



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년02월19일

(11) 등록번호 10-2217525

(24) 등록일자 2021년02월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/747 (2014.01) A23L 33/135 (2016.01)

A61K 8/99 (2017.01) A61P 1/02 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01) A61Q 11/00 (2006.01)

A61Q 17/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/747 (2013.01)

A23L 33/135 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2020-0103173

(22) 출원일자 2020년08월18일

심사청구일자 2020년08월18일

(56) 선행기술조사문헌

JP2008037859 A

KR1020090096724 A

KR1020120035923 A

(73) 특허권자

주식회사 메디오젠

충청북도 제천시 바이오밸리1로 120(왕암동)

백남수

서울특별시 서초구 서운로 201, 103동 1201호(서초동, 서초푸르지오써밋)

(72) 발명자

백남수

서울특별시 서초구 서운로 201, 103동 1201호(서초동, 서초 푸르지오써밋)

강창호

충청북도 충주시 국원초1길 48, 101동 804호(안림동, 엘리시아 아파트)

(74) 대리인

김순용

전체 청구항 수 : 총 10 항

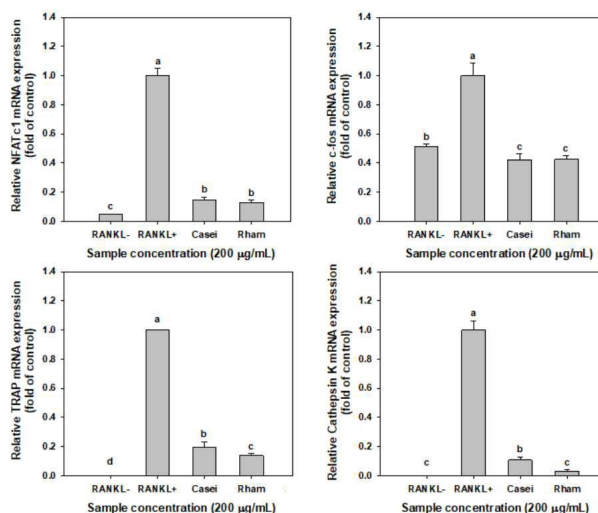
심사관 : 양용철

(54) 발명의 명칭 치주염 예방 또는 치료용 유산균 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 치주염 예방 또는 치료용 유산균 및 그의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 유산균은 치아우식증 또는 치주질환 유발 균주인 스트렙토코쿠스 뮤탄스 (*Streptococcus mutans*)에 대한 항균력을 가지고, 파골세포의 활성을 억제하며, 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)에 의해 유도된 염증발생을 억제함으로써, 치아우식증 또는 치주질환, 특히 치주염 예방 또는 치료 효과가 뛰어나다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 8/99 (2013.01)

A61P 1/02 (2018.01)

A61P 31/04 (2018.01)

A61Q 11/00 (2013.01)

A61Q 17/005 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/312 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

락토바실러스 파라카세이 (*Lactobacillus paracasei*) MG310 (KCTC14260BP), 이의 배양액, 이의 추출물 또는 이의 무세포 상등액을 포함하는 충치균 또는 치주염균 억제용 향균 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 추출물은,

탄소수 1 내지 4의 저급알코올 추출물인 것을 특징으로 하는 충치균 또는 치주염균 억제용 향균 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 충치균 또는 치주염균은,

스트렙토코쿠스 뮤탄스 (*Streptococcus mutans*) 또는 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*) 인 것을 특징으로 하는 충치균 또는 치주염균 억제용 향균 조성물.

청구항 4

락토바실러스 파라카세이 (*Lactobacillus paracasei*) MG310 (KCTC14260BP), 이의 배양액, 이의 추출물 또는 이의 무세포 상등액을 포함하는 치아우식증 또는 치주질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 락토바실러스 파라카세이 (*Lactobacillus paracasei*) MG310 (KCTC14260BP)은,

파골세포의 분화를 억제하는 것을 특징으로 하는 치아우식증 또는 치주질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 락토바실러스 파라카세이 (*Lactobacillus paracasei*) MG310 (KCTC14260BP)은,

구강 내 염증을 억제하는 것을 특징으로 하는 치아우식증 또는 치주질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

락토바실러스 파라카세이 (*Lactobacillus paracasei*) MG310 (KCTC14260BP), 이의 배양액, 이의 추출물 또는 이의 무세포 상등액을 포함하는 치아우식증 또는 치주질환 개선용 식품 조성물.

