

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0004233

(43) 공개일자 2022년01월11일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A23L 33/135* (2016.01)
A61K 35/747 (2014.01) *C12R 1/225* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2021.05)
A23L 33/135 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2022-0000928(분할)
 (22) 출원일자 2022년01월04일
 심사청구일자 2022년01월04일
- (62) 원출원 특허 10-2021-0067851
 원출원일자 2021년05월26일
 심사청구일자 2021년05월26일
- (30) 우선권주장
 1020170127422 2017년09월29일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
 경희대학교 산학협력단
 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
- 주식회사 네비팜
 경기도 수원시 장안구 장안로448번길 5 (이목동)
- (72) 발명자
 김동현
 서울특별시 성북구 선잠로 92-24 (성북동)
- 한명주
 서울특별시 성북구 선잠로 92-24 (성북동)
- (74) 대리인
 김경교, 양용

전체 청구항 수 : 총 17 항

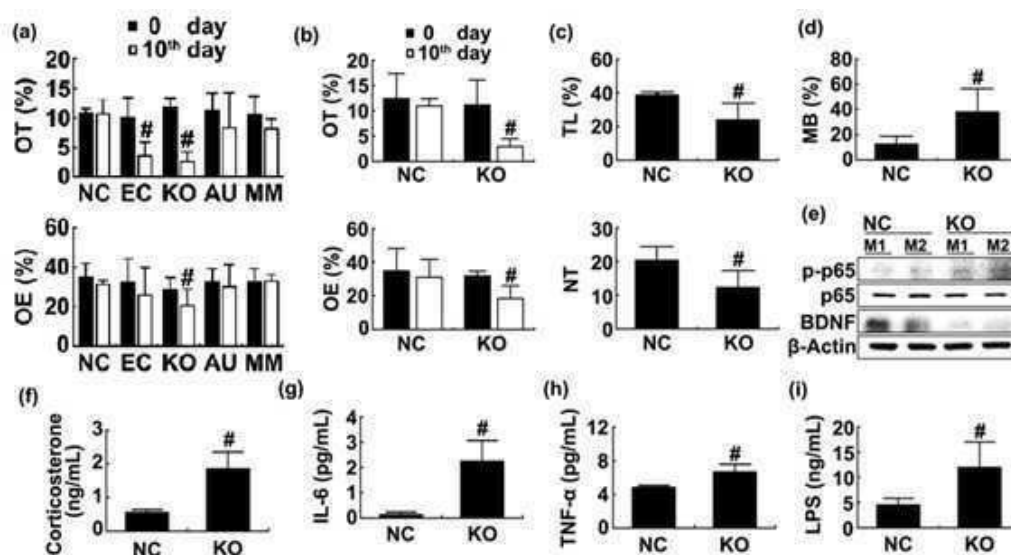
(54) 발명의 명칭 신규 유산균 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 신규한 유산균에 관한 것으로, 구체적으로 신규 유산균인 락토바실러스 루테리 NK33 (*Lactobacillus reuteri* NK33) KCCM12090P 또는 비피도박테리움 아도레센티스 NK98(*Bifidobacterium adolescentis* NK98) KCCM 12297P를 포함하는 뇌신경정신질환 또는 염증 질환의 예방 및 치료에 유용한 조성물에 관한 것이다.

또한, 본 발명은 장내 미생물의 수준을 측정하는 제제를 포함하는 뇌신경정신질환 진단용 조성물, 이를 포함하는 키트 및 장내 미생물의 수준을 측정하는 단계를 포함하는 뇌신경정신질환의 진단 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도11



(52) CPC특허분류

A61K 35/747 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/322 (2013.01)

A23Y 2220/71 (2013.01)

C12R 2001/225 (2021.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711057531
과제번호	2017R1A5A2014768
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원
연구과제명	뉴로바이오타 연구센터
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교
연구기간	2017.06.01 ~ 2018.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

장내 미생물의 수준을 측정하는 제제를 포함하는 뇌신경정신질환 진단용 조성물로서, 상기 장내 미생물은 박테로이데테스균(bacteroidetes), 방선균류(Actinobacteria), 피르미쿠테스(Firmicutes), 비피더스균(Bifidobacteria), 젖산균(Lactobacilli), β -프로테오박테리아(Proteobacteria), δ -프로테오박테리아(Proteobacteria), γ -프로테오박테리아(Proteobacteria), ϵ -프로테오박테리아(Proteobacteria) 및 장내세균(Enterobacteriaceae)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인, 뇌신경정신질환 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 장내 미생물 중 β -프로테오박테리아(Proteobacteria), δ -프로테오박테리아(Proteobacteria), γ -프로테오박테리아(Proteobacteria), ϵ -프로테오박테리아(Proteobacteria) 및 장내세균(Enterobacteriaceae)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 수준이 증가하는 경우 뇌신경정신질환으로 진단하는, 뇌신경정신질환 진단용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 장내세균은 클렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*), 대장균(*Escherichia coli*) 및 모르가넬라 모르가니균(*Morganella morganii*)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인, 뇌신경정신질환 진단용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물은 장내 미생물 중 박테로이데테스균(bacteroidetes), 방선균류(Actinobacteria), 피르미쿠테스(Firmicutes), 비피더스균(Bifidobacteria) 및 젖산균(Lactobacilli)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 수준이 감소하는 경우 뇌신경정신질환으로 진단하는, 뇌신경정신질환 진단용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 젖산균은 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*), 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*), 락토바실러스 람노시스(*Lactobacillus rhamnosus*)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상이고, 상기 비피더스균은 비피도박테리움 애니말리스(*Bifidobacterium animalis*)인, 뇌신경정신질환 진단용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 조성물은 장내 미생물 중 β -프로테오박테리아(Proteobacteria), δ -프로테오박테리아(Proteobacteria), γ -프로테오박테리아(Proteobacteria), ϵ -프로테오박테리아(Proteobacteria) 및 장내세균(Enterobacteriaceae)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 수준이 증가하고, 장내 미생물 중 박테로이데테스균(bacteroidetes), 방선균류(Actinobacteria), 피르미쿠테스(Firmicutes), 비피더스균(Bifidobacteria) 및 젖산균(Lactobacilli)으로 이루어진 군으로부터 어느 하나의 수준이 감소하는 경우 뇌신경정신질환으로 진단하는, 뇌신경정신질환 진단용 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 제제는 장내 미생물의 특이적인 유전자의 수준을 측정할 수 있는 프라이머 또는 프로브; 상기 특이적인 유전자로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정할 수 있는 항체 또는 앵타머; 장내 미생물의 16S rDNA의 서열을 정량적으로 분석하기 위한 프라이머 또는 프로브; 또는 장내 미생물의 게놈 DNA 서열을 정량적으로 분석하기 위한 파이로시퀀싱용 제제인, 뇌신경정신질환 진단용 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 조성물은 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)의 양을 측정하는 제제를 추가적으로 포함하는, 뇌신경정신질환 진단용 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 뇌신경정신질환은 신경 퇴행성 질환 또는 정신 장애인, 뇌신경정신질환 진단용 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 정신 장애는 불안, 우울증, 기분 장애, 불면증, 망상 장애, 강박 장애, 편두통, 스트레스, 기억 장애, 인지 장애 및 주의력 장애로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 뇌신경정신질환 진단용 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 신경 퇴행성 질환은 파킨슨 병, 헌팅턴 병, 알츠하이머 병, 근위축성 측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 척수소뇌성 운동실조증(Spinocerebellar Atrophy), 뚜렛 증후군(Tourette's Syndrome), 프리드리히 보행실조(Friedrich's Ataxia), 마차도-조셉 병(Machado-Joseph's disease), 치매, 근육긴장이상(Dystonia) 및 진행성 핵상 마비(Progressive Supranuclear Palsy)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 뇌신경정신질환 진단용 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 뇌신경정신질환 진단용 키트.

청구항 13

뇌신경정신질환이 의심되는 개체에서 분리된 분변으로부터 장내 미생물의 수준을 측정하는 단계; 및 상기 장내 미생물의 수준을 뇌신경정신질환이 아닌 대조군의 분변의 장내 미생물 수준과 비교하는 단계를 포함하는 뇌신경정신질환의 진단을 위한 정보제공 방법으로서, 상기 장내 미생물은 박테로이데테스균(bacteroidetes), 방선균류(actinobacteria), 피르미쿠테스(firmicutes), 비피더스균(Bifidobacteria), 젖산균(Lactobacilli), β -프로테오박테리아(proteobacteria), δ -프로테오박테리아(proteobacteria), γ -프로테오박테리아(proteobacteria), ϵ -프로테오박테리아(proteobacteria) 및 장내세균(Enterobacteriaceae)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인, 정보제공 방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

뇌신경정신질환이 의심되는 개체의 분변의 장내 미생물 수준이 뇌신경정신질환이 아닌 대조군의 분변의 장내 미생물 수준과 비교하여 장내 미생물의 수준이 증가하는 개체에 대해 뇌신경정신질환으로 판단하는 단계;를 더 포함하는 것인, 정보제공 방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

장내 미생물 수준이 증가하는 장내 미생물은 β -프로테오박테리아

(proteobacteria), δ -프로테오박테리아(proteobacteria), γ -프로테오박테리아(proteobacteria), ϵ -프로테오박테리아(proteobacteria) 및 장내세균(Enterobacteriaceae)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 정보제공 방법.

청구항 16

제13항에 있어서,

뇌신경정신질환이 의심되는 개체의 분변의 장내 미생물 수준이 뇌신경정신질환이 아닌 대조군의 분변의 장내 미생물 수준과 비교하여 장내 미생물의 수준이 감소하는 개체에 대해 뇌신경정신질환으로 판단하는 단계;를 더 포함하는 것인, 정보제공 방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

장내 미생물 수준이 감소하는 장내 미생물은 박테로이데테스균

(bacteroidetes), 방선균류(actinobacteria), 피르미쿠테스(firmicutes), 비피더스균(Bifidobacteria) 및 젖산균(Lactobacilli)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 정보제공 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규한 유산균인 락토바실러스 루테리 및 비피도박테리움 아돌레센티스에 관한 것으로, 구체적으로 뇌신경정신질환 또는 염증질환의 예방 및 치료에 유용한 신규한 유산균을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0002] 또한, 본 발명은 장내 미생물 수준을 측정하는 제제를 포함하는 뇌신경정신질환 진단용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0004] 현대사회는 급증하는 스트레스 등으로 인해 불안, 우울, 정신분열 등을 포함하는 뇌신경정신질환이 증가하고 있다. 특히 개인주의가 팽배한 현 시대의 사회적, 구조적 원인 등의 다양한 원인으로 우울증 및 불안증 등의 정신 장애를 겪는 환자들이 증가하는 추세이다.

[0005] 정신 장애를 겪는 환자들은 심할 경우 자살 사고로 이어질 수 있고, 특히 우울증 환자의 과반수 이상이 자살을 고려하는 것으로 보고된 바 있으며, 실제로 10 내지 15%의 환자들이 자살을 시행하는 것으로 알려져 있다.

[0006] 정신 장애는 명확하고 객관적인 판단기준이 없어 각각의 환자마다 증상이 달리 나타날 수 있고, 정신 장애가 의심될 경우 정확한 진단 및 검사에 따른 치료가 요구되나, 정신 장애로 인한 병원치료에 대한 부정적인 사회 인식으로 제대로 된 치료가 이루어지지 않는 실정이다. 또한, 정신 장애를 치료하기 위해 사용되는 항우울제 등의 약물들은 치료 효과가 크지 않고, 심혈관계 질환 및 자살 등의 심각한 부작용이 나타날 수 있어 사용이 제한적이다.

[0007] 한편, 천연물을 이용한 연구의 결과로서, 국내공개특허 제10-2017-0061457호에서는 말굽버섯 추출물 및 자초 추출물을 이용한 정신 장애 치료용 조성물이 개시되어 있으나, 아직까지 정신 장애를 치료할 수 있는 효과적인 유산균에 대해서는 지속적인 연구가 필요한 실정이다.

[0008] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 정신 장애의 예방 및 치료제를 연구하던 중, 장내 미생물 군집의 변화로부터 정신 장애를 진단할 수 있음을 확인하고, 나아가 인간 및 마우스의 분변에서 분리된 신규한 유산균이 신경 퇴행성 질환 유발 인자를 억제하고 불안 및 우울 행동을 개선하는 효과 등을 나타내어 뇌신경정신질환, 구체적으로 신경 퇴행성 질환 및 정신 장애의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 국내공개특허 제10-2017-0061457호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 신규한 유산균을 제공하는 것이다.

- [0012] 본 발명의 다른 목적은 신규한 유산균을 포함하는 뇌신경정신 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 신규한 유산균을 포함하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 장내 미생물의 수준을 측정하는 제제를 포함하는 뇌신경정신 질환 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 뇌신경정신 질환이 의심되는 개체에서 분리된 분변으로부터 장내 미생물의 수준을 측정하는 단계; 및 상기 장내 미생물의 수준을 뇌신경정신 질환이 아닌 대조군의 분변의 장내 미생물 수준과 비교하는 단계를 포함하는 뇌신경정신 질환의 진단 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0017] 상기 목적을 수행하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 신규한 유산균을 제공한다.
- [0018] 구체적으로 본 발명에 있어, 상기 신규한 유산균은 락토바실러스 루테리 NK33 (*Lactobacillus reuteri* NK33) (기탁기관: 한국미생물보존센터, 기탁일: 2017.08.04, 수탁번호: KCCM12090P) 또는 비피도박테리움 아돌레센티스 NK98 (*Bifidobacterium adolescentis* NK98) (기탁기관: 한국미생물보존센터, 기탁일: 2018.08.03, 수탁번호: KCCM12297P)일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 락토바실러스 루테리 NK33 또는 비피도박테리움 아돌레센티스 NK98은 인간 또는 마우스의 분변으로부터 분리 및 동정된 신규한 유산균임을 특징으로 한다.
- [0020] 본 발명의 락토바실러스 루테리 NK33의 동정 및 분류를 위한 16S rDNA 염기서열은 본 명세서에 첨부된 서열번호 1과 같다. 따라서, 본 발명의 락토바실러스 루테리 NK33(*Lactobacillus reuteri* NK33)은 서열번호 1의 16S rDNA를 포함할 수 있다. 상기 서열번호 1의 16S rDNA 염기서열의 분석 결과, 공지된 락토바실러스 루테리 균주들과 99%의 상동성을 나타내어 락토바실러스 루테리와 가장 높은 분자계통학적 유연관계를 보였다. 따라서, 상기 유산균을 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*)로 동정하고, 락토바실러스 루테리 NK33으로 명명하였으며, 한국미생물보존센터에 2017년 8월 4일자로 기탁하였다(수탁번호 KCCM12090P).
- [0021] 본 발명의 락토바실러스 루테리 NK33은 그람양성균이고, 세포의 형태는 간균이다. 보다 구체적인 락토바실러스 루테리 NK33의 생리학적 특성은 당해 기술분야의 통상의 방법에 따라 분석할 수 있고, 그 결과는 하기 표 3과 같은 것으로 나타났다. 구체적으로, 락토바실러스 루테리 NK33은 탄소원으로 L-아라비노스, D-리보스, D-자일로스, D-갈락토스, D-글루코스, D-프럭토스, D-만노스, 만니톨, 솔비톨, N-아세틸-글루코사민, 아미그달린, 알부틴, 에스쿨린, 살리신, 셀로비오스, 말토오스, 락토오스, 멜리비오스, 수크로오스, 트레할로오스, 멜리지토오스, 라피노오스, 젠티오비오스, D-투라노오스 및 글루코네이트를 이용할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 비피도박테리움 아돌레센티스 NK98의 동정 및 분류를 위한 16S rDNA 염기서열은 본 명세서에 첨부된 서열번호 38과 같다. 따라서, 본 발명의 비피도박테리움 아돌레센티스 NK98(*Bifidobacterium adolescentis* NK98)은 서열번호 38의 16S rDNA를 포함할 수 있다. 상기 서열번호 38의 16S rDNA 염기서열의 분석 결과, 공지된 비피도박테리움 아돌레센티스 균주와 98%의 상동성을 나타내어 비피도박테리움 아돌레센티스와 가장 높은 분자계통학적 유연관계를 보였다. 따라서, 상기 유산균을 비피도박테리움 아돌레센티스 (*Bifidobacterium adolescentis*)로 동정하고, 비피도박테리움 아돌레센티스 NK98으로 명명하였으며, 한국미생물보존센터에 2018년 8월 3일자로 기탁하였다(수탁번호 KCCM 12297P).
- [0023] 본 발명의 비피도박테리움 아돌레센티스 NK98의 생리학적 특성은 당해 기술분야의 통상의 방법에 따라 분석할 수 있고, 그 결과는 하기 표 4와 같다. 구체적으로, 비피도박테리움 아돌레센티스 NK98은 탄소원으로 D-글루코스, D-만니톨, D-락토오스, D-사카로즈, D-말토오스, 살리신, D-자일로스, L-아라비노스, 젤라틴, 에스쿨린, 구연산철, D-셀로비오스, D-라피노오스 및 D- 트레할로스를 이용할 수 있다.
- [0024] 상기 목적을 수행하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 신규한 유산균을 포함하는 뇌신경정신 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0025] 본 발명에 있어, 상기 신규한 유산균은 락토바실러스 루테리 NK33 (*Lactobacillus reuteri* NK33), 비피도박테리움 아돌레센티스 NK98 (*Bifidobacterium adolescentis* NK98) 또는 이들의 혼합물일 수 있다.

