(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년11월27일
(11) 등록번호 10-2049526
(24) 등록일자 2019년11월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*A61K 31/197* (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
*A61P 31/06* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*A61K 31/197* (2013.01)
*A23L 33/10* (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0065040
(22) 출원일자 2018년06월05일
심사청구일자 2018년06월05일
(56) 선행기술조사문헌
US20090143435 A1
KR1020150092041 A

(73) 특허권자
**충남대학교산학협력단**
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
**조은경**
대전광역시 중구 계백로1716번길 87, 301동 2302호(문화동, 센트럴파크3단지아파트)
**김이삭**
대전광역시 서구 문예로 16, 5동 1506호 (탄방동, 한가람아파트)
**김진경**
대전광역시 서구 배재로 134, 114동 1206호 (도마동, 경남아파트1단지)
(74) 대리인
**김원준**

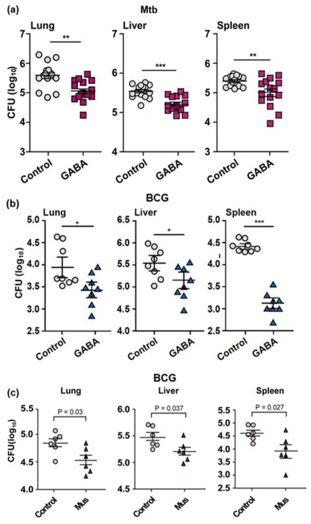
전체 청구항 수 : 총 7 항 심사관 : 고태욱

(54) 발명의 명칭 **GABA를 유효성분으로 하는 항결핵 약학 조성물**

## (57) 요 약

본 발명은 항결핵 약학 조성물에 관한 것으로, 결핵균 감염 시 대식세포에서 자가포식을 활성화하고 면역능력을 향상시켜 결핵균의 성장을 저해하는 항결핵 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 GABA(γ-aminobutyric acid) 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는 결핵 예방 및 치료/증상개선용 조성물에 관한 것이다.

*대 표 도* - 도2



(52) CPC특허분류
***A61P 31/06*** (2018.01)
*A23V 2002/00* (2013.01)
*A23V 2200/30* (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2015M3C9A2054326
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 원천기술개발사업
연구과제명 공생미생물에 의한 숙주면역 조절 기전 분석 및 치료적 응용
기 여 율 1/1
주관기관 충남대학교
연구기간 2017.09.01 ~ 2018.06.30

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

GABA(γ-aminobutyric acid) 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는 결핵 예방 및 치료용 약학 조성물.

### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 조성물은 채소, 과일, 곡물, 찻잎, 발효식품 및 장내 미생물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상으로부터 유래된 GABA 또는 그의 염을 포함하거나, 채소, 과일, 곡물, 찻잎, 발효식품 또는 장내 미생물의 배양물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 가공물로서 GABA 또는 그의 염을 포함하는 것을 특징으로 하는 결핵 예방 및 치료용 약학 조성물.

### 청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 GABA는 GABA성 작용제인 무시몰(muscimol) 또는 이소구바신(isoguvacine) 또는 이들의 염의 형태로 제공되는 것을 특징으로 하는 결핵 예방 및 치료용 약학 조성물.

### 청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 결핵은 다제내성 결핵, 폐결핵, 담결핵, 골결핵, 인후결핵, 임파선결핵, 폐허증, 유방결핵 또는 척추결핵인 결핵 예방 및 치료용 약학 조성물.

### 청구항 5

GABA(γ-aminobutyric acid) 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는 결핵 예방 및 증상 개선용 건강기능식품 조성물.

### 청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 조성물은 채소, 과일, 곡물, 찻잎, 발효식품 및 장내 미생물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상으로부터 유래된 GABA 또는 그의 염을 포함하거나, 채소, 과일, 곡물, 찻잎, 발효식품 또는 장내 미생물의 배양물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 가공물로서 GABA 또는 그의 염을 포함하는 것을 특징으로 하는 결핵 예방 및 증상 개선용 건강기능식품 조성물.

### 청구항 7

제 5 항에 있어서,

상기 GABA는 GABA성 작용제인 무시몰(muscimol) 또는 이소구바신(isoguvacine) 또는 이들의 염의 형태로 제공되

는 것을 특징으로 하는 결핵 예방 및 증상 개선용 건강기능식품 조성물.

## 발명의 설명

### 기 술 분 야

[0001] 본 발명은 항결핵 약학 조성물에 관한 것으로, 결핵균 감염 시 대식세포에서 자가포식을 활성화하고 면역능력을 향상시켜 결핵균의 성장을 저해하는 항결핵 조성물에 관한 것이다.

### 배 경 기 술

[0002] 결핵(tuberculosis)은 미코박테륨, 특히 결핵균의 감염에 의해 발생하는 전염성 질환이다. 세계적으로 전체 인구의 1/3이 결핵균에 감염되어 있는 것으로 추정되며 매년 약 800백만명의 새로운 환자가 발생한다. 대부분의 감염자들은 증상이 없고 그 중 1/10 정도가 발병하며, 발병 시 적절한 치료를 하지 않으면 그 중 절반 이상이 사망에 이르게 된다. 전형적인 증상은 피가 섞인 가래를 동반한 기침, 오한, 식은땀, 체중 감소로, 몸의 어느 기관에나 감염될 수 있기 때문에 감염된 기관에 따라 다양한 증상을 초래한다.

