



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0093035
(43) 공개일자 2025년06월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/50 (2017.01) C12Q 1/02 (2017.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/5029 (2013.01)
C12Q 1/02 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0183823
(22) 출원일자 2023년12월15일
심사청구일자 2023년12월15일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 조선대길 126(서석동, 산학협력단)
(72) 발명자
송희상
광주광역시 남구 봉선로133번길 4, 3동 1004호 (봉선동, 금호타운)
(74) 대리인
특허법인리채

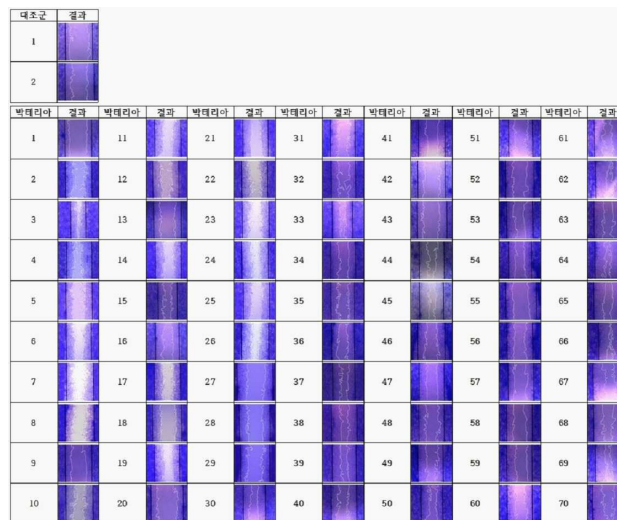
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 실내 공기 중 심혈관 질환 유발 인자의 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명은 실내 공기 중 심혈관 질환 유발 인자의 스크리닝 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 인체로부터 분리된 심혈관 세포에 실내 공기 중에 존재하는 미생물을 처리하여 배양한 후, 세포의 이동을, 증식률 및 사이토카인 분비량으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나를 측정하는 단계를 포함함으로써 실내 공기 중 포함된 생물 유해 인자를 동정할 수 있고 생물 유해 인자의 제어 시스템 구축 및 종합적인 인체 영향 평가에 유용하게 활용될 수 있는 실내 공기 중 심혈관 질환 유발 인자의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/5044 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1485018633

과제번호 ARQ202101648002

부처명 환경부

과제관리(전문)기관명 한국환경산업기술원

연구사업명 실내공기생물학적위해인자관리기술개발사업

연구과제명 실내공기 생물 유해인자에 의한 세포 및 생물체 반응 평가를 위한 다각적 모델링 기
법 개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 조선대학교 산학협력단

연구기간 2022.01.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

인체로부터 분리된 심혈관 세포에 실내 공기에 존재하는 미생물을 처리하여 배양한 후, 상기 세포의 이동률, 증식률 및 사이토카인 분비량으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나를 측정하는 단계를 포함하는 상기 실내 공기 중의 심혈관 질환 유발 인자의 스크리닝 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 심혈관 세포는 혈관 평활근세포 또는 혈관 내피세포인, 상기 실내 공기 중의 심혈관 질환 유발 인자의 스크리닝 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 세포의 이동률은 Wound healing assay로 측정하는, 상기 실내 공기 중의 심혈관 질환 유발 인자의 스크리닝 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 세포의 증식률은 BrdU ELISA로 측정하는, 상기 실내 공기 중의 심혈관 질환 유발 인자의 스크리닝 방법.

청구항 5

청구항 3에 있어서, 상기 미생물을 1×10^3 내지 1×10^4 CFU/ml의 농도로 처리하여 Wound healing assay로 상기 이동률이 100%를 초과하면 상기 미생물을 상기 심혈관 질환 유발 인자로 판단하는 단계를 더 포함하는 상기 실내 공기 중의 심혈관 질환 유발 인자의 스크리닝 방법.

청구항 6

청구항 4에 있어서, 상기 미생물을 1×10^2 내지 1×10^3 CFU/ml의 농도로 처리하여 BrdU ELISA로 상기 증식률이 100%를 초과하면 상기 미생물을 상기 심혈관 질환 유발 인자로 판단하는 단계를 더 포함하는 상기 실내 공기 중의 심혈관 질환 유발 인자의 스크리닝 방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 미생물은 *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter pittii*, *Agrococcus baldri*, *Brevibacterium senegalense*, *Arthrobacter bussei*, *Bacillus aerius*, *Bacillus cereus*, *Paenibacillus macquariensis*, *Bacillus infantis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus marisflavi*, *Priestia megaterium*, *Bacillus proteolyticus*, *Paenibacillus terrigena*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus wiedmannii*, *Brachybacterium paraconglomeratum*, *Brevibacterium sediminis*, *Brevundimonas diminuta*, *Brevundimonas vesicularis*, *Mammaliococcus sciuri*, *Chryseobacterium cucumeris*, *Chryseobacterium gwangjuense*, *Chryseobacterium taihuense*, *Corynebacterium doosanense*, *Corynebacterium glutamicum*,

Pseudarthrobacter sulfonivorans, *Psychrobacillus psychrodurans*, *Kocuria marina*, *Kocuria palustris*, *Kocuria rhizophila*, *Lysinibacillus parviboronicapiens*, *Planomicrobium okeanokoites*, *Massilia haematophila*, *Microbacterium oxydans*, *Kocuria gwangalliensis*, *Micrococcus yunnanensis*, *Staphylococcus edaphicus*, *Pseudarthrobacter oxydans*, *Pseudarthrobacter siccitolerans*, *Micrococcus aloeverae*, *Pseudomonas parafulva*, *Pseudomonas psychrotolerans*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas straminea*, *Roseomonas mucosa* 및 *Streptomyces californicus*로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 박테리아인 상기 실내 공기 중의 심혈관 질환 유발 인자의 스크리닝 방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 미생물은 *Alternaria alternata*, *Penicillium crustosurn*, *Arthriniun camelliae-sinensis*, *Aspergillus niger*, *Chaetomium globosum*, *Fusarium incarnatum*, *Fusarium proliferatum*, *Hypocrea lutea*, *Irpex lacteus*, *Microdochium albescent*, *Moesziomyces aphidis*, *Neurospora tetrasperma*, *Penicillium brasilianum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium glabrum*, *Penicillium oxalicum*, *Penicillium rolfsii*, *Penicillium sclerotiorum*, *Phanerochaete sordida*, *Phlebia tremellosa*, *Rhodotorula dairenensis*, *Rhodotorula glutinis*, *Schizophyllum commune* 및 *Trichoderma harzianum*으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 곰팡이인, 상기 실내 공기 중의 심혈관 질환 유발 인자의 스크리닝 방법.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 미생물은 *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter pittii*, *Agrococcus baldri*, *Brevibacterium senegalense*, *Arthrobacter bussei*, *Bacillus aerius*, *Priestia aryabhattai*, *Bacillus cereus*, *Paenibacillus macquariensis*, *Bacillus infantis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus marisflavi*, *Priestia megaterium*, *Bacillus proteolyticus*, *Paenibacillus terrigena*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus wiedmannii*, *Brachybacterium paraconglomeratum*, *Brevibacterium sediminis*, *Brevundimonas diminuta*, *Brevundimonas vesicularis*, *Mammaliococcus sciuri*, *Chryseobacterium cucumeris*, *Chryseobacterium gwangjuense*, *Chryseobacterium taihuense*, *Corynebacterium doosanense*, *Corynebacterium glutamicum*, *Pseudarthrobacter sulfonivorans*, *Dermacoccus profundus*, *Psychrobacillus psychrodurans*, *Kocuria salsicia*, *Rhodococcus biphenylivorans*, *Exiguobacterium acetylicum*, *Paenarthrobacter nicotinovorans*, *Kocuria carniphila*, *Kocuria marina*, *Kocuria palustris*, *Kocuria rhizophila*, *Kocuria rosea*, *Leucobacter chromiirensistens*, *Lysinibacillus pakistanensis*, *Lysinibacillus parviboronicapiens*, *Planomicrobium okeanokoites*, *Massilia haematophila*, *Rosenbergiella epipactidis*, *Dietzia cercidiphylli*, *Microbacterium oxydans*, *Massilia agri*, *Microbacterium testaceum*, *Kocuria gwangalliensis*, *Micrococcus yunnanensis*, *Moraxella osloensis*, *Neomicrococcus lactis*, *Nocardia globerula*, *Paenibacillus bovis*, *Microbacterium arborescens*, *Brevundimonas bullata*, *Pseudomonas plecoglossicida*, *Staphylococcus edaphicus*, *Pseudarthrobacter oxydans*, *Pseudarthrobacter siccitolerans*, *Micrococcus aloeverae*, *Pseudomonas parafulva*, *Pseudomonas psychrotolerans*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas straminea*, *Roseomonas mucosa* 및 *Streptomyces californicus*로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 박테리아인 상기 실내 공기 중의 심혈관 질환 유발 인자의 스크리닝 방법.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 미생물은 *Alternaria alternata*, *Penicillium crustosurn*, *Arthriniun camelliae-sinensis*, *Aspergillus niger*, *Bjerkandera adusta*, *Chaetomium globosum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Coprinellus radians*, *Fusarium incarnatum*, *Fusarium proliferatum*, *Hypocrea lutea*, *Irpex lacteus*, *Moesziomyces aphidis*, *Neurospora tetrasperma*, *Penicillium brasilianum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium glabrum*, *Penicillium oxalicum*, *Penicillium rolfsii*, *Penicillium sclerotiorum*, *Phanerochaete sordida*, *Phlebia tremellosa*, *Rhodotorula dairenensis*, *Rhodotorula glutinis*, *Schizophyllum commune*, *Trametes versicolor* 및 *Trichoderma harzianum*으로 이루어진 군에서 선택되는 어느