- [0026] 본 발명의 “락토바실러스 루테리 NK33 (*Lactobacillus reuteri* NK33)” 및 “비피도박테리움 아돌레센티스 NK98 (*Bifidobacterium adolescentis* NK98)”은 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0027] 구체적으로, 본 발명의 약학 조성물에 포함되는 유산균은 이의 생균체, 이의 사균체, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물일 수 있으나, 뇌신경정신 질환의 예방 또는 치료 효과를 달성할 수 있는 유산균의 형태라면 제한없이 사용될 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 용어, “배양물”은 유산균을 공지의 액체 배지 또는 고체 배지에서 배양시켜 수득한 사물을 의미하며, 본 발명에서는 신규한 유산균을 포함하는 개념이다.
- [0029] 본 발명의 뇌신경정신질환은 신경 퇴행성 질환 또는 정신 장애일 수 있다.
- [0030] 구체적으로, 본 발명의 뇌신경정신질환은 정신 장애일 수 있고, 상기 정신 장애는 불안, 우울증, 기분 장애, 불면증, 망상 장애, 강박 장애, 편두통, 스트레스, 기억 장애, 인지 장애 및 주의력 장애를 포함하는 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0031] 본 발명의 일 실시예에서는 스트레스가 유도된 동물모델에 락토바실러스 루테리 NK33 또는 비피도박테리움 아돌레센티스 NK98 (*Bifidobacterium adolescentis* NK98) 투여시, 스트레스에 의한 불안 및 우울 행동이 현저히 개선되고, 스트레스가 유도된 동물모델의 해마에서 NF- κ B의 활성이 억제되고, 뇌유래신경영양인자의 발현이 증가하며, 혈중 스트레스 지표 인자인 코르티코스테론, IL-6, TNF- α 및 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)의 양이 감소함을 확인하였다. 이를 통해, 상기 유산균들을 포함하는 약학 조성물이 뇌신경정신질환, 구체적으로 정신 장애의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [0032] 구체적으로, 본 발명의 뇌신경정신질환은 신경 퇴행성 질환일 수 있고, 상기 신경 퇴행성 질환은 파킨슨 병, 헌팅턴 병, 알츠하이머 병, 근위축성 측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 척수소뇌성 운동실조증(Spinocerebellar Atrophy), 뚜렛 증후군(Tourette's Syndrome), 프리드리히 보행실조(Friedrich's Ataxia), 마차도-조셉 병(Machado-Joseph's disease), 치매, 근육긴장이상(Dystonia), 진행성 핵상 마비(Progressive Supranuclear Palsy) 및 전두측두엽 치매(Frontotemporal Dementia)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 일 실시예에서는 신경 세포에 스트레스 호르몬인 코르티코스테론과 함께 상기 유산균들의 처리시 알츠하이머와 같은 신경 퇴행성 질환을 유발하는 물질로 알려진 NF- κ B의 활성이 억제됨과 동시에 노화 및 치매 등에서 발현이 감소하는 것으로 알려진 뇌유래신경영양인자(brain derived neurotrophic factor, BDNF)의 발현이 증가함을 확인하였다(표 5 및 6). 이를 통해, 상기 유산균들을 포함하는 약학 조성물이 뇌신경정신질환, 구체적으로 신경 퇴행성 질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [0034] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는 락토바실러스 루테리 NK33 및 비피도박테리움 아돌레센티스 NK98을 병용 투여하는 경우, 상기 유산균들의 단독 투여군과 비교하여 뇌신경정신질환, 구체적으로 스트레스 개선 효과가 현저히 상승함을 확인하였다(표 20).
- [0035] 본 발명에 있어서, 상기 약학 조성물은 비피도박테리움 아돌레센티스 IM38 (*Bifidobacterium adolescentis* IM38) KCCM 11807P를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0036] 상기 비피도박테리움 아돌레센티스 IM38 (*Bifidobacterium adolescentis* IM38) KCCM 11807P는 국내공개특허 제 10-2017-0090359호에 개시된 공지의 유산균으로서, 국내공개특허 제10-2017-0090359호를 근거로 용이하게 입수가 가능하다.
- [0037] 본 발명의 일 실시예에서는 스트레스가 유도된 동물모델에 락토바실러스 루테리 NK33 또는 비피도박테리움 아돌레센티스 NK98와 비피도박테리움 아돌레센티스 IM38의 병용 투여시 스트레스에 의한 불안 및 우울 행동이 현저히 개선되고, 혈중 스트레스 지표 인자인 코르티코스테론의 양이 감소함을 확인하였다.
- [0038] 상기 목적을 수행하기 위한 또 다른 양태로서, 본 발명은 락토바실러스 루테리 NK33 (*Lactobacillus reuteri* NK33), 비피도박테리움 아돌레센티스 NK98 (*Bifidobacterium adolescentis* NK98) 또는 이들의 혼합물을 포함하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0039] 본 발명의 “락토바실러스 루테리 NK33 (*Lactobacillus reuteri* NK33)” 및 “비피도박테리움 아돌레센티스 NK98 (*Bifidobacterium adolescentis* NK98)”은 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0040] 구체적으로, 본 발명의 약학 조성물에 포함되는 유산균은 이의 생균체, 이의 사균체, 이의 배양물, 이의 파쇄물

또는 이의 추출물일 수 있으나, 염증 질환의 예방 또는 치료 효과를 달성할 수 있는 유산균의 형태라면 제한없이 사용될 수 있다.

- [0041] 본 발명에서 용어, “배양물”은 유산균을 공지의 액체 배지 또는 고체 배지에서 배양시켜 수득한 사물을 의미하며, 본 발명에서는 신규한 유산균을 포함하는 개념이다.
- [0042] 본 발명의 염증 질환은 관절염, 통풍, 간염, 천식, 비만, 각막염, 위염, 장염, 신장염, 대장염, 당뇨, 결핵, 기관지염, 홍막염, 복막염, 척추염, 췌장염, 염증 통증, 요도염, 방광염, 질염, 동맥경화증, 폐혈증, 화상, 피부염, 치주염 및 치은염을 포함하는 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0043] 본 발명의 일 실시예에서는 마우스로부터 분리된 대식세포에 염증 반응 유도물질인 리포폴리사카라이드와 함께 상기 유산균들의 처리시 염증반응이 현저히 억제됨을 확인하였다(표 5 및 표 6). 이를 통해, 본 발명의 상기 유산균을 포함하는 약학 조성물이 염증 질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [0044] 구체적으로, 상기 염증 질환은 대장염일 수 있다.
- [0045] 본 발명의 일 실시예에서는 스트레스로 인해 대장염이 유도된 동물모델에 락토바실러스 루테리 NK33 또는 비피도박테리움 아돌레센티스 NK98의 투여시 대장염의 지표인 대장의 길이가 정상 수준으로 회복되고, 대장염의 지표인자인 미엘로퍼옥시다아제, COX-2 및 iNOS의 양이 감소하며 TNF- α 의 활성이 감소함을 확인하였다(도 15 및 표 15). 이를 통해, 상기 락토바실러스 루테리 NK33 또는 비피도박테리움 아돌레센티스 NK98을 포함하는 약학 조성물이 염증 질환, 구체적으로 대장염의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [0046] 본 발명에 따른 뇌신경정신질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물 또는 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 약학적 제형으로 제조될 수 있다. 제형의 제조에 있어서, 본 발명에 따른 약학 조성물은 신규한 유산균의 활성을 저해하지 않는 범위 내에서 추가적으로 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다.
- [0047] 상기 약제학적으로 허용가능한 담체는 통상적으로 사용되는 것들, 예컨대 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제, 기타 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 포함할 수 있다.
- [0048] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량은 약제학적으로 유효한 양이어야 한다. “약제학적으로 유효한 양”은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 뇌신경정신 질환 또는 염증 질환을 예방 또는 치료하기에 충분한 양을 의미한다. 유효 용량 수준은 제제화 방법, 환자의 상태 및 체중, 환자의 성별, 연령, 질환의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간, 배설 속도, 반응 감응성 등과 같은 요인들에 따라 당업자에 의해 다양하게 선택될 수 있다. 유효량은 당업자에게 인식되어 있듯이 처리의 경로, 부형제의 사용 및 다른 약제와 함께 사용할 수 있는 가능성에 따라 변할 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 경구 투여제의 경우 일반적으로 성인에게 1일에 체중 1 kg당 본 발명의 조성물을 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 mg/kg으로 투여할 수 있다. 상기과 같이 투여제를 투여할 경우, 본 발명의 락토바실러스 루테리 NK33 또는 비피도박테리움 아돌레센티스 NK98을 1일 1×10^2 CFU/60kg 내지 1×10^{11} CFU/60kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0049] 본 발명의 뇌신경정신질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 또는 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 마우스, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로를 통해 투여될 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구 투여(예를 들어, 도포 또는 정맥 내, 피하, 복강 내 주사)할 수 있으나 경구 투여가 바람직하다. 경구 투여를 위한 고형제제에는 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 연질캡슐제, 환제 등이 포함될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 에어로졸 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제로는 각각 통상의 방법에 따라 멸균된 수용액, 액제, 비수용성제, 현탁제, 에멀전, 점안제, 안연고제, 시럽, 좌제, 에어로졸 등의 외용제 및 멸균 주사제제의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 바람직하게는 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 안연고제, 점안제, 파스타제 또는 카타플라스마제의 약제학적 조성물을 제조하여 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 국소

투여를 위한 제제는 임상적 처방에 따라 무수형 또는 수성형일 수 있다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0050] 상기 목적을 수행하기 위한 또 다른 양태로서, 본 발명은 락토바실러스 루테리 NK33 (*Lactobacillus reuteri* NK33), 비피도박테리움 아돌레센티스 NK98 (*Bifidobacterium adolescentis* NK98) 또는 이들의 혼합물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 뇌신경정신질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0051] 상기 목적을 수행하기 위한 또 다른 양태로서, 본 발명은 락토바실러스 루테리 NK33 (*Lactobacillus reuteri* NK33), 비피도박테리움 아돌레센티스 NK98 (*Bifidobacterium adolescentis* NK98) 또는 이들의 혼합물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 염증 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0052] 본 발명의 “락토바실러스 루테리 NK33 (*Lactobacillus reuteri* NK33)” “비피도박테리움 아돌레센티스 NK98 (*Bifidobacterium adolescentis* NK98)” “투여”, “뇌신경정신질환” 및 “염증 질환” 등의 용어는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0053] 상기 개체는 동물을 말하며, 전형적으로 본 발명의 신규한 유산균을 이용한 치료로 유의한 효과를 나타낼 수 있는 포유동물일 수 있다. 이러한 개체의 바람직한 예로 인간과 같은 영장류, 랫트, 마우스, 원숭이, 개, 고양이, 소, 말, 돼지, 양 또는 염소가 포함될 수 있다. 또한 이와 같은 개체들에는 뇌신경정신 질환 또는 염증 질환의 증상을 갖거나 이와 같은 증상을 가질 위험이 있는 개체들이 모두 포함될 수 있다.

[0054] 상기 목적을 수행하기 위한 또 다른 양태로서, 본 발명은 락토바실러스 루테리 NK33 (*Lactobacillus reuteri* NK33), 비피도박테리움 아돌레센티스 NK98 (*Bifidobacterium adolescentis* NK98) 또는 이들의 혼합물을 포함하는 뇌신경정신질환의 예방 또는 개선용 건강기능 식품을 제공한다.

[0055] 상기 목적을 수행하기 위한 또 다른 양태로서, 본 발명은 락토바실러스 루테리 NK33 (*Lactobacillus reuteri* NK33), 비피도박테리움 아돌레센티스 NK98 (*Bifidobacterium adolescentis* NK98) 또는 이들의 혼합물을 포함하는 염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능 식품을 제공한다.

[0056] 본 발명의 “락토바실러스 루테리 NK33 (*Lactobacillus reuteri* NK33)” “비피도박테리움 아돌레센티스 NK98 (*Bifidobacterium adolescentis* NK98)” “투여” “뇌신경정신 질환” 및 “염증 질환” 등의 용어는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0057] 상기 건강기능 식품은 식품의 생체 조절 기능을 강조한 식품으로 물리적, 생화학적, 생물공학적인 방법을 이용하여 특정 목적에 작용 및 발현하도록 부가 가치를 부여한 식품이다. 이러한 건강기능 식품의 성분은 생체 방어와 신체 리듬의 조절, 질환의 방지 및 회복에 관계하는 신체 조절 기능을 생체에 대하여 충분히 발휘하도록 설계하여 가공하게 되며, 식품으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제, 감미료 또는 기능성 원료를 함유할 수 있다.

[0058] 본 발명의 락토바실러스 루테리 NK33 또는 비피도박테리움 아돌레센티스 NK98을 건강기능 식품(또는 건강기능 음료 첨가물)으로 사용할 경우, 상기 유산균들을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용하고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 상기 유산균들의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 개선, 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0059] 상기 건강기능 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 점증제, pH 조절제, 안정화제, 보존제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 또한, 본 발명의 건강기능 식품은 과일 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 단독으로 또는 조합으로 사용될 수 있으며, 이러한 첨가제의 비율은 조성물 전체 중량당 0.001 내지 50 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0060] 상기 건강기능 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 유산균을 첨가할 수 있는 식품은 소세지, 육류, 빵, 초콜릿류, 스낵류, 캔디류, 과자류, 라면, 피자, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있다. 음료수로 제형화할 경우에 신규한 유산균 이외에 첨가되는 액체 성분으로는 이에 한정되지는 않으나, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 모노사카라이드(예, 포도당, 과당 등), 디사카라이드(예, 말토오스, 수크로오스 등) 및 폴리사카라이드(예, 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은

통상적인 당), 및 자일리톨, 소르비톨, 에리스리톨 등의 당 알코올일 수 있다.

- [0061] 상기 목적을 수행하기 위한 또 다른 양태로서, 본 발명은 장내 미생물의 수준을 측정하는 제제를 포함하는 뇌신경정신질환 진단용 조성물을 제공한다.
- [0062] 본 발명의 “뇌신경정신질환” 등의 용어는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0063] 본 발명에서 용어, “장내 미생물”은 소화관, 구체적으로 장내에 특이적으로 존재하는 미생물로서, 구체적으로 박테로이데테스균(bacteroidetes), 방선균류(Actinobacteria), 피르미쿠테스(Firmicutes), 비피더스균(Bifidobacteria), 젖산균(Lactobacilli), β -프로테오박테리아(Proteobacteria), δ -프로테오박테리아(Proteobacteria), γ -프로테오박테리아(Proteobacteria), ϵ -프로테오박테리아(Proteobacteria) 및 장내세균(Enterobacteriaceae)을 포함하는 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0064] 구체적으로, 본 발명의 진단용 조성물은 상기 장내 미생물 중 β -프로테오박테리아(Proteobacteria), δ -프로테오박테리아(Proteobacteria), γ -프로테오박테리아(Proteobacteria), ϵ -프로테오박테리아(Proteobacteria) 및 장내세균(Enterobacteriaceae)을 포함하는 군에서 선택된 어느 하나 이상의 수준이 증가하는 경우 뇌신경정신질환으로 진단할 수 있고, 상기 장내 미생물 중 박테로이데테스균(bacteroidetes), 방선균류(Actinobacteria), 피르미쿠테스(Firmicutes), 비피더스균(Bifidobacteria) 및 젖산균(Lactobacilli)을 포함하는 군에서 선택된 어느 하나의 수준이 감소하는 경우 뇌신경정신질환으로 진단할 수 있으며, 상기 장내 미생물 중 β -프로테오박테리아(Proteobacteria), δ -프로테오박테리아(Proteobacteria), γ -프로테오박테리아(Proteobacteria), ϵ -프로테오박테리아(Proteobacteria) 및 장내세균(Enterobacteriaceae)을 포함하는 군에서 선택된 어느 하나 이상의 수준이 증가하고, 장내 미생물 중 박테로이데테스균(bacteroidetes), 방선균류(Actinobacteria), 피르미쿠테스(Firmicutes), 비피더스균(Bifidobacteria) 및 젖산균(Lactobacilli)을 포함하는 군에서 선택된 어느 하나의 수준이 감소하는 경우 뇌신경정신질환으로 진단할 수 있다.
- [0065] 구체적으로, 상기 수준이 증가하는 장내세균은 클렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*), 대장균(*Escherichia coli*) 및 모르가넬라 모르가니균(*Morganella morganii*)을 포함하는 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0066] 또한, 상기 수준이 감소하는 젖산균은 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*), 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*), 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*)를 포함하는 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있고, 상기 수준이 감소하는 비피더스균은 비피도박테리움 애니말리스(*Bifidobacterium animalis*)일 수 있다.
- [0067] 본 발명에서 제공하는 뇌신경정신질환 진단용 조성물은 장내 미생물의 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는데, 상기 조성물에 포함된 제제를 사용하여 뇌신경정신질환의 발병 여부를 확인하고자 하는 개체로부터 분리된 분변으로부터의 장내 미생물의 수준을 측정함으로써 개체의 뇌신경정신질환의 발병 여부를 확인할 수 있다. 상기 개체는 동물일 수 있으며, 바람직하게 포유류이며, 예를 들어 인간과 같은 영장류, 랫트, 마우스, 원숭이, 개, 고양이, 소, 말, 돼지, 양 또는 염소이다.
- [0068] 개체의 분변으로부터 분리된 장내 미생물의 수준을 측정함으로써, 상기 개체에 뇌신경정신질환이 발병되었는지의 여부를 확인하는데 사용될 수 있다.
- [0069] 상기 장내 미생물의 수준을 측정할 수 있는 제제는 개체의 분변으로부터 분리된 장내 미생물을 정량적으로 분석하는데 사용될 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적으로 장내 미생물의 특이적인 유전자의 수준을 측정할 수 있는 프라이머 또는 프로브 등이 될 수 있고, 상기 특이적인 유전자로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정할 수 있는 항체 또는 앵타머 등이 될 수 있고, 장내 미생물의 16S rDNA의 서열을 정량적으로 분석하기 위한 프라이머 또는 프로브 등이 될 수 있으며, 장내 미생물의 게놈 DNA 서열을 정량적으로 분석하기 위한 파이로시퀀싱용 제제 등이 될 수 있다.
- [0070] 구체적으로, 상기 장내 미생물인 피르미쿠테스(Firmicutes)에 특이적인 프라이머는 서열번호 2 및 서열번호 3의 서열번호로 구성되는 프라이머쌍이고, 박테로이데테스(Bacteroidetes)에 특이적인 프라이머는 서열번호 4 및 서열번호 5의 서열번호로 구성되는 프라이머쌍이고, β -프로테오박테리아(Proteobacteria)에 특이적인 프라이머는 서열번호 6 및 서열번호 7의 서열번호로 구성되는 프라이머쌍이고, δ/γ -프로테오박테리아(Proteobacteria)에 특이적인 프라이머는 서열번호 8 및 9의 서열번호로 구성되는 프라이머쌍이고, ϵ -프로테오박테리아(Proteobacteria)에 특이적인 프라이머는 서열번호 10 및 서열번호 11의 서열번호로 구성되는 프라이머쌍이고, 방선균류(Actinobacteria)에 특이적인 프라이머는 서열번호 12 및 서열번호 13의 서열번호로 구성되는 프라이머쌍이며, 장내세균(Enterobacteriaceae)에 특이적인 프라이머는 서열번호 18 및 서열번호 19의 서열로 구성되는

프라이머쌍일 수 있다.