청구항 8

락토바실러스 파라카세이 (*Lactobacillus paracasei*) MG310 (KCTC14260BP), 이의 배양액, 이의 추출물 또는 이의 무세포 상등액을 포함하는 치아우식증 또는 치주질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 9

락토바실러스 파라카세이 (*Lactobacillus paracasei*) MG310 (KCTC14260BP), 이의 배양액, 이의 추출물 또는 이의 무세포 상등액을 포함하는 치아우식증 또는 치주질환 예방 또는 개선용 의약품 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 의약품 조성물은,

치약류, 구강청결제류, 구강세정제류 구강 스프레이류 중 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 치아우식증 또는 치주질환 예방 또는 개선용 의약품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 치주염 예방 또는 치료용 유산균 및 그의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 사람의 구강에는 400종류 이상의 세균이 번식하고 있으며, 그 균 수는 100억 개에 달하고 타액에는 $10^8 \sim 10^9$ CFU/ml 수준의 균이 존재하는 것으로 알려졌다. 치아는 미세한 구멍이 다수 개 천공되어 있어서 충치를 일으키는 세균이 천공된 구멍으로 들어가 치아를 병들게 하는데 이것이 충치이다. 이러한 충치는 치아에서 가장 흔히 볼 수 있는 대표적인 질환의 하나로 치아우식증이라고도 한다. 충치는 구강 내 음식물이 내산성 연쇄상구균과 유산균에 의해 부패되고 산에 의해 치아의 성분이 파괴되는 감염성 세균성 질환으로, 치석 (plaque)내 미생물과 음식물의 상호작용으로 발생하는 다인성 질환이다.

[0004] 미생물 중에서 스트렙토코쿠스 뮤탄스 (*Streptococcus mutans*)가 치석의 주요 원인균이며, 이 미생물은 치면의 피막에 부착한 후 생성하는 글루코실트랜스퍼라아제 (glucosyltransferase, GTase)에 의하여 음식물 중의 수크로오스로부터 불용성 글루칸을 합성한다. 합성된 글루칸은 치면에서 증식하는 미생물 간의 결합을 증가시키며, 치면에 부착한 스트렙토코쿠스 뮤탄스는 당질 대사과정에서 젖산 등의 유기산을 생성하여 치아의 에나멜질을 탈회 (decalcification) 시켜 충치를 유발하는 것으로 알려져 있다. 우리나라에서는 영구 치아의 충치 이환율이 약 80%에 이르고, 한 사람이 평균 2-3개의 충치를 가지고 있는 것으로 보고되고 있다.

[0005] 한편, 치주질환은 치주조직에 발생하는 병변의 총칭으로, 일반적으로는 치조농루라고도 한다. 충치와 더불어 구강의 2대 질환이다. 치주질환의 원인은 일반적으로 치구 내의 여러 세균에 의한 것이나, 흡연, 스트레스, 영양의 편향, 운동 부족, 당뇨병, 혈액질환 등에 의한 면역력의 저하도 크게 관여하는 것으로 알려졌다.

[0006] 치주질환의 초기에는 치구가 붙은 부분에 염증이 남아 발적, 종창이 나타나지만 동통은 없다. 이를 닦으면 치육에서 출혈하는 경우도 있다. 이 상태를 치주염이라고 하며, 이 단계에서 치구를 제거하면 염증은 없어지고 건강한 치육으로 되돌아간다. 중기에는 치구 내의 세균에 의해 염증이 치육에서 치조골로 전파하여 골이 침단으로 녹아간다. 치주조직이 자극에 과민하여 치육에서 출혈하기 쉬워지거나 이가 숨어 들어가는 경우가 많기 때문에 이 단계에서 자각하게 되는 사람이 많다. 구취도 강해지고 이를 닦는 것으로는 개선이 불가능하기 때문에 시멘트질에 침입한 미세한 치석이나 독소를 제거하고 시멘트질 표면을 치료한다. 후기가 되면 치조골의 대부분이 녹

아 치욕에서 농이 흘러나오면서 치아가 움직이거나 빠지기도 한다. 치주질환은 초기에는 동통이 없고 만성적으로 진행하기 때문에 발견이 늦어진다.

