



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년07월27일
 (11) 등록번호 10-1762167
 (24) 등록일자 2017년07월21일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/8962 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 36/8962 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2015-0174464
- (22) 출원일자 2015년12월08일
 심사청구일자 2015년12월08일
- (65) 공개번호 10-2017-0077300
- (43) 공개일자 2017년07월06일
- (56) 선행기술조사문헌

- (73) 특허권자
김정천
 서울특별시 노원구 덕릉로77길 5, 대림벽산 아파트 104동 1101호 (중계동, 벽산아파트)
- (72) 발명자
김정천
 서울특별시 노원구 덕릉로77길 5, 대림벽산 아파트 104동 1101호 (중계동, 벽산아파트)
- (74) 대리인
이재량

Shiju TM 외 3명. Indian Journal of Experimental Biology. Vol. 51, 2013년 2월, pp. 139-148*
 M. Thomson, K.K 외 3명. International Journal of Pharmacology. 2013년, pp. 1-12*
 S.M.A Shariatzadeh 외 6명. Journal of Biological Sciences. Vol. 8, No. 8, 2008년, pp. 1316-1321*
 KR1020100038628 A*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 1 항

심사관 : 김미화

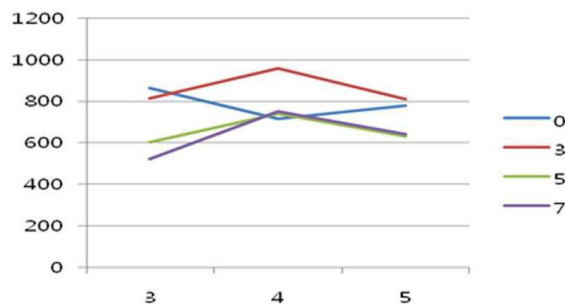
(54) 발명의 명칭 **마늘 추출물을 이용한 신장질환 예방 및 치료용 약학 조성물과 건강기능식품 조성물**

(57) 요약

본 발명은 신장질환 예방 및 치료용 약학 조성물과 건강기능식품 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 마늘 추출물을 함유하여 신장질환 예방 및 치료에 효과적인 약학 조성물과 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

본 발명은 마늘 추출물이 혈중 요소 질소 함량, 혈중 크레아티닌 함량, 피사 세노관 세포 수 및 변성 사구체 수를 감소시킴으로서 신장기능을 증진시킴을 확인하였다. 따라서 본 발명은 신장질환의 예방 및 치료 용도를 갖는 약학 조성물 및 신장기능을 개선시키는 건강기능식품으로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

A23V 2300/14 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

마늘 추출물을 유효성분으로 함유하는 신부전증 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것으로서,

상기 마늘 추출물은 생 마늘을 4℃에서 4주 동안 숙성시키는 숙성단계와; 상기 숙성단계에서 숙성된 마늘을 분쇄하는 분쇄단계와; 상기 분쇄단계에서 분쇄된 마늘에 추출용매로 에탄올을 가하여 20 내지 30℃에서 1 내지 3 시간 동안 정지시켜 상기 마늘 추출물을 추출하는 추출단계와; 상기 마늘 추출물을 여과하여 수득한 여과액 중의 황화합물의 함량을 증대시키기 위한 정제단계;를 통해 수득되며,

상기 정제단계는 a)상기 여과액에 폴리에틸렌글리콜을 농도 3%(w/w)로 첨가하여 교반하는 단계와, b)상기 교반 후 20 내지 60분 동안 방치시킨 다음 고액분리하여 침전물을 제거하는 단계와, c)상기 침전물이 제거된 상등액에 폴리비닐피롤리돈을 가한 후 여과하는 단계로 이루어지고,

상기 신부전증은 신독성에 의해 유발된 것을 특징으로 하는 마늘 추출물을 이용한 신독성 유발 신부전증의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신장질환 예방 및 치료용 약학 조성물과 건강기능식품 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 마늘 추출물을 함유하여 신장질환 예방 및 치료에 효과적인 약학 조성물과 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 신장은 좌, 우에 하나씩 두 개가 있으며 각 신장은 약 100만개의 네프론(nephron)이라는 기본구조로 이루어지며 하나의 네프론은 사구체라고 불리는 미세한 모세혈관 덩어리와 신세뇨관으로 구성되어 여과와 흡수의 기능을 한다.

[0003] 신장이 배설, 조절, 대사 및 내분비적 기능을 정상적으로 수행하지 못하고 전체적으로 저하되거나 이상이 초래된 상태를 신장질환이라고 한다.

[0004] 신장질환은 진행상태에 따라 급성신부전증, 만성신부전증으로 분류될 수 있다. 또한, 발병 원인에 따라 사구체에 염증반응이 생겨 발생하는 사구체 신염, 당뇨병 또는 고혈압 등의 합병증으로 유발된 당뇨병성 신장질환, 항생제 또는 항암제 등의 약물 독성에 의한 신독성, 세균 감염에 의한 요로감염 등으로 나뉜다.

[0005] 신장질환은 원인이 되는 신장질환의 종류에 관계없이 만성적으로 신기능 장애가 진행되어 사구체 여과율이 50~70%로 감소하면 경도, 30~50%로 감소하면 중등도, 30% 이하로 감소하면 고도의 신기능 장애로 분류한다. 신기능 장애가 발생하면 대부분의 경우 계속적으로 사구체 여과율이 감소하게 되며, 궁극적으로 말기 신부전증에 도달하게 되고 혈액학적 이상, 신경계 합병증, 위장관계 합병증, 면역학적 합병증, 감염 또는 골이영양증 등의 합병증이 일어나 심한 경우 죽음에 이르게 된다.

[0006] 신장질환은 전세계적으로 매년 그 발병자가 증가하고 있으며 더욱이 증상이 나타나지 않거나 잘 인지하지 못하여 초기 발견하더라도 말기 신부전에 이르는 경우가 많다. 신부전증의 치료에 있어서 비록 장기적 투석과 신장이식(renal transplantation) 등 치료수단이 존재하지만 만성 신부전증의 초기, 중기의 치료문제를 해결하지는 못하며, 게다가 치료비용이 높아 나라와 환자가정에 심한 경제부담을 가져다준다.

[0007] 최근 국내외 학자들은 신부전 신장조직의 지속적 파손 메커니즘(Mechanism)에 대해 많은 연구 결과 신부전 치료에 있어서 투석 이외의 수단으로 안지오텐신 전환효소(angiotensin converting enzyme, ACE) 억제제, 활성비타민 D₃, 적혈구생성 자극인자(erythropoiesis stimulating factors)등의 약물을 개발했으나 이런 약물들은 고가이며 제한된 효능으로 널리 사용되지 못하고 있다. 그러므로 효과적인 신장질환 치료제의 개발은 현재 의학계의 공동 노력 방향이라 할 수 있다.

[0008] 전통적으로 사용해 온 천연물은 새로운 작용, 골격구조를 갖는 화합물과 독성 및 부작용이 적은 물질이 발견될 가능성이 매우 높기 때문에 천연물, 특히 생약을 이용한 신장질환 치료에 유효한 약물에 대한 연구가 진행되고 있다.

[0009] 대한민국 등록특허 제10-1011333호에는 생약추출물을 함유하는 신장질환 치료용 약학 조성물이 개시되어 있고, 대한민국 등록특허 제10-1512095호에는 족제비싸리 추출물을 포함하는 신장질환 예방 또는 치료용 조성물이 개시되어 있고, 대한민국 등록특허 제10-1355508호에는 쉬잔드린, 고미신 또는 이를 포함하는 오미자 추출물을 유효성분으로 함유하는 신장질환 예방 또는 치료용 조성물이 개시되어 있다.

[0010] 이와 같이 다양한 천연 추출물을 이용하여 신장질환을 예방 또는 치료하기 위한 약물을 연구하기 위한 시도가 계속되고 있으나 아직까지 마늘 추출물이 신장질환 예방 또는 치료에 효과가 있음이 보고되지 않았다.

[0011] 마늘(*Allium sativum*)은 파, 양파, 부추 등과 함께 식물분류학적으로 백합과 (Liliaceae) 알리움속(*Allium*)에 속하는 다년생 구근 식물로, 5천 년 이상 재배되어 온 인류 최초의 경작식물 중의 하나이다. 특히 이집트의 단편 기록에 따르면 마늘의 22가지 이용법이 기록되어 있는데, 여기에는 심장질환, 두통, 종양, 기생충 등에 대하여 적용하였음이 언급되어 있어 식품으로뿐만 아니라 민간의약품으로 이용되기도 하였음을 알 수 있다.