- [0071] 본 발명의 일 실시예에서는 표 1의 서열번호 2 내지 19의 barcoded 프라이머를 포함하는 파이로시퀀싱용 재제를 사용하여 파이로시퀀싱을 수행하여 장내 미생물의 수준을 측정하였다(실험예 3).
- [0072] 본 발명의 조성물은 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)의 양을 측정하는 재제를 추가적으로 포함할 수 있다. 구체적으로 상기 리포폴리사카라이드의 양을 측정하는 재제는 리포폴리사카라이드의 양을 측정하는데 통상적으로 사용되는 제제일 수 있고, 보다 구체적으로 Limulus amoebocyte lysate (LAL) assay kit에 포함되는 제제일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0073] 본 발명의 일 실시예에서는 정신 장애가 유도된 동물모델의 분변을 분석한 결과, 리포폴리사카라이드의 양이 증가하였음을 확인하였다(도 1, 2, 7 및 11).
- [0074] 본 발명은 또 다른 양태로서 상기 조성물을 포함하는 뇌신경정신질환 진단용 키트를 제공한다.
- [0075] 본 발명의 키트는 상기 조성물을 이용하여 뇌신경정신질환 발병 여부의 확인 대상 개체의 분변을 수집할 수 있는 수집용기, 분변 내 장내 미생물을 추출하기 위한 완충액, 장내 미생물을 측정하는데 사용되는 측정수단 등을 포함할 수 있다.
- [0076] 본 발명은 또 다른 양태로서 뇌신경정신질환이 의심되는 개체에서 분리된 분변으로부터 장내 미생물의 수준을 측정하는 단계 및 상기 장내 미생물의 수준을 뇌신경정신질환이 아닌 대조군의 분변의 장내 미생물 수준과 비교하는 단계를 포함하는 뇌신경정신질환의 진단 방법을 제공한다.
- [0077] 또한, 본 발명은 뇌신경정신질환이 의심되는 개체에서 분리된 분변으로부터 장내 미생물의 수준을 측정하는 단계 및 상기 장내 미생물의 수준을 뇌신경정신질환이 아닌 대조군의 분변의 장내 미생물 수준과 비교하는 단계를 포함하는 뇌신경정신질환의 진단을 위한 정보제공 방법을 제공한다.
- [0078] 상기 분변은 장내 미생물의 수준을 측정하기 위한 시료로서, 개체로부터 분리되어 수집된 분변을 의미한다.
- [0079] 구체적으로, 상기 장내 미생물은 박테로이데테스균(bacteroidetes), 방선균류(Actinobacteria), 피르미쿠테스(firmicutes), 비피더스균(Bifidobacteria), 젖산균(Lactobacilli), β -프로테오박테리아(proteobacteria), δ -프로테오박테리아(proteobacteria), γ -프로테오박테리아(proteobacteria), ϵ -프로테오박테리아(proteobacteria) 및 장내세균(Enterobacteriaceae)을 포함하는 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0080] 본 발명의 뇌신경정신질환의 진단 또는 정보제공 방법은 상기 장내 미생물 중에서 수준이 증가하는 미생물을 확인하여 뇌신경정신질환의 발병 또는 위험성 여부를 진단할 수 있다.
- [0081] 구체적으로, 상기 뇌신경정신질환의 진단 또는 정보제공 방법은 뇌신경정신질환이 의심되는 개체의 분변의 장내 미생물 수준이 뇌신경정신질환이 아닌 대조군의 분변의 장내 미생물 수준과 비교하여 장내 미생물의 수준이 증가하는 개체에 대해 뇌신경정신질환으로 판단하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0082] 상기 수준이 증가하는 장내 미생물은 β -프로테오박테리아(proteobacteria), δ -프로테오박테리아(proteobacteria), γ -프로테오박테리아(proteobacteria), ϵ -프로테오박테리아(proteobacteria) 및 장내세균(Enterobacteriaceae)을 포함하는 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0083] 특히, 상기 장내세균은 클렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*), 대장균(*Escherichia coli*) 및 모르가넬라 모르가니균(*Morganella morganii*)을 포함하는 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0084] 또한, 본 발명의 뇌신경정신질환의 진단 또는 정보제공 방법은 상기 장내 미생물 중에서 수준이 감소하는 미생물을 확인하여 뇌신경정신질환의 발병 또는 위험성 여부를 진단할 수 있다.
- [0085] 본 발명의 “뇌신경정신질환” 등의 용어는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0086] 구체적으로, 상기 뇌신경정신질환의 진단 또는 정보제공 방법은 뇌신경정신질환이 의심되는 개체의 분변의 장내 미생물 수준이 뇌신경정신질환이 아닌 대조군의 분변의 장내 미생물 수준과 비교하여 장내 미생물의 수준이 감소하는 개체에 대해 뇌신경정신질환으로 판단하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0087] 상기 수준이 감소하는 장내 미생물은 박테로이데테스균(bacteroidetes), 방선균류(Actinobacteria), 피르미쿠테스(firmicutes), 비피더스균(Bifidobacteria) 및 젖산균(Lactobacilli)을 포함하는 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.

- [0088] 특히, 상기 젖산균은 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*), 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*), 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*)를 포함하는 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있고, 상기 비피더스균은 비피도박테리움 애니말리스(*Bifidobacterium animalis*)일 수 있다.
- [0089] 본 발명의 일 실시예에서는 구속 스트레스 또는 항생제 스트레스 등의 스트레스를 유도한 동물모델로부터 분리된 분변을 사용하여 장내 미생물의 군집 변화를 확인한 결과, 스트레스를 받지 않은 동물모델에 비해 β -프로테오박테리아(*proteobacteria*), δ -프로테오박테리아(*proteobacteria*), γ -프로테오박테리아(*proteobacteria*), ϵ -프로테오박테리아(*proteobacteria*) 및 장내세균(*Enterobacteriaceae*)의 수준이 증가하고, 박테로이데테스균(*bacteroidetes*), 방선균류(*actinobacteria*), 피르미쿠테스(*firmicutes*), 비피더스균(*Bifidobacteria*) 및 젖산균(*Lactobacilli*)의 수준이 감소함을 확인하였다(도 2, 6, 8, 10 및 12). 특히, 수준이 증가한 구체적인 장내세균으로 클렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*), 대장균(*Escherichia coli*) 및 모르가넬라 모르가니균(*Morganella morganii*)이 있고, 수준이 감소한 구체적인 젖산균으로 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*), 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*), 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*)가 있으며, 수준이 감소한 구체적인 비피더스균은 비피도박테리움 애니말리스(*Bifidobacterium animalis*)가 있음을 확인하였다.
- [0090] 이상 본 명세서에 기재된 수치값은 달리 명시되어 있지 않은 한 균등범위까지 포함하는 것으로 해석되어야 한다.
- [0091] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [0093] 본 발명에 따른 신규한 유산균인 락토바실러스 루테리 NK33 (*Lactobacillus reuteri* NK33) 또는 비피도박테리움 아도레센티스 NK98 (*Bifidobacterium adolescentis* NK98)은 신경 퇴행성 질환 유발 인자를 억제하고 불안 및 우울 행동을 개선하는 효과가 있다. 따라서, 본 발명에 따른 신규한 유산균은 뇌신경정신질환의 예방 또는 치료용 조성물로 이용될 수 있으며, 특히, 신경 퇴행성 질환 및 정신 장애의 예방 및 치료에 효과적이다.
- [0094] 또한, 본 발명에 따른 신규한 유산균은 염증 반응을 억제하는 효과가 있어 염증 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 이용될 수 있으며, 특히, 대장염의 예방 및 치료에 효과적이다.
- [0095] 나아가 본 발명에 따른 장내 미생물의 수준을 측정하는 조성물은 장내 미생물의 수준을 측정하여 뇌신경정신질환을 진단하는데 효과적이다.

도면의 간단한 설명

- [0097] 도 1은 구속 스트레스를 가한 마우스(IS)에 대한 불안 행동 측정 및 혈액지표를 측정한 결과이다; (a)는 고가플러스미로 시험 결과 개방 통로에서 보낸 시간(OT) 및 개방 통로 진입(OE)이 감소함을 확인한 그래프이다; (b)는 명암이행 시험 결과 밝은 곳에서 보내는 시간이 감소함을 확인한 그래프이다; (c)는 구슬매장 시험에서 구슬을 매장하는 행동이 증가함을 확인한 그래프이다; (d)는 해마에서 NF- κ B 활성화(p-p65/p65)의 증가 및 뇌유래신경영양인자(brain derived neurotrophic factor, BDNF)의 발현량이 감소함을 확인한 도이다; (e)는 혈액 중의 코르티코스테론이 증가함을 확인한 그래프이다; (f)는 혈액 중의 IL-6가 증가함을 확인한 그래프이다; (g)는 혈액 중의 TNF- α 가 증가함을 확인한 그래프이다; (h)는 혈액 중의 리포폴리사카라이드가 증가함을 확인한 그래프이다.
- 도 2 (a)는 구속 스트레스를 가한 마우스(IS)의 분변의 장내 미생물 군집이 변화함을 확인한 도이다; 도 2 (b)는 구속 스트레스를 가한 마우스(IS)의 분변에서 리포폴리사카라이드가 증가함을 확인한 그래프이다.
- 도 3은 구속 스트레스를 가한 마우스(IS)에 대한 대장염 지표를 측정한 결과이다; (a)는 구속 스트레스를 가한 마우스(IS)의 대장의 길이가 감소함을 확인한 그래프이다; (b)는 대장에서 미엘로퍼옥시다아제가 증가함을 확인한 그래프이다; (c)는 대장에서 TNF- α 가 증가함을 확인한 그래프이다; (d)는 대장에서 NF- κ B 활성화(p-p65/p65)의 증가, COX-2 및 iNOS의 발현이 증가함을 확인한 도이다; (e)는 대장에서 오클루딘과 클라우딘-1이

감소함을 확인한 도이다.

도 4는 구속 스트레스를 유도한 동물모델의 분변을 투여한 동물모델(FIS)의 상태를 확인한 결과이다; (a)는 고가플러스미로 시험 결과 개방 통로에서 보낸 시간(OT) 및 개방 통로 진입(OE)이 감소함을 확인한 그래프이다; (b)는 명암이행 시험 결과 밝은 곳에서 보내는 시간이 감소함을 확인한 그래프이다; (c)는 구슬매장 시험에서 구슬을 매장하는 행동이 증가함을 확인한 그래프이다; (d)는 해마에서 NF- κ B 활성(p-p65/p65)의 증가 및 뇌유래신경영양인자(brain derived neurotrophic factor, BDNF)의 발현량이 감소함을 확인한 도이다; (e)는 대장의 길이가 감소함을 확인한 그래프이다; (f)는 대장에서 미엘로퍼옥시다아제가 증가함을 확인한 그래프이다.

도 5는 구속 스트레스를 유도한 동물모델의 분변을 투여한 동물모델(FIS)의 혈액지표를 측정된 결과이다; (a)는 혈액 중의 코르티코스테론이 증가함을 확인한 그래프이다; (b)는 혈액 중의 IL-6가 증가함을 확인한 그래프이다; (c)는 혈액 중의 TNF- α 가 증가함을 확인한 그래프이다.

도 6은 구속 스트레스를 유도한 동물모델의 분변을 투여한 동물모델(FIS)에 대한 대장염 지표 및 미생물 군집 변화를 확인한 결과이다; (a)는 TNF- α 가 증가함을 확인한 그래프이다; (b)는 대장에서 IL-6가 증가함을 확인한 그래프이다; (c)는 대장에서 IL-10이 감소함을 확인한 그래프이다; (d)는 대장에서 NF- κ B 활성(p-p65/p65)의 증가, COX-2 및 iNOS의 발현이 증가함을 확인한 도이다; (e)는 분변의 장내 미생물 군집이 변화함을 확인한 도이다.

도 7은 항생제 스트레스를 가한 마우스(AP)에 대한 불안 행동 측정 및 혈액지표를 측정된 결과이다; (a)는 고가플러스미로 시험 결과 개방 통로에서 보낸 시간(OT) 및 개방 통로 진입(OE)이 감소함을 확인한 그래프이다; (b)는 명암이행 시험 결과 밝은 곳에서 보내는 시간이 감소함을 확인한 그래프이다; (c)는 구슬매장 시험에서 구슬을 매장하는 행동이 증가함을 확인한 그래프이다; (d)는 해마에서 NF- κ B 활성(p-p65/p65)의 증가 및 뇌유래신경영양인자(brain derived neurotrophic factor, BDNF)의 발현량이 감소함을 확인한 도이다; (e)는 혈액 중의 코르티코스테론이 증가함을 확인한 그래프이다; (f)는 혈액 중의 IL-6가 증가함을 확인한 그래프이다; (g)는 혈액 중의 TNF- α 가 증가함을 확인한 그래프이다; (h)는 혈액 중의 리포폴리사카라이드가 증가함을 확인한 그래프이다.

도 8 (a)는 항생제 스트레스를 가한 마우스(AP)의 분변의 장내 미생물 군집이 변화함을 확인한 도이다; 도 8 (b)는 항생제 스트레스를 가한 마우스(AP)의 분변의 리포폴리사카라이드가 증가함을 확인한 그래프이다.

도 9는 항생제 스트레스를 가한 마우스(AP)에 대한 대장염 지표를 측정된 결과이다; (a)는 대장의 길이가 감소함을 확인한 그래프이다; (b)는 대장에서 미엘로퍼옥시다아제가 증가함을 확인한 그래프이다; (c)는 대장에서 TNF- α 가 증가함을 확인한 그래프이다; (d)는 대장에서 NF- κ B 활성(p-p65/p65)의 증가, COX-2 및 iNOS의 발현이 증가함을 확인한 도이다; (e)는 대장에서 오클루딘과 클라우딘-1이 감소함을 확인한 도이다.

도 10 (A)는 구속 스트레스를 가한 마우스(IS) 및 항생제 스트레스를 가한 마우스(AP)의 분변을 선택배지에서 배양한 결과 증가하는 균을 확인한 도이다; 도 10 (B)는 구속 스트레스를 가한 마우스(IS) 및 항생제 스트레스를 가한 마우스(AP)의 분변을 선택배지에서 배양한 결과 감소하는 균을 확인한 도이다.

도 11은 구속 스트레스 및 항생제 스트레스를 가한 마우스의 분변에서 증가한 미생물을 투여한 마우스에 대한 불안 행동 측정 및 혈액지표를 측정된 결과이다; (a)는 클렙시엘라 옥시토카(KO), 대장균(EC), 에어로코커스 우리나에쿠이(*Aerococcus urinaequi*, AU) 및 모르가넬라 모르가니균(MM)을 투여한 마우스의 고가플러스미로 시험 결과 클렙시엘라 옥시토카를 투여한 군이 개방 통로에서 보낸 시간(OT) 및 개방 통로 진입(OE)이 현저히 감소함을 확인한 그래프이다; (b)는 클렙시엘라 옥시토카(KO)를 투여한 마우스의 고가플러스미로 시험 결과 개방 통로에서 보낸 시간(OT) 및 개방 통로 진입(OE)이 감소함을 확인한 그래프이다; (c)는 명암이행 시험 결과 밝은 곳에서 보내는 시간이 감소함을 확인한 그래프이다; (d)는 구슬매장 시험에서 구슬을 매장하는 행동이 증가함을 확인한 그래프이다; (e)는 해마에서 NF- κ B 활성(p-p65/p65)의 증가 및 뇌유래신경영양인자(brain derived neurotrophic factor, BDNF)의 발현량이 감소함을 확인한 도이다; (f)는 혈액 중의 코르티코스테론이 증가함을 확인한 그래프이다; (g)는 혈액 중의 IL-6가 증가함을 확인한 그래프이다; (h)는 혈액 중의 TNF- α 가 증가함을 확인한 그래프이다; (i)는 혈액 중의 리포폴리사카라이드가 증가함을 확인한 그래프이다.

도 12 (a)는 클렙시엘라 옥시토카를 투여한 마우스(KO)의 분변의 장내 미생물 군집이 변화함을 확인한 도이다; 도 12 (b)는 클렙시엘라 옥시토카를 투여한 마우스(KO)의 분변의 리포폴리사카라이드가 증가함을 확인한 그래프이다.

도 13은 클렙시엘라 옥시토카를 투여한 마우스(KO)에 대한 대장염 지표를 측정된 결과이다; (a)는 대장의 길이

가 감소함을 확인한 그래프이다; (b)는 대장에서 미엘로퍼옥시다아제가 증가함을 확인한 그래프이다; (c)는 대장에서 TNF- α 가 증가함을 확인한 그래프이다; (d)는 대장에서 NF- κ B 활성화(p-p65/p65)의 증가, COX-2 및 iNOS의 발현이 증가함을 확인한 도이다; (e)는 대장에서 오클루딘과 클라우딘-1이 감소함을 확인한 도이다.

도 14는 구속 스트레스를 가한 마우스에 생리식염수를 투여한 군(IS)과 신규한 유산균인 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) NK33(IS+LR)을 투여한 군에 대한 불안 행동 측정 및 혈액지표를 비교한 결과이다; (a)는 신규한 유산균인 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) NK33(IS+LR)을 투여한 군의 고가플러스미로 시험 결과 개방 통로에서 보낸 시간(OT) 및 개방 통로 진입(OE)이 증가함을 확인한 그래프이다; (b)는 명암 이행 시험 결과 밝은 곳에서 보내는 시간이 증가함을 확인한 그래프이다; (c)는 구슬매장 시험에서 구슬을 매장하는 행동이 감소함을 확인한 그래프이다; (d)는 해마에서 NF- κ B 활성화(p-p65/p65)의 억제 및 뇌유래신경영양인자(brain derived neurotrophic factor, BDNF)의 발현량이 증가함을 확인한 도이다; (e)는 혈액 중의 코르티코스테론이 감소함을 확인한 그래프이다; (f)는 혈액 중의 IL-6가 감소함을 확인한 그래프이다; (g)는 혈액 중의 TNF- α 가 감소함을 확인한 그래프이다.

도 15는 구속 스트레스를 가한 마우스에 생리식염수를 투여한 군(IS)과 신규한 유산균인 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) NK33(IR)을 투여한 군에 대한 대장염 지표를 측정된 결과이다; (a)는 대장의 길이가 회복됨을 확인한 그래프이다; (b)는 대장에서 미엘로퍼옥시다아제가 감소함을 확인한 그래프이다; (c)는 대장에서 TNF- α 가 감소함을 확인한 그래프이다; (d)는 대장에서 NF- κ B 활성화(p-p65/p65)의 감소, COX-2 및 iNOS의 발현이 감소함을 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0098] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 실험예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 이에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0099] **실험예 1: 정신 장애 유도 동물모델**

[0100] **(1) 구속 스트레스**

[0101] 불안증, 우울증 또는 스트레스 등의 정신 장애를 유도하기 위해 3x10 cm의 원통모양의 구속 스트레스 기구에 마우스를 움직일 수 없도록 고정하였다.

[0102] 구체적으로, 구속 스트레스로 인한 불안 유도 마우스를 제작하기 위해, 기구에 고정된 상기 마우스를 2일에 한번씩 머리가 위로 가도록 2시간씩 세워놓는 방법으로 구속 스트레스를 5회 반복하고, 마지막 구속 스트레스 2시간 후에 행동실험을 수행하였다.

[0103] 또한, 구속 스트레스로 인한 우울 유도 마우스를 제작하기 위해, 기구에 고정된 상기 마우스를 머리가 위로 가도록 12시간씩 세워놓는 방법으로 매일 1회씩 2일간 연속 구속 스트레스를 반복하였다. 유산균 투여는 매일 1회씩 5일간 투여하였고, 최종 투여 1시간 후에 행동실험을 수행하였다.

[0104] **(2) 항생제 스트레스**

[0105] 불안증, 우울증 또는 스트레스 등의 정신 장애를 유도하기 위해 암피실린(100 mg/kg)을 2일간 연속으로 마우스에 투여하였다. 투여 10일 후에 불안 행동을 측정하였다.

[0106] **(3) 정신 장애 유도 동물모델에 대한 실험 방법**

[0107] 구속 스트레스를 유도한 마우스 모델에 대해서 구속 스트레스를 시작하고 7일째부터 1일 1회씩 3일간 실험군에 따라 유산균 또는 생리식염수를 투여하였다. 항생제 스트레스를 유도한 마우스 모델에 대해서 항생제 스트레스를 유도하고 7일째부터 1일 1회씩 3일간 실험군에 따라 유산균 또는 생리식염수를 투여하였다.

[0108] 불안 행동은 유산균 또는 생리식염수의 투여 5시간 후에 측정하였고, 혈액 지표(코르티코스테론, IL-6, TNF- α 등)는 고가플러스미로 시험이 끝나고 1시간 후에 혈액을 채취하여 측정하였다.