하나의 곰팡이인 상기 실내 공기 중의 심혈관 질환 유발 인자의 스크리닝 방법.

청구항 11

청구항 1에 있어서, 상기 미생물을 1×10^2 내지 1×10^3 CFU/ml의 농도로 처리한 후 상기 사이토카인 분비량이 증가하면 상기 미생물을 상기 심혈관 질환 유발 인자로 판단하는 단계를 더 포함하는 상기 실내 공기 중의 심혈관 질환 유발 인자의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 공기 중 심혈관 질환 유발 인자의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 현대인들은 건물 내에서 대부분의 시간을 보내기 때문에 실내 공기질은 도시민의 건강에 직접적인 영향을 줄 수 있다. 즉, 한정된 공간 속에서 인공적인 설비를 통하여 계속적으로 순환되는 오염된 공기에 노출되거나, 환기설비가 없는 밀폐된 공간에서 오랫동안 생활함으로써 각종 인체 유해 오염물질들을 흡입하게 됨으로써 각종 호흡기 및 심혈관 관련 질환에 시달리고 있는 현대인이 증가하고 있다.

[0004] 최근 실내 환경문제가 국민건강의 주요 이슈로 부각되면서 주요 오염물질에 대한 실시간 관리의 필요성이 대두되고 있으며, 특히, 경제적 수준과 과학의 발달로 다양한 생활용품, 건축 내장재 등으로부터 다양한 오염물질이 방출되는 등 실내공간에서 생활하는 거주자들로부터 빌딩 증후군 증상을 호소하는 사례가 증가하고 있다.

[0005] 이렇게 실내 환경은 인체의 건강에 중요한 영향을 미치는 요인이 되었고, 근래 들어 심혈관 환자의 증가로 인해 실내 공기 중의 미생물 독성 연구의 필요성이 대두되고 있으나, 이에 대한 연구가 미비한 실정이다.

[0006] 이에 본 발명자들은 실내 공기에 존재하는 생물유해인자들을 스크리닝하였고, 생물유해인자들이 세포 또는 생물체에 미치는 영향을 분석함으로써, 실내 공기 중의 생물유해인자인 박테리아 또는 곰팡이로 인한 세포 이동률, 증식률 및 사이토카인 분비량 측정 실험의 표준화를 구축할 수 있는 체계를 확립하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-2308883호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 실내 공기 중 포함된 심혈관 질환 유발 미생물의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0010] 본 발명은 실내 공기 중 포함된 심혈관 질환 유발 인자를 제공한다.

과제의 해결 수단

[0012] 1. 인체로부터 분리된 심혈관 세포에 실내 공기에 존재하는 미생물을 처리하여 배양한 후, 세포의 이동률, 증식률 및 사이토카인 분비량으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나를 측정하는 단계를 포함하는 실내 공기 중의 심혈관 질환 유발 인자의 스크리닝 방법.

- [0013] 2. 위 1에 있어서, 심혈관 세포는 혈관 평활근세포 또는 혈관 내피세포인, 실내 공기 중의 심혈관 질환 유발 인자의 스크리닝 방법.
- [0014] 3. 위 1에 있어서, 세포의 이동률은 Wound healing assay로 측정하는, 실내 공기 중의 심혈관 질환 유발 인자의 스크리닝 방법.
- [0015] 4. 위 1에 있어서, 세포의 증식률은 BrdU ELISA로 측정하는, 실내 공기 중의 심혈관 질환 유발 인자의 스크리닝 방법.
- [0016] 5. 위 3에 있어서, 미생물을 1×10^3 내지 1×10^4 CFU/ml의 농도로 처리하여 Wound healing assay로 이동률이 100%를 초과하면 미생물을 심혈관 질환 유발 인자로 판단하는 단계를 더 포함하는 실내 공기 중의 심혈관 질환 유발 인자의 스크리닝 방법.
- [0017] 6. 위 4에 있어서, 미생물을 1×10^2 내지 1×10^3 CFU/ml의 농도로 처리하여 BrdU ELISA로 증식률이 100%를 초과하면 미생물을 심혈관 질환 유발 인자로 판단하는 단계를 더 포함하는 실내 공기 중의 심혈관 질환 유발 인자의 스크리닝 방법.
- [0018] 7. 위 1에 있어서, 미생물은 *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter pittii*, *Agrococcus baldri*, *Brevibacterium senegalense*, *Arthrobacter bussei*, *Bacillus aerius*, *Bacillus cereus*, *Paenibacillus macquariensis*, *Bacillus infantis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus marisflavi*, *Priestia megaterium*, *Bacillus proteolyticus*, *Paenibacillus terrigena*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus wiedmannii*, *Brachybacterium paraconglomeratum*, *Brevibacterium sediminis*, *Brevundimonas diminuta*, *Brevundimonas vesicularis*, *Mammaliicoccus sciuri*, *Chryseobacterium cucumeris*, *Chryseobacterium gwangjuense*, *Chryseobacterium taihuense*, *Corynebacterium doosanense*, *Corynebacterium glutamicum*, *Pseudarthrobacter sulfonivorans*, *Psychrobacillus psychrodurans*, *Kocuria marina*, *Kocuria palustris*, *Kocuria rhizophila*, *Lysinibacillus parviboronicapiens*, *Planomicrobium okeanoikoites*, *Massilia haematophila*, *Microbacterium oxydans*, *Kocuria gwangalliensis*, *Micrococcus yunnanensis*, *Staphylococcus edaphicus*, *Pseudarthrobacter oxydans*, *Pseudarthrobacter siccitolerans*, *Micrococcus aloeverae*, *Pseudomonas parafulva*, *Pseudomonas psychrotolerans*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas straminea*, *Roseomonas mucosa* 및 *Streptomyces californicus*로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 박테리아인 실내 공기 중의 심혈관 질환 유발 인자의 스크리닝 방법.
- [0019] 8. 위 1에 있어서, 미생물은 *Alternaria alternata*, *Penicillium crustosum*, *Arthrrium camelliae-sinensis*, *Aspergillus niger*, *Chaetomium globosum*, *Fusarium incarnatum*, *Fusarium proliferatum*, *Hypocrea lutea*, *Irpex lacteus*, *Microdochium albescent*, *Moesziomyces aphidis*, *Neurospora tetrasperma*, *Penicillium brasilianum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium glabrum*, *Penicillium oxalicum*, *Penicillium rolsii*, *Penicillium sclerotiorum*, *Phanerochaete sordida*, *Phlebia tremellosa*, *Rhodotorula dairenensis*, *Rhodotorula glutinis*, *Schizophyllum commune* 및 *Trichoderma harzianum*으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 곰팡이인, 실내 공기 중의 심혈관 질환 유발 인자의 스크리닝 방법.
- [0020] 9. 위 1에 있어서, 미생물은 *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter pittii*, *Agrococcus baldri*, *Brevibacterium senegalense*, *Arthrobacter bussei*, *Bacillus aerius*, *Priestia aryabhattai*, *Bacillus cereus*, *Paenibacillus macquariensis*, *Bacillus infantis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus marisflavi*, *Priestia megaterium*, *Bacillus proteolyticus*, *Paenibacillus terrigena*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus wiedmannii*, *Brachybacterium paraconglomeratum*, *Brevibacterium sediminis*, *Brevundimonas diminuta*, *Brevundimonas vesicularis*, *Mammaliicoccus sciuri*, *Chryseobacterium cucumeris*, *Chryseobacterium gwangjuense*, *Chryseobacterium taihuense*, *Corynebacterium doosanense*, *Corynebacterium glutamicum*, *Pseudarthrobacter sulfonivorans*, *Dermacoccus profundus*, *Psychrobacillus psychrodurans*, *Kocuria salsicia*, *Rhodococcus biphenylivorans*, *Exiguobacterium acetylicum*, *Paenarthrobacter nicotinivorans*, *Kocuria carniphila*, *Kocuria marina*, *Kocuria palustris*, *Kocuria rhizophila*, *Kocuria rosea*, *Leucobacter chromiirensistens*, *Lysinibacillus pakistanensis*, *Lysinibacillus parviboronicapiens*, *Planomicrobium okeanoikoites*, *Massilia haematophila*, *Rosenbergiella epipactidis*, *Dietzia cercidiphylli*, *Microbacterium oxydans*, *Massilia agri*, *Microbacterium testaceum*, *Kocuria gwangalliensis*, *Micrococcus yunnanensis*, *Moraxella osloensis*, *Neomicrococcus lactis*, *Nocardia globerula*, *Paenibacillus bovis*, *Microbacterium*