[0003] 결핵으로 인한 사망률은 90년대 이후 다시 증가하고 있는데 이는 다약제내성(multi-drug resistant; MDR) 결핵균에 의한 감염 증가와 HIV/TB 동시감염의 증가가 주원인으로 판단된다. 현재 전세계적으로 약 5000만명의 다약제내성 결핵 환자가 있지만, 이에 대한 치료효율은 50% 정도 밖에 되지 않는다. 또한, 현재 전세계적으로 약 600만명의 HIV/TB 동시 감염환자가 있으며 대부분이 결핵으로 사망하는 것으로 추정되고 있다(비특허문헌 1). 따라서 기존 약제와 작용기전이 다르고 부작용이 상대적으로 적은 새로운 항결핵제의 개발이 매우 시급한 과제이다.

[0004] *Mycobacterium tuberculosis*(Mtb)는 결핵의 주된 원인균으로 파고솜(phagosome)과 리소좀의 융합을 효과적으로 억제하여 숙주의 대식세포 내에서 생존하는 것으로 알려져 있다. 자가포식(Autophagy)은 세포내 손상 기관, 노화된 단백질 및 응집체가 리소좀의 분해로 표적화되기 위한 필수적인 과정으로, 세포내 항상성의 유지에 기여한다. 대식세포에서 자가포식을 증가시키면 다양한 세포외 병소, 특히 Mtb에 대하여 선천적인 숙주의 면역을 증가시킨다. 본 발명자들은 결핵균에 감염된 대식세포에서 항결핵제가 결핵균의 생존율을 감소시키고, 자가포식을 유도하며, 활성 산소종을 분석시키는 것을 확인하고, (A) 대식세포에 결핵균을 감염시키는 단계; (B) 결핵균이 감염된 대식세포에 항결핵 효능을 측정하고자 하는 시료를 처리하는 단계; (C) 상기 시료의 처리에 의한 ① 자가포식의 유도 여부, ② 활성산소종의 증가 여부 및 ③ 결핵균 생존율의 감소 여부로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상을 확인하는 단계;를 포함한 항결핵제의 스크리닝 방법에 대해 출원하여 제10-1344025호로 등록받은 바 있다.

[0005] 감마-아미노부티릭산(GABA, γ-aminobutyric acid)은 자연계에 분포하는 비단백질성 아미노산의 일종으로 뇌나 척수와 같은 중추신경계의 필수 구성요소로, 주된 억제성 신경전달물질(inhivitory neurotransmitter)로 알려져 있다. GABA는 많은 생리조절에 관여하는데 동물의 경우 뇌의 혈류를 활발하게 하고 뇌에 산소 공급량을 증가시켜 뇌세포의 대사기능을 촉진시키며, 혈액 내의 중성지방을 줄이고 간기능을 개선시켜 고혈압의 예방과 같은 성인병 예방 등에 효과가 있으며, 통증완화, 우울, 불안 등에 대한 신경안정 기능이 있다. 스트레스에 시달리는 현대인, 특히 수험생, 알코올 과다 섭취자 등의 경우에는, 뇌와 혈중 GABA농도가 낮은 것으로 보고되어 있으며, 체내 GABA 농도의 극심한 부족은 발작, 경련, 간질 증세를 일으킨다. 이와 같은 생리작용으로 인하여 GABA는 정맥주사제로 뇌졸중, 머리외상, 뇌동맥 후유증에 있어 뇌혈류 개선 및 뇌대사 증진 작용에 사용되고 있으며, 경구 처방약으로도 판매되고 있다.

[0006] 최근 들어서는 의약품으로서의 용도 뿐 아니라 기능성 식품 소재로서의 관심 또한 고조되고 있다. GABA는 각종 채소, 과일, 쌀, 콩, 발효식품, 장내 미생물 등에 널리 분포되어 있는 것으로 이를 식품을 통해 보충할 경우 필요량은 하루 500-3000mg이며, 하루에 GABA 80mg으로 혈압강하가 가능하다고 알려져 있다. 또한 GABA 함량을 높인 녹차, 쌀배아, 발아현미 등이 개발되면서 식품업계와 소비자의 관심이 고조되고 있다(등록특허 제10-0367055호 등).

[0007] 최근 말초 면역 세포에서 GABA-A 이온 채널, GABA-B 수용체, GABA 수송체, GABA의 합성 또는 분해에 관여하는 효소와 같은 GABA성(GABAergic) 성분이 발현되는 것이 보고되고 있다. 전임상 연구에 의하면 GABA 또는 GABA성 약물(작용제)은 1형 당뇨병(등록특허 제10-1485575호), 자가면역 뇌척수염이나 콜라겐 유발성 관절염과 같은 자가면역 질환과 염증질환에 대한 새로운 치료제로 사용 가능성을 보여준다. 그러나 결핵균 감염에 대한 항결핵

활성이 보고된 바는 없다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 등록특허 제10-0367055호

(특허문헌 0002) 등록특허 제10-1485575호

### 비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) WHO Report 2011. Global Tuberculosis Control, World Health Organization. 2011.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 종래 신경전달물질로 알려져 있어 의약품 및 기능성 소재로 관심을 받고 있는 GABA의 새로운 효능을 밝히고, 이를 이용한 새로운 유형의 항결핵제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

### 과제의 해결 수단

[0011] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 GABA(γ-aminobutyric acid) 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는 결핵 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0012] GABA는 대식세포를 대상으로 하는 in-vitro 실험은 물론 in-vivo 실험에서도 각 조직에서 결핵균의 생존율을 크게 저하시켰으며, 결핵균 감염 조직의 병리학적 반응을 크게 완화시켰다. 이에 반해 GABA성 저해제는 결핵균의 생존율 및 병리학적 반응을 증가시켜 GABA의 효능을 추가적으로 입증할 수 있었다.