[0109] **실험예 2: 스트레스 진단을 위한 행동 측정 방법**

[0110] **(1) 고가플러스미로(elevated plus maze, EPM) 시험**

[0111] 고가플러스미로는 스트레스 또는 불안증 등의 정신 장애의 정도를 측정하기 위한 실험 장치이다. 본 실험에 사

용된 고가플러스미로 실험 장치는 두 개의 개방 통로(Open arm (30 x 7 cm))와 20 cm 높이의 벽을 가진 두 개의 폐쇄 통로(Enclosed arm (30 x 7 cm))가 바닥으로부터 50 cm만큼 높고, 중앙 플랫폼으로부터 7 cm씩 뻗어 있는 검정색 플렉시 유리 장치이다. 본 시험은 20 룩스의 밝기에 비디오 카메라가 위에 설치되어 있는 방에서 고가플러스미로에 놓인 쥐의 움직임을 기록하였다.

[0112] 구체적으로, C57BL/6 마우스(수컷, 19-22 g)를 고가플러스미로의 정중앙에 두고, 머리는 개방 통로를 향하게 두었다. 5분 동안 개방 통로와 폐쇄 통로에서 보낸 시간과 횟수를 측정하였다. 통로의 진입(Arm entry)은 네 발이 모두 들어간 것을 인정하였다.

[0113] 전체 시험 시간 중 개방 통로에서 보낸 시간(Time spent in open arms, OT)은 [개방 통로에서 보낸 시간/(개방 통로에서 보낸 시간+폐쇄 통로에서 보낸 시간)]x100으로 계산하였다. 그리고 개방 통로 진입(open arm entries, OE)은 [개방 통로 입장/(개방 통로 입장+폐쇄 통로 입장)]x100으로 계산하였다. 매 행동실험 종료 후에는 70% 에탄올로 남아있는 냄새를 제거하였다.

[0114] 공지된 시험 결과 해석에 따라, 개방 통로에서 보낸 시간(OT) 및 개방 통로 진입(OE)이 감소하는 경우 불안증 또는 우울증 등의 정신 장애 증상이 나타난 것으로 해석하였다.

[0115] (2) 명암이행(Light-dark transition) 시험

[0116] 어둠 / 빛으로 전환 시험에 사용되는 장치는 문(7.5x7.5 cm)이 있는 파티션에서 동일한 크기의 밝은 부분(21x42x25 cm, 390 룩스 백색 다이오드)과 어두운 부분(21x42x25 cm, 2 룩스)로 구성되어 있다. 밝은 부분에 마우스를 두고 5분 동안 관찰하면서 밝은 부분에 머문 시간(time in bright area) 및 밝은 부분으로 왕복한 횟수(number of transitions)를 측정하였다. 매 행동실험 종료 후에는 70% 에탄올로 남아있는 냄새를 제거하였다.

[0117] 공지된 시험 결과 해석에 따라, 밝은 부분에 머문 시간 및 밝은 부분으로 왕복한 횟수가 감소하는 경우 불안증 또는 우울증 등의 정신 장애 증상이 나타난 것으로 해석하였다.

[0118] (3) 구슬매장(marble burying) 시험

[0119] 톱밥이 5 cm 깊이로 채워져 있는 투명 케이지에 마우스를 15분간 두었다. 이후 5 cm 간격으로 25개의 구슬(지름 2 cm 투명구슬)을 톱밥 위에 두었다. 마우스를 한쪽의 중앙에 놓고 30분간 매장한 구슬의 개수를 측정하였다.

[0120] 공지된 시험 결과 해석에 따라, 마우스가 매장한 구슬을 숨기는 행동이 증가하는 경우 불안증 또는 우울증 등의 정신 장애 증상이 나타난 것으로 해석하였다.

[0121] (4) 강제수영 실험(Forced Swimming Test, FST)

[0122] Porsolt 등(Porsolt RD, Le Pichon, Jalfre M (1977) Depression: A new animal model sensitive to antidepressant treatments, Nature, Vol.266; pp.730-732)의 방법에 따라 높이 40 cm, 직경 20 cm인 수조에 온도 25±1℃의 물을 25 cm 높이까지 채웠다. 실험용 마우스를 한 마리씩 수조에 넣고 총 6분 중 최초 2분은 적응시간으로 측정하지 않고, 마지막 4분 동안 실험동물의 부동상태(immobility) 시간을 측정하였다. 부동상태는 머리만을 물 위로 드러내기 위한 최소한의 움직임만 하면서 똑바로 서서 움직이지 않고 떠있는 상태를 의미한다.

[0123] (5) 꼬리 매달기 실험(Tail Suspension Test, TST)

[0124] Steru 등(Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P (1985) The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice, Psychopharmacology, Vol.85; pp.367-370)의 방법에 따라 직경 35 cm 및 높이 50 cm인 통속에 마우스 꼬리 끝 1 cm 정도에 고정 장치를 장착 후 지면에서 50 cm 떨어진 위치에 매달았다. 총 6분 동안 실험동물의 부동상태(immobility) 시간을 측정하였다.

[0125] 실험예 3: 장 내 미생물 군집 확인 실험

[0126] 장내 미생물 군집에서 피르미쿠테스(Firmicutes), 프로테오박테리아(Proteobacteria), 방선균류(Actinobacteria) 및 박테로이데테스(Bacteroidetes) 등의 점유율을 측정하기 위해 실시간 PCR(real-time PCR) 또는 454 파이로시퀀싱(pyrosequencing)을 수행하였다.

[0127] 구체적으로, 동물모델로부터 얻은 분변의 DNA는 QIAamp DNA stool mini kit(Qiagen, Germany)를 사용하여 분리하였다. 파이로시퀀싱은 barcoded 프라이머(bacterial 16S rDNA 유전자의 V1 내지 V3 부분)를 사용하였다. qPCR은 하기 표 1의 프라이머를 사용하여 분석하였다.

표 1

종류	염기서열(5'-3')	
<i>Firmicutes</i>	정방향(F)	(서열번호 2)GGA GYA TGT GGT TTA ATT CGA AGC A
	역방향(R)	(서열번호 3)AGC TGA CGA CAA CCA TGC AC
<i>Bacteroidetes</i>	정방향(F)	(서열번호 4)GTT TAA TTC GAT GAT ACG CGA G
	역방향(R)	(서열번호 5)TTA ASC CGA CAC CTC ACG G
<i>β-Proteobacteria</i>	정방향(F)	(서열번호 6)AAC GCG AAA AAC CTT ACC TAC C
	역방향(R)	(서열번호 7)TGC CCT TTC GTA GCA ACT AGT G
<i>δ/γ-Proteobacteria</i>	정방향(F)	(서열번호 8)GCT AAC GCA TTA AGT RYC CCG
	역방향(R)	(서열번호 9)GCC ATG CRG CAC CTG TCT
<i>ε-Proteobacteria</i>	정방향(F)	(서열번호 10)TAG GCT TGA CAT TGA TAG AAT C
	역방향(R)	(서열번호 11)CTT ACG AAG GCA GTC TCC TTA
<i>Actinobacteria</i>	정방향(F)	(서열번호 12)TGT AGC GGT GGA ATG CGC
	역방향(R)	(서열번호 13)AAT TAA GCC ACA TGC TCC GCT
<i>TM</i>	정방향(F)	(서열번호 14)AYT GGG CGT AAA GAG TTG C
	역방향(R)	(서열번호 15)TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T
<i>Verrucomicrobia</i>	정방향(F)	(서열번호 16)TCA KGT CAG TAT GGC CCT TAT
	역방향(R)	(서열번호 17)CAG TTT TYA GGA TTT CCT CCG CC
<i>Enterobacteriaceae</i>	정방향(F)	(서열번호 18)CAT TGA CGT TAC CCG CAG AAG AAG C
	역방향(R)	(서열번호 19)CTC TAC GAG ACT CAA GCT TGC
<i>Escherichia coli</i>	정방향(F)	(서열번호 20)CGC GTA CTA TAC GCC ATG AAC GTA
	역방향(R)	(서열번호 21)ACC GTT GAT CAC TTC GGT CAG G
<i>Klebsiella spp.</i>	정방향(F)	(서열번호 22)GAT ACG GAG TAT GCC TTT ACG GTG
	역방향(R)	(서열번호 23)TAG CCT TTA TCA AGC GGA TAC TGG
<i>Klebsiella oxytoca</i>	정방향(F)	(서열번호 24)GTT AAT ACC TTT GCT CAT TGA
	역방향(R)	(서열번호 25)ACC AGG GTA TCT AAT CCT GTT
<i>Morganella morganii</i>	정방향(F)	(서열번호 26)CTC GCA CCA TCA GAT GAA CCC ATA T
	역방향(R)	(서열번호 27)CAA AGC ATC TCT GCT AAG TTC TCT GGA TG
<i>Lactobacillus reuteri</i>	정방향(F)	(서열번호 28)GAA CGC AYT GGC CCA A
	역방향(R)	(서열번호 29)TCC ATT GTG GCC GAT CAG T
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	정방향(F)	(서열번호 30)CAC TAG ACG CAT GTC TAG AG
	역방향(R)	(서열번호 31)AGT CTC TCA ACT CGG CTA TG
<i>Lactobacillus plantarum</i>	정방향(F)	(서열번호 32)TCA TGA TTT ACA TTT GAG TG
	역방향(R)	(서열번호 33)GAC CAT GCG GTC CAA GTT GTT
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	정방향(F)	(서열번호 34)CGC CCT TAA CAG CAG TCT TC
	역방향(R)	(서열번호 35)GCC CTC CGT ATG CTT AAA CC
<i>Bacterial 16S rDNA</i>	정방향(F)	(서열번호 36)TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG GTG CCA GCM GCC GCG GTA A
	역방향(R)	(서열번호 37)GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT

[0128]

[0129]

실험예 4: 리포폴리사카라이드 측정 방법

[0130]

(1) 분변 중의 리포폴리사카라이드 측정 방법

[0131]

분변(20 mg)을 30 mL의 PBS에 현탁하고, 1시간동안 초음파처리하여 미생물을 분쇄한 다음 500 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 그 상등액을 0.45 μm 필터로 여과하고, 이어서 0.22 μm 필터로 여과한 다음 70℃에서 10분간 처리하여 검체로 사용하였다. 상기 검체를 Limulus amoebocyte lysate (LAL) assay kit (Cape Cod Inc., East Falmouth, MA, U.S.A.)를 사용하여 리포폴리사카라이드를 측정하였다.

[0132]

(2) 혈액 중의 리포폴리사카라이드 측정 방법

[0133]

혈액을 PBS로 10배 희석하고, 원심분리한 다음 상등액을 0℃에서 10분간 처리하였다. 상기 상등액을 0.45 μm

필터로 여과하고, 이어서 0.22 μm 필터로 여과하여 검체로 사용하였다. 상기 검체를 Limulus amoebocyte lysate (LAL) assay kit (Cape Cod Inc., East Falmouth, MA, U.S.A.)를 사용하여 리포폴리사카라이드를 측정하였다.

[0134] 실험예 5: 대장염 지표 측정 방법

[0135] (1) 미엘로퍼옥시다아제 활성 측정

[0136] 대장조직 100 mg에 0.5% 헥사데실 트리메틸 암모늄 브롬화물(hexadecyl trimethyl ammonium bromide) 함유 10 mM 인산칼슘 완충액(potassium phosphate buffer, pH 7.0) 200 μl 를 넣고 균질화(homogenization)하였다. 4℃ 및 10,000 g의 조건에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액 50 μl 를 0.95 ml의 반응액(1.6 mM 테트라메틸 벤지딘(tetramethyl benzidine)과 0.1 mM H_2O_2 함유)에 넣고 37℃에서 반응시키면서 650 nm에서 경시적으로 흡광도를 측정하였다. 상기 미엘로퍼옥시다아제(myeloperoxidase, MPO)의 활성은 반응물로서 생긴 H_2O_2 1 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ 을 1 유닛으로 계산하였다.

[0137] (2) 염증 지표의 측정

[0138] 웨스턴블롯팅 방법을 이용하여 p-p65, p65, iNOS, COX-2 및 β -actin과 같은 염증 반응 지표 물질을 측정하였다. 구체적으로, 상기 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성 측정 실험과 동일한 방법으로 얻은 상등액 50 μg 을 취해 면역블롯팅을 수행하였다. 또한, 사이토카인의 발현량은 ELISA kit로, LPS는 LAL assay kit를 이용하여 측정하였다.

[0139] 실시예 1: 구속 스트레스를 유도한 동물모델의 상태 확인

[0140] 상기 실험예 1-(1)과 같은 방법으로 2일에 1회씩 총 5회 구속 스트레스를 가한 마우스(IS)에 대하여 실험예 2 내지 4의 실험을 수행하였다.

[0141] 실험예 2의 수행 결과, 고가플러스미로 시험에서 개방 통로에서 보낸 시간(OT) 및 개방 통로 진입(OE)이 감소하고, 명암이행 시험에서 밝은 곳에서 보내는 시간이 감소하며, 구슬매장 시험에서 구슬을 매장하는 행동이 증가함을 확인하였다(도 1 (a) 내지 (c)).

[0142] 또한 웨스턴블랏을 통해 확인한 결과, 해마(hippocampus)에서 NF- κB 활성(p-p65/p65)이 증가하고, 뇌유래신경영양인자(brain derived neurotrophic factor, BDNF)의 발현량이 감소하고(도 1 (d)), 혈액 중의 코르티코스테론(corticosterone), IL-6, TNF- α 및 리포폴리사카라이드의 양이 증가함을 확인하였다(도 1 (e) 내지 (h)).

[0143] 실험예 3의 수행 결과, 분변 중의 박테로이데테스균(bacteroidetes), 방선균류(actinobacteria), 피르미쿠테스(firmicutes)가 감소하고, δ , γ -프로테오박테리아(proteobacteria)와 ϵ -프로테오박테리아(proteobacteria)가 증가함을 확인하였고, 실험예 4의 수행 결과, 분변 중의 리포폴리사카라이드가 증가함을 확인하였다(도 2).

[0144] 실험예 5의 수행 결과, 대장염의 지표인 대장의 길이가 감소하고, 미엘로퍼옥시다아제가 증가하고, 대장의 TNF- α 가 증가하고, 대장의 COX-2 및 iNOS의 발현이 증가하고, NF- κB 의 활성이 증가하며, 밀착연접단백질인 오클루딘(occludin)과 클라우딘-1(claudin-1)이 감소함을 확인하였다(도 3 (a) 내지 (e)).

[0145] 실시예 2: 구속 스트레스를 유도한 동물모델의 분변을 투여한 동물모델의 상태 확인

[0146] 상기 실험예 1-(1)과 같은 방법으로 2일에 1회씩 총 5회 구속 스트레스를 가한 마우스의 분변을 투여한 마우스(FIS)에 대하여 실험예 2 내지 4의 실험을 수행하였다.

[0147] 실험예 2의 수행 결과, 고가플러스미로 시험에서 개방 통로에서 보낸 시간(OT) 및 개방 통로 진입(OE)이 감소하고, 명암이행 시험에서 밝은 곳에서 보내는 시간이 감소하며, 구슬매장 시험에서 구슬을 매장하는 행동이 증가함을 확인하였다(도 4 (a) 내지 (c)).

[0148] 또한, 웨스턴블랏을 통해 확인한 결과, 해마(hippocampus)에서 NF- κB 활성(p-p65/p65)이 증가하고, 뇌유래신경영양인자(brain derived neurotrophic factor, BDNF)의 발현량이 감소하고(도 4 (d)), 혈액 중의 코르티코스테론(corticosterone), IL-6 및 TNF- α 의 양이 증가함을 확인하였다(도 5 (a) 내지 (c)).

[0149] 실험예 5의 수행 결과, 대장염의 지표인 대장의 길이가 감소하고, 미엘로퍼옥시다아제가 증가하고(도 4 (e) 및 (f)), 대장의 TNF- α 및 IL-6가 증가하고, 대장의 IL-10이 감소하고, 대장의 COX-2 및 iNOS의 발현이 증가하며,

NF- κ B의 활성이 증가함을 확인하였다(도 6 (a) 내지 (d)).

[0150] 실험예 3의 수행 결과, 분변 중의 박테로이데테스균(bacteroidetes), 방선균류(Actinobacteria), 피르미쿠테스(Firmicutes)가 감소하고, γ -프로테오박테리아(Proteobacteria)와 ϵ -프로테오박테리아(Proteobacteria)가 증가함을 확인하였다(도 6 (e)).

[0151] **실시예 3: 항생제 스트레스를 유도한 동물모델의 상태 확인**

[0152] 상기 실험예 1-(2)과 같은 방법으로 암피실린(100 mg/kg)을 2일간 연속으로 투여하여 항생제 스트레스를 가한 마우스(AP)에 대하여 실험예 2 내지 4의 실험을 수행하였다.

[0153] 실험예 2의 수행 결과, 고가플러스미로 시험에서 개방 통로에서 보낸 시간(OT) 및 개방 통로 진입(OE)이 감소하고, 명암이행 시험에서 밝은 곳에서 보내는 시간이 감소하며, 구슬매장 시험에서 구슬을 매장하는 행동이 증가함을 확인하였다(도 7 (a) 내지 (c)).

[0154] 해마(hippocampus)에서 NF- κ B 활성(p-p65/p65)이 증가하고, 뇌유래신경영양인자(brain derived neurotrophic factor, BDNF)의 발현량이 감소하고(도 7 (d)), 혈액 중의 코르티코스테론(corticosterone), IL-6, TNF- α 및 리포폴리사카라이드의 양이 증가함을 확인하였다(도 7 (e) 내지 (h)).

[0155] 실험예 3의 수행 결과, 분변 중의 박테로이데테스균(bacteroidetes), 방선균류(Actinobacteria), 피르미쿠테스(Firmicutes)가 감소하고, δ , γ -프로테오박테리아(Proteobacteria)와 ϵ -프로테오박테리아(Proteobacteria)가 증가함을 확인하였고, 실험예 4의 수행 결과, 분변 중의 리포폴리사카라이드가 증가함을 확인하였다(도 8 (a) 및 (b)).

[0156] 실험예 5의 수행 결과, 대장염의 지표인 대장의 길이가 감소하고, 미엘로퍼옥시다아제가 증가하고, 대장의 TNF- α 가 증가하고, 대장의 COX-2 및 iNOS의 발현이 증가하고, NF- κ B의 활성이 증가하며, 밀착연접단백질인 오클루딘(occludin)과 클라우딘-1(Claudin-1)이 감소함을 확인하였다(도 9 (a) 내지 (e)).

[0157] **실시예 4: 스트레스 유도 동물모델의 분변에서 분리된 미생물을 투여한 동물모델의 상태 확인**

[0158] **(1) 스트레스 유도 동물모델의 분변에서 미생물 분리**

[0159] 구속 스트레스를 가한 마우스 및 항생제 스트레스를 가한 마우스의 분변을 선택배지에서 배양하였다. 그 결과, DHL 배지에서 자라는 장내세균(Enterobacteriaceae)이 증가하였는데, 특히 클렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*), 대장균(*Escherichia coli*) 및 모르가넬라 모르가니균(*Morganella morganii*)이 증가함을 확인하였다(도 10 (A)).

[0160] 반면, BL 배지에서 자라는 비피더스균(Bifidobacteria) 및 젖산균(Lactobacilli)은 감소하였는데, 특히 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*), 락토바실러스 존슨시(*Lactobacillus johnsonii*), 락토바실러스 람노시스(*Lactobacillus rhamnosus*) 및 비피도박테리움 애니말리스(*Bifidobacterium animalis*)가 감소함을 확인하였다(도 10 (B)).