[0012] 본 발명자는 마늘을 연구하던 중 종래에 효과가 밝혀진 바 없는 신장 기능을 개선하는 효과를 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0013] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 등록특허 제10-1011333호: 생약추출물을 함유하는 신장질환 치료용 약학 조성물
- (특허문헌 0002) 2. 대한민국 등록특허 제10-1512095호: 족제비싸리 추출물을 포함하는 신장질환 예방 또는 치료용 조성물
- (특허문헌 0003) 3. 대한민국 등록특허 제10-1355508호: 쉬잔드린, 고미신 또는 이를 포함하는 오미자 추출물을 유효성분으로 함유하는 신장질환 예방 또는 치료용 조성물

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 본 발명은 마늘 추출물을 이용하여 신장질환 예방 및 치료에 효과적인 약학 조성물과 건강기능식품 조성물을 제공하는 데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기의 목적을 달성하기 위한 본 발명의 신장질환 예방 및 치료용 약학 조성물은 마늘 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 한다.
- [0016] 상기 마늘 추출물은 마늘을 2 내지 6℃에서 3 내지 5주 동안 숙성시킨 후 추출한다.
- [0017] 상기 마늘 추출물은 마늘에 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올, 다가 알코올 또는 이들의 혼합물로부터 선택된 적어도 어느 하나의 추출용매를 가하여 추출한다.
- [0018] 상기 마늘 추출물은 상기 추출용매를 가하여 20 내지 30℃에서 1 내지 3시간 동안 정치시켜 추출한다.
- [0019] 상기 마늘 추출물은 황화합물의 함량을 증대시키기 위해 정제하여 단백질과 폴리페놀을 감소시킨 것을 특징으로 한다.
- [0020] 상기 마늘 추출물에 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol)을 가한 후 침전물을 제거하여 상기 단백질을 감소시킨 것을 특징으로 한다.
- [0021] 상기 마늘 추출물에 폴리비닐피롤리돈(polyvinyl pyrrolidone)을 가한 후 여과하여 상기 단백질 및 상기 폴리페놀을 감소시킨 것을 특징으로 한다.
- [0022] 상기 신장질환은 당뇨병에 의해 유발된 신장질환이다.
- [0023] 상기 신장질환은 신독성에 의해 유발된 신장질환이다.
- [0024] 상기 신장질환은 신염, 신증후군, 신부전증 중에서 선택된 어느 하나이다.
- [0025] 그리고 상기의 목적을 달성하기 위한 신장기능 개선을 위한 건강기능식품 조성물은 마늘 추출물을 함유하는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [0026] 본 발명은 마늘 추출물이 혈중 요소 질소 함량, 혈중 크레아티닌 함량, 피사 세뇨관 세포 수 및 변성 사구체 수를 감소시킴으로서 신장기능을 증진시킴을 확인하였다.
- [0027] 따라서 본 발명은 신장질환의 예방 및 치료 용도를 갖는 약학 조성물 및 신장기능을 개선시키는 건강기능식품으로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1은 숙성기간과 폴리에틸렌글리콜(PEG)의 농도를 달리하여 제조한 마늘 추출물의 황화합물 함량을 나타낸 그

래프이고,

도 2는 숙성기간을 4주로 하고, 폴리에틸렌글리콜(PEG)의 농도를 달리하여 제조한 마늘 추출물의 황화합물 함량의 평균값을 나타낸 그래프이고,

도 3 내지 도 7은 스트렙토조토신으로 유발한 당뇨모델 실험에 사용된 실험동물로부터 적출한 신장 검체의 현미경 관찰 사진이고.

도 8은 사염화탄소로 유발한 아급성 신부전 모델 실험에 사용된 실험동물의 혈중 요소 질소함량 값을 나타낸 그래프이고,

도 9는 사염화탄소로 유발한 아급성 신부전 모델 실험에 사용된 실험동물의 혈중 크레아티닌의 함량 값을 나타낸 그래프이고,

도 10 내지 도 15는 사염화탄소로 유발한 아급성 신부전 모델 실험에 사용된 실험동물로부터 적출한 신장 검체의 현미경 관찰 사진이고,

도 16은 시스플라틴으로 유발한 급성 신부전 모델 실험에 사용된 실험동물의 혈중 요소 질소함량 값을 나타낸 그래프이고,

도 17은 시스플라틴으로 유발한 급성 신부전 모델 실험에 사용된 실험동물의 혈중 크레아티닌의 함량 값을 나타낸 그래프이고,

도 18 내지 도 23은 시스플라틴으로 유발한 급성 신부전 모델 실험에 사용된 실험동물로부터 적출한 신장 검체의 현미경 관찰 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 이하, 본 발명의 바람직한 실시 예에 따른 마늘 추출물을 이용한 신장질환 예방 및 치료용 약학 조성물과 건강 기능식품 조성물에 대하여 구체적으로 설명한다.
- [0030] 본 발명의 일 실시 예에 따른 신장질환 예방 및 치료용 약학 조성물은 마늘 추출물을 유효성분으로 함유한다.
- [0031] 마늘 추출물은 다양한 방법으로 추출이 가능하다.
- [0032] 가령, 생 마늘에 추출용매를 가하여 열수추출, 냉침 또는 온침 추출할 수 있다. 추출용매로 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올, 다가 알코올 또는 이들의 혼합물로부터 선택된 적어도 어느 하나를 이용할 수 있다. 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올로 메탄올, 에탄올 등을 이용할 수 있고, 다가 알코올로 부틸렌글리콜 및 프로필렌글리콜, 펜틸렌글리콜 등을 이용할 수 있다. 그리고 혼합물로는 물 및 저급 알코올의 혼합물, 물 및 다가 알코올의 혼합물, 저급 알코올 및 다가 알코올의 혼합물, 또는 물 및 저급알코올 및 다가 알코올의 혼합물을 이용할 수 있다.
- [0033] 또한, 마늘 추출물은 환류냉각추출, 초음파 추출방법, 초임계 유체 추출방법 등을 이용하여 수득할 수 있다. 또한, 상술한 추출방법뿐만 아니라, 통상적인 정제 과정을 거친 추출물도 포함한다. 예컨대, 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외여과막을 이용한 분리, 다양한 크로마토그래피에 의한 분리 등, 추가적으로 실시된 다양한 정제 방법을 통해 얻어진 활성 분획도 추출물에 포함되는 것이다.
- [0034] 추출의 일 예로 마늘에 상술한 추출용매를 중량비로 2 내지 20배를 가하여 혼합한 후 10 내지 150℃에서 1 내지 24시간 동안 추출한 다음 여과하여 마늘 추출물을 얻을 수 있다.
- [0035] 이와 달리 추출의 다른 예로 마늘의 전처리과정을 거친 다음 추출하고, 추출 후 정제과정을 거칠 수 있다. 전처리과정과 정제과정을 통해 마늘에 함유된 유효성분을 함량을 증대시키기 위함이다.
- [0036] 통상적으로 마늘은 약 60%의 수분, 약 28%의 탄수화물(주로 프룩탄-과당의 중합체, fructan), 약 2.3%의 유기황 화합물, 약 2%의 단백질(주로 알리나아제, allinase), 약 1.2%의 유기아미노산(주로 아르기닌, arginine), 약 1.5%의 섬유소, 약 0.15%의 지방, 소량의 피친산(phytic acid, 약 0.08%), 소량의 사포닌(saponin, 약 0.07%) 및 시토스테롤(sitosterol, 약 0.0015%) 등이 함유되어 있고, 그 밖에 비타민 A, B1, B2, C 등의 비타민류와 칼슘, 칼륨, 구리, 아연, 게르마늄, 철, 마그네슘, 망간, 인, 황, 셀레늄 등의 무기물도 미량 함유되어 있다고 알려져 있다.
- [0037] 마늘은 타 식물에 비하여 상대적으로 유기 황화합물을 많이 함유하고 있으며, 이러한 유기 황화합물은 여러 가지 질병을 예방하거나 치료하는 효과가 있는데, 여기서, 유기 황화합물은 셀파이드류, 디셀파이드류, 트리셀파

이드류와 디틴(dithine)계 화합물이며, 알린(alliin), 메티오닌(methionine) 등을 포함한다. 특히, 알린은 알리이나제(alliinase)라는 효소에 의해 알리신(allicin)으로 변화하는데, 이 알리신은 마늘이 갖는 약효의 주된 성분이다.