arborescens, *Brevundimonas bullata*, *Pseudomonas plecoglossicida*, *Staphylococcus edaphicus*, *Pseudarthrobacter oxydans*, *Pseudarthrobacter siccitolerans*, *Micrococcus aloeverae*, *Pseudomonas parafulva*, *Pseudomonas psychrotolerans*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas straminea*, *Roseomonas mucosa* 및 *Streptomyces californicus*로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 박테리아인 실내 공기 중의 심혈관 질환 유발 인자의 스크리닝 방법.

[0021] 10. 위 1에 있어서, 미생물은 *Alternaria alternata*, *Penicillium crustosum*, *Arthrrium camelliae-sinensis*, *Aspergillus niger*, *Bjerkandera adusta*, *Chaetomium globosum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Coprinellus radians*, *Fusarium incarnatum*, *Fusarium proliferatum*, *Hypocrea lutea*, *Irpex lacteus*, *Moesziomyces aphidis*, *Neurospora tetrasperma*, *Penicillium brasilianum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium glabrum*, *Penicillium oxalicum*, *Penicillium rolfsii*, *Penicillium sclerotiorum*, *Phanerochaete sordida*, *Phlebia tremellosa*, *Rhodotorula dairenensis*, *Rhodotorula glutinis*, *Schizophyllum commune*, *Trametes versicolor* 및 *Trichoderma harzianum*으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 곰팡이인 실내 공기 중의 심혈관 질환 유발 인자의 스크리닝 방법.

[0022] 11. 위 1에 있어서, 미생물을 1×10^2 내지 1×10^3 CFU/ml의 농도로 처리한 후 사이토카인 분비량이 증가하면 미생물을 심혈관 질환 유발 인자로 판단하는 단계를 더 포함하는 실내 공기 중의 심혈관 질환 유발 인자의 스크리닝 방법.

발명의 효과

[0024] 본 발명의 방법은 실내 공기 중 포함된 심혈관 질환 유발 미생물을 스크리닝할 수 있다.

[0025] 본 발명의 방법은 실내 공기 중 포함된 생물 유해 인자를 동정할 수 있다.

[0026] 본 발명의 방법은 실내 공기 중 생물 유해 인자를 제어할 수 있는 시스템 구축에 유용하게 활용될 수 있다.

[0027] 본 발명의 방법은 생물 유해 인자의 종합적인 인체 영향 평가에도 유용하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 혈관 평활근세포에 박테리아(70종)를 처리한 경우 세포 이동을 보여주는 Wound healing assay 결과이다.

도 2는 혈관 평활근세포에 곰팡이(30종)를 처리한 경우 세포 이동을 보여주는 Wound healing assay 결과이다.

도 3은 대조군, 박테리아 12 및 곰팡이 23에 대한 사이토카인 분비량 측정 실험 결과이다.

도 4는 박테리아 12를 처리한 경우 각 사이토카인의 분비량을 상기 실험 방법 및 계산식에서 기재한 식에 따라 계산하여 나타낸 그래프이다.

도 5는 곰팡이 23를 처리한 경우 각 사이토카인의 분비량을 상기 실험 방법 및 계산식에서 기재한 식에 따라 계산하여 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 본 발명은 실내 공기 중 심혈관 질환 유발 인자의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0031] 본 발명은 인체로부터 분리된 심혈관 세포에 실내 공기 중 존재하는 미생물을 처리하여 배양한 후, 세포의 이동률, 증식률 및 사이토카인 분비량으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나를 측정하는 단계를 포함함으로써 실내 공기 중 포함된 생물 유해 인자를 동정할 수 있고 생물 유해 인자의 제어 시스템 구축 및 종합적인 인체 영향 평가에 유용하게 활용될 수 있는 실내 공기 중 심혈관 질환 유발 인자의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0032] 본 발명에서 심혈관 세포는 심혈관을 구성하는 세포로 예컨대 혈관 평활근세포 또는 혈관 내피세포일 수 있다.

[0033] 본 발명에서 심혈관 질환은 동맥경화증, 협심증, 심근경색증, 허혈성 심장 질환, 말초혈관질환, 뇌경색, 뇌졸중, 고혈압, 저혈압, 관상동맥질환, 뇌혈관 질환, 신장 혈관 질환, 심장 마비, 부정맥, 심실세동, 심방세동, 기외수축, 발작성 빈맥증, 대동맥류, 심근병증, 고혈압성 심장 질환, 심부전, 폐성심, 심장 부정맥,

심내막염, 심낭염, 심장 비대, 심근염, 심장판막증, 류마티스성 심장병, 승모판폐쇄부전증, 승모판협착증, 대동맥판협착증, 대동맥판폐쇄부전증, 신동맥 협착증, 원발성 폐고혈압증 중 어느 하나일 수 있다.