[0007] 종래의 치아우식증 또는 치주질환 예방 방법으로는 칫솔질과 적절한 식이 요법을 통해 당분의 섭취를 줄이거나 자일리톨을 이용하여 충치균 또는 치주질환 유발균에 의한 산의 생성을 방지하는 방법 등이 있으나, 이러한 방법만으로는 충치 유발균 또는 치주질환 유발균의 사멸을 통한 근본적인 충치 예방효과를 얻지 못하고 있는 실정이다.

[0008] 따라서, 인체에 무해하고 섭취가 용이하며, 충치 유발균 또는 치주질환 유발균의 생육을 직접적으로 억제하는 새로운 충치 예방 방법에 대한 필요성이 대두되는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) CN 108048347 A (2018.05.18.)

비특허문헌

[0011] (비특허문헌 0001) Kim S, Choi SI, Kim GH, Imm JY. 2019. Anti-inflammatory effect of Ecklonia cava extract on Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-stimulated macrophages and a periodontitis rat model. Nutrients 11: 1143.

(비특허문헌 0002) Kim S, Kang SS, Choi SI, Kim GH, Imm JY. 2019. Ecklonia cava extract containing dieckol suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis via MAP kinase/NF- κ B pathway inhibition and hemoxygenase-1 induction. J. Microbiol. Biotechnol, 29: 11-20.

(비특허문헌 0003) Liu TH, Tsai TY, pan TM. 2018. The anti-periodontitis effects of ethanol extract prepared using Lactobacillus paracasei subsp. paracasei NTU 101. Nutrients 10: 472.

(비특허문헌 0004) Logar DB, Komadina R, Prezelj J, Ostanek B, Trost Z, Marc J. 2007. Expression of bone resorption genes in osteoarthritis and in osteoporosis. J. Bone Miner Meta. 25: 2019-225.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명자들은 인체 및 식품 유래의 유산균 중 충치 예방에 효과가 있는 유산균에 대하여 연구하던 중, 락토바실러스 파라카세이 (*Lactobacillus paracasei*) MG310 (KCTC14260BP) 및 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) MG316 (KCTC14187BP)이 충치 유발균인 스트렙토코쿠스 뮤탄스 및 치주염균인 포르피로모나스 진지발리스에 대한 항균 효과가 뛰어나며, 과골세포의 활성 및 염증 발생 억제 효과가 뛰어나함을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0013] 따라서 본 발명의 목적은 락토바실러스 파라카세이 (*Lactobacillus paracasei*) MG310 (KCTC14260BP) 및 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) MG316(KCTC14187BP), 이의 배양액, 이의 추출물 또는 이의 무세포 상등액을 포함하는 충치균 또는 치주염균 억제용 항균 조성물, 이를 이용한 치아우식증 또는 치주질환 예방, 치료, 개선용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명은 락토바실러스 파라카세이 (*Lactobacillus paracasei*) MG310 (KCTC14260BP), 이의 배양액, 이의 추출물 또는 이의 무세포 상등액을 포함하는 충치균 또는 치주염균 억제용 항균 조성물을 제공한다. 이때, 상기 추출물은, 바람직하게는 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 추출물인 것이 좋다.

[0016] 본 발명의 항균 조성물에 있어, 상기 충치균 또는 치주염균은, 바람직하게는 스트렙토코쿠스 뮤탄스

(*Streptococcus mutans*) 또는 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)인 것이 좋다.

- [0017] 한편, 본 발명은 락토바실러스 파라카세이 (*Lactobacillus paracasei*) MG310 (KCTC14260BP), 이의 배양액, 이의 추출물 또는 이의 무세포 상등액을 포함하는 치아우식증 또는 치주질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 약학 조성물에 있어, 상기 락토바실러스 파라카세이 (*Lactobacillus paracasei*) MG310 (KCTC14260BP)은, 바람직하게는 파골세포의 분화를 억제하는 것이 좋다.
- [0019] 본 발명의 약학 조성물에 있어, 상기 락토바실러스 파라카세이 (*Lactobacillus paracasei*) MG310 (KCTC14260BP)은, 바람직하게는 구강 내 염증을 억제하는 것이 좋다.
- [0020] 한편, 본 발명은 락토바실러스 파라카세이 (*Lactobacillus paracasei*) MG310 (KCTC14260BP), 이의 배양액, 이의 추출물 또는 이의 무세포 상등액을 포함하는 치아우식증 또는 치주질환 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0021] 한편, 본 발명은 락토바실러스 파라카세이 (*Lactobacillus paracasei*) MG310 (KCTC14260BP), 이의 배양액, 이의 추출물 또는 이의 무세포 상등액을 포함하는 치아우식증 또는 치주질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0022] 한편, 본 발명은 락토바실러스 파라카세이 (*Lactobacillus paracasei*) MG310 (KCTC14260BP), 이의 배양액, 이의 추출물 또는 이의 무세포 상등액을 포함하는 치아우식증 또는 치주질환 예방 또는 개선용 의약품 조성물을 제공한다. 이때, 상기 의약품 조성물은, 바람직하게는 치약류, 구강청결제류, 구강세정제류 구강 스프레이류 중 선택되는 어느 하나인 것이 좋다.