- [0038] 따라서 본 발명에 적용될 수 있는 마늘 추출물의 추출방법은 알리신과 기타 황화합물의 함량을 증대시키고자 전처리과정, 추출과정, 정제과정을 거친다. 이러한 추출방법을 구체적으로 살펴본다.
- [0039] 전처리과정은 숙성과정 및 분쇄과정으로 이루어진다.
- [0040] 먼저, 생 마늘을 2 내지 6℃에서 3 내지 5주 동안 숙성시킨다. 생마늘을 2 내지 6℃의 저온에서 숙성시킴으로써 마늘 추출물 중의 황화합물의 함량을 증대시킬 수 있다.
- [0041] 다음으로, 숙성된 마늘을 분쇄한다. 마늘의 분쇄를 통해 알리신의 생성을 유도할 수 있다. 분쇄방법으로 마늘을 썰거나 다지는 등 파쇄 방법에는 제한이 없다. 마늘이 분쇄되면 알린이 알리나아제의 의해 알리신으로 변화가 촉진된다.
- [0042] 전처리과정을 완료한 후 분쇄된 마늘에 추출용매를 가한 후 압착하여 여과액을 얻는 추출과정을 수행한다. 추출용매는 상술한 바와 같다. 분쇄된 마늘에 추출용매를 중량비로 2 내지 20배를 가한 후 20 내지 30℃에서 1 내지 3시간 동안 정치시켜 추출한다.
- [0043] 알리신은 열에 약하여 높은 열을 가하게 되면 알리신이 파괴되므로 추출시 20 내지 30℃의 상온에서 수행하는 것이 바람직하다. 특히, 알리신은 매우 불안정하므로 생성된 알리신과 그 대사물질인 황화합물은 시간의 경과에 따라 빠르게 반응하여 갈변되는 등 그 성질이 변화하기 때문에, 상온에서 적절한 시간동안 정치시켜 추출할 필요가 있다. 따라서 정치시간은 1 내지 3시간이 적당하다. 반응시간이 길어지거나 반응온도가 높아질수록 알리나아제에 대한 저해효과로 인하여 황화합물의 양은 감소한다.
- [0044] 1 내지 3시간의 정치 후 압착한 다음 여과망을 이용하여 걸러내어 고형잔사물을 제거하여 여과액을 얻는다.
- [0045] 다음으로, 여과액 중의 황화합물의 함량을 증대시키기 위해 단백질과 폴리페놀 성분을 제거하는 정제과정을 수행한다. 정제과정은 아래와 같이 수행할 수 있다.
- [0046] 여과액에 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol)을 가하여 교반한 후 일정시간동안 방치하여 침전시킨다. 폴리에틸렌글리콜은 황화합물과 단백질의 결합을 파괴시킨다. 폴리에틸렌글리콜은 여과액 중에 1 내지 7% 농도(질량 백분율)가 되도록 여과액에 첨가된다. 여과액과 폴리에틸렌글리콜이 잘 섞이도록 교반한 후 20 내지 60분 동안 방치시킨 다음 침전물을 제거한다. 침전물을 제거하기 위해 다양한 고액분리방법을 이용할 수 있다. 가령, 여과나 원심분리 방법을 적용할 수 있다. 원심분리방법으로 8,000rpm의 회전속도로 약 30분간 실시할 수 있다.
- [0047] 고액분리를 통해 침전물과 분리된 상등액 중에 잔류하는 단백질과 폴리페놀 성분을 제거하기 위해 폴리비닐피롤리돈(polyvinyl pyrrolidone)을 가한다. 폴리비닐피롤리돈은 상등액에 1000 내지 3000ppm의 농도로 첨가될 수 있다. 폴리비닐피롤리돈으로 상업화된 제품(상품명: Polyclar)을 이용할 수 있다. 폴리비닐피롤리돈을 상등액에 가한 후 30분간 진탕한 후 0.1~10 μ m의 공극을 갖는 필터를 사용하여 여과하여 상등액 중에 단백질 및 폴리페놀과 결합된 폴리비닐피롤리돈을 제거하여 최종적으로 마늘 추출물을 수득할 수 있다.
- [0048] 이와 같이 마늘을 숙성시키고 분쇄하는 전처리과정, 분쇄된 마늘에 추출용매를 가해 추출하는 추출과정, 추출후 여과하여 얻은 여과액에 폴리에틸렌글리콜과 폴리비닐피롤리돈을 순차적으로 가해 정제하는 공정을 통해 수득한 마늘 추출물은 알리신 및 기타 황화합물의 함량을 크게 증대시킬 수 있다.
- [0049] 상술한 다양한 추출방법으로 얻은 마늘 추출물은 건조시켜 분말형태로 보관하는 것이 바람직하다. 알리신과 황화합물은 그 성분이 매우 불안정하기 때문에, 상온이나 액체상태에서는 그 순도를 유지하기 어려우므로 건조시킨 후 -2℃ ~ 4℃의 온도에서 보관하는 것이 바람직하다. 건조방법으로 동결건조(freeze drying, FD) 방식을 적용할 수 있다. 가령, 동결건조 방법으로 -50 내지 -40℃의 온도에서 10 내지 20시간 동안 급속동결시킨 다음, 0.1 내지 0.5torr의 진공도를 가진 동결건조기에서 1 내지 3일 동안 건조시킬 수 있다. 마늘 추출물을 동결건조시키는 경우 동결된 상태에서 승화에 의하여 수분이 제거되기 때문에 건조된 제품은 가벼운 다공성 구조를 가지며, 열을 가하지 않고 저온에서 처리되기 때문에 가용성 성분의 이동, 비효소적 갈변, 변성 등이 거의 일어나지 않는다.
- [0050] 상술한 마늘 추출물을 신장질환이 유발된 실험동물에 투여하여 혈중 요소 질소 함량, 혈중 크레아티닌 함량, 피사 세뇨관 세포 수 및 변성 사구체를 측정함으로써 신장질환에 유효한 효과가 있음을 확인하였다.

- [0051] 요소 질소는 생체 내에서 단백질이 대사된 최종 산물인 요소에 함유된 질소이며, 크레아티닌은 근육의 수축에 에너지를 공급한 후 생기는 단백질의 분해물인데, 최종적으로 신장에서 여과되어 소변으로 배출된다. 신장의 배출 기능이 저하되면 여과가 제대로 이루어지지 않아 혈액 중의 요소 질소 및 크레아티닌의 농도가 증가하게 된다. 따라서 혈중 요소 질소(blood urea nitrogen)와 혈중 크레아티닌(creatinine)은 신장병 모델에서 신장질환 치료제의 약효평가에 있어서 매우 중요한 지표 중 하나로 사용되고 있다(Arch Med Res. 2004 Nov-Dec;35(6):484-94).
- [0052] 또한 신장이 기능하는데 최소 단위는 네프론으로, 네프론은 사구체와 세뇨관으로 이루어져 있어 네프론의 수가 감소하면 신장의 기능이 저하되므로 신병증시 세뇨관 피사가 초래되며 이와 함께 사구체의 혈액 여과기능이 저하되고 이에 따라 사구체 변성이 초래됨으로써 네프론의 수가 감소하는 증상이 나타난다. 따라서 피사 세뇨관 세포 수 및 변성된 사구체 수의 변화도 신장질환에 있어 주요한 지표 중의 하나로도 사용되고 있다.
- [0053] 본 발명은 신장 질환의 주요지표인 혈중 요소 질소 함량 및 크레아티닌 함량의 변화, 변성 사구체 수 및 피사 세뇨관 세포 수를 측정하여 마늘 추출물이 신장 기능 개선효과가 현저함을 확인하였다.
- [0054] 그러므로 마늘 추출물을 유효성분으로 함유하는 본 발명은 여러 요인으로 인해 신장기능에 이상이 초래되어 발병된 신장질환을 예방하거나 치료할 수 있는 약학조성물 및 건강기능식품으로 유용하게 이용될 수 있다.
- [0055] 본 발명의 약학 조성물이 예방하거나 치료할 수 있는 신장질환으로 급성신염, 만성신염, 신증후군, 급성 신부전증, 만성 신부전증을 예로 들 수 있다.
- [0056] 이러한 신장질환은 당뇨병에 의해 유발되거나, 신독성에 의해 유발된 것일 수 있다.
- [0057] 본 발명의 신장질환 예방 및 치료용 약학 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 마늘 추출물을 10 내지 90중량% 함유할 수 있다. 바람직하게 70 내지 85중량%이다.
- [0058] 본 발명의 신장질환 예방 및 치료용 약학 조성물은 원하는 제제 형태에 따라 약학적으로 허용가능한 적절한 담체, 부형제 및 희석제 중에서 선택된 하나 이상을 더 함유할 수 있다.
- [0059] 제제 형태로 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁제, 유화제, 시럽제와 같은 경구제제 및 주사제, 흡입제, 좌제, 패취제와 같은 비경구제제 등으로 제형화될 수 있다.
- [0060] 경구투여용으로 제형화되는 경우, 예를 들어 결합제(예비 젤라틴화된 옥수수 전분, 폴리비닐피롤리돈, 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스 등), 충전제(락토스, 미세결정성 셀룰로오스, 인산 칼슘 등), 윤활제(마그네슘 스테아레이트, 활석, 실리카 등), 붕해제(감자 전분, 나트륨 전분 글리콜레이트 등), 습윤제(나트륨 라우릴 설페이트 등)와 같은 약제학적으로 허용되는 어느 하나 이상의 부형제를 포함하여 제조될 수 있다.
- [0061] 경구 투여용 고체 제제로 과립제, 산제, 정제, 캡슐제, 등의 형태이며, 정제 또는 캡슐제는 이 기술 분야에 알려진 방법에 의해 코팅될 수 있다. 경구 투여용 액체 제제는 예를 들어 용액, 시럽, 에멀전, 또는 현탁액 등의 형태를 취할 수 있고, 사용 전에 물 또는 다른 적절한 비히클과 함께 구성되기 위한 건식 생성물로서 존재할 수 있다.
- [0062] 이러한 액체 제제는, 임의로 약제학적으로 허용되는 첨가제, 예를 들어 현탁화제(예: 소르비톨 시럽, 메틸셀룰로오스, 하이드록시-프로필 메틸셀룰로오스, 수소화 식용성 지방 등); 유화제(예: 레시틴, 아라비아 검 등); 비수성 비히클(예: 알몬드 오일, 오일성 에스테르, 에틸 알콜 등); 방부제(예: 메틸 또는 프로필 p-하이드록시벤조에이트, 소르브산 등)를 추가적으로 포함할 수 있으며 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 또한, 약제학적으로 허용되는 감미료를 포함할 수 있으며, 감미료는 예를 들어 사카린, 소듐 사카린, 칼슘 사카린, 아스팔탐, 아세살팜 포타시움, 소듐 사이클라메이트, 알리탐, 디하이드로찰콘 감미료, 모넨린, 스테비오시드 또는 슈크랄로즈(4,1',6'-트리클로로-4,1',6'-트리데옥시갈락토슈크로즈), 임의의 벌크 감미료(예: 소르비톨, 만니톨, 프럭토스, 슈크로즈, 말토스, 이소몰트, 글루코즈, 수소화 글루코즈시럽, 크실리톨, 카라멜 또는 꿀 등) 등을 포함할 수 있다.
- [0063] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 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.
- [0064] 본 발명의 약학 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에

따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 가령, 1일 0.0001 내지 100mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 mg/kg으로 투여될 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다.