[0013] GABA는 비단백질성 아미노산으로 채소, 과일, 곡물 또는 찻잎과 같은 각종 식물이나 발효식품과 장내 미생물에 널리 분포하고, 특히 발아곡물에 다량 함유되어 있으며 최근에는 GABA 함량을 증가시킨 식물에 대한 연구도 활발하게 이루어지고 있다. 본 발명의 조성물에서 상기 GABA 또는 그의 염(이하에서는, GABA와 그의 염을 포함하여 'GABA'로 약칭합니다)은 유기합성에 의해 제조되거나, GABA를 함유하는 식물이나, 발효식품 또는 장내 미생물 유래로서 정제된 단일 화합물의 형태일 수 있다. 혹은 정제된 상태가 아닌 GABA 또는 그의 염을 포함하는 채소, 과일, 곡물, 찻잎, 발효식품 또는 장내 미생물의 배양물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 가공물일 수 있다. 이 경우 상기 식물은 GABA의 함량이 증진된 형태, 예를 들면 발아곡물이나 GABA차인 것이 더욱 바람직함은 당연하다. 식물의 '가공물'이라 함은 식물을 인공적으로 처리한 것을 의미하는 것으로, 예를 들면, 건조하거나 이를 추출한 추출물을 예로 들 수 있다. 가공의 방법에 대해서는 가공 산물에서 GABA의 함량이 높고, 보관 및 사용이 용이하도록 종래기술의 적절한 방법을 취할 수 있으며, 본 특허는 가공방법 자체가 아닌 GABA를 유효성분으로 하는 결핵 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이므로, 가공방법에 대한 자세한 설명은 생략한다.

[0014] 또한 본 발명의 조성물에서 상기 GABA는 체내에서 GABA의 발현을 증가시키는 GABA성 작용제일 수 있다. GABA성 작용제로 하기 실시예에서는 무시몰(muscimol) 또는 이소구바신(isoguvacine)을 사용하였으나, 이는 GABA성 작용제의 예시일 뿐으로 GABA성 작용제로서의 효능을 갖는 것이라면 어떤 것을 사용하여도 무방하다.

[0015] 본 발명에서 상기 결핵은 다제내성 결핵, 폐결핵, 담결핵, 골결핵, 인후결핵, 임파선결핵, 폐허증, 유방결핵 또는 척추결핵 등을 포함하며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0016] 상기 약학 조성물은 약제학적 분야에서 공지의 방법에 의하여, 그 자체 또는 약학적으로 허용되는 담체(carrier), 부형제(forming agent), 희석제 등과 혼합하여 분말, 과립, 정제, 캡슐제 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있다.

[0017] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 본 발명에서 상기 '약제학적으로 유효한 양'이란 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미한

다. 유효 용량 수준은 환자의 질병 종류, 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 단독 또는 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있을 것이다.

[0018] 본 발명은 또한 GABA 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는 결핵 예방 및 증상 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다. 본 조성물에서 제공될 수 있는 GABA의 유형은 상기 약학 조성물에 대해 설명한 것과 마찬가지로 적용될 수 있다. 상기 GABA는 본 발명의 건강기능식품에 바람직하게는 0.01~100 중량%로 하여 첨가될 수 있다. 본 발명의 건강기능식품 조성물의 유효용량은 상기 약학적 조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있다. 본 발명의 조성물은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태로 가공될 수 있으며, 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성식품류 등이 있다.

## *발명의 효과*

[0019] 이상과 같이 본 발명의 조성물에 의하면 종래 의약품 뿐만 아니라 기능성 식품 소재로서 관심이 고조되고 있는 GABA를 활용하여 결핵균 감염에 대하여 각 조직에서 결핵균의 생존율을 현저하게 감소시킬 수 있어 새로운 결핵의 예방 및 치료/증상개선제로 유용하게 사용될 수 있다.

## *도면의 간단한 설명*

[0020] 도 1은 in-vitro 실험에서 GABA 및 GABA성 약물(작용제)이 결핵균의 생존율에 미치는 영향을 보여주는 그래프.

도 2는 in-vivo 실험에서 GABA 및 GABA성 약물(작용제)이 마우스의 각 조직 내 결핵균 및 BCG의 생존율에 미치는 영향을 보여주는 그래프.

도 3은 in-vivo 실험에서 GABA성 약물(저해제)이 마우스의 폐 조직 내 결핵균 및 BCG의 생존율에 미치는 영향을 보여주는 그래프.

도 4는 in-vivo 실험에서 GABA 및 GABA성 약물(작용제)이 마우스의 폐 조직 내 BCG의 생존율에 미치는 영향을 보여주는 형광 이미지.