발명의 효과

- [0024] 본 발명의 유산균은 치아우식증 또는 치주질환 유발 균주인 스트렙토코쿠스 뮤탄스 (*Streptococcus mutans*)에 대한 항균력을 가지고, 파골세포의 활성을 억제하며, 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)에 의해 유도된 염증발생을 억제함으로써, 치아우식증 또는 치주질환, 특히 치주염 예방 또는 치료 효과가 뛰어나다.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1은 실시예 2의 유산균 에탄올 추출물 제조과정을 나타낸 모식도이다.
- 도 2는 본 발명 유산균 처리가 치주질환 병동력인자로 자극된 RAW264.7 대식세포의 TNF- α 유전자 발현에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
- 도 3은 본 발명 유산균 처리가 RANKL 유도 파골세포의 특이적 유전자의 발현에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 본 발명은 락토바실러스 파라카세이 (*Lactobacillus paracasei*) MG310 (KCTC14260BP), 이의 배양액, 이의 추출물 또는 이의 무세포 상등액을 포함하는 충치균 또는 치주염균 억제용 항균 조성물을 제공한다. 이때, 상기 추출물은, 바람직하게는 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 추출물인 것이 좋고, 더욱 바람직하게는 에탄올인 것이 좋다.
- [0028] 본 발명의 항균 조성물에 있어, 상기 충치균 또는 치주염균은, 바람직하게는 스트렙토코쿠스 뮤탄스 (*Streptococcus mutans*) 또는 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*)인 것이 좋다.
- [0029] 한편, 본 발명은 락토바실러스 파라카세이 (*Lactobacillus paracasei*) MG310 (KCTC14260BP), 이의 배양액, 이의 추출물 또는 이의 무세포 상등액을 포함하는 치아우식증 또는 치주질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0030] 치아우식증 및 치주질환은 모두 세균 감염성 질환으로 치아우식증은 스트렙토코쿠스 뮤탄스(*S. mutans*), 스트렙토코쿠스 상퀴니스(*S. sanguinis*), 스트렙토코쿠스 소브리누스(*S. sobrinus*), 스트렙토코쿠스 라티(*S. ratti*), 스트렙토코쿠스 크리세티(*S. criceti*), 스트렙토코쿠스 안지노수스(*S. anginosus*) 또는 스트렙토코쿠스 고도니(*S. gordonii*) 와 같은 균에 의해서, 치주질환은 치주염을 유발하는 세균인 포르피로모나스 진지발리스 (*Porphyromonas gingivalis*), 프리보텔라 인터미디아(*Prevotella intermedia*), 악티노바실러스 악티티노미세텀 코미탄스(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*), 트레포네마 덴티콜라(*Treponema denticola*) 및 푸소박테리

움 누클리아툼(*Fusobacterium nucleatum*) 등에 의해서 유발될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 대표적인 치아우식증 및 치주질환 유발균을 효과적으로 억제할 수 있으므로 치아우식증 또는 치주질환의 예방 또는 치료에 매우 효과적이다.

[0031] 또한, 본 발명의 약학 조성물에 있어, 상기 락토바실러스 파라카세이 (*Lactobacillus paracasei*) MG310 (KCTC14260BP)은, 바람직하게는 과일세포의 분화를 억제 또는 바람직하게는 구강 내 염증을 억제하는 것으로써, 치주질환의 예방 또는 치료에 매우 효과적이다.