- [0065] 본 발명의 약학 조성물은 가축, 인간 등을 포함하는 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있으며, 경구, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁내, 경막 또는 뇌혈관내 주사 등에 의해 투여될 수 있다.
- [0066] 한편, 본 발명의 다른 실시 예로 상술한 마늘 추출물을 함유하여 신장기능 개선 효과를 갖는 건강기능식품 조성물을 제공한다. 본 발명의 건강기능식품 조성물은 마늘 추출물을 조성물 총 중량에 대하여 10 내지 90중량%로 함유할 수 있다.
- [0067] 식품 조성물은 사람이 먹고 마시는 것의 총칭으로서, 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 의미로서 식품, 식품 첨가제, 기능성 식품 및 음료를 모두 포함하는 것을 말한다.
- [0068] 본 발명에서 '건강기능식품 조성물'은 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체내조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다.
- [0069] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 신장기능을 개선하여 신장질환을 예방하거나 치료하는 용도로 사용될 수 있다.
- [0070] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 본원발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영, 유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 목류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 빵류, 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스낵류), 캔디류, 초코렛류, 껌류, 아이스크림류, 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과일 음료, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등), 천연조미료(예, 라면 스프 등)를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 식품, 음료 또는 식품첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.
- [0071] 나아가 본 발명의 건강기능식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있으며, 상기 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [0072] 또한, 본 발명의 건강기능식품 조성물에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.
- [0073] 건강기능식품 조성물은 다양한 형태로 제형이 가능하므로 그 형태는 특별히 제한되지 않는다. 바람직하게 건강기능식품 조성물은 과립, 정제, 파우더, 환, 캡슐 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 형성될 수 있다. 이러한 과립, 정제, 파우더, 환, 캡슐 제형을 갖는 건강기능식품 조성물은 휴대가 간편하고 언제 어디서나 수시로 섭취하기가 용이하다.
- [0074] 과립, 정제, 파우더, 환, 캡슐의 고체 제형은 마늘 추출물 0.01 내지 60중량%를 함유하고, 기타 점착제, 향미료, 비타민, 탄수화물 등을 추가로 함유할 수 있다.
- [0075] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시 예를 제시하나, 하기 실시 예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시 예에 한정되는 것은 아니다.
- [0076] <추출실험>
- [0077] 1. 마늘 추출물의 제조
- [0078] 생 마늘을 4℃에서 3~5주 동안 숙성시킨 다음 껍질을 벗기고 믹서기로 갈아 거칠게 분쇄하였다. 분쇄한 마늘에 농도 40%의 에탄올을 중량비로 10배를 가한 후 25℃에서 2시간 동안 정치시킨 다음 압착기로 압착한 후 여과하여 고형잔사물이 제거된 여과액을 수득하였다.
- [0079] 그리고 여과액에 폴리에틸렌글리콜(Macrogol 6000, sanyo chemical, 일본)을 일정한 농도(0%, 3%, 5%, 7%)가 되도록 첨가한 후 교반하여 40분 동안 방치시킨 다음 8,000rpm으로 30분간 원심분리하여 상등액을 얻었다.

[0080] 그리고 상등액에 폴리비닐피롤리돈(Polyclar, ISP, USA)을 2000ppm의 농도로 되도록 이용할 가한 후 30분간 진탕한 후 0.2 μ m의 공극을 갖는 필터로 여과하여 최종적으로 액상의 마늘 추출물을 제조하였다.

[0081] 제조한 마늘 추출물은 -40℃의 온도에서 급속동결시킨 다음 0.5torr의 조건에서 3일 동안 동결건조시킨 후 2℃에서 보관하여 시료로 이용하였다. 이하의 모든 실험에서 마늘 추출물은 동결건조시킨 시료를 이용하였다.

[0082] 2. 마늘 추출물의 황화합물 함량 분석

[0083] 숙성기간과 폴리에틸렌글리콜(PEG)의 농도를 달리하여 제조한 마늘 추출물의 황화합물 함량(ppm)을 분석하였다. 가스크로마토그래피-질량분석기(GC-MS)를 이용하여 마늘 추출물에 함유된 황화합물(아릴설파이드, 다이설파이드, 트리설파이드, 디틴)의 총 함량을 측정하였다.

[0084] 분석결과를 하기 표 1 및 도 1에 나타내었다. 도 1에서 가로축은 숙성기간이고, 세로축은 황화합물의 함량이다.

표 1

PEG 농도(%)	숙성기간		
	3주	4주	5주
0	862.92	715.67	777.27
3	814.17	957.62	811.82
5	602.82	741.66	631.70
7	521.19	751.57	641.73

[0086] 상기 표 1과 도 1의 결과를 참조하면, 폴리에틸렌글리콜을 첨가하지 않은 경우 숙성기간이 4주, 5주인 경우 오히려 3주보다 황화합물의 함량이 더 낮게 나타났다. 그리고 폴리에틸렌글리콜을 첨가한 경우 숙성기간이 3주때보다 4주때 크게 증가한 것으로 나타났다. 그리고 5주때는 4주때보다 황화합물의 함량이 낮아졌다.

[0087] 상기 실험결과를 통해 폴리에틸렌글리콜 농도 3 내지 7%, 숙성기간 3주 내지 5주가 적당한 것으로 확인되었고, 특히 바람직하게는 폴리에틸렌글리콜 농도 3%, 숙성기간 4주인 것으로 나타났다.

[0088] 숙성기간을 4주로 하고, 폴리에틸렌글리콜(PEG)의 농도를 달리해서 마늘 추출물을 제조하였다. 각 농도마다 8회 반복하여 8개의 마늘 추출물 시료를 준비하여 황화합물 총 함량(ppm)을 분석하였다.

표 2

PEG 농도(%)	1시료	2시료	3시료	4시료	5시료	6시료	7시료	8시료	평균	SD
0	685.49	1158.61	1005.06	639.75	647.72	750.77	821.77	525.48	775.58	210.43
3	1081.77	1119.56	1095.56	1024.2	813.22	533.21	766.89	502.68	867.08	251.77
5	939.01	938.46	802.27	819.72	587.12	403.36	466.25	369.51	665.71	237.24
7	1013.49	680.54	596.5	830.98	668.62	445.87	411.14	576.03	652.89	197.54

[0090] 상기 표 2를 참조하면, 폴리에틸렌글리콜 농도가 3%일 때가 황화합물의 함량이 가장 높은 것으로 나타났다. 평균값의 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2에서 가로축은 폴리에틸렌글리콜 농도이고, 세로축은 황화합물의 함량이다.

[0091] <1. 마늘 추출물의 혈당조절효과 실험>

[0092] (1)실험방법

[0093] 체중 약 180g±20% 이내의 6주령 수컷 SD rat(오리엔트바이오 공급)에 스트렙토조토신(Streptozotocin; STZ)을 주사하여(100mg/kg) 스트렙토조토신유도 당뇨모델을 생성하여 이를 그룹당 5마리씩 2개군으로 분류하였다. 즉, 당뇨를 유발시킨 후 마늘 추출물을 투여하지 않은 군(대조군), 당뇨를 유발시킨 후 마늘추출물을 100mg/kg씩 경구투여한 군(실험군)으로 분류하였다. 마늘추출물은 0.5%의 CMC에 현탁시킨 후 1일 1회, 매일 경구투여하였다.

[0094] 실험기간 동안 사료는 (주)카길에그리푸리나에서 생산하는 실험동물용 사료를 공급받아 급이기에 넣고 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 물은 정수된 물을 음수병에 넣고 자유롭게 섭취하도록 하였다.

[0095] 2주간 사육실험 후 혈액을 채취하여 clot activator가 들어 있는 vacutainer tube에 주입하고 약 15분간 실온에

방치하여 응고시킨 후 3,000rpm으로 10분간 원심분리하여 얻은 혈청으로 혈액생화학분석기(7020 Hitachi, Japan)를 이용하여 혈당을 측정하였다.

[0096] 본 실험 및 이하의 실험들에서 사용한 마늘 추출물은 숙성기간 4주, 폴리에틸렌글리콜 농도 3%를 사용하여 추출한 것이다.

[0097] (2) 실험결과

[0098] 대조군과 실험군의 혈당 측정결과를 하기 표 3 및 표 4에 나타내었다. 표 3은 대조군의 혈당 측정결과이다.