도 5는 결핵균 및 BCG 감염 조직의 병리학적 반응에 대한 GABA 및 GABA성 약물(저해제)의 영향을 보여주는 H&E 염색 이미지.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0021] 이하 첨부된 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[0022] **[실시예]**

[0023] **실시예 1 : 실험동물 및 대식세포의 준비**

[0024] **1) 실험동물의 준비**

[0025] 6~8주령의 C57BL/6 마우스(Samtako Bio Korea)는 특정 무병소 조건(specific pathogen-free condition)에서 유지하였으며, 하기 모든 동물실험은 충남대학교 의과대학 동물실험윤리위원회에 의해 감독 및 승인되었다.

[0026] **2) 대식세포의 수집 및 배양**

[0027] 상기 C57BL/6 마우스로부터 분리한 일차 골수유래대식세포(BMDM)와 사람의 BMDM는 10% FBS (Lonza), penicillin G (100 IU/㎖), streptomycin (100 ㎍/㎖)가 보충된 DMEM (Lonza) 배지에서 배양하였다. BMDM는 1 $\times 10^5$/㎖의 농도로 부유시켜 37℃, 5% $CO_2$ 조건에서 100파이 petri dish에 부착시켰다. 2시간 후에 세포를 수집하고 원심분리하였다. 세포 배지에 대식세포 집락 인자(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)를 25

ng/ml의 농도로 첨가하여 배양액에 3~5일 동안 대식세포로 분화하여 실험에 사용하였다. 분화한 대식세포가 아닌 림프구들은 기계적인 파괴로 제거하였다.

[0028] **실시예 2 : 결핵균 감염 대식세포에서의 항결핵능 평가**

[0029] 실시예 1의 2)에서 준비한 대식세포의 배지 내에 병원성 결핵균인 *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis* H37Rv, 아리조나 대학 R.L. Friedmann으로부터 제공받아 사용)를 배양세포 1개당 감염된 균의 개체 평균수(multiplicity of infection, MOI)가 1:5가 되도록 첨가하여 2시간 동안 감염시켰다. 이후, GABA(10, 100 또는 1000μM) 또는 $GABA_AR$ 작용제인 muscimol(Mus) 또는 isoguvacine hydrochloride(Iso)(10, 100 또는 1000μM)을 처리하여 3일간 배양하였다. 대조군(SC)에는 별도의 약물을 처리하지 않았다. 배양 후 세포내 박테리아를 방출시키기 위하여 증류수(0.3% 사포닌 포함)로 대식세포를 터트리고, PBS로 10배 희석하였다. 7H10 아가 플레이트에 분주하여 37℃, 5% $CO_2$ incubator에서 14일 정도 배양하고 집락형성단위(CFU)를 측정하여 세포내 균 생존율(intracellular survival, ICS)을 확인하고 그 결과를 도 1에 도시하였다.

[0030] 도 1의 (a)는 마우스 BMDM, (b)는 인간 BMDM에 대한 결과를 보여주는 것으로, (b)에서 각 약물의 처리농도는 100 μM이다. 도 1에서 GABA 또는 GABA성 약물(작용제)은 대식세포에서 약물의 농도에 의존적으로 결핵균의 생존율을 감소시켜 항결핵 활성이 있음을 확인할 수 있다.

[0031] **실시예 3 : 결핵균 감염 마우스에서의 항결핵능 평가**

[0032] 실시예 1의 1)에서 준비한 C57BL/6 마우스에 GABA(200 mg/kg)을 7일간 하루에 한번씩 복강투여 하였다. 7일째 *M. tuberculosis*(Mtb) $1\times10^6$ CFU 또는 BCG $1\times10^7$ CFU를 정맥주사하여 감염시켰다. 감염 후 결핵균 감염 마우스에는 14일간, BCG 감염 마우스에는 10일간, 하루에 한번씩 GABA(200 mg/kg)를 추가로 복강투여 하였다. 이와 별도로, C57BL/6 마우스를 BCG $1\times10^7$ CFU로 정맥주사하여 감염시킨 후, GABA성 약물(작용제)인 muscimol(2 mg/kg)을 감염 7일 후 10일간 하루에 한번씩 복강투여하였다. 대조군으로는 약물 대신 PBS 버퍼를 투여하였다. 결핵 감염으로부터 소정 기일 후에 마우스를 희생시킨 후 간, 비장 및 폐 조직을 채취하고 homogenizer를 이용하여 곱게 갈았다. 이후 실시예 2에 기재된 대식세포에서의 세포내 생존율 측정방법과 동일한 방법에 의해 각 조직에서의 결핵균의 생존율을 측정하였다.

[0033] 도 2는 상기 실험 결과를 보여주는 그래프로, (a)는 결핵균 감염 14일째 GABA 투여군 및 대조군의 각 조직에서의 결핵균 생존율을 도시한 것(각 군당 n=15)이고, (b)는 BCG 감염 10일째 GABA 투여군 및 대조군의 각 조직에서의 결핵균 생존율을 도시한 것(각 군당 n=8)이며, (c)는 BCG 감염 17일째 muscimol 투여군 및 대조군의 각 조직에서의 결핵균 생존율을 도시한 것(각 군당 n=6)이다. 도 3는 in-vitro 실험과 마찬가지로, in-vivo 실험에서도 GABA 또는 GABA성 약물(작용제)에 의해 결핵균의 생존율이 감소함을 보여주었다.

