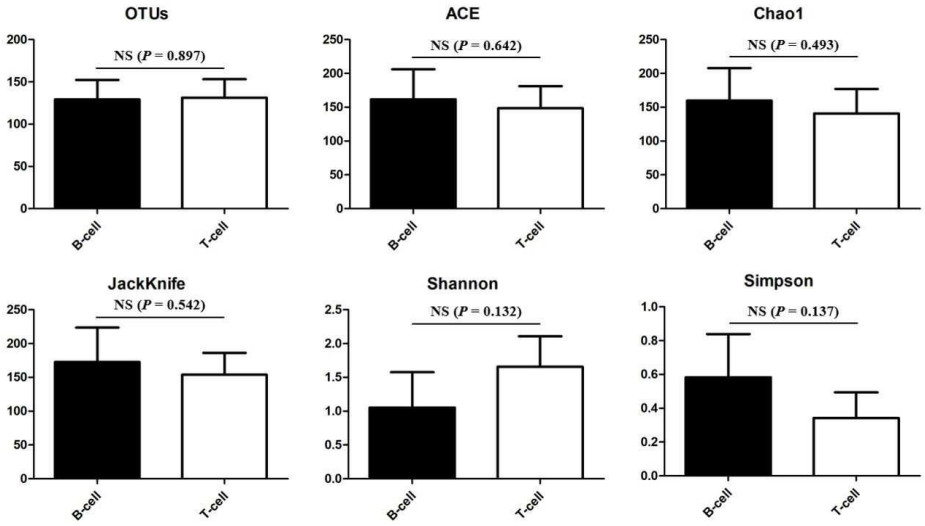
도면13



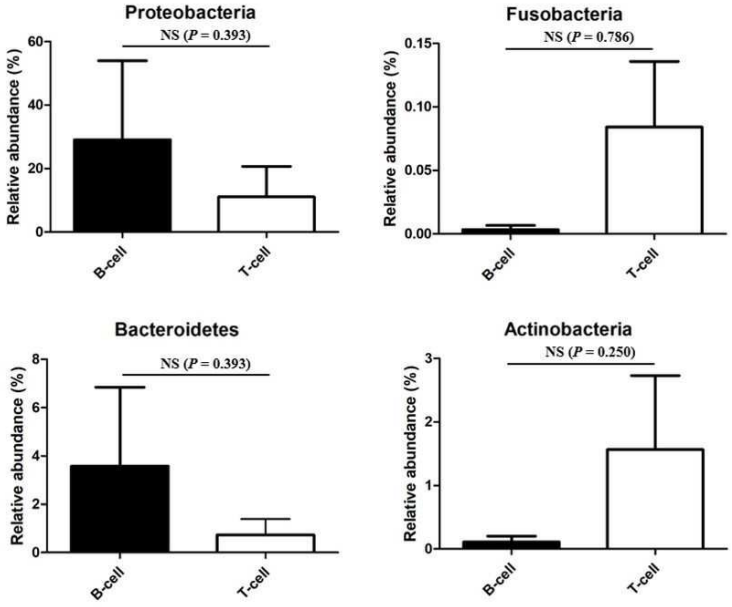
도면14



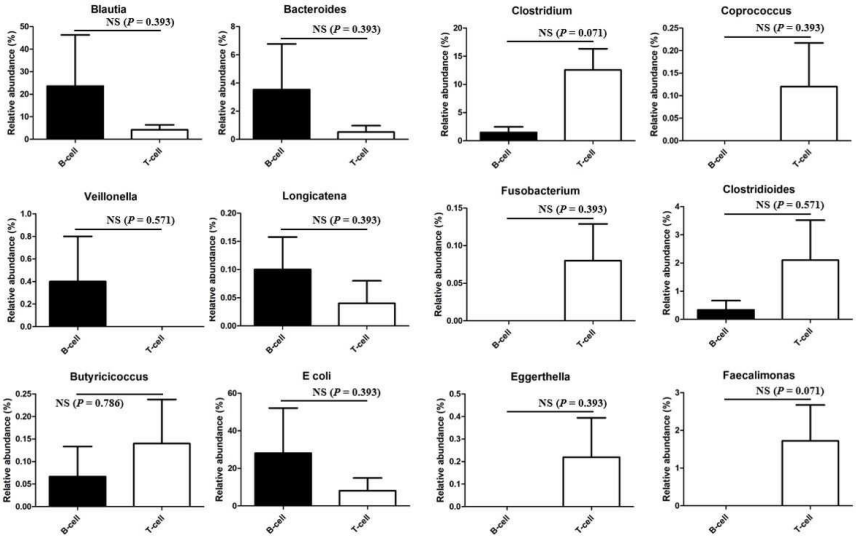
도면15


OTUs
NS (P = 0.897)
ACE
NS (P = 0.642)
Chao1
NS (P = 0.493)
JackKnife
NS (P = 0.542)
Shannon
NS (P = 0.132)
Simpson
NS (P = 0.137)
B-cell
T-cell