표 3

[0099]

구분	혈당(mg/dl)		
	실험전	실험 후	변화량(%)
마우스1	347	455	31.12
마우스2	305	461	51.15
마우스3	261	513	96.55
마우스4	417	473	13.43
마우스5	424	455	7.31
평균값	350.8	471.4	39.9
표준편차	70.56	24.39	35.67

[0100] 실험군의 혈당측정 결과를 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

[0101]

구분	혈당(mg/dl)		
	실험전	실험 후	변화량(%)
마우스1	367	(폐사)	-
마우스2	369	438	18.70
마우스3	343	334	-2.62
마우스4	313	495	58.15
마우스5	382	495	29.58
평균값	354.8	440.5	26.0
표준편차	27.28	75.91	25.29

[0102] 상기 표 3 및 표 4를 참조하면, 대조군의 경우 평균혈당이 350.8mg/dl에서 2주 후 471.4mg/dl로 증가하여 평균 39.9%의 증가율을 나타내었다. 그리고 실험군의 경우 평균혈당이 354.8mg/dl에서 2주 후 440.5mg/dl로 증가하여 평균 26%의 증가율을 나타내었다. 실험군의 경우 대조군에 비해 혈당의 증가율이 34.8%가 감소하였다. 이는 마늘 추출물이 혈당상승을 억제하여 혈당을 조절하는 효과가 있음을 나타낸다.

[0103] <2. 조직병리학적 검사>

[0104] 신장 세포의 변성 및 섬유화는 신장질환의 정도를 특정할 수 있는 지표(J Pathol. 2000 Mar;190(4):484-8)로서 신장조직을 직접 관찰하여 상기 현상들을 확인함으로써 마늘 추출물이 신장질환에 미칠 수 있는 영향을 조사하였다.

[0105] (1) 실험방법

[0106] 체중 약 180g±20% 이내의 6주령 수컷 SD rat(오리엔트바이오 공급)에 스트렙토조토신(STZ)을 주사하여 스트렙토조토신 당뇨모델을 생성하고 마늘추출물을 투여하지 않은 군(대조군)과 마늘추출물을 50mg/kg, 100mg/kg, 200mg/kg씩 경구투여한 군(실험군)으로 분류하였다. 이와 함께 당뇨를 유발시키지 않은 군(정상군)을 별도로 분류하였다. 마늘추출물은 0.5%의 CMC에 현탁시킨 후 1일 1회, 매일 경구투여하였다.

[0107] 2주간의 실험기간 동안 사료는 (주)카길애그리퓨리나에서 생산하는 실험동물용 사료를 공급받아 급이기에 넣고 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 물은 정수된 물을 음수병에 넣고 자유롭게 섭취하도록 하였다.

[0108] 실험 후 SD rat를 안락사시킨 후 신장을 적출하여 10% 중성완충포름알린 용액에 고정하고, 고정된 조직은 석정,

탈수, 파라핀 포매 및 Hematoxylin& Eosin 염색 등의 조직처리 과정을 거쳐 조직병리학적 검사를 위한 검체를 제작한 다음, 광학 현미경(Olympus BX53, Japan)으로 조직병리학적 변화를 관찰하였다.

- [0109] (2) 실험 결과
- [0110] 사구체 변성과 세뇨관 괴사에 의해 신병증이 진행되면 이 부위에 섬유화에 의한 실질 조직의 변화가 일어나고 이 결과 신부전이 초래된다. 따라서 신장의 섬유화는 신부전이 진행되고 있음을 의미하고 이 섬유화 역시 신부전을 판단하는 중요한 지표가 된다.
- [0111] 세뇨관 괴사(Tubular necrosis)는 하기와 같은 등급기준에 의해 점수를 측정하였다.
- [0112] grade 0 : normal
- [0113] grade 1: focal, mild vacuolization
- [0114] grade 2: multifocal, moderate vacuolization
- [0115] grade 3: severe vacuolization
- [0116] grade 4: extensive vacuolization
- [0117] 실험결과를 하기 표 5와 도 3 내지 7에 나타내었다. 도 3은 정상군, 도 4는 대조군, 도 5는 마늘추출물을 50mg/kg 투여한 실험군, 도 6은 마늘추출물을 100mg/kg 투여한 실험군, 도 7은 마늘추출물을 200mg/kg씩 투여한 실험군이다.

표 5

구분	tubular necrosis(mean±SD)	
정상군	0.00±0.00	
대조군	3.40±0.55	
실험군	마늘추출물 50mg/kg	2.20±0.45
	마늘추출물 100mg/kg	1.80±0.45
	마늘추출물 200mg/kg	2.00±0.71

[0119] 상기 실험결과를 참조하면, 대조군과 실험군 모두에서 정상군에 비하여 세뇨관 괴사가 발생하였으나 마늘추출물을 투여한 실험군에서는 대조군에 비하여 세뇨관괴사의 정도가 35~45% 감소하였다. 그리고 도 3 내지 도 7에 나타난 바와 같이 정상군에 비해 대조군과 실험군은 사구체의 변성에 의한 섬유화가 진행되었으나 실험군은 대조군에 비해 그 정도가 덜한 것으로 나타났다. 이는 마늘 추출물이 신장질환의 발생을 억제한다고 할 수 있다.

[0120] <3. 마늘추출물의 최종당화산물 생성억제 효능분석>

[0121] 마늘 추출물을 30 μ g/ml, 60 μ g/ml, 90 μ g/ml, 120 μ g/ml, 150 μ g/ml의 농도로 증류수에 용해한 후, 이를 소혈청알부민(BSA)과 당의 혼합액에 첨가하고 37 $^{\circ}$ C에서 4주간 배양하였다. 배양시작 후 1주일 간격으로 배양액에서 생성된 최종당화산물의 양을 spectrofluorometer(Excitation: 350nm, Emission: 450nm)로 측정하고 그 억제율을 하기 표 6에 나타내었다.

표 6

마늘추출물 농도	억제율(%)			
	1주 후	2주 후	3주 후	4주 후
30 μ g/ml	24.56	14.23	6.33	4.3
60 μ g/ml	29.24	17.11	10.09	7.31
90 μ g/ml	29.00	16.69	11.74	6.57
120 μ g/ml	33.33	15.51	13.27	6.59
150 μ g/ml	32.98	12.25	12.23	7.08

[0123] 상기 표 6을 참조하면, 마늘 추출물은 30 μ g/ml, 60 μ g/ml, 90 μ g/ml, 120 μ g/ml, 150 μ g/ml에서 각각 최종당화산물 생성억제 효과가 배양 1주 후 24.56%, 29.24%, 29.00%, 33.33% 32.98%로 나타났다. 그리고 시간이 지날수록 점차 감소하였다. 이는 마늘 추출물의 주성분인 알리신의 반감기가 짧고 열에 약한 성질을 갖고 있어 배양온도인

37℃에서 그 성질이 변하기 때문인 것으로 추정된다.

[0124] 마늘 추출물의 최종당화산물 생성억제 효과와 비교할 수 있는 지표로서 양성대조군으로서 피리독사민(pyridoxamine)을 사용하여 최종당화산물 생성억제를 실험하였다. 피리독사민은 당뇨합병증 발생억제 효과가 있으나 독성이 강하여 실험실에서만 사용되는 물질이다.

[0125] 실험방법은 마늘 추출물의 최종당화산물 생성억제 실험과 동일하게 하고, 증류수에 용해시킨 피리독사민의 농도는 70µg/ml, 100µg/ml, 150µg/ml, 200µg/ml로 하였다. 그 결과를 하기 표 7에 나타내었다.

표 7

피리독사민 농도	억제율(%)			
	1주 후	2주 후	3주 후	4주 후
70µg/ml	23.20	31.17	32.61	29.73
100µg/ml	31.23	40.68	40.91	38.13
150µg/ml	43.98	40.74	42.01	38.53
200µg/ml	58.24	61.97	58.93	60.34

[0127] 상기 표 7을 참조하면, 양성대조군인 피리독사민은 200µg/ml 농도에서 배양 후 2주에 61.97%의 최고 억제율을 나타내었으며 피리독사민의 양에 비례하여 억제율이 높았고 배양기간 4주 동안 비슷한 효과를 나타내었다.

[0128] <4. 아급성 신부전 유발 실험 동물군의 혈중 요소 질소 함량 변화 측정>

[0129] (1) 실험방법

[0130] 실험동물은 정상군, 사염화탄소(CCl₄)로 유발된 아급성 신부전 모델의 대조군, 사염화탄소(CCl₄)로 아급성 신부전을 유발하고 캡토프릴(captopril, CAPT) 100mg/kg을 투여한 양성 대조군, 사염화탄소(CCl₄)로 아급성 신부전을 유발하고 마늘 추출물을 50, 100, 200mg/kg 각각 투여한 3개의 실험군으로 분류하여 총 6개의 군으로 설정하고, 각군 당 5마리의 생후 6주령의 수컷 SD 랫트(오리엔트바이오 공급)를 사용하였다.

[0131] 실험군은 마늘추출물을 50, 100 및 200mg/kg으로 경구투여하였으며, 양성대조군은 CAPT 100mg/kg을 경구투여하였다. 마늘추출물과 캡토프릴은 0.5%의 CMC에 현탁시킨 후 1일 1회, 매일 경구투여하였다.