[0034] GABA의 항결핵능을 추가적으로 확인하기 위하여, C57BL/6 마우스에 GABA성 약물(저해제) 중 $GABA_AR$ 관련 $Cl^-$ 채널의 차단제로 알려진 pentylenetetrazole(PTZ)를 간질 발작을 야기하지 않는 저용량인 40 mg/kg의 농도로 선처리하고, 6시간(또는 7일) 후 *M. tuberculosis*(Mtb)를 $1\times10^5$ CFU 또는 BCG를 $2\times10^6$ CFU의 농도로 정맥주사하여 감염시켰다. 이후 위와 동일한 방법에 의해 마우스의 폐 조직에서 결핵균의 생존율을 측정하고 그 결과를 도 3에 도시하였다. 도 3의 왼쪽은 결핵균 감염 14일째 PTZ 투여군 및 대조군의 각 조직에서의 결핵균 생존율을 도시한 것(각 군당 n=9)이고, 오른쪽은 BCG 감염 7일째 PTZ 투여군 및 대조군의 각 조직에서의 결핵균 생존율을 도시한 것(각 군당 n=8)이다. GABA성 약물(저해제)인 PTZ는 오히려 결핵균의 생존율을 증가시켜, GABA의 항결핵 활성을 다시 한번 확인할 수 있었다.

[0035] GABA의 항결핵능을 ERFP 표지된 결핵균(BCG-ERFP)을 사용하여 추가로 확인하였다. BCG-ERFP(J. Immunol. 198, 3283-3295, 2017)를 비강을 통하여 주입하여 감염시킨 것을 제외하고는 위와 동일한 방법에 의해 GABA 또는 PTZ를 각각 투여하고, 감염으로부터 7일 후 폐의 형광이미지를 관측하였다. 도 4는 그 결과를 도시한 것으로, (a)는 GABA 투여(n=3), (b)는 PTZ 투여(n=4)의 결과를 보여준다. 도 4에서 GABA 투여군에서는 대조군에 비해 형광의 감소가, PTZ 투여군에서는 형광의 증가가 관측되었으며, 이는 GABA가 폐에서 결핵균의 생존을 저해함을 의미한다.

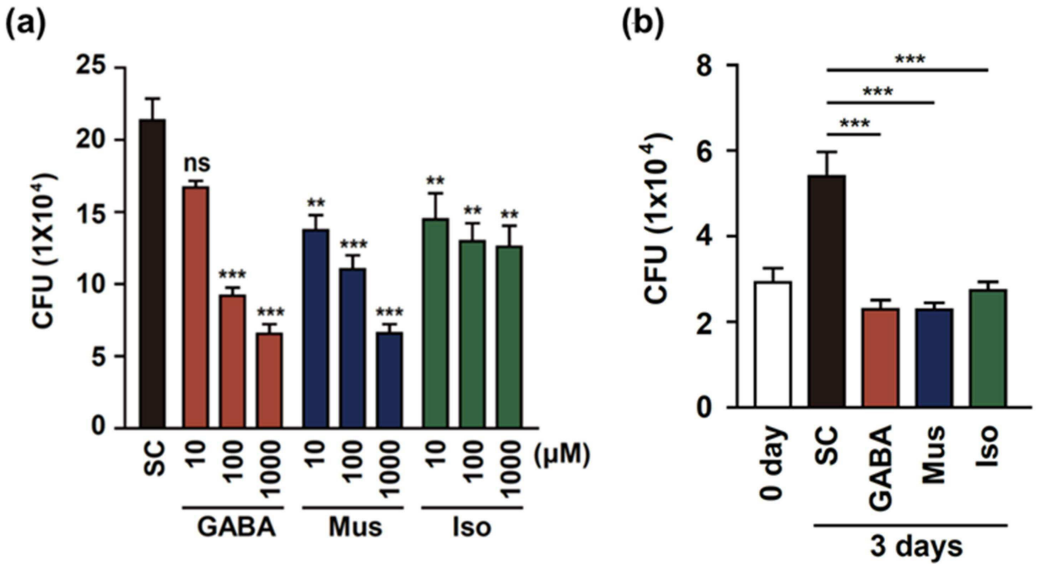
[0036] 한편, GABA가 결핵균 감염에 의한 면역병리적 반응에 미치는 역할을 확인하기 위하여, 상기 실험과정에서 채취한 폐를 10% 포르말린에 고정하고 파라핀 왁스에 임베딩하였다. 이후 4㎛ 두께로 파라핀 절편을 제조하여 H&E 염색한 후, Aperio digital pathology slide scanner(Leica, Germany)로 관측하였다. 도 5는 그 결과를 보여

주는 이미지로 (a)는 도 2의 (a)의 실험에 사용된 폐조직을, (b)는 도 2의 (b)의 실험에 사용된 폐조직, (c)는 도 3의 BCG 감염에 의한 폐조직을 관찰한 것이며, 스케일바는 100㎛를 나타낸다.