[0034]

본 발명에서 실내 공기에 존재하는 미생물은 *Brevibacterium frigoritolerans*, *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter pittii*, *Agrococcus baldri*, *Brevibacterium senegalense*, *Arthrobacter bussei*, *Bacillus aerius*, *Priestia aryabhattai*, *Bacillus cereus*, *Paenibacillus macquariensis*, *Bacillus infantis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus marisflavi*, *Priestia megaterium*, *Bacillus proteolyticus*, *Paenibacillus terrigena*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus wiedmannii*, *Brachybacterium paraconglomeratum*, *Brevibacterium sediminis*, *Brevundimonas diminuta*, *Brevundimonas vesicularis*, *Mammaliococcus sciuri*, *Chryseobacterium cucumeris*, *Chryseobacterium gwangjuense*, *Chryseobacterium taihuense*, *Corynebacterium doosanense*, *Corynebacterium glutamicum*, *Pseudarthrobacter sulfonivorans*, *Dermacoccus profundus*, *Psychrobacillus psychrodurans*, *Kocuria salsicia*, *Rhodococcus biphenylivorans*, *Exiguobacterium acetylicum*, *Paenarthrobacter nicotinovorans*, *Kocuria carniphila*, *Kocuria marina*, *Kocuria palustris*, *Kocuria rhizophila*, *Kocuria rosea*, *Leucobacter chromiisistens*, *Lysinibacillus pakistanensis*, *Lysinibacillus parviboronicapiens*, *Planomicrobium okeanoikoites*, *Massilia haematophila*, *Rosenbergiella epipactidis*, *Dietzia cercidiphylli*, *Microbacterium oxydans*, *Massilia agri*, *Microbacterium testaceum*, *Kocuria gwangalliensis*, *Micrococcus yunnanensis*, *Moraxella osloensis*, *Neomicrococcus lactis*, *Nocardia globerula*, *Paenibacillus bovis*, *Microbacterium arborescens*, *Brevundimonas bullata*, *Pseudomonas plecoglossicida*, *Staphylococcus edaphicus*, *Pseudarthrobacter oxydans*, *Pseudarthrobacter siccitolerans*, *Micrococcus aloeverae*, *Pseudomonas parafulva*, *Pseudomonas psychrotolerans*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas straminea*, *Roseomonas mucosa*, *Streptomyces californicus* 중 어느 하나의 박테리아일 수 있다. 이들은 표 1과 같이 박테리아 1, 박테리아 2 등으로 명명한다.

[0035]

[표 1]

박테리아	Species (Bacteria)	Sample #	박테리아	Species (Bacteria)	Sample #
1	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	SSD26-2	36	<i>Paenarthrobacter nicotinovorans</i>	KD172-6
2	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	SSD38-4	37	<i>Kocuria carniphila</i>	SSD 36-3
3	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	DD45-2	38	<i>Kocuria marina</i>	SSD 15-2
4	<i>Acinetobacter pittii</i>	SSD 16-3	39	<i>Kocuria palustris</i>	SSD 38-6
5	<i>Agrococcus baldri</i>	NST 6-1	40	<i>Kocuria rhizophila</i>	SSD 38-2
6	<i>Brevibacterium senegalense</i>	SSD 36-1	41	<i>Kocuria rosea</i>	NST 4-1
7	<i>Arthrobacter bussei</i>	SSD 20-3	42	<i>Leucobacter chromiisistens</i>	NST 19-3
8	<i>Bacillus aerius</i>	NST 16-3	43	<i>Lysinibacillus pakistanensis</i>	DD 44-5
9	<i>Priestia aryabhattai</i>	NST 4-2	44	<i>Lysinibacillus parviboronicapiens</i>	NSD 4-2
10	<i>Bacillus cereus</i>	GD 11	45	<i>Planomicrobium okeanoikoites</i>	BD91-3
11	<i>Paenibacillus macquariensis</i>	SSD 26-3	46	<i>Massilia haematophila</i>	NST 3-4
12	<i>Bacillus infantis</i>	SSD109-3	47	<i>Rosenbergiella epipactidis</i>	GD 6
13	<i>Bacillus licheniformis</i>	BD 58-2	48	<i>Dietzia cercidiphylli</i>	KD169-3
14	<i>Bacillus marisflavi</i>	DD 38-2	49	<i>Microbacterium oxydans</i>	GD 9
15	<i>Priestia megaterium</i>	SSD 20-2	50	<i>Massilia agri</i>	DD68-3
16	<i>Bacillus proteolyticus</i>	DD 39-3	51	<i>Microbacterium testaceum</i>	GT 1-2
17	<i>Paenibacillus terrigena</i>	NST 2-2	52	<i>Kocuria gwangalliensis</i>	BD89-2
18	<i>Bacillus thuringiensis</i>	SSD27-1	53	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	SSD 23-1
19	<i>Bacillus wiedmannii</i>	DD 36-2	54	<i>Moraxella osloensis</i>	SSD 37-6
20	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>	DD 35-3	55	<i>Neomicrococcus lactis</i>	SSD 23-3
21	<i>Brevibacterium sediminis</i>	SSD 15-4	56	<i>Nocardia globerula</i>	GD 5
22	<i>Brevundimonas diminuta</i>	SSD 17-1	57	<i>Paenibacillus bovis</i>	NST 18-4
23	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	BD 58-1	58	<i>Microbacterium arborescens</i>	BT28-1
24	<i>Mammaliococcus sciuri</i>	NST 5-3	59	<i>Brevundimonas bullata</i>	KD163-2
25	<i>Chryseobacterium cucumeris</i>	NST 17-1	60	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	KT 4
26	<i>Chryseobacterium gwangjuense</i>	NST 18-1	61	<i>Staphylococcus edaphicus</i>	KD 12
27	<i>Chryseobacterium taihuense</i>	GD1	62	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	NST 14-3
28	<i>Corynebacterium doosanense</i>	DD 40-5	63	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i>	KD 7
29	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	NST 6-4	64	<i>Micrococcus aloeverae</i>	BD85-4
30	<i>Pseudarthrobacter sulfonivorans</i>	NST 2-1	65	<i>Pseudomonas parafulva</i>	NST 15-1
31	<i>Dermacoccus profundus</i>	DD 40-7	66	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	NST 18-3
32	<i>Psychrobacillus psychrodurans</i>	GD 17-1	67	<i>Pseudomonas putida</i>	KD 10
33	<i>Kocuria salsicia</i>	KD164-8	68	<i>Pseudomonas straminea</i>	GD 4
34	<i>Rhodococcus biphenylivorans</i>	KD172-9	69	<i>Roseomonas mucosa</i>	BD 58-4
35	<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	KD 9	70	<i>Streptomyces californicus</i>	NSH 3-3

[0036]

[0037]

본 발명에서 실내 공기에 존재하는 미생물은 *Alternaria alternata*, *Penicillium crustosum*, *Arthrinium camelliae-sinensis*, *Aspergillus niger*, *Bjerkandera adusta*, *Chaetomium globosum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Coprinellus radians*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium incarnatum*, *Fusarium proliferatum*, *Hypocrea lutea*, *Irpex lacteus*, *Microdochium albescentis*, *Moesziomyces aphidis*, *Neurospora tetrasperma*, *Penicillium brasilianum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium glabrum*, *Penicillium oxalicum*, *Penicillium rolsii*, *Penicillium sclerotiorum*, *Phanerochaete sordida*, *Phlebia*

tremellosa, *Rhodotorula dairenensis*, *Rhodotorula glutinis*, *Schizophyllum commune*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum* 중 어느 하나의 곰팡이일 수 있다. 이들 곰팡이는 표 2와 같이 곰팡이 1, 곰팡이 2 등으로 명명한다.