[0132] 6주간의 실험기간 동안 사료는 (주)카길애그리퓨리나에서 생산하는 실험동물용 사료를 공급받아 급이기에 넣고 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 물은 정수된 물을 음수병에 넣고 자유롭게 섭취하도록 하였다.

[0133] 실험 후 혈액을 채취하여 clot activator가 들어 있는 vacutainer tube에 주입하고 약 15분간 실온에 방치하여 응고시킨 후 3,000rpm으로 10분간 원심분리하여 얻은 혈청으로 혈액생화학분석기(7020 Hitachi, Japan)를 이용하여 혈중 요소 질소(BUN: Blood urea nitrogen) 함량을 측정하였다.

[0134] (2) 실험결과

[0135] 혈중 요소 질소(BUN: Blood urea nitrogen) 함량 변화 측정 결과를 하기 표 8에 나타내었다.

표 8

구분	혈중 요소 질소 함량(mg/dl)			
	CCl ₄ 투여 전	실험 후	증가율(%)	
정상군	17.35±1.88	18.86±2.03	8.7	
대조군	17.41±2.32	26.48±4.99	52.1	
양성대조군	18.2±0.72	20.60±2.19	13.2	
실험군	50mg/kg	17.37±2.59	22.12±1.91	27.3
	100mg/kg	18.36±1.36	21.14±2.13	15.1
	200mg/kg	16.58±1.53	22.47±0.95	35.5

[0137] 상기 표 8에서 알 수 있는 바와 같이, 사염화탄소 투여 후 모든 실험군에서 정상군에 비해 혈중 BUN의 증가가 나타났으며, 양성 대조군(captopril)군과 실험군에서 대조군에 비해 혈중 BUN이 낮게 나타났다. 이는 마늘 추출물이 BUN의 증가를 억제하는 효과를 나타내는 것이라 할 수 있다.

[0138] 도 8은 CCl₄ 투여 전과 42일간의 실험 후의 혈중 요소 질소함량 값을 그래프로 나타낸 것이다. 참고로 도 8에서 control은 정상군, CCl₄는 대조군, captopril은 양성대조군, G5는 마늘 추출물 50mg/kg을 투여한 실험군, G10은 마늘 추출물 100mg/kg을 투여한 실험군, G20은 마늘 추출물 200mg/kg을 투여한 실험군을 의미한다.

[0139] <5. 아급성 신부전 유발 실험 동물군의 혈중 크레아티닌 함량 변화 측정>

[0140] 본 실험은 혈중 크레아티닌 함량을 측정함으로써 마늘 추출물이 신장 질환에 미치는 영향을 알아보기 위한 것이다.

[0141] (1) 실험방법

[0142] 위의 아급성 신부전 유발 실험에서 채취한 혈액을 clot activator가 들어 있는 vacutainer tube에 주입하고 약 15분간 실온에 방치하여 응고시킨 후 3,000rpm으로 10분간 원심분리하여 얻은 혈청으로 혈액생화학분석기(7020 Hitachi, Japan)를 이용하여 혈중 크레아티닌 함량을 측정하였다.

[0143] (2) 실험 결과

[0144] 혈중 크레아티닌 함량 변화 측정 결과를 하기 표 9에 나타내었다.

표 9

구분	혈중 크레아티닌 함량(mg/dl)			
	CCl ₄ 투여 전	실험 후	증가율(%)	
정상군	0.42±0.047	0.42±0.04	0	
대조군	0.42±0.01	0.51±0.067	21.4	
양성대조군	0.41±0.03	0.42±0.012	2.4	
실험군	50mg/kg	0.45±0.045	0.43±0.068	-4.4
	100mg/kg	0.4±0.03	0.41±0.048	2.5
	200mg/kg	0.42±0.056	0.41±0.046	-2.4

[0146] 상기 표 9를 참조하면, 정상군에 비해 대조군에서 CCl₄ 투여 후 혈중 크레아티닌의 증가가 나타났으며, 양성 대조군과 실험군에서는 대조군에 비해 혈중 크레아티닌의 증가율이 현저히 감소되었다. 이는 마늘 추출물이 혈중 크레아티닌의 증가를 억제하는 효과가 있음을 나타내는 것으로서, 마늘 추출물의 신장보호효과를 보여주는 것이다.

[0147] 도 9는 CCl₄ 투여 전과 42일간의 실험 후의 혈중 크레아티닌 함량 값을 그래프로 나타낸 것이다. 참고로 도 9에서 control은 정상군, CCl₄는 대조군, captopril은 양성대조군, G5는 마늘 추출물 50mg/kg을 투여한 실험군, G10은 마늘 추출물 100mg/kg을 투여한 실험군, G20은 마늘 추출물 200mg/kg을 투여한 실험군을 의미한다.

[0148] <6. 아급성 신부전 유발 실험 동물군에서 신장변성부위 비율의 변화 관찰>

[0149] 위의 아급성 신부전 유발 실험에 사용한 실험동물을 안락사시킨 후 신장을 적출하여 10% 중성완충포르말린 용액에 고정하고, 고정된 조직은 삭정, 탈수, 파라핀 포매 및 Hematoxylin& Eosin 염색 등의 조직처리 과정을 거쳐 조직병리학적 검사를 위한 검체를 제작한 다음, 광학 현미경(Olympus BX53, Japan)으로 조직병리학적 변화를 관찰하였다.

[0150] 세뇨관 괴사(Tubular necrosis)는 하기와 같은 등급기준에 의해 점수를 측정하여 그 결과를 하기 표 10에 나타내었다.

[0151] grade 0 : normal

[0152] grade 1: focal, mild vacuolization

[0153] grade 2: multifocal, moderate vacuolization

[0154] grade 3: severe vacuolization

[0155] grade 4: extensive vacuolization

표 10

구분		tubular necrosis(mean±SD)
정상군		0.00±0.00
대조군		2.20±0.4
양성대조군		0.8±0.8
실험군	마늘추출물 50mg/kg	1.2±0.8
	마늘추출물 100mg/kg	1.4±0.5
	마늘추출물 200mg/kg	1.2±0.8

[0157] 상기 표 10 및 도 10 내지 도 15의 결과를 참조하면, 조직병리학적 검사상 대조군과 실험군에서 세뇨관의 확장 및 세뇨관 상피의 공포화가 관찰되었다. 세포공포화를 수치화한 결과 실험군은 대조군에 비하여 낮은 경향을 보였다.

[0158] 도 10은 정상군, 도 11은 대조군, 도 12는 양성대조군, 도 13은 마늘추출물을 50mg/kg 투여한 실험군, 도 14는 마늘추출물을 100mg/kg 투여한 실험군, 도 15는 마늘추출물을 200mg/kg씩 투여한 실험군이다.

[0159] <7. 급성신부전 유발 실험 동물군의 혈중 요소 질소 함량 변화 측정>

[0160] (1) 실험방법

[0161] 실험동물은 정상군, 시스플라틴(Cisplatin, CCDP)으로 유발된 급성 신부전 모델의 대조군, 시스플라틴으로 급성 신부전을 유발하고 캡토프릴(captopril, CAPT) 100mg/kg을 투여한 양성 대조군, 시스플라틴으로 급성 신부전을 유발하고 마늘 추출물을 50, 100, 200mg/kg 각각 투여한 3개의 실험군으로 분류하여 총 6개의 군으로 설정하고, 각군 당 5마리의 생후 6주령의 수컷 SD 랫트(오리엔트바이오 공급)를 사용하였다.

[0162] 시스플라틴 투여하기 28일 전부터 실험군은 매일 마늘추출물을 50, 100 및 200mg/kg을 시스플라틴 투여 5일 후 까지 경구투여하였으며, 양성대조군 역시 시스플라틴 투여하기 28일 전부터 매일 CAPT 100mg/kg을 시스플라틴 투여 5일 후까지 경구투여하였다.

[0163] 실험기간 동안 사료는 ㈜카길에그리푸리나에서 생산하는 실험동물용 사료를 공급받아 급이기에 넣고 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 물은 정수된 물을 음수병에 넣고 자유롭게 섭취하도록 하였다.

[0164] 실험 후 혈액을 채취하여 clot activator가 들어 있는 vacutainer tube에 주입하고 약 15분간 실온에 방치하여 응고시킨 후 3,000rpm으로 10분간 원심분리하여 얻은 혈청으로 혈액생화학분석기(7020 Hitachi, Japan)를 이용하여 혈중 요소 질소(BUN: Blood urea nitrogen) 함량을 측정하였다.

[0165] (2) 실험결과

[0166] 실험결과를 하기 표 11 및 도 16에 나타내었다.

표 11

구분		혈중 요소 질소 함량(mg/dl)			
		CCDP투여 28일 전	CCDP투여일	CCDP투여 5일후	증가율(%)
정상군		18.69±2.99	16.99±0.93	18.99±2.08	11.8
대조군		16.41±2.44	19.30±2.81	194.42±33.63	907.3
양성대조군		16.68±2.58	16.92±1.27	72.51±11.44	328.5
실험군	50mg/kg	19.62±1.88	17.16±1.71	77.83±25.81	353.6
	100mg/kg	16.44±2.13	18.12±3.06	66.31±28.86	266
	200mg/kg	16.23±1.56	17.66±0.87	77.64±28.76	339.6

[0168] 표 11 및 도 16을 참조하면, CCDP 투여 후 대조군은 정상군에 비해 혈중 요소질소(BUN) 함량의 유의한 증가가 나타났으며, 양성 대조군과 실험군은 정상군에 비해 BUN 함량의 증가가 나타났으나 대조군에 비해서는 BUN 함량의 증가가 억제되었다.