[0161] **(2) 미생물을 투여한 동물모델의 상태 확인**

[0162] 구속 스트레스를 가한 마우스 및 항생제 스트레스를 가한 마우스의 분변에서 증가한 클렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*), 대장균(*Escherichia coli*) 및 모르가넬라 모르가니균(*Morganella morganii*)을 각각 마우스에 1×10^9 cfu 만큼 투여한 후, 상기 실험예 2-(1)의 고가플러스미로 시험을 수행하였다. 그 결과, 다른 미생물 투여군에 비해 클렙시엘라 옥시토카를 투여한 군의 개방 통로에서 보낸 시간(OT) 및 개방 통로 진입(OE)이 현저히 감소함을 확인하였다(도 11 (a)).

[0163] 이후, 클렙시엘라 옥시토카를 투여한 마우스(KO)에 대하여 실험예 2 내지 4의 실험을 수행하였다.

[0164] 실험예 2의 수행 결과, 고가플러스미로 시험에서 개방 통로에서 보낸 시간(OT) 및 개방 통로 진입(OE)이 감소하고, 명암이행 시험에서 밝은 곳에서 보내는 시간이 감소하며, 구슬매장 시험에서 구슬을 매장하는 행동이 증가함을 확인하였다(도 11 (b) 내지 (d)).

[0165] 해마에서 NF- κ B 활성(p-p65/p65)이 증가하고, 뇌유래신경영양인자의 발현량이 감소하고(도 11 (e)), 혈액 중의 코르티코스테론, IL-6, TNF- α 및 리포폴리사카라이드의 양이 증가함을 확인하였다(도 11 (f) 내지 (i)).

[0166] 실험예 3의 수행 결과, 분변 중의 박테로이데테스균, 방선균, 피르미쿠테스가 감소하고, δ , γ -프로테오박테리

아와 ϵ -프로테오박테리아가 증가함을 확인하였고, 실험예 4의 수행 결과, 분변 중의 리포폴리사카라이드가 증가함을 확인하였다(도 12 (a) 및 (b)).

[0167] 실험예 5의 수행 결과, 대장염의 지표인 대장의 길이가 감소하고, 미엘로퍼옥시다아제가 증가하고, 대장의 TNF- α 가 증가하고, 대장의 COX-2 및 iNOS의 발현이 증가하고, NF- κ B의 활성이 증가하며, 밀착연접단백질인 오클루딘(occludin)과 클라우딘-1(claudin-1)이 감소함을 확인하였다(도 13 (a) 내지 (e)).

[0168] **실시예 5: 유산균의 분리 및 동정**

[0169] **(1) 사람 및 마우스의 분변으로부터 유산균의 분리**

[0170] 사람 및 마우스의 신선한 분변을 GAM 액체 배지(GAM broth; Nissui Pharmaceutical, Japan)에 넣고 현탁하였다. 이후, 상등액을 취해 MRS, BHI(Brain-Heart-Infusion) 또는 BL 한천 배지(BL agar medium; Nissui Pharmaceutical, Japan)에 이식하고 37℃에서 약 48시간 내지 72시간 동안 혐기적으로 배양한 후, 콜로니(colony)를 형성한 균주들을 분리하였다.

[0171] **(2) 분리된 유산균의 동정**

[0172] 사람 또는 마우스의 분변으로부터 분리한 균주들의 생리학적 특성 및 16S rDNA 서열을 분석하여 균주의 종을 확정하고, 균주명을 부여하였다. 부여된 유산균의 균주명은 하기 표 2와 같다. 구체적으로, 사람 또는 마우스의 분변으로부터 분리된 유산균은 락토바실러스 속 9종 및 비피도박테리움 속 22종 이었다.

표 2

관리번호	균주명
1	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK31
2	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK32
3	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK33
4	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK34
5	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK35
6	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK36
7	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK37
8	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK38
9	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK39
10	<i>Bifidobacterium longum</i> NK81
11	<i>Bifidobacterium longum</i> NK82
12	<i>Bifidobacterium longum</i> NK83
13	<i>Bifidobacterium longum</i> NK84
14	<i>Bifidobacterium bifidum</i> NK85
15	<i>Bifidobacterium bifidum</i> NK86
16	<i>Bifidobacterium infantis</i> NK87
17	<i>Bifidobacterium infantis</i> NK88
18	<i>Bifidobacterium infantis</i> NK89
19	<i>Bifidobacterium breve</i> NK90
20	<i>Bifidobacterium breve</i> NK91
21	<i>Bifidobacterium choerinum</i> NK92
22	<i>Bifidobacterium catenulatum</i> NK93
23	<i>Bifidobacterium catenulatum</i> NK94
24	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> NK95
25	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> NK96
26	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> NK97
27	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> NK98
28	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> NK99
29	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> NK100
30	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> NK101
31	<i>Bifidobacterium minimum</i> NK102

[0174]

[0175] (3) 신규한 유산균 락토바실러스 루테리 NK33의 생리학적 특성

[0176] 상기 표 2에 기재된 균주들 중 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) NK33(수탁번호 KCCM12090P)은 그람양성 간균인 것으로 확인되었다. 또한, 락토바실러스 루테리 NK33의 16S rDNA는 서열번호 1의 염기서열을 갖는 것으로 나타났다. 락토바실러스 루테리 NK33의 16S rDNA 염기서열을 BLAST 검색으로 비교한 결과, 동일한 16S rDNA 염기서열을 갖는 락토바실러스 루테리 균주는 검색되지 않았고, 공지된 락토바실러스 루테리 균주의 16S rDNA 서열과 99% 상동성을 보임을 확인하였다.

[0177] 락토바실러스 루테리 NK33의 생리학적 특성 중 탄소원 이용성을 API 50 CHL 키트(BioMerieux's, USA)를 사용하여 당 발효 시험으로 분석하였다. 그 결과는 하기 표 3과 같다. 하기 표 3에서 “+”는 탄소원 이용성이 양성인 경우를 나타내고, “-”는 탄소원 이용성이 음성인 경우를 나타낸다.

표 3

탄소원	<i>L. reuteri</i> NK33	탄소원	<i>L. reuteri</i> NK33
CONTROL	-	에스콜린	+
글리세롤	-	살리신	+
에리쓰리톨	-	셀로비오스	+
D-아라비노오스	-	말토오스	+
L-아라비노오스	+	락토오스	+
D-리보오스	+	멜리비오스	+
D-자일로오스	+	수크로오스	+
L-자일로오스	-	트레할로오스	+
D-아도니톨	-	이눌린	-
메틸-β-D-자일로피라노사이드	-	멜리지토오스	+
D-갈락토오스	+	라피노오스	+
D-글루코오스	+	전분(Starch)	-
D-프럭토오스	+	글리코겐	-
D-만노오스	+	자일리톨	-
L-소르보오스	-	젠티오비오스	+
람노서스	-	D-투라노오스	+
돌시톨	-	D-릭소오스	-
이노시톨	-	D-타가토오스	-
만니톨	+	D-푸코오스	-
솔비톨	±	L-푸코오스	-
α-메틸-D-만노사이드	-	D-아라비톨	-
α-메틸-D-글루코사이드	-	L-아라비톨	-
N-아세틸-글루코사민	+	글루코네이트	±
아미그달린	+	2-케토-글루코네이트	-
알부틴	+	5-케토-글루코네이트	-

[0178]

[0179] (4) 신규한 유산균 비피도박테리움 아돌레센티스 NK98의 생리학적 특성

[0180] 상기 표 2에 기재된 균주들 중 비피도박테리움 아돌레센티스 (*Bifidobacterium adolescentis*) NK98(수탁번호 KCCM12297P)의 16S rDNA는 서열번호 38의 염기서열을 갖는 것으로 나타났다. 비피도박테리움 아돌레센티스 NK98의 16S rDNA 염기서열을 BLAST 검색으로 비교한 결과, 동일한 16S rDNA 염기서열을 갖는 비피도박테리움 아돌레센티스 (*Bifidobacterium adolescentis*) 균주는 검색되지 않았고, 공지된 비피도박테리움 아돌레센티스 균주의 16S rDNA 서열과 98% 상동성을 보임을 확인하였다.

[0181] 비피도박테리움 아돌레센티스 NK98의 생리학적 특성 중 탄소원 이용성 등을 API 키트(API 20A, BioMerieux's, USA)를 사용하여 당 발효 시험으로 분석하였다. 그 결과는 하기 표 4와 같다. 하기 표 4에서 “+”는 탄소원 이용성이 양성인 경우를 나타내고, “-”는 탄소원 이용성이 음성인 경우를 나타낸다.

표 4

탄소원	반응/효소	<i>B. adolescentis</i> NK98
L- 트립토판	indole formation	-
요소	urease	-
D- 글루코오스	acidification(glucose)	+
D- 만니톨	acidification(mannitol)	+
D- 락토오스	acidification(lactose)	+
D-사카로즈	acidification(saccharose)	+
D-말토오스	acidification(maltose)	+
살리신	acidification(salicin)	+
D-자일로스	acidification(xylose)	±
L-아라비노스	acidification(arabinose)	+
젤라틴	hydrolysis(protease)	+
에스쿨린 구연산철	hydrolysis(β -glucosidase)	+
글리세롤	acidification(glycerol)	-
D-셀로비오스	acidification(cellobiose)	±
D-만노오스	acidification(mannose)	-
D-멜레치토스	acidification(melezitose)	-
D-라피노오스	acidification(raffinose)	+
D-솔비톨	acidification(sorbitol)	-
L-람노오스	acidification(rhamnose)	-
D- 트레할로스	acidification(trehalose)	+
	Catalase	-
	Spores	-
	Gram reaction	+
	Morphology	-

[0182]

[0183]

실시예 7: 분리된 유산균들의 활성 비교

[0184]

(1) 항산화 활성(in vitro)

[0185]

DPPH(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)를 0.2 mM 농도가 되도록 에탄올에 녹여 DPPH 용액을 제조하였다. 상기 DPPH 용액 0.1 mL에 유산균의 현탁액(1×10^8 CFU/mL) 또는 비타민 C 용액(1 g/mL)을 넣고 20분간 37°C에서 배양하였다. 배양액을 3000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 수득하였다. 이후, 517 nm에서 상등액의 흡광도를 측정하여 분리된 유산균들의 항산화 활성을 계산하였다. 각 유산균 별 항산화 활성은 하기 표 5(락토바실러스 속) 및 표 6(비피도박테리움 속)과 같다.

[0186]

(2) 대식세포에서의 염증 지표 측정

[0187]

C57BL/6 마우스(male, 6주령 20-23 g)의 복강에 멸균된 4% 티오글라이콜레이트(thioglycolate) 2 mL를 투여하였다. 96시간이 지난 뒤에 마우스를 마취시키고, 마우스의 복강에 RPMI 1640 배지 8 mL를 투여하였다. 5-10분 후에 마우스의 복강 내의 RPMI 배지(대식세포)를 뽑아, 1000 g에서 10분간 원심분리하고 다시 RPMI 1640 배지로 2회 세척하였다. 상기 대식세포를 각 웰 당 0.5×10^6 의 수로 24-웰 플레이트에 깔고, 분리된 락토바실러스 속 유산균과 염증 반응 유도 물질인 리포폴리사카라이드를 2시간 또는 24시간 동안 처리한 후 상등액 및 세포를 수득하였다. 수득한 세포를 RIPA 버퍼(Gibco사)에 넣고 균질화하였다. 24시간 처리한 배양 상등액에서 TNF- α 등의 사이토카인 발현량을, 2시간 동안 처리하여 수득한 세포로부터 p65(NF-kB), p-p65(phosphor-NF-kB) 및 β -actin의 발현량을 면역블롯팅(immunoblotting) 방법으로 측정하였다. 각 락토바실러스 속 유산균 별 염증 지표

의 발현 수준은 하기 표 5와 같다.

(3) 소교세포의 염증 지표 측정

BV-2 소교세포를 각 웰 당 0.5×10^6 의 수로 24-웰 플레이트에 깔고, 분리된 비피도박테리움 유산균과 염증 반응 유도 물질인 리포폴리사카라이드를 2시간 또는 24시간 동안 처리한 후 상등액 및 세포를 수득하였다. 수득한 세포를 RIPA 버퍼(Gibco사)에 넣고 균질화하였다. 2시간 처리하고, 세포를 수득한 세포로부터 p65(NF-κB), p-p65(phosphor-NF-κB) 및 β-actin의 발현량을 면역블롯팅 방법으로 측정하였다. 각 비피도박테리움 속 유산균 별 염증 지표의 발현 수준은 하기 표 6과 같다.

(4) SH-SY5Y 세포에 대한 뇌유래신경영양인자(BDNF) 발현 효과 및 NF-κB 활성화 효과

신경 세포인 SH-SY5Y 세포를 한국 세포주 은행에서 분양하여 10% FBS 및 1% 항생제가 첨가된 DMEM 배지에서 배양하고, 12-웰 플레이트에 웰 당 2×10^6 세포수로 분주하였다. 이 후, 각 웰에 유산균 (1×10^4 CFU/ml)과 함께 코르티코스테론(corticosterone)을 300 mg/ml의 농도로 첨가하여 배양한 뒤, NF-κB(p65, p-p65) 및 뇌유래신경영양인자(brain derived neurotrophic factor, BDNF)의 발현량을 면역블롯팅 방법으로 측정하였다. 각 유산균 별 BDNF 발현 수준 및 NF-κB 활성화 수준은 하기 표 5(락토바실러스 속) 및 표 6(비피도박테리움 속)과 같다.

표 5

균주명	항산화 활성	대식세포			SH-SY5Y 세포	
		TNF-α 억제능	IL-10 발현증가	NF-κB 억제능	BDNF 발현증가	NF-κB 억제
<i>L. reuteri</i> NK31	+	+	+	+	+	+
<i>L. reuteri</i> NK32	++	++	++	++	+	++
<i>L. reuteri</i> NK33	+++	++	++	++	++	++
<i>L. reuteri</i> NK34	+	+	+	+	+	+
<i>L. reuteri</i> NK35	+	+	+	+	+	+
<i>L. johnsonii</i> NK36	++	++	++	+	++	+
<i>L. johnsonii</i> NK37	++	++	++	++	+	++
<i>L. johnsonii</i> NK38	+	+	+	+	+	+
<i>L. johnsonii</i> NK39	+	+	+	+	-	+

표 6

균주명	항산화 활성능	소교세포 NF-κB 억제능	SH-SY5Y세포 BDNF 발현능
무처리	-	-	-
<i>L. reuteri</i> NK33	+++	++	++
<i>B. longum</i> NK81	+	+	+
<i>B. longum</i> NK82	+	+	+
<i>B. longum</i> NK83	++	+	+
<i>B. longum</i> NK84	++	++	+
<i>B. bifidum</i> NK85	++	++	+
<i>B. bifidum</i> NK86	+	-	+
<i>B. infantis</i> NK87	++	+	+
<i>B. infantis</i> NK88	+	+	++
<i>B. infantis</i> NK89	+	+	+
<i>B. breve</i> NK90	+	+	++
<i>B. breve</i> NK91	++	+	+
<i>B. choerinum</i> NK92	+	+	+
<i>B. catenulatum</i> NK93	+	+	+
<i>B. catenulatum</i> NK94	+	+	+
<i>B. adolescentis</i> NK95	++	+	+
<i>B. pseudolongum</i> NK96	++	+	+
<i>B. adolescentis</i> NK97	+	+	+
<i>B. adolescentis</i> NK98	++	+++	+++
<i>B. adolescentis</i> NK99	+	++	++
<i>B. pseudocatenulatum</i> NK100	++	+	++
<i>B. pseudocatenulatum</i> NK101	++	+	+
<i>B. minimum</i> NK102	+	+	+

* -, <10%; +, 10~30%; ++, 30~50%; +++, >50%

(5) 실험 결과

분리된 유산균들의 활성을 평가한 결과, 분리된 락토바실러스 속 또는 비피도박테리움 속 유산균들 중 본원의 락토바실러스 루테리 NK33 및 비피도박테리움 아도레센티스 NK98의 항산화 활성 및 염증반응 억제 효과가 현저히 우수함을 확인하였다. 특히, 알츠하이머와 같은 노화관련 질환을 유발하는 물질로 알려진 NF-κB의 활성을 억제하고, 노화 및 치매 등에서 보이는 소교세포의 염증반응을 억제하며, 노화 및 치매 등에서 감소하는 뇌의 신경이 생산하는 뇌유래신경영양인자의 발현을 증가시킴을 확인하였다(표 5 및 표 6).

실시예 8: 분리된 비피도박테리움 속 유산균들의 면역 조절 효능 평가

분변으로부터 분리한 비피도박테리움 속 유산균의 면역조절 효능을 평가하기 위하여, 대식세포 및 비장세포의

면역반응에 비피도박테리움 속 유산균이 미치는 영향을 측정하였다.

(1) 대식세포에서의 면역반응

C57BL/6 마우스(수컷, 6주령 20-23 g, 라운바이오㈜)의 복강에 멸균된 4% 티오글라이콜레이트(thioglycolate) 2 ml를 투여하였다. 투여 후 96시간이 지난 뒤에 마우스를 마취시키고, 마우스의 복강에 RPMI 1640 배지 8 ml를 투여하였다. 5~10분 후에 마우스의 복강 내의 RPMI 배지(대식세포 포함)를 뽑아내고 1000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후 다시 RPMI 1640 배지로 2회 세척하였다. 상기 대식세포를 각 웰 당 0.5×10^6 의 수로 24-웰 플레이트에 깔고, 24시간 동안 배양한 후 부착하지 않은 세포를 제거하여 사용하였다.

상기 대식세포 배양액에 비피도박테리움 아돌레센티스 NK98과 염증 반응 유도 물질인 리포폴리사카라이드를 2시간 또는 24시간 동안 처리한 후 상등액 및 세포를 수득하였으며, 이때 유산균 처리 농도는 1×10^4 CFU/ml 이었다. 수득한 세포를 RIPA 버퍼(Gibco사)에 넣고 균질화하였다. 수득한 상등액으로부터 TNF- α 의 발현량을 ELISA kit로 측정하고, 수득한 세포로부터 p65(NF- κ B), p-p65(phosphor-NF- κ B) 및 β -actin의 발현량을 면역블롯팅 방법으로 측정하였다. 구체적으로, 상등액 50 μ g을 취해 SDS 10%(w/v) polyacrylamide gel에서 1시간 30분간 전기영동을 하였다. 전기영동한 샘플을 니트로셀룰로소지에 100 V 및 400 mA의 조건에서 1시간 10분간 트랜스퍼(transfer) 하였다. 샘플이 트랜스퍼된 니트로셀룰로소지를 5% 탈지유로 30분간 blocking 한 후, 5분씩 3회에 걸쳐 PBS-Tween으로 세척하고, 1차 항체(Santa Cruz Biotechnology, 미국)를 1:100의 비율로 하여 하룻밤 동안 반응시켰다. 이후, 10분씩 3회에 걸쳐 세척하고, 2차 항체(Santa Cruz Biotechnology, 미국)를 1:1000의 비율로 하여 1시간 20분간 반응시켰다. 이후, 15분씩 3회에 걸쳐 세척하고, 형광발색 시킨 후 현상하고, 발색밴드의 강도(Intensity)를 측정하였으며, 그 결과는 하기 표 7과 같다.