[표 2]

곰팡이	Species (Fungi)	Sample #	곰팡이	Species (Fungi)	Sample #
1	<i>Alternaria alternata</i>	SSD13-3	16	<i>Moesziomyces aphidis</i>	DD56-4
2	<i>Penicillium crustosum</i>	DD17-4	17	<i>Neurospora tetrasperma</i>	BT4-4
3	<i>Arthrinium camelliae-sinensis</i>	DT4-1	18	<i>Penicillium brasilianum</i>	SSD27-2
4	<i>Aspergillus niger</i>	GD24-2	19	<i>Penicillium chrysogenum</i>	SSD22-1
5	<i>Bjerkandera adusta</i>	NST7-2	20	<i>Penicillium glabrum</i>	DB8-1
6	<i>Chaetomium globosum</i>	SSD13-2	21	<i>Penicillium oxalicum</i>	SSH3-1
7	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	NST1-1	22	<i>Penicillium rolfsii</i>	DD44-7
8	<i>Coprinellus radians</i>	NSD7-2	23	<i>Penicillium sclerotiorum</i>	DD52-4
9	<i>Fusarium equiseti</i>	KD27-2	24	<i>Phanerochaete sordida</i>	DT3-2
10	<i>Fusarium fujikuroi</i>	GD22-1	25	<i>Phlebia tremellosa</i>	SST4-1
11	<i>Fusarium incarnatum</i>	DT5-1	26	<i>Rhodotorula dairenensis</i>	BD14-1
12	<i>Fusarium proliferatum</i>	GT2-2	27	<i>Rhodotorula glutinis</i>	DD19-1
13	<i>Hypocrea lutea</i>	GD22-2	28	<i>Schizophyllum commune</i>	NSD11-2
14	<i>Irpex lacteus</i>	KD24-1	29	<i>Trametes versicolor</i>	NST16-4
15	<i>Microdochium albescent</i>	SSD26-2	30	<i>Trichoderma harzianum</i>	KH12-3

이하 본 발명을 실시예로 보다 상세하게 설명한다.

실시예

준비에 및 실험방법

세포 이동률, 세포 증식률 및 사이토카인 분비량 측정 실험의 표준화를 위한 미생물 준비

실험에 사용한 미생물은 상기 표 1에 제시한 박테리아 70종과 표 2에 제시한 곰팡이 30종이며 실험을 위한 미생물의 준비는 다음과 같이 진행하였다.

미생물 배양 및 전처리 과정

(1) 박테리아

Micrococcus 속을 제외한 다른 박테리아들은 각각 50 ml Luria Bertani(LB) 브로쓰에 접종하고 37℃ 진탕 배양기에서 16시간 동안 배양하였으며, *Micrococcus* 속 박테리아는 50 ml Nutrient 브로쓰에 접종하여 25℃ 진탕 배양기에서 2일 동안 배양하였다.

전처리 과정은 다음과 같이 수행하였다. 상기와 같이 배양된 박테리아는 원심분리하여 회수하고 차가운 PBS(phosphate buffered saline)로 2회 세척 후 3 ml의 차가운 PBS로 박테리아 부유액을 제조하고, 상기 박테리아 부유액을 10배 희석하여 흡광도(600 nm, spectrophotometer)를 측정하였다. 이때 실험에 필요한 박테리아의 농도는 2×10^9 CFU/ml (O.D.=1)을 기준으로 하였다.

(2) 곰팡이

곰팡이들은 PDA(Potato Dextrose Agar) 플레이트에 각각 접종하고 25℃ 배양기에서 5일 동안 배양하였다.

또한 전처리 과정은 다음과 같이 수행하였다. 10 ml의 PBS를 PDA 플레이트에서 배양된 곰팡이에 부어 일회용 스프레더를 사용하여 포자를 모았다. 곰팡이 포자 부유액은 Miracloth에 걸러 포자만을 순수 분리하였다. 이후 곰팡이 농도를 결정하기 위하여 곰팡이 부유액을 10배 희석한 후 헤마토사이토메터에서 측정하여 농도를 결정하였다.

상기 박테리아 및 곰팡이의 비활성화는 물중탕으로 수행하였는데, PBS에 함유된 박테리아 및 곰팡이 부유액을 끓는 물에 10분간 중탕하여 비활성화하였다.

[0057] 또한 박테리아 및 곰팡이의 부유액은 사용하기 전까지 -70°C 냉동고에서 보관한 후, 실험에 사용하였다.

[0059] 실험 방법 및 계산식

[0060] (1) 세포 이동률 평가 시험법

[0061] 1) 실험 방법

[0062] 미생물에 의한 혈관 평활근세포의 이동률을 Wound healing (상처치유) assay를 통해 평가하였다.

[0063] Wound healing assay는 in vitro의 이차원 평면상에서 세포의 이동을 관찰할 수 있는 연구 기법으로, 단층으로 뿔뿔하게 배양된 세포의 일부분을 인위적으로 긁어내 Wound(상처)를 형성하여 세포가 없도록 빈 공간을 만든 후 그 빈 공간을 채워가는 세포의 이동 능력을 모니터링하는 실험법으로, 미생물이 혈관 평활근세포의 이동성에 미치는 영향을 평가할 수 있다.

[0064] 본 실험에서는 혈관 평활근세포를 12 well plate에 $4 \times 10^5/\text{well}$ 로 seeding 한 뒤 37°C , 5% CO_2 조건으로 cell confluency가 100%가 되도록 배양하였다. 그 후, 1% FBS가 들어간 DMEM 배지로 24시간 동안 starvation시켰다. 3 mm 폭의 scraper를 이용하여 각 well의 중심부 바닥을 일직선으로 그어 동일한 굵기의 scratch를 낸 후, serum free DMEM 배지로 3번 세척하고 2% FBS가 들어간 DMEM 배지로 교환하였다. 각 well에 1×10^3 CFU/ml 농도의 시료를 처리 후 동일한 배양조건에서 72시간 동안 정지 배양하였다. 이후, 배지를 제거하고 PBS로 씻어낸 다음 20% methanol에 녹아있는 0.5% crystal violet 용액에 10분간 반응시켜 세포를 고정, 염색 시킨 후 PBS로 3번 세척하였다. 광학 현미경을 이용하여 400배 배율로 빈 공간으로 이동한 세포 면적을 관찰하고 이를 카메라로 촬영하였다.

[0065] 판정을 위해 눈금자를 이용하여 처음 scratch 난 출발점을 기준으로 세포가 이동한 길이를 무작위로 6군데에서 선정하여 평균치를 기록하고 이동한 정도를 %로 나타내었다.

[0066] 2) 계산식

[0067]
$$\text{Cell migration (\%)} = (\text{시료 처리군 평균 이동 길이} / \text{시료 미처리군 평균 이동 길이}) \times 100$$

[0069] (2) 세포 증식률 평가 시험법

[0070] 1) 실험 방법

[0071] 미생물에 의한 혈관 평활근세포의 증식률을 BrdU ELISA 분석법을 통해 평가하였다.

[0072] BrdU ELISA 분석법은 증식 세포의 DNA에 결합하는 티미딘(thymidine) 유사체인 5-Bromo-2-deoxyuridine(BrdU)을 peroxidase가 표지된 BrdU 특이적인 항체로 표시한 뒤 기질을 첨가하여 peroxidase와 반응함으로써 나타나는 발색 정도를 Microplate Reader기로 측정하여 BrdU 양성세포 수를 정량화하는 시험법이다.

[0073] 본 실험에서는 전배양 단계에서 혈관 평활근세포를 96 well plate에 $5 \times 10^3/\text{well}$ 로 seeding 한 뒤 37°C , 5% CO_2 조건으로 12시간 동안 배양하였다. 이후 1% FBS가 들어간 배지로 24시간 동안 starvation 시켰다. 상기 방법으로 전배양한 세포액에 1×10^2 CFU/ml 농도의 시료를 처리하고, 동일한 배양조건에서 24시간 동안 반응시켰다. 세포 증식률 확인을 위해 BrdU cell proliferation assay kit (Cell signaling)를 사용하여 BrdU labeling solution을 각 well에 첨가하고 5시간 동안 37°C 에서 배양하였다. 배양액을 제거하고 PBS로 세척한 뒤 100 μl 의 Fixing/Denaturing Solution을 처리하여 실온에서 30분간 세포를 고정/변성시켰다. 이후 Anti-BrdU를 추가하고 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 HRP-conjugated secondary antibody solution을 처리하여 30분 동안 반응시켰다. 이후 antibody conjugate를 제거하고 washing buffer로 세포를 3회 씻은 후 100 μl peroxidase substrate를 추가하여 발색시켜 흡광도를 450nm에서 측정하였다.