[0169] 이는 마늘 추출물이 신장의 급성손상으로 인한 BUN의 증가에 대해 억제효과가 있음을 나타내는 것으로 추출물의 신장손상에 대한 예방효과를 나타내는 것이라 할 수 있다.

[0170] 도 16은 CCDP 투여 28일 전, CCDP 투여일, CCDP 투여 5일 후의 혈중 요소 질소함량 값을 그래프로 나타낸 것이다. 참고로 도 16에서 control은 정상군, cisplatin은 대조군, captopril은 양성대조군, G5는 마늘 추출물 50mg/kg을 투여한 실험군, G10은 마늘 추출물 100mg/kg을 투여한 실험군, G20은 마늘 추출물 200mg/kg을 투여한 실험군을 의미한다.

[0171] <8. 급성신부전 유발 실험동물군의 혈중 크레아티닌 함량 변화 측정>

[0172] (1) 실험방법

[0173] 위의 급성 신부전 유발 실험에서 채취한 혈액을 clot activator가 들어 있는 vacutainer tube에 주입하고 약 15분간 실온에 방치하여 응고시킨 후 3,000rpm으로 10분간 원심분리하여 얻은 혈청으로 혈액생화학분석기(7020 Hitachi, Japan)를 이용하여 혈중 크레아티닌 함량을 측정하였다.

[0174] (2) 실험 결과

[0175] 혈중 크레아티닌 함량 변화 측정 결과를 하기 표 12 및 도 17에 나타내었다.

표 12

구분		혈중 크레아티닌 함량(mg/dl)			
		CCDP투여 28일 전	CCDP투여일	CCDP투여 5일후	증가율(%)
정상군		0.42±0.03	0.57±0.03	0.52±0.03	-8.8
대조군		0.43±0.03	0.56±0.05	6.98±1.19	1146.4
양성대조군		0.39±0.03	0.56±0.06	2.33±0.48	316.1
실험군	50mg/kg	0.42±0.04	0.57±0.05	2.20±0.65	286
	100mg/kg	0.43±0.04	0.56±0.05	2.03±0.92	262.5
	200mg/kg	0.40±0.02	0.59±0.02	2.59±0.76	339

[0177] 표 12 및 도 17을 참조하면, CCDP 투여 전까지는 혈중 크레아티닌 함량의 변화는 모든 군에서 정상군과 유사한 변화를 나타내었다. 그리고 CCDP 투여 후 양성 대조군과 실험군에서 대조군에 비해 혈중 크레아티닌 함량이 유의하게 감소되었다. 이는 마늘 추출물이 신장손상으로 나타나는 혈중크레아티닌의 증가를 억제시키는 효과가 있음을 나타내는 것으로 마늘 추출물의 신장손상에 대한 예방효과를 나타내는 것이다.

[0178] 도 17은 CCDP 투여 28일 전, CCDP 투여일, CCDP 투여 5일 후의 혈중 크레아티닌 함량 값을 그래프로 나타낸 것이다. 참고로 도 11에서 control은 정상군, cisplatin은 대조군, captopril은 양성대조군, G5는 마늘 추출물 50mg/kg을 투여한 실험군, G10은 마늘 추출물 100mg/kg을 투여한 실험군, G20은 마늘 추출물 200mg/kg을 투여한 실험군을 의미한다.

[0179] <9. 급성신부전 유발 실험동물군에서 신장변성부위 비율의 변화 관찰>

[0180] 급성신부전 유발 실험동물군의 조직 병리학적 검사를 통해 신장질환에 미치는 영향을 알아보았다.

[0181] 위의 급성신부전 유발 실험에 사용한 실험동물을 안락사시킨 후 신장을 적출하여 10% 중성완충포르말린 용액에 고정하고, 고정된 조직은 삭정, 탈수, 파라핀 포매 및 Hematoxylin& Eosin 염색 등의 조직처리 과정을 거쳐 조직병리학적 검사를 위한 검체를 제작한 다음, 광학 현미경(Olympus BX53, Japan)으로 조직병리학적 변화를 관찰하였다.

[0182] 세뇨관 괴사(Tubular necrosis)는 하기와 같은 등급기준에 의해 점수를 측정하여 그 결과를 하기 표 13에 나타내었다.

[0183] grade 0 : normal

[0184] grade 1: focal, mild vacuolization

[0185] grade 2: multifocal, moderate vacuolization

[0186] grade 3: severe vacuolization

[0187] grade 4: extensive vacuolization

표 13

구분		tubular necrosis(mean±SD)
정상군		0.00±0.00
대조군		3.4±0.5
양성대조군		2.2±0.4
실험군	마늘추출물 50mg/kg	1.8±0.4
	마늘추출물 100mg/kg	2.0±0.7
	마늘추출물 200mg/kg	2.0±0.7

[0188] 상기 표 13 및 도 18 내지 도 23의 실험결과를 참조하면, 세뇨관 상피 괴사 및 탈락을 포함한 국소 변성을 특징으로 하는 전형적인 CCDP 유발 급성신부전증 경우의 조직소견이 모든 CCDP 투여군에서 인정되었다. 특히, 대조군의 경우 심한 tubular dilatation, degeneration, acute necrosis 소견이 확인되었으며 기타 소견으로 사구체 위축, 세뇨관 주위 단핵구 위주의 염증세포 침윤이 확인되었다.

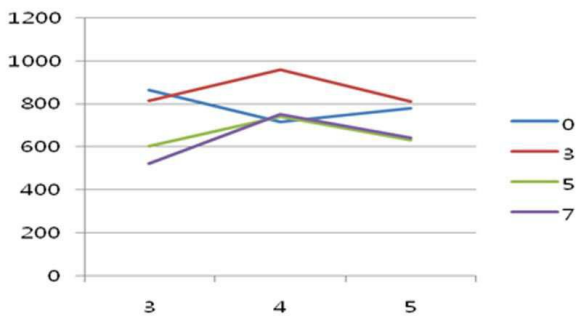
[0190] 그러나 조직병리학적 급성 신병증 소견은 실험군에서 감소되는 것으로 관찰되었으며 양성대조군과 유사한 수준으로 개선되는 경향을 보였다. 따라서, 마늘 추출물은 CCDP 유발 급성신부전을 위시한 신병증의 예방에 유효할 것으로 판단된다.

[0191] 도 18은 정상군, 도 19는 대조군, 도 20은 양성대조군, 도 21은 마늘추출물을 50mg/kg 투여한 실험군, 도 22는 마늘추출물을 100mg/kg 투여한 실험군, 도 23은 마늘추출물을 200mg/kg씩 투여한 실험군이다.

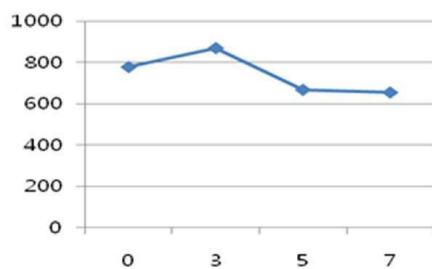
[0192] 이상, 본 발명은 일 실시 예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 실시 예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 보호 범위는 첨부된 등록청구범위에 의해서만 정해져야 할 것이다.