도면16


Proteobacteria
NS (P = 0.393)
Fusobacteria
NS (P = 0.786)
Bacteroidetes
NS (P = 0.393)
Actinobacteria
NS (P = 0.250)
Relative abundance (%)
B-cell
T-cell

도면17



도면18

Variables	White blood cell		Neutrophils		Lymphocytes		Hematocrit		Platelets		Fibrinogen	
	rho	*P*-value	rho	*P*-value	rho	*P*-value	rho	*P*-value	rho	*P*-value	rho	*P*-value
Firmicutes	0.140	0.566	0.056	0.821	-0.385	0.104	0.132	0.591	0.108	0.658	0.405	0.151
Bacteroidetes	0.229	0.346	0.274	0.257	0.148	0.546	-0.107	0.662	-0.363	0.127	0.349	0.221
Proteobacteria	-0.151	0.537	-0.089	0.718	0.375	0.114	-0.179	0.463	-0.001	0.997	-0.372	0.190
Fusobacteria	0.023	0.924	0.156	0.524	0.086	0.726	-0.021	0.930	-0.357	0.134	0.066	0.822
Actinobacteria	-0.298	0.215	-0.175	0.473	-0.557*	0.013	0.387	0.101	0.273	0.259	-0.029	0.923
Acidobacteria	-0.301	0.210	-0.258	0.286	-0.215	0.376	0.490*	0.033	0.258	0.286	-	-
Saccharibacteria_TM7	-0.571*	0.011	-0.445	0.056	-0.460	0.048	0.608**	0.006	0.192	0.431	-0.494	0.073

Variables	Ionized calcium		Creatinine		Blood urea nitrogen		Albumin		Globulin		Glucose		Lactate	
	rho	*P*-value	rho	*P*-value	rho	*P*-value	rho	*P*-value	rho	*P*-value	rho	*P*-value	rho	*P*-value
Firmicutes	0.292	0.239	0.051	0.836	-0.221	0.364	-0.008	0.976	0.373	0.116	-0.253	0.297	-0.137	0.588
Bacteroidetes	-0.178	0.481	0.254	0.294	0.372	0.117	0.155	0.527	-0.009	0.970	0.686**	0.001	0.214	0.394
Proteobacteria	-0.160	0.526	-0.218	0.370	0.097	0.692	-0.006	0.980	-0.427	0.068	0.215	0.377	0.138	0.584
Fusobacteria	-0.083	0.742	0.378	0.110	0.391	0.098	0.092	0.708	0.178	0.465	0.553*	0.014	-0.062	0.807
Actinobacteria	-0.127	0.615	0.356	0.135	0.225	0.355	0.181	0.459	0.375	0.114	0.105	0.670	-0.248	0.320
Acidobacteria	-0.127	0.615	0.260	0.282	0.259	0.284	-0.087	0.725	0.173	0.480	-0.129	0.598	0.023	0.926
Saccharibacteria_TM7	-0.077	0.761	0.247	0.308	0.264	0.274	0.159	0.514	0.158	0.519	-0.007	0.976	0.020	0.937