[0074] 2) 계산식

[0075]
$$\text{Cell proliferation (\%)} = (\text{시료 처리군 OD450} / \text{시료 미처리군 OD450}) \times 100$$

[0076] *OD450 : 450 nm에서 측정된 흡광도 값

[0078] (3) 사이토카인 분비량 측정 시험법

[0079] 1) 실험 방법

[0080] 본 실험에서는 Human Cytokine Antibody Array를 이용한 사이토카인 정량 분석 시험법을 적용하였다.

[0081] 상기 시험법은 세포의 배양 상청액을 수집하여 80개의 바이오틴화된 사이토카인 항체가 부착된 membrane에 첨가해 반응시킨 후 streptavidin-horseradish peroxidase(HRP) 항체와 반응시켜 X-ray 필름 또는 겔 이미지화 기계상에 나타난 각 사이토카인 분비 정도를 정량 분석 프로그램을 이용하여 분석하는 시험법이다. 표 3은 본 실험에서 사용한 RayBio® C-Series Human Cytokine Antibody Array C5 kit의 구성이다.

[0082] [표 3]

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	CXCL5	G-CSF	GM-CSF	GRO a/b/g	CXCL1
2	CCL1	IL-1 F1	IL-1 F2	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	CXCL8	IL-10
3	IL-12 p40/p70	IL-13	IL-15	IFN- γ mma	CCL2	CCL8	CCL7	M-CSF	CCL22	CXCL9	CCL4
4	MIP-1 delta	CCL5	SCF	SDF-1 alpha	CCL17	TFG beta 1	TNF alpha	TNF beta	EGF	IgF-1	Angioge nin
5	OSM	TPO	VEGF-A	PDGF-B B	Leptin	BDNF	CXCL13	CCL23	CCL11	CCL24	CCL26
6	FGF-4	FGF-6	FGF-7	FGF-9	FLT-3 Ligand	CX4CL1	CXCL6	GDNF	HGF	IGFBP-1	IGFBP-2
7	IGFBP-3	IGFBP-4	IL-16	IP-10	LIF	LIGHT	MCP-4	MIF	MIP-3 alpha	NAP-2	NT-3
8	NT-4	OPN	OPG	PARC	PLGF	TGF beta 2	TGF beta 3	TIMP-1	TIMP-2	POS	POS

[0083]

[0084] 표 3에서 A 내지 K 및 1 내지 8은 kit에서 각 사이토카인 항체의 위치를 지정하기 위한 것이다. POS는 Positive Control Spots이며 측정값의 정규화 및 배열의 방향을 지정하고, NEG는 Negative Control Spots이며 사이토카인 항체가 없는 버퍼이다.

[0085] 본 실험의 전배양 단계에서 혈관 내피세포를 6 well plate에 2.5×10^5 /well로 seeding 한 뒤 37℃, 5% CO₂ 조건으로 12시간 동안 배양하였다. 이후 1% FBS가 들어간 배지로 24시간 동안 starvation 시켰다. 상기 방법으로 전배양한 세포액에 1×10^2 CFU/ml 농도의 시료를 처리하고, 동일한 배양 조건에서 48시간 동안 반응시켰다. 미생물에 의해 혈관 내피세포에서 분비되는 사이토카인의 상대적 수준은 RayBio® C-Series Human Cytokine Antibody Array C5 kit를 이용하여 검출하였다. 48시간 동안 배양한 혈관 내피세포 배양 상청액을 수집 후 80개의 바이오틴화된 사이토카인 항체가 부착된 membrane에 첨가하여 12시간 동안 4℃에서 반응시켰다. 이후 PBS로 membrane을 세척한 다음 streptavidin-horseradish peroxidase(HRP) 항체를 첨가하여 2시간 동안 반응시켰다. 그 다음, Enhanced chemiluminescence reagent(ECL)을 처리하여 X-ray 필름상에 나타난 각 사이토카인 spot들의 신호 밀도(signal density)를 Image J 소프트웨어를 이용하여 수치화한 뒤 상대적 정량을 대조군(control)과 비교해 분석하였다.

[0086] 2) 계산식

[0087] ① 시료군 사이토카인 “X” 정규화 값(normalization) = 사이토카인 “X” spot 신호 밀도 값 × (대조군 positive control spot의 신호 밀도 평균값 / 시료군 positive control spot의 신호 밀도 평균값)

[0088] ② 시료군 사이토카인 “X” 상대 정량 값 = 시료군 사이토카인 “X” 정규화 값 / 대조군 사이토카인 “X” 신호 밀도 값

[0089] 예를 들어, 대조군과 *Bacillus infantis* 처리된 시료에서 CXCL5의 상대적 발현을 정량하고자 할 때 하기와 같이 계산하였다.

[0090] - 대조군의 positive control spot의 신호 밀도 평균값 = 85629

[0091] - 시료 처리군의 positive control spot의 신호 밀도 평균값 = 85303

- [0092] - 대조군의 CXCL5 신호 밀도 값 = 9292
- [0093] - 시료 처리군의 CXCL5 신호 밀도 값 = 22380
- [0094] - 시료 처리군의 CXCL5 정규화 값 = $22380 \times 85629 / 85303 = 22465$
- [0095] 대조군 CXCL5 vs 시료군 CXCL5 = $22465 / 9292 = 2.42$ 배 증가하였다.

[0097] **실시예 1 : 세포 이동률 측정**

[0098] **(1) 박테리아 1 내지 박테리아 70의 세포 이동률 측정**

[0099] 박테리아 1 내지 박테리아 70을 혈관 평활근 세포에 1×10^3 CFU/ml로 처리한 후 72시간 동안 세포 이동을 유발해 Wound healing assay를 진행하여 세포 이동률을 분석하였다. 도 1은 상기 Wound healing assay의 결과이며, 이에 기초해 세포 이동률을 측정하여 표 4로 정리하였다.

[0100] [표 4]

박테리아	세포 이동률(%)	박테리아	세포 이동률(%)	박테리아	세포 이동률(%)
1	59.02	26	136.59	51	70.81
2	109.80	27	110.67	52	101.24
3	107.96	28	103.39	53	102.47
4	114.40	29	107.08	54	92.94
5	115.89	30	108.72	55	95.60
6	124.81	31	92.53	56	85.25
7	134.44	32	103.80	57	84.84
8	117.53	33	96.42	58	77.36
9	96.72	34	92.12	59	81.05
10	110.77	35	90.17	60	96.42
11	124.30	36	89.35	61	120.91
12	114.77	37	91.20	62	146.02
13	110.00	38	108.11	63	126.65
14	114.77	39	111.69	64	137.08
15	107.08	40	119.12	65	169.18
16	106.16	41	93.28	66	123.07
17	114.46	42	72.80	67	165.08
18	110.56	43	89.25	68	132.39
19	126.34	44	110.05	69	132.70
20	103.05	45	104.72	70	144.69
21	113.54	46	111.98		
22	114.05	47	92.33		
23	113.84	48	92.02		
24	137.31	49	100.52		
25	123.37	50	98.99		

[0101]

[0102] 총 48개의 박테리아가 통계적으로 유의한 세포 이동을 유발했으며, 특히 감마프로테오 박테리아의 한 종류인 슈도모나스파에 속하는 *Pseudomonas parafulva*(박테리아 65)와 *Pseudomonas putida*(박테리아 67)를 처리한 세포에서 대조군과 비교하여 현저한 세포이동 변화가 관찰되었다.

[0104] **(2) 곰팡이 1 내지 곰팡이 30의 세포 이동률 측정**

[0105] 곰팡이 1 내지 곰팡이 30을 혈관 평활근 세포에 1×10^3 CFU/ml로 처리한 후 72시간 동안 세포 이동을 유발해 Wound healing assay를 진행하여 세포 이동률을 분석하였다. 도 2는 상기 Wound healing assay의 결과이며, 이에 기초해 세포 이동률을 측정하여 표 5로 정리하였다.