표 7

군주명	NF- κ B 억제능 (p-p65/p65)	TNF- α 억제능
무처리	-	-
<i>B. adolescentis</i> NK98	+	++

* 억제율 : -, <10%; +, 10~30%; ++, 30~60%; +++, >60

(2) 비장세포에서의 면역반응

C57BL/6 마우스(수컷, 6주령, 20-22 g, (주)오리엔트바이오)의 비장을 분리 및 분쇄하여 10% FCS 함유 RPMI 1640 배지에 현탁하였다. CD4 T cell isolation kit(MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, 독일)를 사용하여 CD4 T 세포를 분리하고, 분리한 CD4 T 세포를 12-웰 플레이트에 각 웰 당 5×10^5 수로 분주하였다.

T 세포의 Th1 세포로의 분화를 유도하기 위해 항-CD3, 항-CD28, IL-2 및 IL-12를, T 세포의 Th2 세포로의 분화를 유도하기 위해 항-CD3, 항-CD28, IL-2 및 IL-4를, T 세포의 Th17 세포로의 분화를 유도하기 위해 항-CD3, 항-CD28, IL-6 및 TGF- β 를, T 세포의 Treg 세포로의 분화를 유도하기 위해 항-CD3 및 항-CD28을 넣고 세포를 배양하면서 유산균을 웰 당 1×10^5 CFU/ml의 양으로 넣고 4일간 배양하였다.

이후, 비장으로부터 분리된 T 세포의 Th1 세포, Th2 세포, Th17 세포 및 Treg 세포로의 분화능을 측정하였다. 구체적으로, 배양액의 세포를 항-FoxP3 또는 항-IL-17A 항체로 염색하고 FACS(Fluorescence-activated cell sorting) 장치(C6 Flow Cytometer System, San Jose, CA, USA)를 이용하여 Th1 세포, Th2 세포, Th17 세포 및 Treg 세포의 분포를 분석하였으며, 그 결과는 하기 표 8과 같다.

표 8

균주명	분화 억제율			분화 증가율
	Th1 세포	Th2 세포	Th17 세포	Treg 세포
무처리	-	-	-	-
<i>B. longum</i> NK81	+	++	+	+
<i>B. longum</i> NK82	+	++	+	+
<i>B. longum</i> NK83	+	++	++	+
<i>B. longum</i> NK84	+++	+	+++	++
<i>B. bifidum</i> NK85	+++	+	+++	++
<i>B. bifidum</i> NK86	+	+	+++	+
<i>B. infantis</i> NK87	+	+	+++	++
<i>B. infantis</i> NK88	+	+	+++	+
<i>B. infantis</i> NK89	+	+	+++	+
<i>B. breve</i> NK90	+	+++	++	++
<i>B. breve</i> NK91	++	++	+	+
<i>B. choerinum</i> NK92	-	+	+	-
<i>B. catenulatum</i> NK93	+	++	++	+
<i>B. catenulatum</i> NK94	++	+	+	++
<i>B. adolescentis</i> NK95	++	+	+	+
<i>B. pseudolongum</i> NK96	++	++	++	+
<i>B. adolescentis</i> NK97	+	++	+	+
<i>B. adolescentis</i> NK98	++	++	+++	+++
<i>B. adolescentis</i> NK99	+	+	++	+
<i>B. pseudocatenulatum</i> NK100	++	++	+	+
<i>B. pseudocatenulatum</i> NK101	+	++	+	+
<i>B. minimum</i> NK102	+	+	+	+

* 억제율 : -, <10%; +, 10~30%; ++, 30~60%; +++, >60%

* 증가율 : -, <10%; +, 10~50%; ++, 50~100%; +++, >100%

[0206]

[0207]

또한, 비장 T 세포로부터 분화된 Th1 세포, Th2 세포, Th17 세포 및 Treg 세포의 전사인자 및 사이토카인 발현율을 측정하였다. 구체적으로, qRT-PCR을 이용하여 Th1 세포 분화 유도 배양액으로부터 T-bet, IFN- γ 및 IL-12를, Th2 세포 분화 유도 배양액으로부터 GATA3 및 IL-5을, Th17 세포 분화 유도 배양액으로부터 ROR γ 및 IL-17을, Treg 세포 분화 유도 배양액으로부터 Foxp3 및 IL-10의 발현량을 분석하였으며, 그 결과는 하기 표 9와 같다.

표 9

균주명	발현 억제율						발현 증가율	
	T-bet	IFN- γ	GATA3	IL-5	ROR γ t	IL-17	FOXP3	IL-10
무처리	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. longum</i> NK81	++	+	+	+	+	+	-	+
<i>B. longum</i> NK82	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. longum</i> NK83	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. longum</i> NK84	++	++	+	+	+++	+++	++	++
<i>B. bifidum</i> NK85	+++	+++	+	+	+	+	++	++
<i>B. bifidum</i> NK86	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>B. infantis</i> NK87	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. infantis</i> NK88	+	+	++	++	+	+	+	+
<i>B. infantis</i> NK89	+	+	+	+	++	++	+	+
<i>B. breve</i> NK90	+	+	+++	+++	++	++	++	++
<i>B. breve</i> NK91	+	+	+	+	+	+++	++	+
<i>B. choerinum</i> NK92	+	+	+	+	+	++	+	++
<i>B. catenulatum</i> NK93	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. catenulatum</i> NK94	++	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. adolescentis</i> NK95	+	+	+	+	++	++	++	++
<i>B. pseudolongum</i> NK96	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. adolescentis</i> NK97	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. adolescentis</i> NK98	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++
<i>B. adolescentis</i> NK99	+	++	+	+	+	+	+	+
<i>B. pseudocatenulatum</i> NK100	++	+	+	+	-	-	+	+
<i>B. pseudocatenulatum</i> NK101	++	+	+	+	-	-	+	+
<i>B. minimum</i> NK102	+	+	+	+	+	-	-	-

* 억제율 : -, <10%; +, 10~30%; ++, 30~60%; +++, >60%

* 증가율 : -, <10%; +, 10~50%; ++, 50~100%; +++, >100%

[0208]

[0209]

상기 표 8 및 표 9에서 확인되는 바와 같이, 비피도박테리움 아둘레센티스 NK98은 T 세포의 Th1 세포, Th2 세포, Th17 세포로의 분화 억제율이 높고, 특히 T 세포의 Treg 세포로의 분화 증가율이 높아 염증반응을 효과적으로 억제할 수 있고, 이에 따라 염증성 질환을 효과적으로 개선할 수 있음을 확인하였다.

[0210]

실시예 9: 락토바실러스 루테리 NK33의 스트레스 개선 효과

[0211]

상기 실험예 1과 같이 구속 스트레스를 가한 마우스에 구속 스트레스를 시작하고 7일째부터 1일 1회씩 5일간 신 규한 유산균인 락토바실러스 루테리 NK33 1×10^9 cfu 또는 생리식염수를 투여하였다. 상기 마우스들에 대하여 실험예 2 내지 5의 실험을 수행하였다.

[0212]

실험예 2의 수행 결과, 생리식염수를 투여한 군(IS)은 고가플러스미로 시험에서 개방 통로에서 보낸 시간(OT)

및 개방 통로 진입(OE)이 감소하고, 명암이행 시험에서 밝은 곳에서 보내는 시간이 감소하며, 구슬매장 시험에서 구슬을 매장하는 행동이 증가하였다. 그러나, 락토바실러스 루테리 NK33을 투여한 군(IS+LR)은 개방 통로에서 보낸 시간(OT) 및 개방 통로 진입(OE)이 증가하고, 밝은 곳에서 보내는 시간이 증가하였으며, 구슬매장 시험에서 구슬을 매장하는 행동이 감소함을 확인하였다(도 14 (a) 내지 (c)).

[0213] 해마에서 생리식염수를 투여한 군(IS)은 NF- κ B 활성화(p-p65/p65)이 증가하고, 뇌유래신경영양인자의 발현량이 감소하고, 혈액 중의 코르티코스테론, IL-6, TNF- α 및 리포폴리사카라이드의 양이 증가함을 확인하였다. 그러나, 락토바실러스 루테리 NK33을 투여한 군(IS+LR)은 NF- κ B 활성화(p-p65/p65)가 억제되고, 뇌유래신경영양인자의 발현량이 증가하고, 혈액 중의 코르티코스테론, IL-6, TNF- α 및 리포폴리사카라이드의 양이 감소함을 확인하였다(도 14 (d) 내지 (g)).

[0214] 실험예 5의 수행 결과, 생리식염수를 투여한 군(IS)은 대장염의 지표인 대장의 길이가 감소하고, 미엘로퍼옥시다아제가 증가하고, 대장의 TNF- α 가 증가하고, 대장의 COX-2 및 iNOS의 발현이 증가하고, NF- κ B의 활성이 증가함을 확인하였다. 그러나, 락토바실러스 루테리 NK33을 투여한 군(IR)은 대장의 길이가 정상 수준으로 회복되고, 미엘로퍼옥시다아제가 감소하고, 대장의 TNF- α 가 감소하고, 대장의 COX-2 및 iNOS의 발현이 감소하고, NF- κ B의 활성이 억제됨을 확인하였다(도 15 (a) 내지(d)).

[0215] 이를 통해, 신규한 유산균인 락토바실러스 루테리 NK33는 불안증, 우울증 및 스트레스 등의 정신 장애의 개선 효과가 우수함을 확인하였다.

[0216] 실시예 10: 비피도박테리움 아돌레센티스 NK98의 스트레스 개선 효과

[0217] 상기 실험예 1의 구속 스트레스를 가한 마우스에 구속 스트레스를 시작하고 7일째부터 1일 1회씩 3일간 비피도박테리움 아돌레센티스 NK98 1×10^9 cfu(NK98), 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38 1×10^9 cfu(IM38), 생리식염수(IS) 또는 부스피론(Buspirone) 1 mg/kg를 투여하고, 상기 실험예 2 및 실험예 5의 실험을 수행하였다.

[0218] (1) 고가플러스미로 시험

[0219] 상기 실험예 2-(1)의 고가플러스미로 실험과 함께 혈중 코르티코스테론(BC)의 양을 측정하였으며, 그 결과는 하기 표 10과 같다.

표 10

	불안 마우스			우울 마우스		
	OT (%)	OE (%)	BC (ng/mL)	OT (%)	OE (%)	BC (ng/mL)
정상대조군	17.1	35.2	0.8	18.2	38.5	0.7
IS	5.2	16.1	2.8	3.4	13.5	7.4
NK98	16.2	34.1	1.2	16.2	32.3	3.5
IM38	14.3	32.6	1.5	13.3	28.6	4.1
부스피론	16.7	33.8	1.2	15.7	29.8	3.8

[0220]

[0221] 상기 표 10에서 확인되는 바와 같이, 구속스트레스 모델에 생리식염수를 투여한 군(IS)은 구속스트레스를 주지 않은 정상대조군에 비해 고가플러스미로 시험에서 개방 통로에서 보낸 시간(OT) 및 개방 통로 진입(OE)이 모두 감소하였다. 그러나 비피도박테리움 아돌레센티스 NK98을 투여한 군은 개방통로에서 보내는 시간과 빈도가 증가하고 혈중 코르티코스테론의 양이 현저히 감소하였으며, 이러한 효과는 비피도박테리움 아돌레센티스 IM38 대비 우수함을 확인하였다.

[0222] (2) 명암이행 시험

[0223] 상기 실험예 2-(2)의 명암이행 실험을 수행하였으며, 그 결과는 하기 표 11과 같다.

표 11

	밝은 부분에 머문 시간 (%)	왕복한 횟수
정상대조군	46.5	23.5
IS	23.1	13.8
NK98	39.4	21.9
IM38	35.8	18.3
부스피론	40.1	19.6

[0224]

[0225]

상기 표 11에서 확인되는 바와 같이, 구속스트레스 모델에 생리식염수를 투여한 군(IS)은 구속스트레스를 주지 않은 정상대조군에 비해 밝은 곳에서 보내는 시간이 감소하였으나, 비피도박테리움 아돌레센티스 NK98을 투여한 군은 밝은 곳에서 보내는 시간이 증가하였으며, 이는 비피도박테리움 아돌레센티스 IM38을 투여한 군보다 증가한 것을 확인하였다.

[0226]

(3) 강제수영 실험

[0227]

상기 실험예 2-(4)의 강제수영 실험을 수행하였으며, 그 결과는 하기 표 12와 같다.

표 12

	부동상태 시간 (%)
정상대조군	28.5
IS	46.7
NK98	31.2
IM38	38.2
부스피론	32.1

[0228]

[0229]

상기 표 12에서 확인되는 바와 같이, 우울마우스 모델에 생리식염수를 투여한 군(IS)은 구속스트레스를 주지 않은 정상대조군에 비해 부동상태 시간이 증가하였으나, 비피도박테리움 아돌레센티스 NK98을 투여한 군은 부동상태 시간이 감소하였으며, 이는 비피도박테리움 아돌레센티스 IM38을 투여한 군보다 보다 감소하였음을 확인하였다.

[0230]

(4) 꼬리 매달기 실험

[0231]

상기 실험예 2-(5)의 꼬리 매달기 실험을 수행하였으며, 그 결과는 하기 표 13과 같다.

표 13

	부동상태 시간 (%)
정상대조군	21.5
IS	37.9
NK98	24.2
IM38	26.9
부스피론	25.2

[0232]

[0233]

상기 표 13에서 확인되는 바와 같이, 우울마우스 모델에 생리식염수를 투여한 군(IS)은 구속스트레스를 주지 않은 정상대조군에 비해 부동상태 시간이 증가하였으나, 비피도박테리움 아돌레센티스 NK98을 투여한 군은 부동상태 시간이 감소하였음을 확인하였다.

[0234] (5) 바이오마커 측정

[0235] 우울마우스의 마지막 행동실험을 수행하고 2시간 후에 마우스를 마취시키고, 상기 실험에 5와 같은 방법으로 혈액의 코르티코스테론은 ELISA로, 뇌의 뇌유래신경영양인자 및 NF-κB와 대장의 NF-κB는 면역블롯팅으로 측정하였으며, 그 결과는 하기 표 14와 같다.

표 14

	NF-κB 활성화 저해능	BDNF 발현양	혈중 코르티코스테론 (mg/mL)
정상대조군			0.7
IS	-	-	7.4
NK98	+++	+++	3.5
IM38	++	++	4.1
부스피론	-	-	3.8

[0236] * -, <10%; +, 10~30%; ++, 30~50%; +++, >50%

[0237] 상기 표 14에서 확인되는 바와 같이, 생리식염수를 투여한 군(IS)은 해마에서 NF-κB 활성(p-p65/p65)이 증가하고, 뇌유래신경영양인자의 발현량이 감소하고, 혈액 중의 코르티코스테론양이 증가함을 확인하였다. 그러나, NK98을 투여한 군은 NF-κB 활성이 억제되고, 뇌유래신경영양인자의 발현량이 증가하였으며, 혈액 중의 코르티코스테론양이 감소하였으며, 이러한 효과는 IM38을 투여한 군 대비 우수함을 확인하였다.

[0238] (6) 대장염 개선 효과

[0239] 실험예 1의 불안마우스의 마지막 행동실험을 수행하고 2시간 후에 마우스를 마취시키고, 상기 실험에 5와 같은 방법으로 장길이, MPO, COX-2, TNF-α 및 NF-κB의 활성화를 측정하였으며, 그 결과는 하기 표 15와 같다.

표 15

	장길이(cm)	MPO 저해능	염증지표 저해율		
			NF-κB	COX-2	TNF-α
정상대조군	6.2				
IS	5.1	-	-	-	-
NK98	5.7	+++	+++	+++	+++
IM38	5.5	+++	++	++	++
부스피론	5.2	+	+	+	+

[0240] * -, <10%; +, 10~30%; ++, 30~50%; +++, >50%

[0241] 상기 표 15에서 확인되는 바와 같이, 구속스트레스 모델에 생리식염수를 투여한 군(IS)은 구속스트레스를 주지 않은 정상대조군에 비해 장길이가 줄어들고, MPO 및 염증지표가 증가하였으나, 비피도박테리움 아돌레센시스 NK98을 투여한 군은 장길이가 회복되고, MPO 저해능 및 염증 지표들이 개선되었음을 확인하였다.

[0242] (7) 항생제 유도 스트레스 개선 효과

[0243] 상기 실험예 1-(2)와 같은 방법으로 암피실린(100 mg/kg)을 2일간 연속으로 투여하여 항생제 스트레스를 유도한 마우스에 대하여 실험예 2 및 5의 실험을 수행하였으며, 그 결과는 하기 표 16 및 17과 같다.

표 16

	개방 통로에서 보낸 시간 (%)	개방 통로 진입 (%)	혈중 코르티코스테론 (ng/mL)
정상대조군	16.8	33.5	0.8
IS	4.9	13.4	3.2
NK98	14.3	30.5	1.6
IM38	12.9	29.2	1.9
부스피론	14.1	31.3	1.6

[0244]

표 17

	장길이(cm)	MPO 저해능	염증지표 저해율		
			NF-κB	COX-2	TNF-α
정상대조군	6.3				
IS	5.4	-	-	-	-
NK98	6.1	+++	+++	+++	+++
IM38	5.8	++	++	++	++
부스피론	5.5	+	+	+	+

[0245]

* -, <10%; +, 10~30%; ++, 30~50%; +++, >50%

[0246]

상기 표 16에서 확인되는 바와 같이, 항생제 유도 스트레스 모델에 생리식염수를 투여한 군(IS)은 정상대조군에 비해 고가플러스미로 시험에서 개방 통로에서 보낸 시간 및 개방 통로 진입이 모두 감소하였으나, 비피도박테리움 아돌레센티스 NK98을 투여한 군은 개방통로에서 보내는 시간과 빈도가 증가하고 혈중 코르티코스테론의 양이 현저히 감소하였으며, 이러한 효과는 비피도박테리움 아돌레센티스 IM38 대비 우수함을 확인하였다.

[0247]

또한, 표 17에서 확인되는 바와 같이, 항생제 유도 스트레스 모델에 생리식염수를 투여한 군(IS)은 정상대조군에 비해 장길이가 줄어들고, MPO 및 염증지표가 증가하였으나, 비피도박테리움 아돌레센티스 NK98을 투여한 군은 장길이가 회복되고, MPO 저해능 및 염증 지표들이 개선되었음을 확인하였다.

[0248]

실시예 11: 비피도박테리움 아돌레센티스 NK98의 인지기능 개선 효과

[0249]

E. coli 분리 LPS(0.5 mg/kg/day)로 마우스의 복강에 5일간 투여한 후 익일부터 유산균을 투여하고 유산균의 인지기능 개선 효능을 물체인지실험, Y미로실험 및 히포캄퍼스에서 BDNF를 면역블롯팅으로 측정하였으며, 그 결과는 하기 표 18과 같다.

[0250]

구체적으로, 물체 인지 실험 방법으로서, 내부에서 외부가 보이지 않도록 제작된 상자(40×40×40 cm) 안에 모양과 크기가 같은 두 개의 물체(A, A')를 고정시킨 후 마우스를 상자의 중심에서 출발시켜, 10분간 마우스가 두 물체를 만지는 횟수를 기록하였다. 24시간이 지난 다음 두 개의 물체 중 하나를 새로운 물체로 바꾼 후(A, B) 원래 있던 물체와 새로운 물체를 만지는 횟수를 기록하여 수치화하였다.