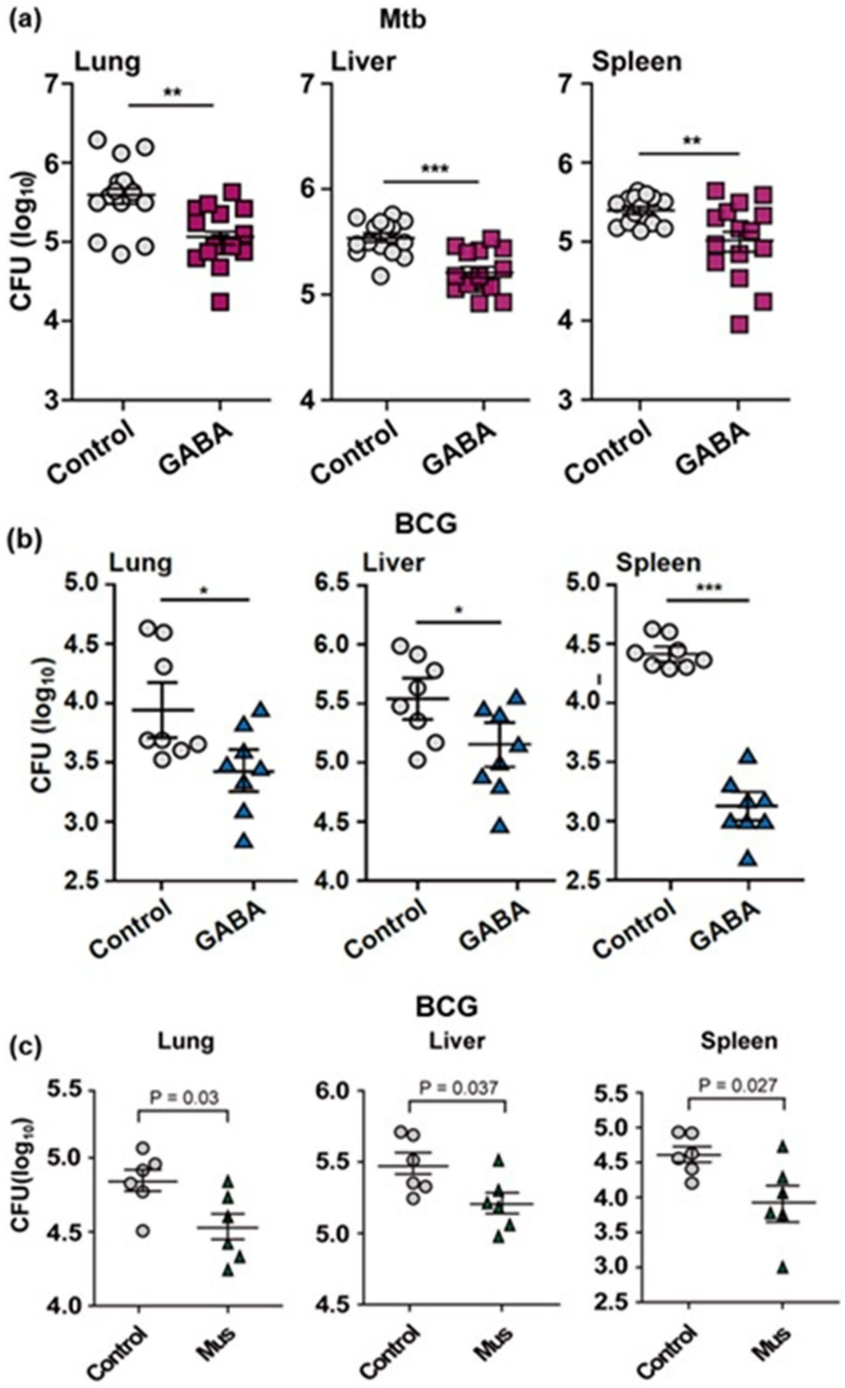
[0037] GABA 투여군의 마우스는 대조군의 마우스에 비해 병리학적 반응(pathological response)과 육아종 장애(granulomatous lesion)가 감소하였으며, GABA성 약물(저해제) 투여군에서는 병리학적 반응이 PTZ의 농도에 의존적으로 증가하는 것을 보여준다. 이로부터 결핵균의 수 뿐 아니라 장기 조직에서의 병리학적 반응 역시 GABA의 투여에 의해 감소됨을 알 수 있었다.