[0106] [표 5]

곰팡이	세포 이동률(%)	곰팡이	세포 이동률(%)	곰팡이	세포 이동률(%)
1	113.72	11	114.81	21	111.46
2	102.31	12	115.30	22	112.05
3	101.92	13	114.12	23	118.35
4	102.80	14	118.25	24	110.28
5	99.95	15	109.89	25	124.45
6	108.31	16	116.77	26	105.26
7	91.59	17	118.54	27	102.61
8	95.62	18	126.81	28	103.10
9	70.73	19	107.13	29	97.69
10	99.95	20	108.80	30	103.10

[0107]

[0108] 총 24개의 곰팡이가 통계적으로 유의한 세포 이동을 유발하였다.

[0110] (3) 세포 이동을 유발하는 상위 10개 균종 선별 결과

[0111] 세포 이동을 유발하는 상위 10개 균종을 선별한 결과 모두 하기 표 6의 박테리아 균종으로 확인되었다.

[0112] [표 6]

순위	박테리아	세포 이동률(%)
1	65	169.18
2	67	165.08
3	62	146.02
4	70	144.69
5	24	137.31
6	64	137.08
7	26	136.59
8	7	134.44
9	69	132.70
10	68	132.39

[0113]

[0115] 실시예 2 : 세포 증식률 측정

[0116] (1) 박테리아 1 내지 박테리아 70의 세포 증식률 측정

[0117] 박테리아 1 내지 박테리아 70을 혈관 평활근 세포에 1×10^2 CFU/ml로 처리한 후 24시간 동안 세포 증식을 유발해 BrdU ELISA를 진행하여 세포 증식률을 분석하였다. 그 결과는 표 7과 같다.

[0118] [표 7]

박테리아	세포 증식률(%)	박테리아	세포 증식률(%)	박테리아	세포 증식률(%)
1	93.20	26	145.86	51	167.40
2	110.46	27	152.41	52	159.87
3	97.42	28	154.24	53	150.77
4	102.53	29	142.53	54	143.27
5	110.92	30	149.32	55	132.76
6	201.87	31	151.24	56	151.05
7	189.50	32	157.50	57	131.80
8	191.04	33	174.53	58	133.43
9	177.39	34	148.41	59	133.37
10	174.79	35	143.44	60	135.50
11	173.01	36	145.13	61	164.71
12	138.18	37	145.70	62	156.56
13	175.27	38	158.69	63	139.95
14	180.64	39	147.31	64	146.10
15	182.38	40	153.32	65	139.64
16	184.79	41	150.48	66	152.58
17	191.46	42	178.91	67	130.63
18	193.35	43	147.36	68	126.76
19	196.94	44	152.03	69	117.41
20	198.87	45	162.12	70	124.43
21	190.13	46	152.21		
22	178.38	47	144.13		
23	193.77	48	146.19		
24	203.95	49	142.98		
25	177.34	50	142.37		

[0119]

[0120] 2개의 시료(박테리아 1 및 3)를 제외한 모든 시료에서 혈관 평활근 세포의 증식성이 유의성 있게 증가함을 확인하였다.

[0122] (2) 곰팡이 1 내지 곰팡이 30의 세포 증식률 측정

[0123] 곰팡이 1 내지 곰팡이 30을 혈관 평활근 세포에 1×10^2 CFU/ml로 처리한 후 24시간 동안 세포 증식을 유발해 BrdU ELISA를 진행하여 세포 증식률을 분석하였다. 그 결과는 표 8과 같다.

[0124] [표 8]

곰팡이	세포 증식률(%)	곰팡이	세포 증식률(%)	곰팡이	세포 증식률(%)
1	116.36	26	116.81	51	148.11
2	116.87	27	134.80	52	146.37
3	129.27	28	140.62	53	131.31
4	112.95	29	116.27	54	131.56
5	119.68	30	96.68	55	106.61
6	116.95	31	126.63	56	157.23
7	119.73	32	120.97	57	146.63
8	121.13	33	116.23	58	143.95
9	95.35	34	121.88	59	135.96
10	93.86	35	103.88	60	123.67

[0125]

[0126] 3개의 시료(곰팡이 9, 10 및 30)를 제외한 모든 시료에서 혈관 평활근 세포의 증식성이 유의성 있게 증가함을 확인하였다.

[0128] (3) 세포 증식을 유발하는 상위 10개 균종 선별 결과

[0129] 세포 증식을 유발하는 상위 10개 균종을 선별한 결과 모두 하기 표 9의 박테리아 균종으로 확인되었다.

[0130] [표 9]

순위	박테리아	세포 증식률(%)
1	24	203.95
2	6	201.87
3	20	198.87
4	19	196.94
5	23	193.77
6	18	193.35
7	17	191.46
8	8	191.04
9	21	190.13
10	7	189.50

[0131]

[0132] 박테리아 중 하나인 *Arthrobacter bussei*(박테리아 7)가 혈관 평활근세포의 이동과 증식을 모두 촉진시키는 상위 균종으로 확인되었다.

[0133] 상기 2가지 실시예에서 박테리아 1을 제외하고는 모든 박테리아 및 곰팡이의 세포 이동을 또는 증식을 측정 실험에서 적어도 하나 이상이 100%를 초과하는 결과를 나타냈다.

[0134] 이러한 결과를 통해, 생물 유해인자인 박테리아 또는 곰팡이가 혈관 평활근 세포의 이동 또는 증식을 유발하여 각종 심혈관 질환을 유발할 수 있음을 알 수 있었다.

[0136] 실시예 3 : 사이토카인 분비량 측정

[0137] 대표 시료군으로 박테리아 12와 곰팡이 23을 선택하여 혈관 내피 세포에 1×10^2 CFU/ml 농도로 48시간 동안 처리하였고, 그 후 얻은 media를 이용하여 대조군(Control)에 대한 사이토카인 분비 변화를 확인하였다.

[0138] 그 결과 박테리아 12를 처리한 경우 대조군에 비해 분비량이 1.5배 이상 증가한 사이토카인은 51개였고, 곰팡이 23을 처리한 경우 48개였다(도 3).

[0139] 표 10 및 표 11은 박테리아 12 및 곰팡이 23을 처리한 경우 각 사이토카인의 분비량을 상기 실험 방법 및 계산식에서 제시한 식에 따라 계산하여 정량화한 것이며, 대조군에 비해 분비량이 1.5배 이상인 것은 빨간색으로 표시하였다. 도 4 및 도 5는 계산한 수치를 그래프로 나타낸 것이다.

[0140] 특히 CCL5가 가장 높은 분비 변화를 나타냈고, FGF-7, VEGF-A, IL-3, SCF 등이 대조군과 비교하여 분비량이 뚜렷하게 많았다.

[0141] 이러한 결과를 통해 생물 유해인자인 박테리아와 곰팡이에 의해 혈관 내피세포에서 분비된 사이토카인들은 혈관 염증을 유발할 뿐만 아니라 혈관 평활근세포의 증식과 이동을 초래하여 심혈관 질환을 유발할 수 있음을 알 수 있었다.