[0251]

또한, Y 미로(Y maze) 실험 방법으로서, 실험 장치는 동일한 3개의 암(arm)(가로 8 cm, 세로 30 cm, 높이 14 cm)으로 구성되어 있으며, 각각은 서로 120°의 일정한 각도로 배치하였다. 마우스를 한쪽 암 끝에 위치시킨 다음 8분 동안 자유롭게 Y 미로를 돌아다니도록 하고, 각 암에 들어간 횟수 및 순서를 측정하여 자발적 변경(spontaneous alteration)(%)을 평가하였다. 변경(alteration)은 3개의 암을 순차적으로 들어가는 경우, 즉 ABC, BCA, CAB 등으로 정의하였다.

[0252]

% 변경(alteration) = [총 변경 수]/[암(arm)에 들어간 총 횟수-2] x 100

표 18

	물체인지실험(%)	Y미로 실험(%)	히포캠퍼스 BDNF 발현능
정상대조군	52.1	76.5	
IS	38.5	56.7	-
NK98	48.6	68.4	+++
IM38	46.5	64.5	++
부스피론	42.9	62.4	+

* -, <10%; +, 10~30%; ++, 30~50%; +++, >50%

[0253]

[0254]

상기 표 18에서 확인되는 바와 같이, 물체인지 실험 및 Y미로 실험을 통해 비피도박테리움 아돌레센티스 NK98을 투여한 군은 인지기능이 개선되고 BDNF 발현이 증가함을 확인하였다.

[0255]

실시예 12: 2종의 유산균 병용 투여에 따른 스트레스 개선 효과

[0256]

신규한 유산균인 락토바실러스 루테리 NK33, 국내공개특허 제10-2017-0090359호에 개시된 유산균인 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) IM38(수탁번호: KCCM 11807P) 또는 이들의 혼합물의 스트레스 개선 효과를 비교하였다.

[0257]

구체적으로, 상기 실험예 1-(1)과 같이 구속 스트레스가 유도된 모델에 생리식염수(IS), 1×10^9 cfu의 락토바실러스 루테리 NK33(NK33), 1×10^9 cfu의 비피도박테리움 아돌레센티스 IM38(IM38) 또는 상기 유산균을 병용(NK33+IM38)하여 각각 0.5×10^9 cfu씩 투여한 후, 고가플러스미로 시험을 수행하였다. 그 후, 각 군별로 혈액을 채취하여 혈중 코르티코스테론의 양을 측정하였으며, 그 결과는 하기 표 19와 같다.

표 19

	개방 통로에서 보낸 시간 (%)	개방 통로 진입 (%)	혈중 코르티코스테론 (ng/mL)
정상대조군	16.1	34.0	0.9
IS	5.4	16.1	2.4
NK33	14.1	33.5	1.4
IM38	14.8	31.5	1.5
NK33+IM38	17.3	36.5	1.2

[0258]

[0259]

상기 표 19에서 확인되는 바와 같이, 단독의 유산균 투여군에 비해 병용 투여군의 개방 통로에서 보낸 시간 및 개방 통로 진입이 증가하였고, 혈중 코르티코스테론의 양이 현저히 감소함을 확인하였다.

[0260]

또한, 락토바실러스 루테리 NK33 및 비피도박테리움 아돌레센티스 NK98 혼합물의 스트레스 개선 효과를 상기 NK33 및 IM38의 병용 투여 실험과 동일한 방법으로 비교하였으며, 그 결과는 하기 표 20과 같다.

표 20

	개방 통로에서 보낸 시간 (%)	개방 통로 진입 (%)	혈중 코르티코스테론 (ng/mL)
정상대조군	18.1	34.2	0.9
IS	5.5	17.1	2.9
NK33	14.1	33.5	1.4
NK98	16.8	33.3	1.3
NK33+NK98	18.5	38.2	1.1

[0261]

[0262]

상기 표 20에서 확인되는 바와 같이, 단독의 유산균 투여군에 비해 병용 투여군의 개방 통로에서 보낸 시간 및 개방 통로 진입이 증가하였고, 혈중 코르티코스테론의 양이 현저히 감소함을 확인하였다.

[0263]

<유산균의 수탁 정보>

[0264]

본 발명의 발명자들은 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) NK33을 2017년 8월 4일에 공인기탁기관인 한국미생물보존센터(주소: 대한민국 서울 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩)에 특허기탁하여 KCCM12090P의 수탁번호를 부여받았다.

[0265]

또한, 본 발명의 발명자들은 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) NK98을 2018년 8월 3일에 공인기탁기관인 한국미생물보존센터(주소: 대한민국 서울 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩)에 특허기탁 하여 KCCM12297P의 수탁번호를 부여받았다.

수탁번호

[0267]

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM12090P

수탁일자 : 20170804

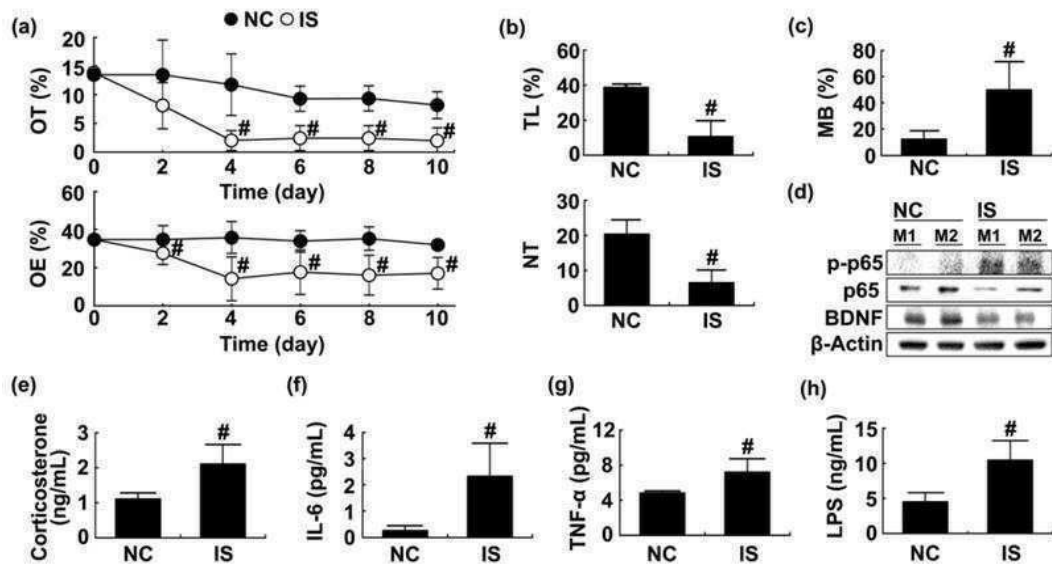
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM12297P