도면19

Variables	White blood cell		Neutrophils		Lymphocytes		Hematocrit		Platelets		Fibrinogen	
	rho	*P*-value	rho	*P*-value	rho	*P*-value	rho	*P*-value	Rho	*P*-value	rho	*P*-value
Proteus	0.387	0.101	0.387	0.101	0.387	0.101	-0.344	0.149	-0.387	0.101	-	-
Pantoea	-0.178	0.466	-0.239	0.324	0.384	0.105	-0.304	0.206	-0.390	0.099	-0.227	0.435
Klebsiella	0.162	0.508	0.079	0.748	0.576**	0.010	-0.377	0.111	-0.627**	0.004	-0.378	0.182
Enterobacter	0.255	0.291	0.285	0.238	0.077	0.753	-0.566*	0.012	-0.019	0.937	-0.130	0.658
Helicobacter	-0.258	0.286	-0.129	0.598	-0.172	0.481	0.344	0.149	-0.258	0.286	-	-
Veillonella	0.043	0.861	0.000	1.000	0.258	0.286	-0.258	0.286	-0.344	0.149	-	-
Longicatena	0.111	0.652	0.285	0.237	0.032	0.898	-0.055	0.822	-0.396	0.093	0.242	0.405
Butyricicoccus	-0.186	0.446	-0.079	0.747	-0.500*	0.029	0.060	0.807	0.358	0.132	-0.199	0.496
Coprococcus	-0.132	0.591	-0.058	0.814	0.106	0.666	0.171	0.484	-0.523*	0.021	-0.462	0.097
Eggerthella	0.112	0.648	0.238	0.327	-0.106	0.665	0.077	0.753	-0.064	0.796	0.083	0.779
Corynebacterium	-0.157	0.522	0.000	1.000	-0.219	0.367	0.219	0.367	0.063	0.799	0.101	0.730
Actinomyces	-0.432	0.065	-0.225	0.354	-0.400	0.090	0.587**	0.008	0.039	0.873	0.069	0.816
Enterococcus	0.255	0.291	0.378	0.111	-0.123	0.616	-0.303	0.208	0.076	0.759	-0.011	0.970
Blautia	-0.499*	0.030	-0.317	0.187	0.053	0.830	0.207	0.395	-0.205	0.401	0.297	0.303
Ecoli	-0.079	0.747	-0.026	0.916	0.408	0.083	-0.185	0.450	0.000	1.000	-0.258	0.373
Clostridium	-0.065	0.791	-0.272	0.260	-0.215	0.376	0.004	0.989	0.046	0.852	-0.669**	0.009
Faecalimonas	-0.125	0.611	-0.135	0.581	0.211	0.385	0.288	0.231	-0.249	0.304	-0.469	0.091
Bacteroides	0.314	0.190	0.417	0.076	0.112	0.648	-0.190	0.436	-0.349	0.143	0.161	0.582
Streptococcus	-0.181	0.458	0.053	0.829	-0.215	0.376	0.442	0.058	0.343	0.150	0.383	0.177
Romboutsia	0.018	0.943	-0.320	0.181	0.324	0.176	0.061	0.806	-0.225	0.355	-0.253	0.383
Paeniclostridium	0.385	0.104	0.096	0.695	0.254	0.293	-0.117	0.634	-0.121	0.621	-0.395	0.162
Lactobacillus	-0.202	0.408	-0.091	0.711	-0.440	0.059	0.300	0.212	0.160	0.513	0.032	0.912
Staphylococcus	-0.086	0.726	-0.043	0.861	-0.086	0.726	0.172	0.481	-0.108	0.661	0.310	0.281
Pediococcus	0.189	0.437	0.276	0.253	-0.155	0.526	-0.293	0.224	0.324	0.177	-0.064	0.827
Ruminococcus	-0.082	0.740	0.110	0.654	-0.033	0.893	0.121	0.621	-0.352	0.140	0.049	0.869
Clostridioides	0.059	0.810	0.220	0.366	0.022	0.929	-0.090	0.713	-0.343	0.151	0.297	0.302
Terrisporobacter	0.233	0.337	-0.022	0.928	0.305	0.204	-0.080	0.745	-0.296	0.219	-0.275	0.341
Rummeliibacillus	0.249	0.305	0.325	0.175	0.363	0.126	-0.192	0.431	-0.054	0.827	0.103	0.726
Enterobacteriaceae_g	0.010	0.968	-0.032	0.897	0.517*	0.024	-0.455	0.050	-0.502*	0.029	-0.177	0.546
Fusobacterium	0.054	0.825	0.190	0.435	0.025	0.919	0.015	0.952	-0.435	0.063	-0.129	0.661
Turicibacter	0.055	0.822	0.077	0.755	0.467*	0.044	-0.132	0.590	-0.232	0.338	-0.203	0.487