[0142] [표 10]

박테리아 12											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	CXCL5	G-CSF	GM-CSF	GRO a/b/g	CXCL1
	0.92	1.01	1.00	0.99	-	-	2.42	1.20	0.16	1.67	1.99
2	CCL1	IL-1 F1	IL-1 F2	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	CXCL8	IL-10
	1.80	2.05	3.06	2.06	3.91	1.71	1.88	0.67	0.78	3.24	1.33
3	IL-12 p40/p70	IL-13	IL-15	IFN-gamma	CCL2	CCL8	CCL7	M-CSF	CCL22	CXCL9	CCL4
	2.01	1.13	2.07	2.40	2.94	1.13	0.99	2.67	1.03	1.19	1.66
4	MIP-1 delta	CCL5	SCF	SDF-1 alpha	CCL17	TFG beta 1	TNF alpha	TNF beta	EGF	IgF-1	Angiogenin
	1.31	6.27	3.52	3.47	3.46	3.13	1.68	2.31	2.73	2.47	1.76
5	OSM	TPO	VEGF-A	PDGF-BB	Leptin	BDNF	CXCL13	CCL23	CCL11	CCL24	CCL26
	3.56	2.39	4.29	2.53	1.63	2.31	1.38	2.14	2.33	2.01	1.64
6	FGF-4	FGF-6	FGF-7	FGF-9	FLT-3 ligand	CX4CL1	CXCL6	GDNF	HGF	IGFBP-1	IGFBP-2
	2.29	1.09	4.81	2.16	1.07	1.92	0.81	3.21	1.03	2.86	1.33
7	IGFBP-3	IGFBP-4	IL-16	IP-10	LIF	LIGHT	MCP-4	MIF	MIP-3 alpha	NAP-2	NT-3
	2.67	1.34	1.24	1.35	0.79	0.89	1.56	1.84	0.90	1.87	2.79
8	NT-4	OPN	OPG	PARC	PLGF	TGF beta 2	TGF beta 3	TIMP-1	TIMP-2	POS	POS
	1.07	1.66	1.27	0.61	0.98	1.31	1.48	2.37	1.89	1.13	0.96

[0143]

[0144] [丑 11]

곰팡이 23

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	CXCL5	G-CSF	GM-CSF	GRO a/b/g	CXCL1
	0.90	0.99	0.98	0.94	-		2.59	1.35	1.03	3.28	2.84
2	CCL1	IL-1 F1	IL-1 F2	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	CXCL8	IL-10
	2.37	1.58	2.79	1.76	3.92	1.74	2.28	0.98	0.99	3.25	1.15
3	IL-12 p40/p70	IL-13	IL-15	IFN- γ emma	CCL2	CCL8	CCL7	M-CSF	CCL22	CXCL9	CCL4
	2.54	1.21	2.04	2.19	3.26	1.26	0.96	2.81	1.13	1.14	1.61
4	MIP-1 δ	CCL5	SCF	SDF-1 α	CCL17	TFG β 1	TNF α	TNF β	EGF	IgF-1	Angiogenin
	1.94	5.86	3.71	2.71	3.16	2.73	2.02	1.88	2.64	2.70	2.52
5	OSM	TPO	VEGF-A	PDGF-BB	Leptin	BDNF	CXCL13	CCL23	CCL11	CCL24	CCL26
	2.88	2.38	3.71	2.92	1.43	2.51	1.46	1.34	2.12	2.04	1.25
6	FGF-4	FGF-6	FGF-7	FGF-9	FLT-3 Ligand	CX4CL1	CXCL6	GDNF	HGF	IGFBP-1	IGFBP-2
	2.22	1.56	3.77	2.14	1.21	1.84	0.89	2.82	0.82	2.32	1.41
7	IGFBP-3	IGFBP-4	IL-16	IP-10	LIF	LIGHT	MCP-4	MIF	MIP-3 α	NAP-2	NT-3
	3.21	1.39	1.30	1.33	0.79	0.80	1.47	2.34	1.47	2.74	2.09
8	NT-4	OPN	OPG	PARC	PLGF	TFG β 2	TFG β 3	TIMP-1	TIMP-2	POS	POS
	1.49	1.47	1.30	0.67	1.00	1.09	1.45	2.38	1.71	1.22	1.01

[0145]

도면

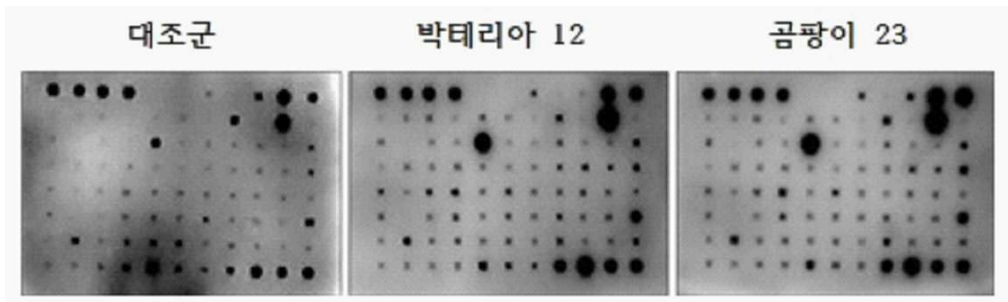
도면1

대조군	결과												
1													
2													
박테리아	결과	박테리아	결과	박테리아	결과	박테리아	결과	박테리아	결과	박테리아	결과	박테리아	결과
1		11		21		31		41		51		61	
2		12		22		32		42		52		62	
3		13		23		33		43		53		63	
4		14		24		34		44		54		64	
5		15		25		35		45		55		65	
6		16		26		36		46		56		66	
7		17		27		37		47		57		67	
8		18		28		38		48		58		68	
9		19		29		39		49		59		69	
10		20		30		40		50		60		70	

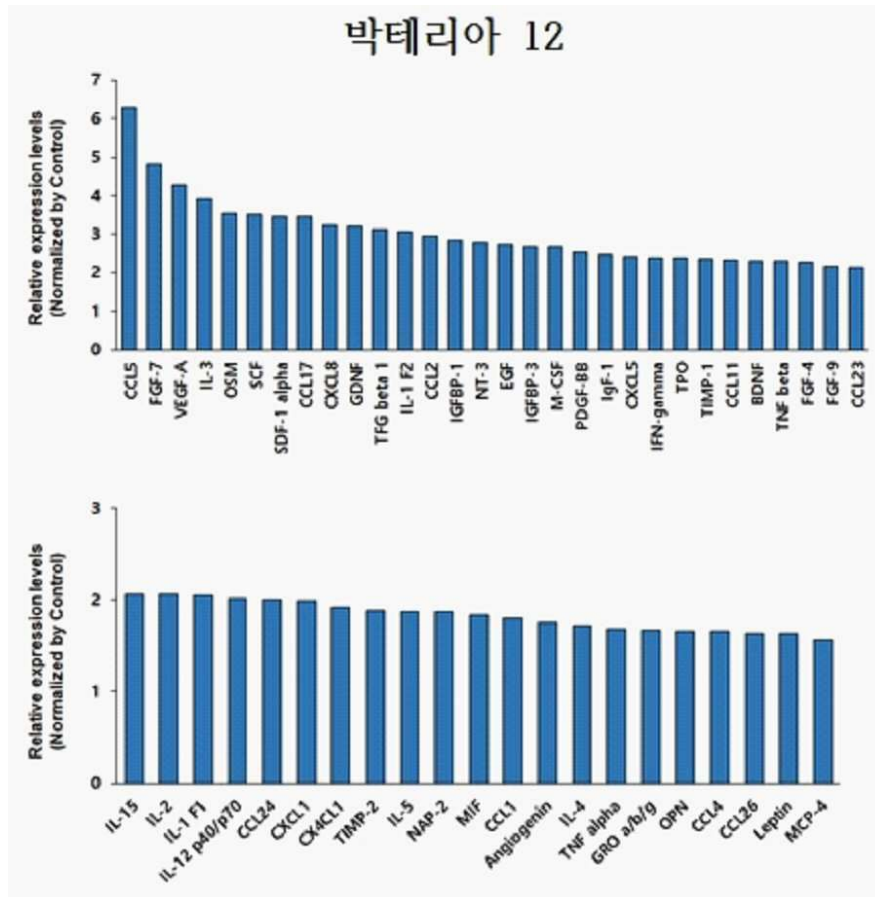
도면2

대조군	결과										
1											
2											
곰팡이	결과	곰팡이	결과	곰팡이	결과	곰팡이	결과	곰팡이	결과	곰팡이	결과
1		6		11		16		21		26	
2		7		12		17		22		27	
3		8		13		18		23		28	
4		9		14		19		24		29	
5		10		15		20		25		30	

도면3



도면4



도면5