[0032] 약학적 조성물에서, 상기 균주는 약학적 조성물 총 100 중량부에 대하여 0.01~95 중량부로 포함되는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 1~80 중량부로 포함하는 것이다. 그 함량이 0.01 중량부 미만일 경우에는 복용 효율성이 떨어질 수 있으며, 95 중량부를 초과할 경우에는 제형화에 어려움이 있을 수 있다.

[0033] 따라서 상기에서 "약학적으로 유효한 양"이란, 예컨대 치아우식증 유발 및 치주염 유발 세균인 스트렙토코쿠스 뮤탄스 및 포르피로모나스 진지발리스의 생육을 억제하여 이로 인해 발생할 수 있는 치아우식증 또는 치주질환의 예방, 개선 또는 치료 효과를 발휘하기에 충분한 양을 말한다. 상기 "약학적으로 허용되는"이란, 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다.

[0034] 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 사용하는 것이 바람직하다.

[0035] 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 광물유 등이 있다. 상기 약학적 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카보네이트(calcium carbonate), 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다.

[0036] 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함된다. 비수용성제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0037] 본 발명의 약학적 조성물은 연구자, 의사, 의사 또는 기타 임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적인 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양, 즉 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양인 치료상 유효량으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물에 대한 치료상 유효투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 약학적 조성물은 1~10,000mg/kg/day, 바람직하게는 1~200mg/kg/day의 양으로 투여할 수 있으며, 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수 회에 나누어 투여할 수도 있다.

[0038] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면 경구 투여가 바람직하다.

[0039] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 단독으로 사용될 수 있으나, 통상의 기술자의 선택에 따라 통상적으로 치아우식증 또는 치주질환의 치료 증강 효과가 있는 적절한 기타 치료 방법(예컨대, 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제 이용 방법 등)과 병용하여 사용할 수 있다.

- [0040] 본 발명에서 용어, "예방"이란, 본 발명에 따른 치아우식증 또는 치주질환의 예방 또는 치료용 조성물을 개체에 투여하여 치아우식증 또는 치주질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미할 수 있다.
- [0041] 본 발명에서 용어, "치료"란, 본 발명에 따른 조성물을 치아우식증 또는 치주질환 의심 개체에 투여하여 치아우식증 또는 치주질환 관련 질환의 증세가 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미할 수 있다.
- [0042] 한편, 본 발명은 락토바실러스 파라카세이 (*Lactobacillus paracasei*) MG310 (KCTC14260BP), 이의 배양액, 이의 추출물 또는 이의 무세포 상등액을 포함하는 치아우식증 또는 치주질환 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0043] 본 발명에서 용어, "개선"은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미할 수 있다.
- [0044] 본 발명에서 용어, "개체"란, 치아우식증 또는 치주질환이 발병되었거나 발병할 가능성이 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미할 수 있다.
- [0045] 본 발명에 따른 식품 조성물에서, 상기 식품의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함할 수 있다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 비제한적인 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다. 상기 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0046] 본 명세서에서 식품이라 함은 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미이고, 상기 식품 조성물은 식품, 식품 첨가제, 건강 기능성 식품 및 음료를 모두 포함하는 의도이다.
- [0047] 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 캔디, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 본 발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영, 유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 목류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스낵류), 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임 식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과일, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류, 아이스크림류 등), 천연조미료(예, 라면 스프 등), 비타민 복합제, 알코올 음료, 주류 및 그 밖의 건강보조식품류를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 식품, 음료 또는 식품첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.
- [0048] 한편, 본 발명은 락토바실러스 파라카세이 (*Lactobacillus paracasei*) MG310 (KCTC14260BP), 이의 배양액, 이의 추출물 또는 이의 무세포 상등액을 포함하는 치아우식증 또는 치주질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0049] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물에서 "건강기능식품"이란 건강보조의 목적으로 특정성분을 원료로 하거나 식품 원료에 들어있는 특정성분을 추출, 농축, 정제, 혼합 등의 방법으로 제조, 가공한 식품을 말하며, 상기 성분에 의해 생체 방어, 생체리듬의 조절, 질병의 방지와 회복 등 생체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발휘할 수 있도록 설계되고 가공된 식품을 말하는 것으로서, 질병의 예방 또는 건강의 회복 등과 관련된 기능을 수행할 수 있는 것을 말한다.
- [0050] 본 발명에 따른 균주를 건강기능식품으로 사용하는 경우, 이를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 이는 필요에 따라 선택하여 적절하게 사용될 수 있다. 또한, 첨가되는 균주들은 단독 또는 혼합하여 사용할 수 있고, 이 경우 혼합양은 그 사용 목적에 따라 적합하게 결정할 수 있다.
- [0051] 또한, 본 발명에 따른 균주가 사용될 수 있는 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한이 없다. 예컨대, 라면, 기타 면류, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료, 각종 스프, 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 과자류, 피자, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 또는 비타민 복합제 등이 있다. 특히, 본 발명에 따른 균주는 충치균 또는 치주염균에 대한 억제 효과가 우수하므로, 다양한 건강기능식품으로 제조하기 적합하다. 본 발명의 균주가 포함될 수 있는 발효유 건강기능식품으로는 예컨대, 요구르트, 칼피스, 치즈, 버터 등을 들 수 있고, 발효 제품으로는 두부, 된장, 청국장, 젤리, 김치 등을 들 수 있다. 상기 발효유 또는 발효제품은 통상적인 제조방법에서 균주만을 본 발명에 따른 균주로 대체함으로써 용이하게 제조할 수 있다.
- [0052] 또한, 본 발명에 따른 균주는 통상의 기술자의 선택에 따라 통상적으로 건강기능식품에 함유될 수 있는 적절한 기타 보조성분과 공지의 첨가제를 혼합할 수 있다. 상기 공지의 첨가제에는 본 발명에 따른 균주와 함께 사용할