## 도면

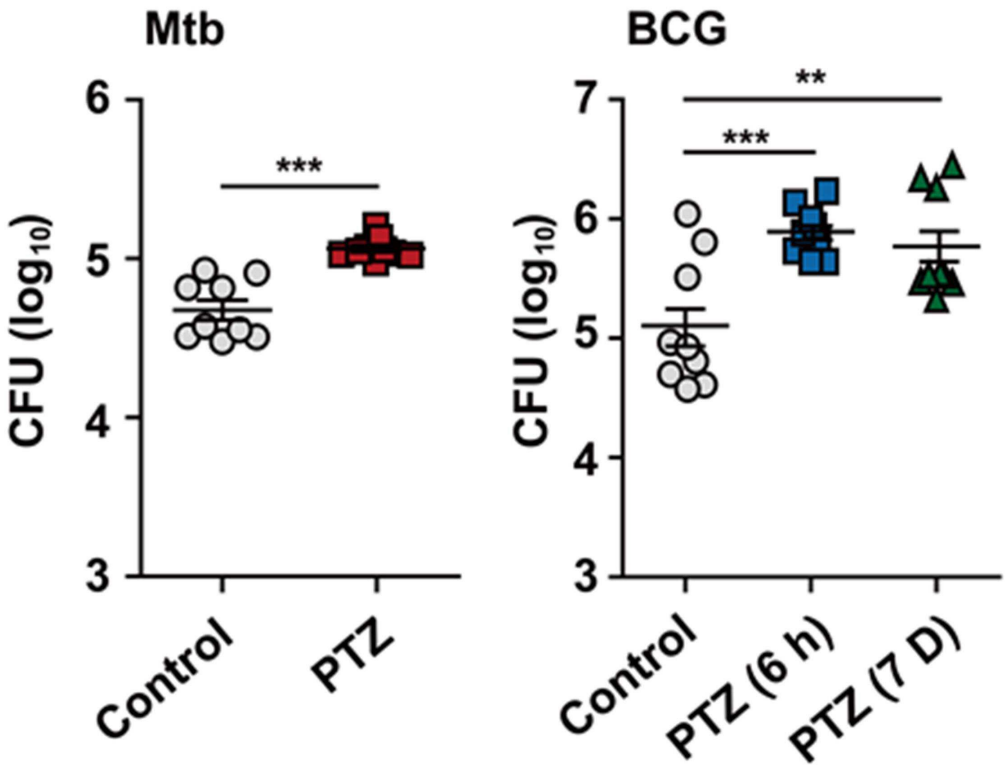
### 도면1



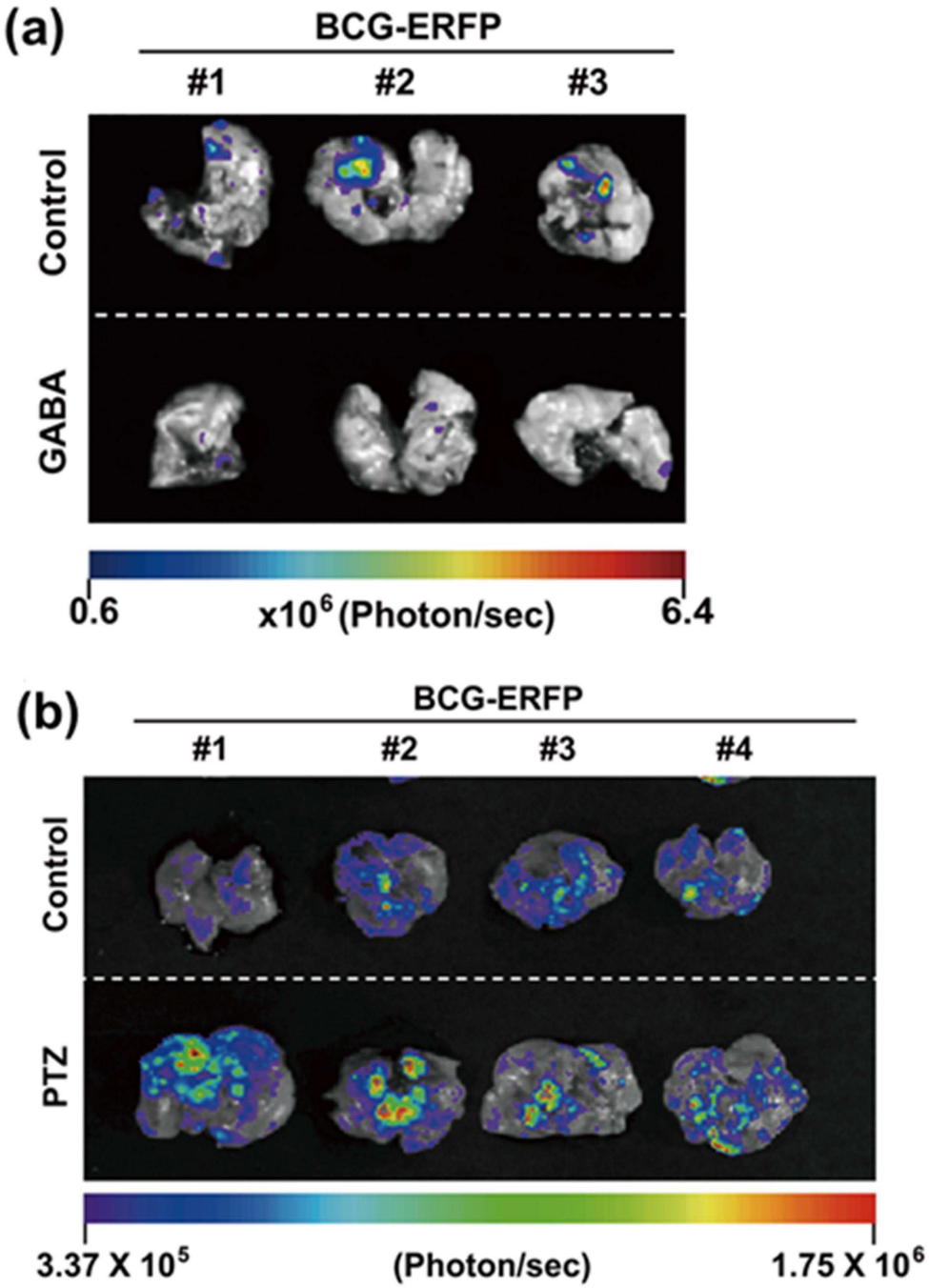
도면2


(a)
Mtb
Lung
Liver
Spleen
CFU (log10)
**
***
**
Control
GABA
(b)
BCG
Lung
Liver
Spleen
CFU (log10)
*
*
***
Control
GABA
(c)
BCG
Lung
Liver
Spleen
CFU(log10)
P = 0.03
P = 0.037
P = 0.027
Control
Mus