도면

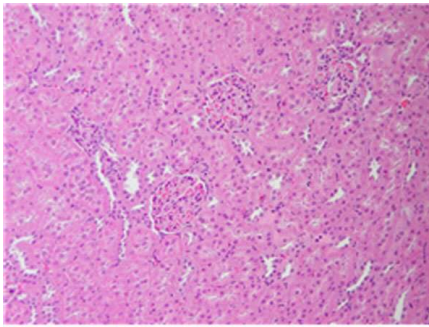
도면1



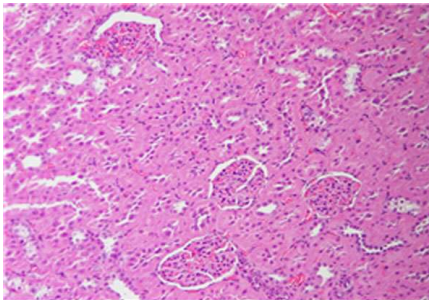
도면2



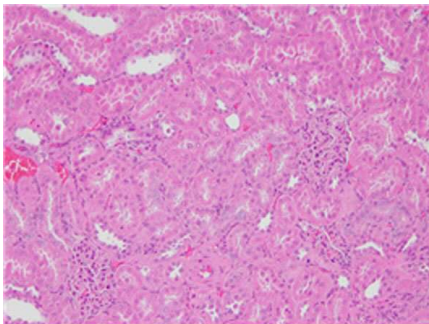
도면3



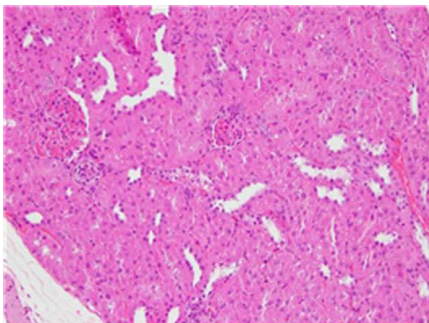
도면4



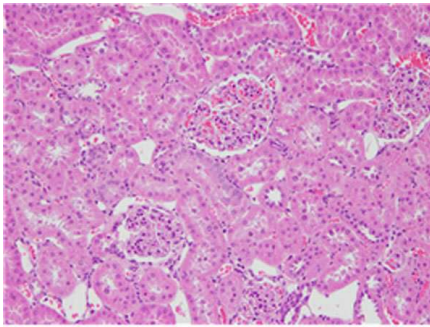
도면5



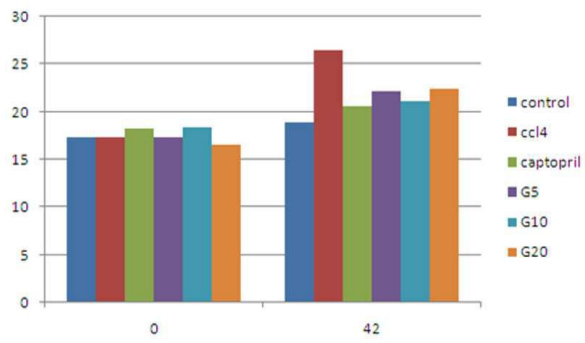
도면6



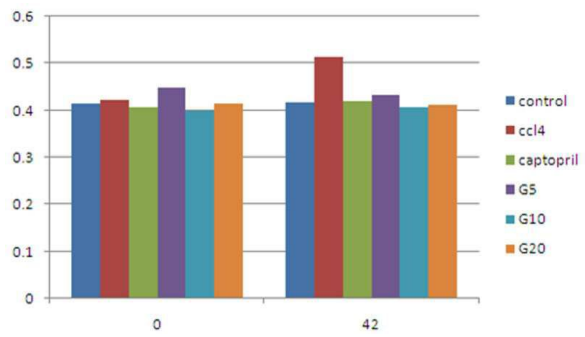
도면7



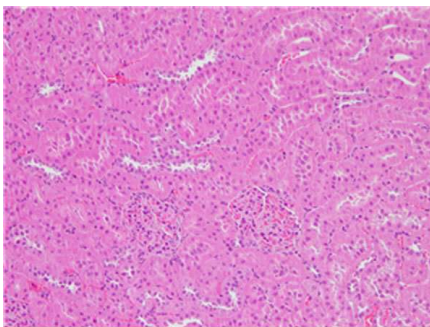
도면8



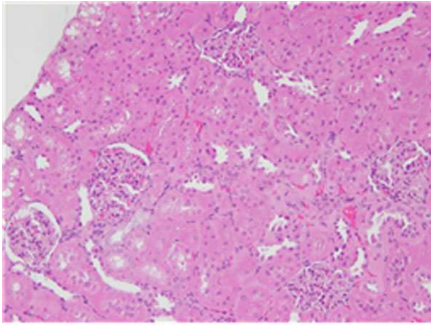
도면9



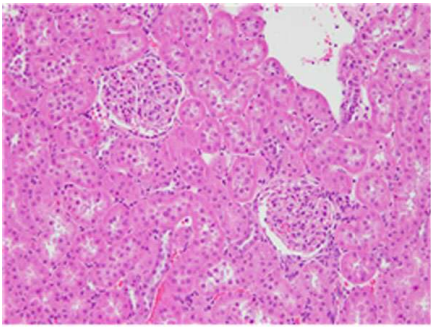
도면10



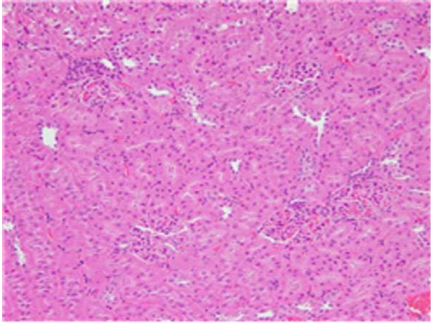
도면11



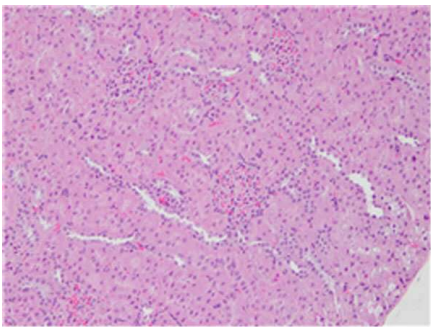
도면12



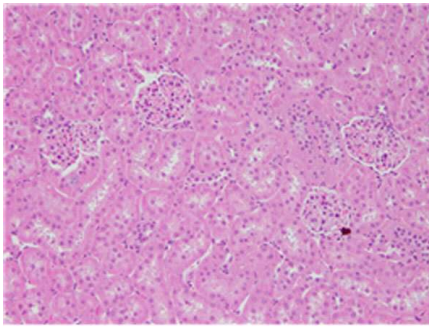
도면13



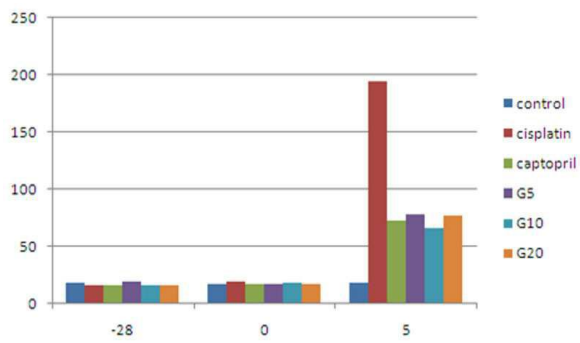
도면14



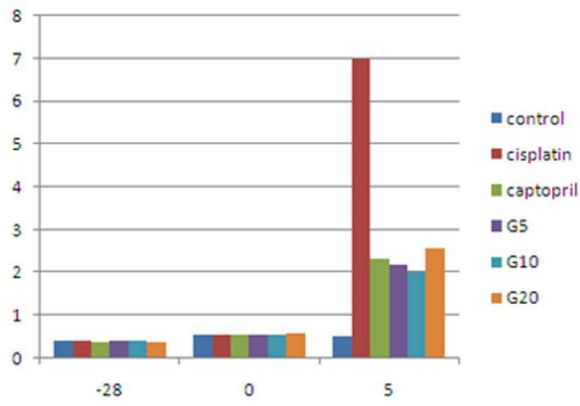
도면15



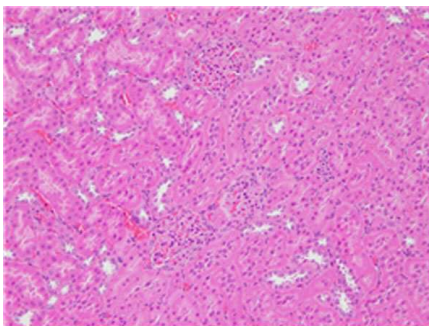
도면16



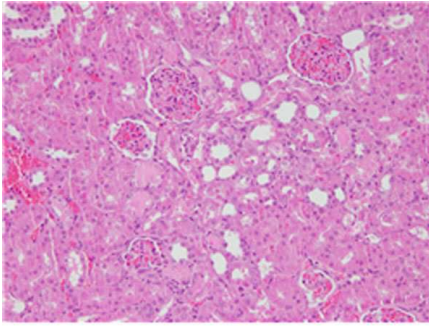
도면17



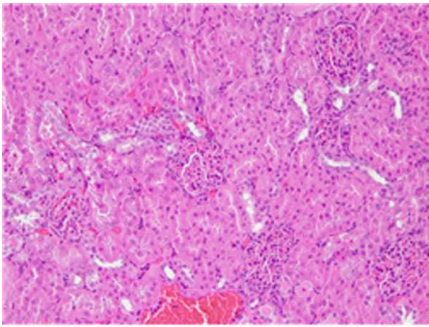
도면18



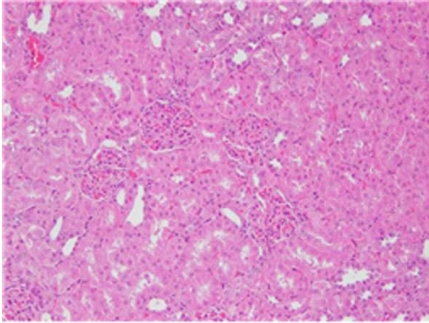
도면19



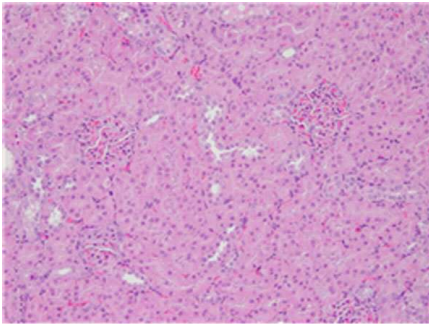
도면20



도면21



도면22



도면23