수 있는 다른 미생물도 포함된다.

[0054] 한편, 본 발명은 락토바실러스 파라카세이 (*Lactobacillus paracasei*) MG310 (KCTC14260BP), 이의 배양액, 이의 추출물 또는 이의 무세포 상등액을 포함하는 치아우식증 또는 치주질환 예방 또는 개선용 의약외품 조성물을 제공한다.

[0055] 본 발명의 균주를 의약외품으로 사용할 경우, 상기 균주를 그대로 첨가하거나 다른 의약외품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적 (예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 본 발명이 의약외품 조성물로 사용되는 경우, 구강 조성물인 치약류, 구강청결제류, 구강세정제류 구강 스프레이류 등의 제형으로 제조하여 사용할 수 있다.

[0057] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예 또는 실험예를 통해 더욱 상세히 설명하기로 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예 및 실험예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[0059] [실시예 1: 본 발명의 치주염 예방 효능을 갖는 유산균의 선발]

[0060] 메디오젠이 보유한 락토바실러스 파라카세이 균주 20종과 락토바실러스 람노시스 7종의 치아우식증 및 치주염 유발 균주인 스트렙토코쿠스 뮤탄스 (*Streptococcus mutans*)에 대한 항균 효능을 비교하였다. 이를 위하여, 메디오젠 보유 균주(실험군)와 스트렙토코쿠스 뮤탄스를 각각 18시간 동안 배양한 후, BHI 아가배지에 10^7 CFU/ml로 희석한 스트렙토코쿠스 뮤탄스를 도말하였다. 이후, 페이퍼 디스크 이에 실험군과 대조군(MRS 배지) 각각을 50 μ l씩 점적하여 건조시켰다. 이후, 건조된 디스크를 스트렙토코쿠스 뮤탄스가 도말된 배지 위에 부착하고, 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 인큐베이터에서 24시간 동안 정치 배양하였다. 디스크 주변의 용균반(clear zone) 직경을 확인한 후, 점수화하였다. 평가결과, 대조군의 용균반 직경과 비슷한 용균반을 보인 균주는 '-' (항균효과 없음)으로 표시하였고, 유의할 정도의 직경을 보인 균주는 '+' (항균효과 있음)으로 표시하여 하기 표 1 내지 2에 나타내었다.