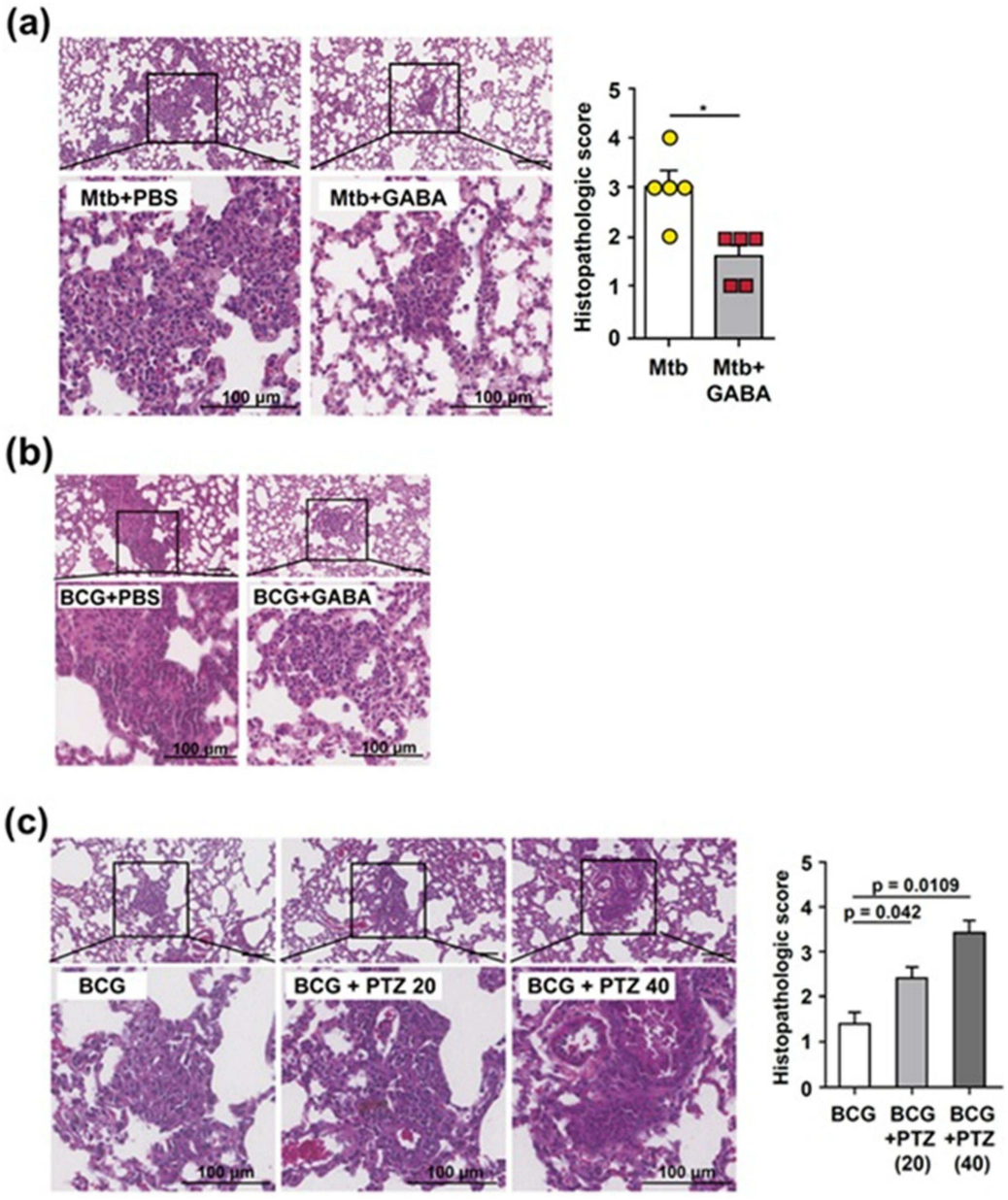
도면3



도면4


(a)
BCG-ERFP
#1
#2
#3
Control
GABA
0.6
x10^6 (Photon/sec)
6.4
(b)
BCG-ERFP
#1
#2
#3
#4
Control
PTZ
3.37 X 10^5
(Photon/sec)
1.75 X 10^6

도면5


(a)
Mtb+PBS
Mtb+GABA
100 μm
100 μm
Histopathologic score
5
4
3
2
1
0
*
Mtb
Mtb+ GABA
(b)
BCG+PBS
BCG+GABA
100 μm
100 μm
(c)
BCG
BCG + PTZ 20
BCG + PTZ 40
100 μm
100 μm
100 μm
Histopathologic score
p = 0.0109
p = 0.042
BCG
BCG +PTZ (20)
BCG +PTZ (40)