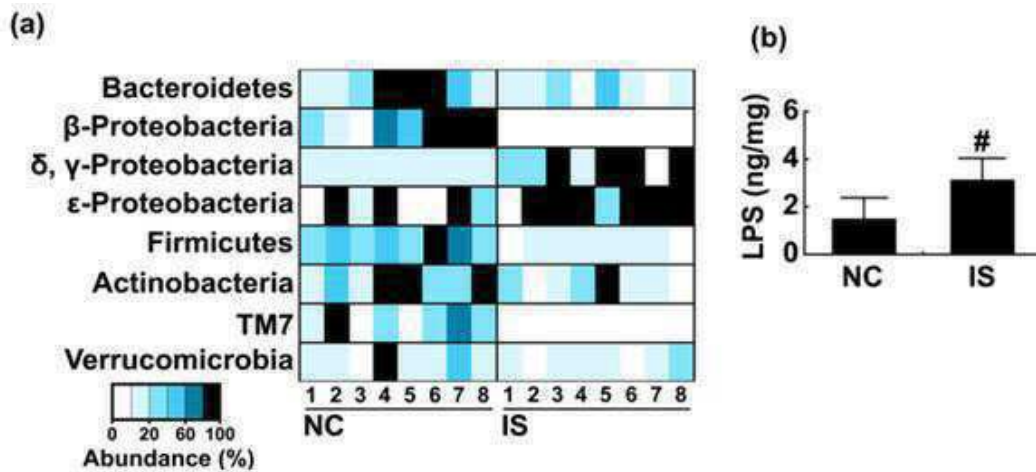
수탁일자 : 20180803

도면

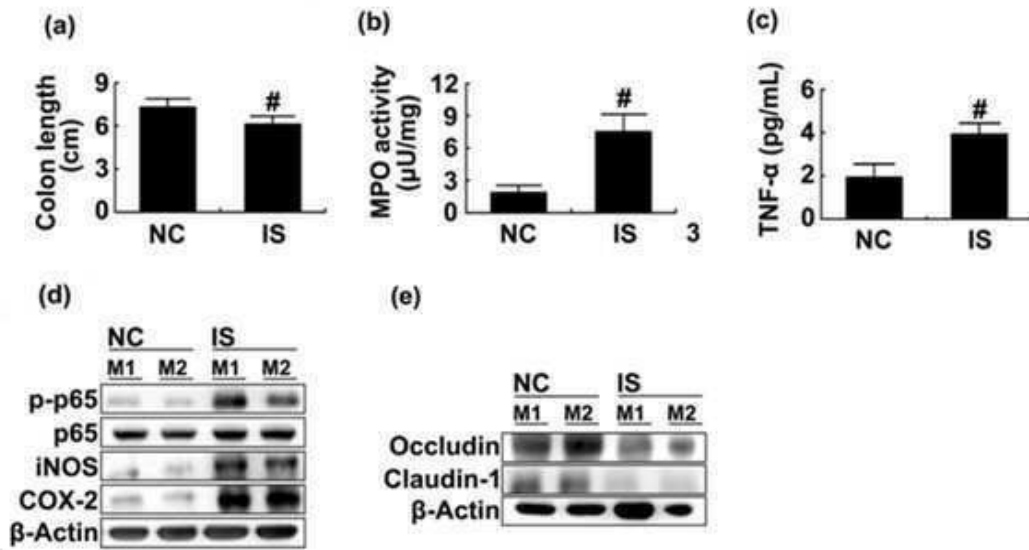
도면1



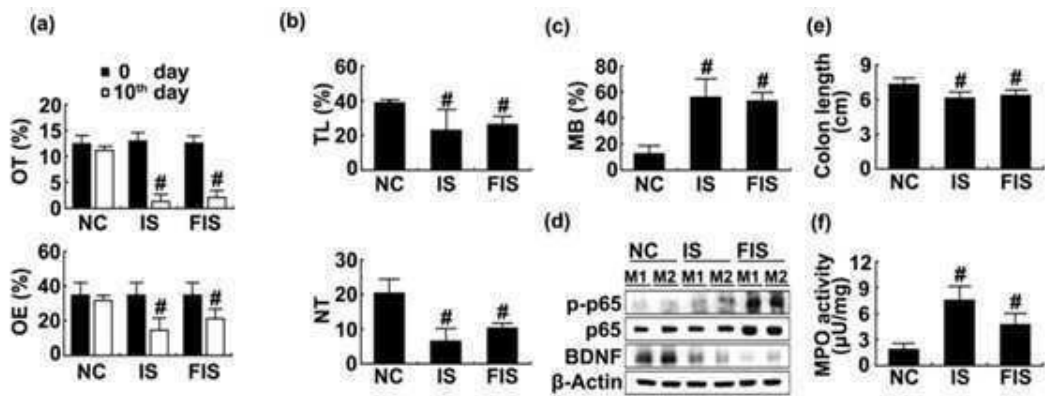
도면2



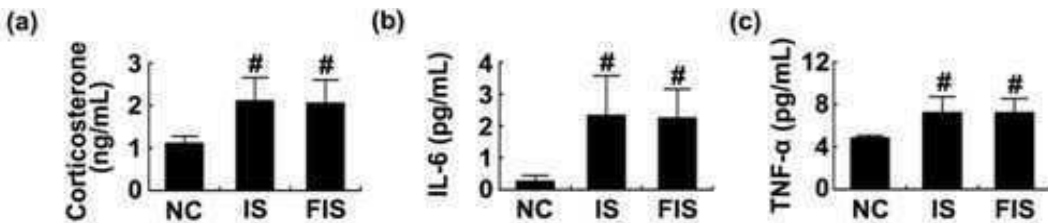
도면3



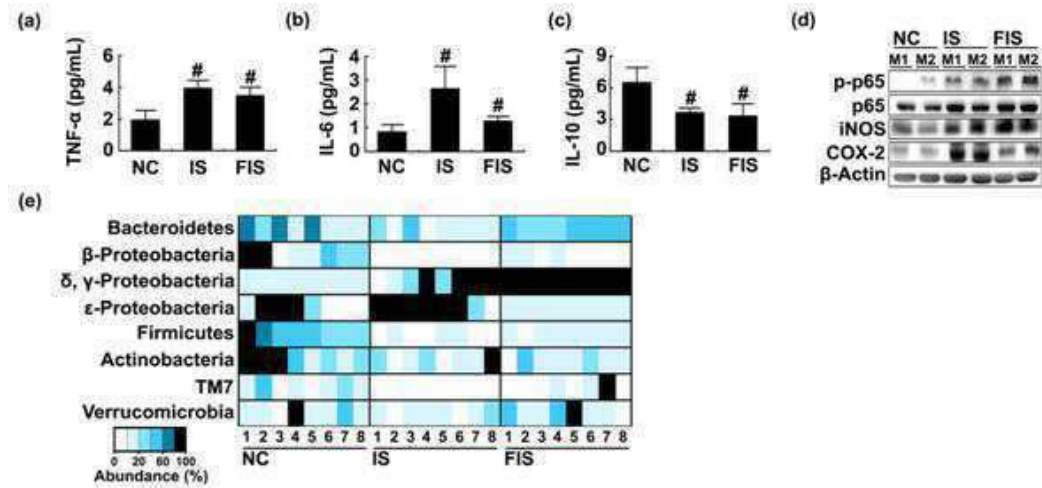
도면4



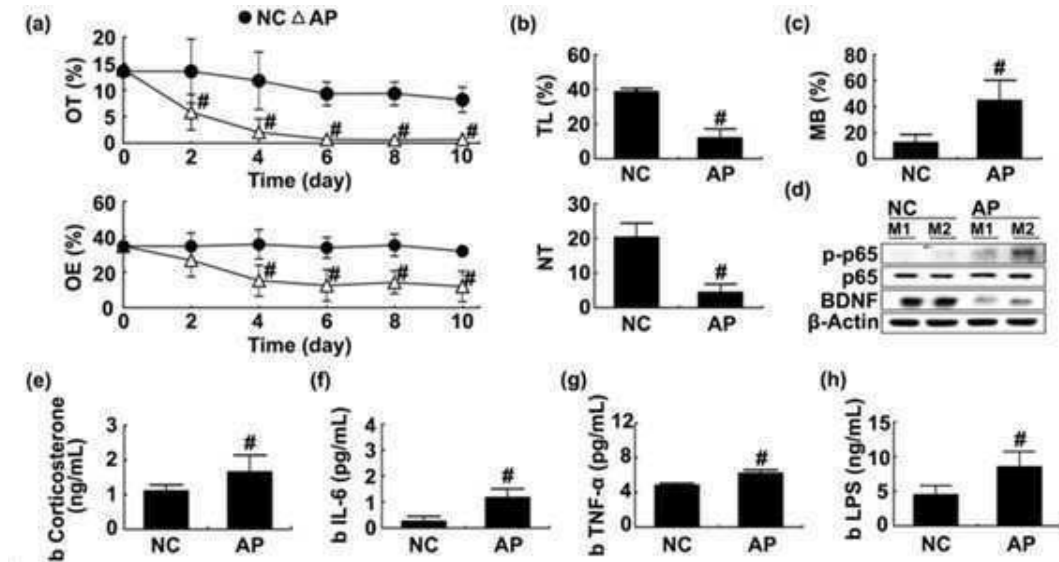
도면5



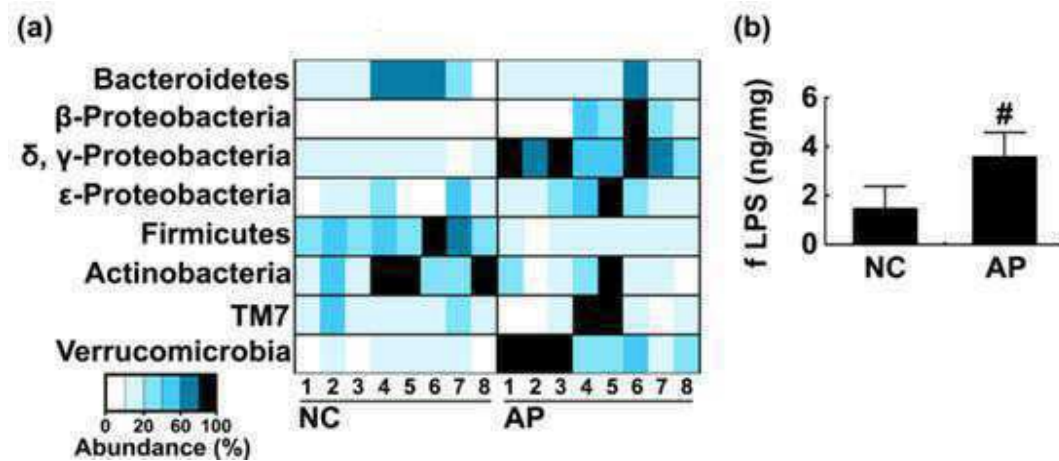
도면6



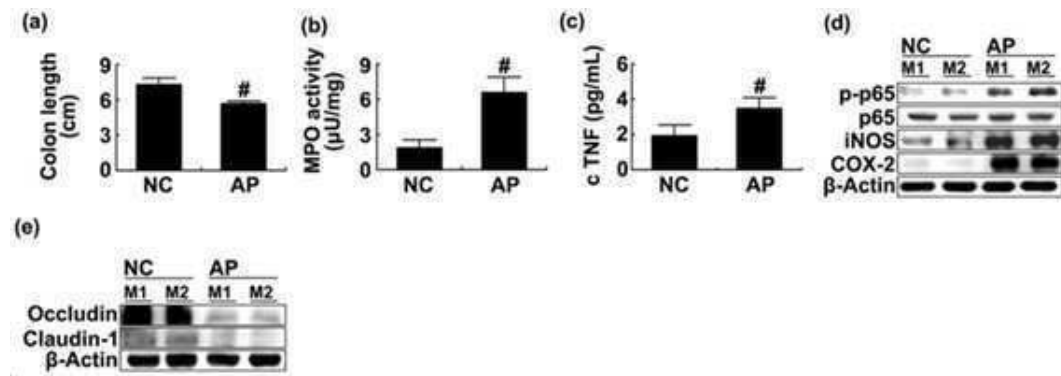
도면7



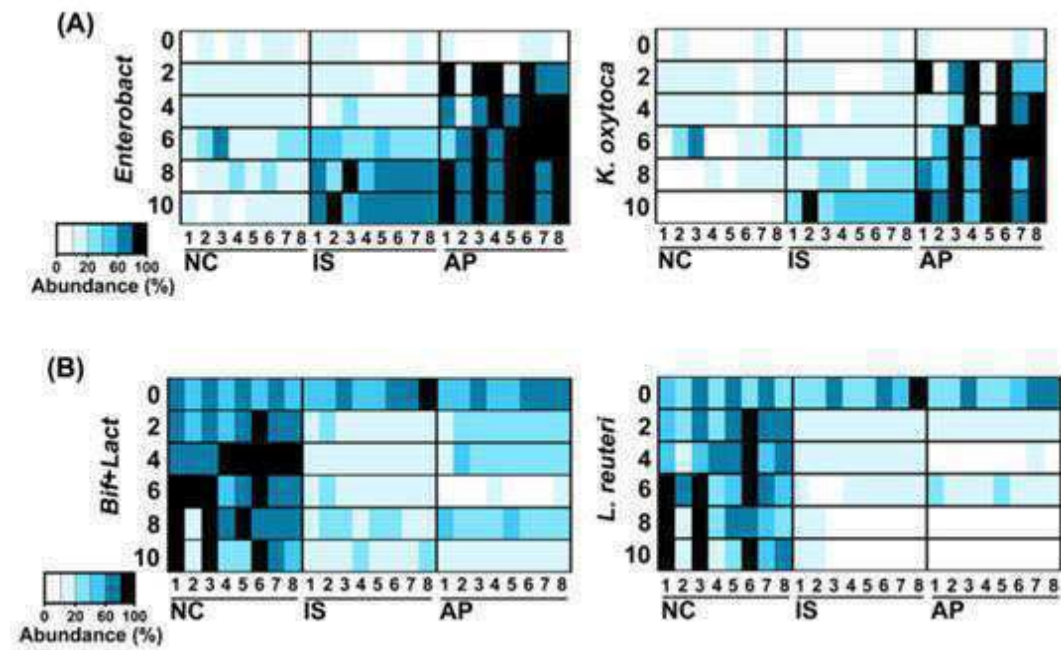
도면8



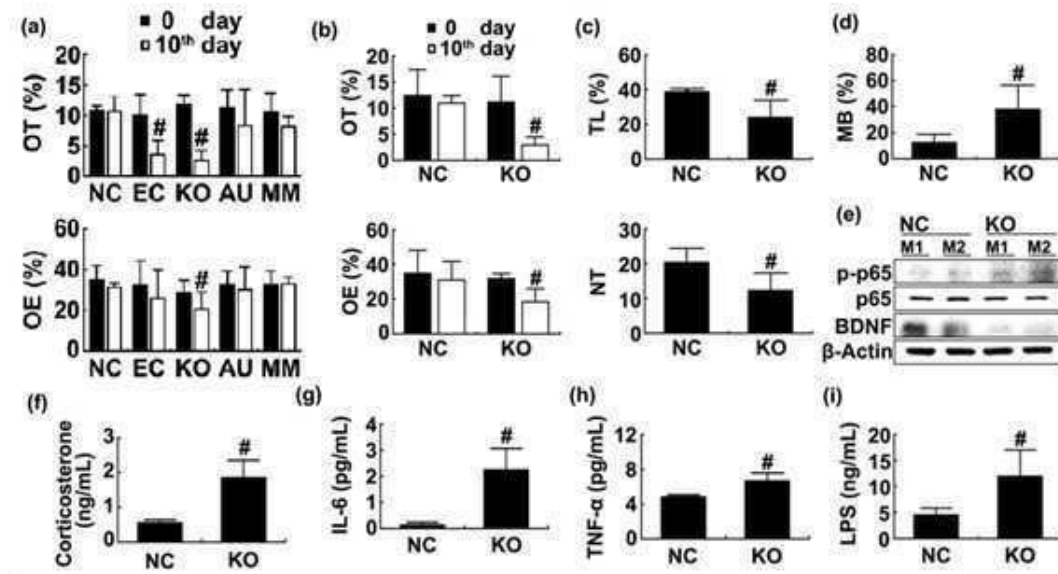
도면9



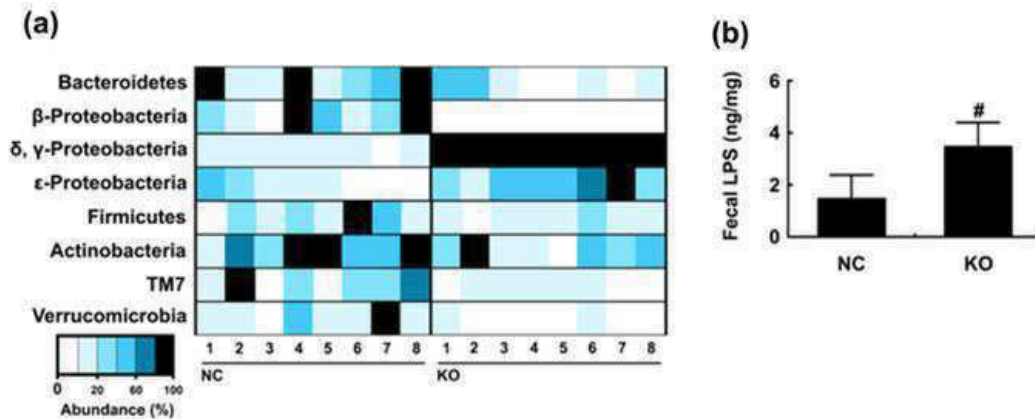
도면10



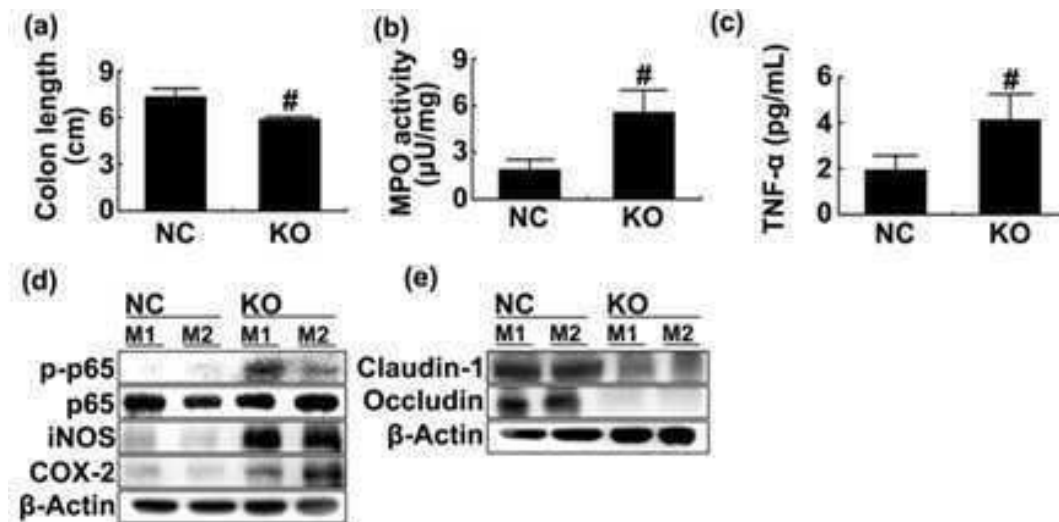
도면11



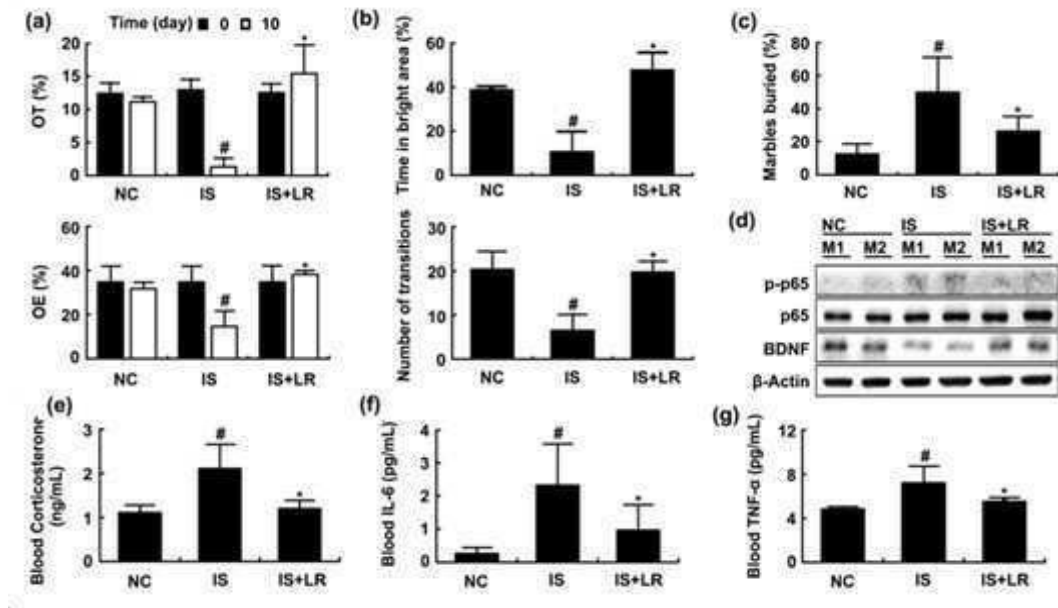
도면12



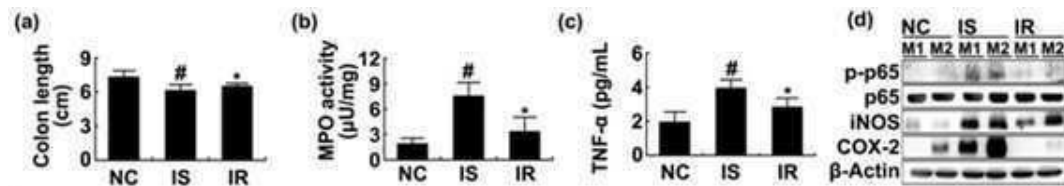
도면13



도면14



도면15



서열 목록

<110> UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY

NAVIPHARM CO, LTD

<120> Novel lactic acid bacteria and use thereof

<130> P17-120-REA-KHU

<160> 38

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 1490

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NK33 16S rDNA

<400> 1

tatggctcag gatgaacgcc ggcggtgtgc ctaatacatg caagtcgtac gcaactggccc 60

aactgattga tgggtgcttg accgtattga cgatggatca ccagtgagtg gcggacgggt 120

gagtaacacg taggtaacct gccccggagc gggggataac atttggaac agatgctaataat 180

accgcataac aacaaaagcc acatggcttt tgtttgaaag atggctttgg ctatcactct 240

gggatggacc tgcggtgcat tagctagttag gtaaggtaac ggcttaccaa ggcgatgatg 300

catagccgag ttgagagact gatcgggcac aatggaactg agacacggtc catactccta 360

cgggaggcag cagtagggaa tcttccacaa tgggcgcaag cctgatggag caacaccgcg 420

tgagtgaaga agggtttcgg ctctgaaagc tctgttttg gagaagaacg tgcgtgagag 480

taactgttca cgcagtgcac gtatccaacc agaaagtcac ggctaactac gtgccagcag 540

ccgcggtaat acgtaggtagg caagcgttat ccggatttat tgggcgtaaa gcgagcgagc 600

gcggttgctt aggtctgatg tgaaagcctt cgcttaacc gaagaagtgc atcgaaacc 660

gggcgacttg agtcagaag aggacagtgg aactccatgt gtacgggtgg aatgcgtaga 720

tatatggaag aacaccagtg gcgaaggcgg ctgtctggtc tgcaactgac gctgaggctc 780

gaaagcatgg gtagcgaaca ggattagata ccctggtagt ccatgccgta aacgatgagt 840

gctaggtgtt ggagggtttc cgcccttcag tgcgggagct aacgcattaa gcaactccgc 900

tggggagtac gaccgcaagg ttgaaactca aaggaattga cgggggcccc cacaagcggc 960

ggagcatgtg gtttaattcg aagctacgcg aagaacctta ccaggtcttg acatcttgcg 1020

ctaacttag agataaggcg ttcccttcgg ggacgcaatg acaggtgggtg catggctgctc 1080

gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgaac gagcgcaacc cttgttacta 1140

gttgccagca ttaagttggg cactctagtg agactgccgg tgacaaaccg gaggaaggtg 1200

gggacgacgt cagatcatca tgcccttat gacctgggct acacacgtgc tacaatggac 1260

ggtacaacga gtcgcaagct cgcgagagta agctaatttc ttaaagccgt tctcagttcg 1320

gactgtaggc tgcaactcgc ctacacgaag tcggaatcgc tagtaatcgc ggatcagcat 1380

gccgcggtga atacgttccc gggccttgta cacaccgccc gtcacaccat ggggagtttg 1440

taacgcccac agtcggtggc ctaaccttta tggaggagc cgcctaagc 1490

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Firmicutes F_primer

<400> 2

ggagyatgtg gtttaattcg aagca 25

<210> 3

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Firmicutes R_primer
 <400> 3
 agctgacgac aaccatgcac 20
 <210> 4
 <211> 22
 <212>
 DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Bacteroidetes F_primer
 <400> 4
 gtttaattcg atgatacgcg ag 22
 <210> 5
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Bacteroidetes R_primer
 <400> 5
 ttaasccgac acctcacgg 19
 <210> 6
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> beta-Proteobacteria F_primer
 <400> 6
 aacgcgaaaa accttaccta cc 22
 <210> 7
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> beta-Proteobacteria R_primer
 <400> 7

tgccctttcg tagcaactag tg	22
<210> 8	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> delta/gamma-Proteobacteria F_primer	
<400> 8	
gctaacgcat taagtryccc g	21
<210> 9	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> delta/gamma-Proteobacteria R_primer	
<400> 9	
gccatgcr gc acctgtct	18
<210> 10	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> epsilon-Proteobacteria F_primer	
<400> 10	
taggcttgac attgatagaa tc	22
<210> 11	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> epsilon-Proteobacteria R_primer	
<400> 11	
cttacgaagg cagtctcctt a	21
<210> 12	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Actinobacteria F_primer
 <400> 12
 tgtagcgggtg gaatgcgc 18
 <210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Actinobacteria R_primer
 <400> 13
 aattaagcca catgctccgc t 21
 <210> 14
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TM F_primer
 <400> 14
 aytgggcgta aagagttgc 19
 <210> 15
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TM R_primer
 <400> 15
 tacggytacc ttgttacgac tt 22
 <210> 16
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Verrucomicrobia F_primer
 <400> 16
 tcakgtcagt atggccctta t 21
 <210> 17
 <211>
 > 23

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Verrucomicrobia R_primer
 <400> 17
 cagttttyag gatttcctcc gcc 23
 <210> 18
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Enterobacteriaceae F_primer
 <400> 18
 cattgacgtt accgcagaa gaagc 25
 <210> 19
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Enterobacteriaceae R_primer

 <400> 19
 ctctacgaga ctcaagcttg c 21
 <210> 20
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Escherichia coli F_primer
 <400> 20
 cgcgtactat acgccatgaa cgta 24
 <210> 21
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Escherichia coli R_primer
 <400> 21
 accgttgatc acttcggtca gg 22
 <210>

> 22

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Klebsiella spp. F_primer

<400> 22

gatacggagt atgcctttac ggtg 24

<210> 23

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Klebsiella spp. R_primer

<400> 23

tagcctttat caagcggata ctgg 24

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Klebsiella oxytoca F_primer

<400> 24

gttaataacct ttgctcattg a 21

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Klebsiella oxytoca R_primer

<400> 25

accagggtat ctaatcctgt t 21

<210> 26

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Morganella morganii F_primer

<400> 26

ctcgcaccat cagatgaacc catat

25

<210> 27

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Morganella morganii R_primer

<400> 27

caaagcatct ctgctaagtt ctctggatg

29

<210> 28

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lactobacillus reuteri F_primer

<400> 28

gaacgcaytg gcccaa

16

<210> 29

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lactobacillus reuteri R_primer

<400> 29

tccattgtgg ccgatcagt

19

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lactobacillus johnsonii F_primer

<400> 30

cactagacgc atgtctagag

20

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lactobacillus johnsonii R_primer

<400> 31

agtctctcaa ctcggctatg

20

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lactobacillus plantarum F_primer

<400> 32

tcatgattta catttgagtg

20

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lactobacillus plantarum R_primer

<400> 33

gaccatgcgg tccaagttgt t

21

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Lactobacillus rhamnosus F_primer

<400> 34

cgcccttaac agcagtcttc

20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lactobacillus rhamnosus R_primer

<400> 35

gccctccgta tgettaaacc

20

<210> 36

<211> 52

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Bacterial 16S rDNA F_primer	
<400>	36	
	tcgtcggcag cgtcagatgt gtataagaga caggtgccag cmgccgcggt aa	52
<210>	37	
<211>	54	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Bacterial 16S rDNA R_primer	
<400>	37	
	gtctcgtggg ctcgagatg tgtataagag acagggacta chvgggtwtc taat	54
<210>	38	
<211>	1460	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	NK98 16S rDNA	
<400>	38	
	ctcaggatga acgttggcgg cgtgcttaac acatgcaagt cgaacgggat cccaggagct	60
	tgctcctggg tgagagtggc gaacgggtga gtaatgcgtg accgacctgc cccatacacc	120
	ggaatagctc ctggaaacgg gtggtaatgc cggatgctcc agttggatgc atgtccttct	180
	gggaaagatt catcggatg ggatggggtc gcgtcctatc agcttgatgg cggggtaacg	240
	gcccaccatg gcttcgacgg gtagccggcc tgagagggcg accggccaca ttgggactga	300
	gatacggccc agactcctac gggaggcagc agtggggaat attgcacaat gggcgcaagc	360
	ctgatgcagc gacgccgcgt gcgggatgac ggccttcggg ttgtaaaccg cttttgactg	420
	ggagcaagcc cticggggtg agtgtacctt tcgaataagc accggctaac tacgtgccag	480
	cagccgcggt aatacgtagg gtgcaagcgt tatccggaat tattgggcgt aaagggtcgc	540
	taggcgggtc gtcgcgtccg gtgtgaaagt ccatcgctta acggtggatc cgcgccgggt	600
	acgggcgggc ttgagtgcgg taggggagac tggaattccc ggtgtaacgg tggaatgtgt	660
	agatatcggg aagaacacca atggcgaagg caggtctctg ggccgtcact gacgtgagg	720
	agcgaagcg tggggagcga acaggattag ataccctggt agtcacgcc gttaaagggtg	780
	gatgctggat gtggggacca ttccacggtc tccgtgtcgg agccaacgcg ttaagcatcc	840

cgcttgggga gtacggccgc aaggctaaaa ctcaaagaaa ttgacggggg cccgcacaag	900
cggcggagca tgcggattaa ttcgatgcaa cgcaagaac cttacctggg cttgacatgt	960
tcccacagc cccagagatg gggcctccct tcggggcggg ttcacaggtg gtgcatggc	1020
gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtccgc aacgagcgca accctcgccc	1080
tgtgttgcca gcacgtcgtg gtgggaactc acgggggacc gccggggtca actcggagga	1140
aggtggggat gacgtcagat catcatgcc cttacgtcca gggttcacg catgtacaa	1200
tggccgttac aacgggatgc gacactgtga ggtggagcgg atcccttaa accggtctca	1260
gttcggattg gagtctgcaa ccgactcca tgaaggcgga gtcgctagta atcgcggtc	1320
agcaacgccg cgtggaatgc gttccgggc cttgtacaca ccgccgtca agtcatgaaa	1380
gtgggtagca cccgaagccg gtggccaac ctttttggg ggagccgtct aaggtgagac	1440
tcgtgattgg gactaatcta	1460