도면20

Variables	Ionized calcium		Creatinine		Blood urea nitrogen		Albumin		Globulin		Glucose		Lactate	
	rho	*P*-value	rho	*P*-value	rho	*P*-value	rho	*P*-value	rho	*P*-value	rho	*P*-value	rho	*P*-value
Proteus	-0.094	0.710	0.152	0.535	0.216	0.374	0.043	0.860	-0.281	0.245	0.388	0.101	0.399	0.101
Pantoea	-0.241	0.334	-0.077	0.755	0.183	0.453	-0.283	0.240	-0.434	0.063	-0.131	0.594	0.056	0.826
Klebsiella	-0.504*	0.033	-0.102	0.676	0.137	0.575	-0.425	0.070	-0.620**	0.005	-0.025	0.919	0.455	0.058
Enterobacter	0.243	0.332	0.073	0.766	0.265	0.273	0.068	0.782	-0.280	0.245	0.252	0.297	0.022	0.931
Helicobacter	0.047	0.853	-0.152	0.535	-0.346	0.147	0.130	0.596	0.216	0.375	0.258	0.285	-0.070	0.781
Veillonella	-0.306	0.217	-0.152	0.535	0.173	0.479	-0.324	0.175	-0.388	0.100	0.022	0.930	0.305	0.218
Longicatena	-0.294	0.236	0.160	0.514	0.254	0.293	0.199	0.414	-0.306	0.203	0.353	0.139	0.292	0.240
Butyricicoccus	0.156	0.536	-0.147	0.547	-0.024	0.923	-0.315	0.189	-0.058	0.814	-0.260	0.283	-0.057	0.822
Coprococcus	-0.349	0.156	0.081	0.741	0.002	0.992	-0.025	0.918	-0.261	0.280	0.108	0.659	0.247	0.324
Eggerthella	-0.513*	0.029	0.632**	0.004	0.419	0.074	-0.005	0.984	0.241	0.320	0.077	0.755	-0.337	0.172
Corynebacterium	-0.343	0.163	0.505*	0.027	0.251	0.299	0.079	0.749	0.000	1.000	-0.016	0.949	-0.068	0.787
Actinomyces	-0.124	0.623	0.444	0.057	0.178	0.466	0.106	0.665	0.189	0.439	0.053	0.829	-0.047	0.853
Enterococcus	0.261	0.296	-0.023	0.926	0.278	0.250	0.108	0.660	0.103	0.676	0.307	0.201	0.012	0.961
Blautia	-0.101	0.691	0.171	0.484	-0.036	0.883	0.058	0.813	0.146	0.552	-0.124	0.613	-0.532*	0.023
Ecoli	-0.292	0.240	-0.259	0.285	-0.003	0.991	-0.099	0.685	-0.336	0.159	0.120	0.626	0.078	0.760
Clostridium	-0.137	0.588	0.000	0.999	0.227	0.350	-0.034	0.890	-0.215	0.377	-0.441	0.059	0.155	0.539
Faecalimonas	-0.190	0.450	0.290	0.228	0.120	0.624	0.185	0.447	0.060	0.808	0.217	0.373	0.141	0.578
Bacteroides	-0.228	0.363	0.107	0.662	0.357	0.134	0.021	0.930	-0.110	0.655	0.628**	0.004	0.276	0.267
Streptococcus	0.305	0.219	0.130	0.595	-0.182	0.457	0.296	0.218	0.304	0.206	0.017	0.945	-0.245	0.326
Romboutsia	-0.040	0.875	0.414	0.078	0.360	0.130	0.005	0.984	0.092	0.708	-0.117	0.633	0.178	0.479
Paeniclostridium	0.112	0.657	0.169	0.488	-0.005	0.982	0.122	0.618	-0.418	0.075	-0.113	0.644	0.490*	0.039
Lactobacillus	0.096	0.705	0.025	0.920	0.000	1.000	-0.261	0.281	0.236	0.332	-0.220	0.365	0.078	0.758
Staphylococcus	-0.094	0.710	0.152	0.535	0.108	0.660	-0.173	0.479	0.302	0.209	-0.237	0.329	0.164	0.515
Pediococcus	0.480*	0.044	-0.067	0.785	-0.027	0.912	0.182	0.456	-0.016	0.948	-0.102	0.677	-0.284	0.253
Ruminococcus	-0.426	0.078	0.409	0.082	0.319	0.184	-0.011	0.963	0.149	0.542	0.186	0.446	-0.068	0.790
Clostridioides	-0.028	0.911	0.293	0.223	0.298	0.215	0.194	0.426	0.383	0.105	0.427	0.068	-0.269	0.281
Terrisporobacter	0.289	0.245	0.183	0.452	0.173	0.478	0.185	0.448	-0.241	0.320	0.062	0.800	0.290	0.242
Rummeliibacillus	0.355	0.148	0.221	0.364	0.153	0.533	0.444	0.057	-0.167	0.495	0.484*	0.036	0.251	0.316
Enterobacteriaceae_g	-0.163	0.517	0.058	0.813	0.306	0.202	-0.145	0.555	-0.479*	0.038	0.123	0.616	0.176	0.485
Fusobacterium	-0.136	0.592	0.427	0.068	0.377	0.111	0.282	0.243	0.103	0.674	0.496*	0.031	-0.083	0.744
Turicibacter	0.024	0.924	0.114	0.642	0.240	0.323	-0.019	0.938	-0.424	0.070	0.179	0.463	0.435	0.071