표 1

균주명	Mediogen No.	Origin	결과
<i>Lactobacillus paracasei</i>	310	한국산발효과채	+
	4267	건강한 성인	-
	4272	건강한 성인	-
	5009	식품유래	-
	5012	식품유래	-
	5016	식품유래	-
	5101	식품유래	-
	5138	자연발효유	-
	5147	자연발효유	-
	5148	자연발효유	-
	5163	자연발효유	-
	5171	자연발효유	-
	5172	자연발효유	-
	5173	자연발효유	-
	5174	자연발효유	-
	5175	자연발효유	-
	5176	자연발효유	-
	5178	자연발효유	-
	5219	자연발효과채	-
	5310	자연발효과채	-

표 2

균주명	Mediogen No.	Origin	결과
-----	--------------	--------	----

<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	316	모유수유하는 유아분변	+
	4283	건강한 성인	-
	4288	건강한 성인	-
	4505	모유	-
	4511	모유수유하는 유아분변	-
	5007	식품유래	-
	5200	자연발효유	-

[0064] 표 1 내지 2에 나타난 바와 같이, 동일 종의 균주들 사이에서도 스트렙토코쿠스 뮤탄스에 항균력을 보유하지 않은 균주들이 확인되었다. 본 발명에서는 각 균주 중 스트렙토코쿠스 뮤탄스에 대한 항균력을 보유한 락토바실러스 파라카세이 MG310과 락토바실러스 람노시스 MG316을 선별하여, 한국생명공학연구원에 기탁하여 각각 기탁번호 KCTC14260BP 및 KCTC14187BP를 부여받았다. 상기 선별된 균주는 각각 분말소재의 균주를 증류수에 용해하여 하기 실험에 이용하였다. 하기에서는 선별된 락토바실러스 파라카세이 MG310을 'Casei'라 명명하고, 락토바실러스 람노시스 MG316을 'Rham'이라 명명하기로 한다.

[0066] [실시예 2: 본 발명의 치주염 예방 효능을 갖는 유산균의 에탄올 추출물 제조]

[0067] 실시예 1에서 선별된 유산균 2종의 에탄올 추출물 제조를 위하여, Liu et al. (2018)의 방법을 일부 반영하여, 각각의 균주 분말 1.5g에 95% 에탄올 6ml를 혼합하고, 도 1의 방법으로 추출하여, 하기 실험에 이용하였다.

[0069] [실험예 1: 본 발명 균주의 치주염 완화 효과 탐색]

[0070] 1. 실험 방법

[0071] 1) 세포 배양

[0072] 뮤린(murine) 대식세포주인 RAW 264.7 세포(ATCC)는 10% FBS와 페니실린-스트렙토마이신(100 units/ml)이 포함된 DMEM 배지에서 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 세포의 밀도가 70~80% 정도 도달하였을 때 계대배양을 실시하였으며, 20 패시지(passage) 이내의 세포만을 실험에 사용하였다. 치주병원균을 병동력인자로 사용한 염증 억제 활성의 평가는 Kim et al. (2019a)의 방법에 따라 RAW 264.7 세포를 배양한 후 시료 및 포르피로모나스 진지발리스 LPS (Pg LPS, 5μg/ml)를 함유하는 DEME 배지로 교체하여 24시간 동안 처리하였다. 파골 세포의 분화 억제를 통한 치아 손실 억제 활성 평가는 Kim et al. (2019b)의 방법에 따라 세포배양 후 RANKL (50ng/ml) 및 M-CSF (25ng/ml)를 함유하는 α-MEM 배지(파골세포분화배지)로 교체하여 42시간 처리한 후 효과를 분석하였다.

[0074] 2) RNA 추출 및 정량 실시간 PCR(quantitative real-time PCR)을 이용한 유전자 발현 변화 분석

[0075] 염증관련 유전자 발현분석 (TNF-α)은 RAW 264.7 세포에 Pg LPS 및 시료를 3시간 처리한 후 실시하였으며, 파골 세포분화 관련 유전자 분석 (TRAP, Cathepsin K, NFATc1, c-fos 및 MMP-9)은 RANKL, M-CSF 및 시료를 24시간 처리한 후 수확하여 세포 용해물을 이용하여 진행하였다. 총 RNA는 NucleoZOL 시약으로 추출하였으며, qRT-PCR은 StepOne plus real-time PCR (Applied Biosystem, USA)을 이용하여 실시하였으며, β-actin을 이용하여 유전자 발현량을 보정하였다 (Kim et al., 2019a).

[0077] 3) 통계 분석

[0078] 모든 정량 분석은 3회 반복 측정하였으며 평균 ± 표준편차로 표현하였다. 통계 분석은 SPSS(SPSS Inc., USA) 소프트웨어를 이용하였으며, 일원분산분석에서 유의적 차이가 발견되면(P<0.05) Duncan의 다중비교법을 수행하여 처리 그룹간에 유의적인 차이를 검정하였다.

[0080] 2. 실험 결과

[0081] 1) 치주질환 병동력인자를 이용한 프로바이오틱 배양액의 염증 억제 효과 분석

[0083] 도 2에 나타난 바와 같이, Pg LPS 자극 대식세포에서의 염증성 유전자 발현 변화 탐색한 결과, 염증반응의 지속과 증폭에 중요한 역할을 담당하는 TNF-α의 유전자 발현은 락토바실러스 파라카세이 MG310 및 락토바실러스 람노시스 MG316 균주 및 이들의 에탄올 추출물 모두에서 억제 효과가 나타났다.

[0085] 2) 프로바이오틱스 배양액의 파골세포 분화 억제 활성

[0086] 세포의 분화는 타겟 유전자의 유도에 필수적인 전사인자를 필요로 한다. NFATc1 (nuclear factor of activated

T cells c1)과 c-fos는 파골세포 분화에 필수적인 전사인자로 발현량이 높을수록 파골세포로의 분화가 촉진되며, 그 결과 골흡수가 증가한다.

[0087]

도 3에 나타난 바와 같이, 락토바실러스 파라카세이 MG310 및 락토바실러스 람노시스 MG316 균주의 처리가 NFATc1 및 c-fos의 유전자 발현에 미치는 효과를 분석한 결과, 파라카세이 MG310 및 락토바실러스 람노시스 MG316 균주 모두에서 NFATc1 및 c-fos의 유전자 발현이 유의적으로 감소한 것으로 나타났다. 파골세포 특이적 유전자 TRAP 및 카텡신 K(cathepsin K)의 발현 양상 또한, 파라카세이 MG310 및 락토바실러스 람노시스 MG316 균주 처리에 의해 유의적으로 감소한 것으로 나타났다.

수탁번호

[0088]

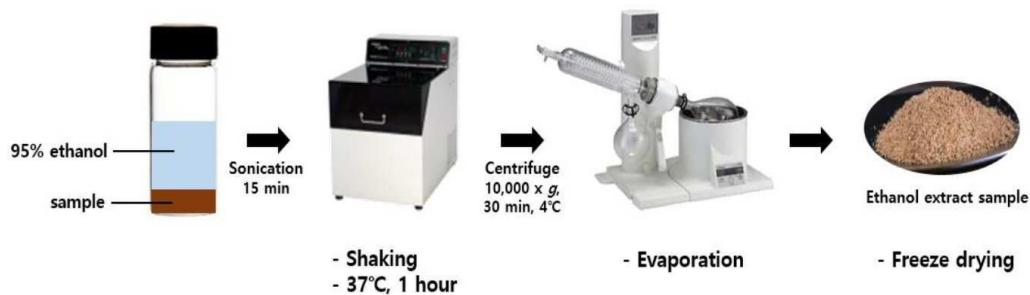
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC14260BP

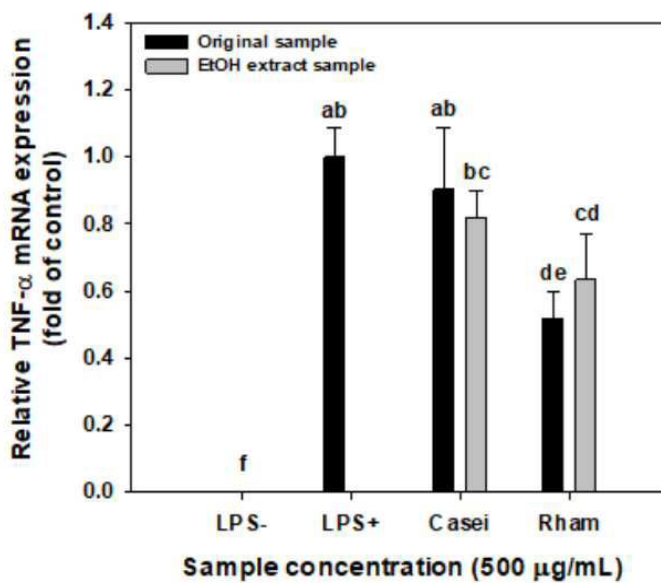
수탁일자 : 20200728

도면

도면1



도면2



도면3

